

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（S）
研究期間：2004～2008
課題番号：16109010
研究課題名（和文）新しい情報伝達タンパク質研究から迫る咬合と脳機能の関連 -基礎歯科学からの先駆的信息発信-
研究課題名（英文）Studies on a novel signaling molecule, PRIP involved in GABA _A receptor function
研究代表者 平田 雅人 (Hirata Masato) 九州大学・大学院歯学研究院・教授 研究者番号 60136471

研究成果の概要：新しいタンパク質分子、PRIPを見いだした。この分子を持っていないマウス（変異マウス）を作製して多方面から解析した。脳の機能は興奮と抑制のバランスで保たれているが、変異マウスは抑制に関わる GABA_A 受容体の機能と細胞膜への輸送に異常が認められ、PRIPは GABA_A 受容体が適切な機能を発揮するためには必須の分子であることが分かった。一方、正しい咀嚼が出来ないようなマウスでは脳内の PRIP の量に変化は認められなかったが、GABA_A 受容体の機能と関連すると思われる情動に関する異常行動を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	30,900,000	9,270,000	40,170,000
2005年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2006年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2007年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2008年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
総計	87,300,000	26,190,000	113,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：GABA_A受容体、咬合、ノックアウトマウス、カルシウム、リン酸化、抗不安薬

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞内情報伝達に関わる新規のイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 [Ins(1, 4, 5)P₃] 結合性タンパク質を発見し、PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) と名付けたが、その細胞内機能は不明のままであった。機能を解明するために、相互作用する分子として GABARAP (GABA_A receptor associated protein) と PP1 (protein phosphatase-1) を同定するとともに、PRIP 分子を欠損したマウス（ノックアウトマウス、KO マウス）を作製していた。

一方、脳機能は興奮と抑制のバランスで保

たれているが、強く正しい咬合は脳機能の維持に重要であることは知られているが、科学的な実証は乏しい。

2. 研究の目的

(1) KO マウスを ① Ins(1, 4, 5)P₃ 結合と ② GABA_A 受容体との関連で多面的に解析することによって PRIP 機能の解明を目指した。

(2) 咬合不全マウスを作製し、行動解析を行うとともに脳内の PRIP 分子の増減や GABA_A 受容体の機能変化との関わりで解析し、強く正しい咬合が脳機能の維持に重要であることの科学的な実証を求めた。

3. 研究の方法

(1) 野生型ならびに KO マウス脳から調製した培養神経細胞を用いて、① カルシウムシグナルを調べるとともに $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 産生や PLC 活性等を生化学的な実験によって比較検討した。また、② GABA_A 受容体の β サブユニットのリン酸化程度と受容体活性との関連や、細胞膜上に発現した受容体量をリガンド結合実験によって定量化するとともに抗不安薬のターゲットである γ サブユニットの量的な相違について比較検討し、その分子基盤について細胞生物学的ならびに生化学的な実験を行った。

(2) 咬合を必要としない粉餌のみを与えたマウスを長期にわたって飼育した。対照マウスと比較しながら種々の行動解析を行った。その後、脳内の PRIP 分子の増減の比較や、 GABA_A 受容体関連の分子発現について検討した。

4. 研究成果

(1) ① PRIP のカルシウムシグナリングへの影響: KO マウスから調製した神経細胞では受容体刺激に伴う細胞内カルシウム上昇がやや抑制された。細胞内に蓄積した $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 量にも減少が認められたが、PLC 活性には相違はなかった。細胞の粗抽出液を用いて $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ ホスファターゼ活性を測定すると KO マウス由来の方が高活性を示し、その時に水溶性 PIP_2 を添加すると低活性化が認められた。これらの結果から、受容体刺激に応じて産生された $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ は非常に高いホスファターゼ (5Ptase) によって水解されるが、野生型では一部は PRIP にトラップされて水解を免れ、その結果として残存する $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ が高くなり適切な Ca^{2+} 放出を惹起するものと思われる。このように PRIP は適切なカルシウムシグナルには必要な分子と思われた。

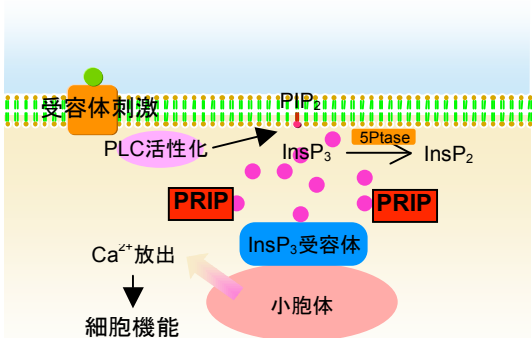


図1. 受容体刺激に伴う $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナリングにおける PRIP の役割 (詳細は本文)

② GABA_A 受容体との関連: KO マウスから調製した神経細胞ではホルスコリン刺激 (細胞内 cAMP 濃度が上昇) に伴う GABA_A 受容体の β

サブユニットのリン酸化レベルは低く、受容体活性 (GABA 刺激による内向きのクロライド電流) も低かった。野生型と比べて神経細胞の cAMP 依存性キナーゼ (PKA) 活性に相違はなく、脱リン酸化 (ホスファターゼ) 活性、なかでも PP1 活性が高かった。このことが受容体のリン酸化レベルが低い原因であると思われた。PRIP 分子が PP1 と結合する部位には 94 番目に位置するスレオニン (T) がある。PRIP に結合した PP1 に酵素活性は無いが、PKA によって T がリン酸化されると PP1 は PRIP から遊離して酵素活性を有するようになる。このように、PRIP は PP1 と結合・離合してその酵素活性を調節することによって GABA_A 受容体のリン酸化レベル、ひいては受容体活性に関わっていることが分かった。KO マウスにおける常時高い PP1 活性と低い受容体のリン酸化レベルという現象から研究を深化させ、PRIP による PP1 調節を解明した。

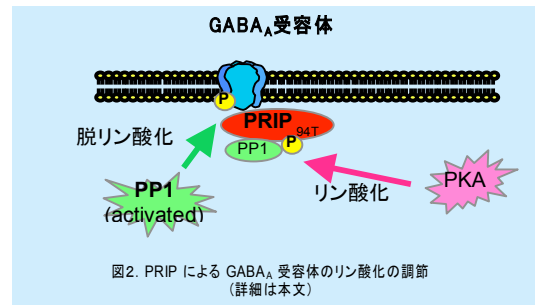
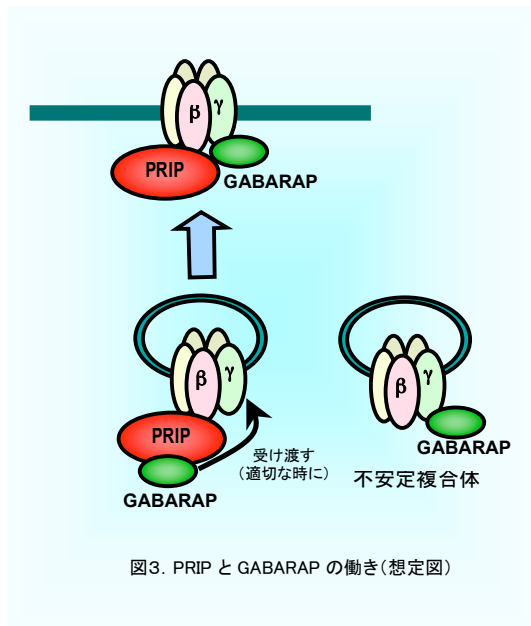


図2. PRIP による GABA_A 受容体のリン酸化の調節 (詳細は本文)

また、KO マウスでは高架式十字迷路試験によって、ベンゾジアゼピン系抗不安薬が効き難いことが分かった。この薬剤のターゲットは GABA_A 受容体の γ サブユニットである。GABARAP は γ サブユニットと結合して細胞膜上への受容体輸送を促進することが知られていること、その γ サブユニットとの結合サイトを PRIP は競合することなどを考え合わせると、予測される現象 (PRIP が無いことによって GABARAP が γ サブユニットと結合し易くなって、 γ サブユニットを含んだ受容体が多く発現される) とは逆であった。 γ パラドクスと称して、その機構の解明に取り組んだ。その過程で PRIP が受容体の β サブユニットと直接に会合することが分かり、野生型マウスの神経細胞において、この直接会合を阻害するペプチドを導入すると、KO 型の振る舞いをするようになることに気づいた。これらの実験結果から、図 3 に示す様に、GABARAP は β サブユニット/PRIP/GABARAP という三者複合体を作っているが、適切な時に適切な所で、GABARAP を γ サブユニットに受け渡し、それによって GABARAP が本来の働きを実行出来るという模式図である。あるいは PRIP が存在しないと GABARAP と γ サブユニット

との複合は不安定であるが、隣接する β サブユニットに PRIP が結合していると安定的な GABARAP/ γ サブユニット複合体を形成出来るのかもしれない。



他にも、GABA_A 受容体は常に細胞膜上から取り込まれているが（内包化）、この過程にも PRIP が関わり促進していることが明らかになっている。

(2) 咬合不全マウスの行動解析ほか：粉末食餌マウスでは、行動学的には、自発運動量が少なく、新奇物体に対する興味をあまり示さない傾向が強く認められた。また、高架式十字迷路試験で粉末餌給餌群マウスでは不安感が強い傾向が認められた。また、ベンゾジアゼピン系抗不安薬が効き難い傾向も認められた。

これらの結果と GABA_A 受容体の量的な関連を調べるために、GABA リガンドの結合実験（GABA_A 受容体量の推定）を行ったが、著明な相違は認められなかった。ところが粉末食餌群では $\beta 1$ 及び $\beta 3$ サブユニットの発現量に有意な増加を認めた。食餌の違いによる PRIP の発現量に差異を認めなかったが、KO マウスでは GABA_A 受容体サブユニットの発現量に食餌の種類による相違を認めなかった。

(3) KO マウスにおける GABA_A 受容体の電気生理学的検討：脳において、PRIP が GABA_A 受容体の生成・発現において果たす役割を明らかにするため、高次中枢ニューロンである大脳皮質錐体細胞及び末梢一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核細胞という異なるレベルの神経細胞に発現する GABA_A 受容体

について解析を行なった。パッチクランプ法により、大脳皮質パレル野錐体細胞から、GABA のパフ投与により引き起こされる GABA_A 受容体電流 ($I_{GABA(A)}$) を記録した。KO マウスでは $I_{GABA(A)}$ の脱感作が強化され、脱活性化が遅延した。また、DKO マウスでは、微小抑制性シナプス電流 (mIPSC) の減衰が促進され、誘発抑制性シナプス電流 (eIPSC) は逆に減衰が遅延した。これらは、それぞれ、 $I_{GABA(A)}$ の脱感作の促進および脱活性化の遅延と矛盾なく合致するものである。これらの所見から、KO マウスでは、GABA_A 受容体のキネテイクスに変化したか、或いは、シナプス外 GABA_A 受容体の発現が増加している可能性が示唆された。さらに、膜電位感受性色素を用いた実験では、KO マウスにおける興奮伝播は、より限局的で迅速な時空間パターンを示し、GABA_A 受容体の働きによる側方抑制が強化されている可能性が示唆された。これは、シナプス外 GABA_A 受容体の発現が増加している可能性を支持するものである。

一方、一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核細胞から記録された $I_{GABA(A)}$ は、野生型に比べて KO マウスでは、脱感作が弱く、脱活性化も促進されたこと、また、低濃度 GABA 溶液灌流投与の影響も小さいことから、シナプス外 GABA_A 受容体の発現が減少している可能性が示唆された。このように、KO による GABA_A 受容体発現に対する影響は、脳内のニューロンにより異なる可能性が強く示唆された。PRIP 分子が、 $\gamma 2$ サブユニットを含む GABA_A 受容体チャネル分子の膜への輸送、および、 β サブユニットを含む受容体分子のエンドサイトーシスの両方に関与することから、両方向性の制御は、それぞれのニューロンにおいてどちらか一方のメカニズムがより強く働いた結果であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 21 件) 全ての論文に査読あり。

- (1) Kanematsu, T., Fujii, M., Mizokami, A., Kittler, J.T., Nabekura, J., Moss, S.J. and Hirata, M.: Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABA_A receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex. *J. Neurochem.* **101**, 898-905, 2007.
- (2) Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A.J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M. and Nabekura, J.: Changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress results in functional downregulation. *J. Neurosci.* **27**, 1642-1650, 2007.

- (3) Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S.J., Yamamoto, T., Nabekura, J. and Hirata, M.: Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of $\gamma 2$ subunit-containing GABA_A receptor to cell surface. *J. Neurosci.* **27**, 1692-1701, 2007.
- (4) Kanematsu, T., Yasunaga, A., Mizoguchi, Y., Kuratani, A., Kittler, J.T., Jovanovic, J.N., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Moss, S.J., Nabekura, J. and Hirata, M.: Modulation of GABA_A receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition. *J. Biol. Chem.* **281**, 22180-22189, 2006.
- (5) Tanida, I., Wakabayashi, M., Kanematsu, T., Minemoto-Ikeguchi, N., Sou, Y.-S., Hirata, M., Ueno, T. and Kominami, E.: Lysosomal turnover of GABARAP- phospholipid conjugate is activated during differentiation of C2C12 cells to myotubes without inactivation of the mTor kinase-signaling pathway. *Autophagy*, **2**, 264-271, 2006.
- (6) Yanagihori, S., Terunuma, M., Koyano, K., Kanematsu, T., Ryu S.H. and Hirata, M.: Protein phosphatase regulation by PRIP, a PLC-related catalytically inactive protein -Implications in the phospho-modulation of the GABA_A receptor- *Adv. Enz. Regul.* **46**, 203-222, 2006.
- (7) Matsuda, M., Yamamoto, T. and Hirata, M.: Ca²⁺-dependent regulation of calcitonin gene expression by the transcriptional repressor DREAM. *Endocrinology* **147**, 4608-4617, 2006.
- (8) Murakami, A., Matsuda, M., Nakasima, A. and Hirata, M.: Characterization of the human PRIP-1 gene structure and transcriptional regulation. *Gene* **382**, 129-139, 2006.
- (9) Harada, K., Takeuchi, H., Oike, M., Matsuda, M., Kanematsu, T., Yagisawa, H., Nakayama, K.I., Maeda, K., Erneux, C. and Hirata, M.: Role of PRIP-1, a novel Ins(1,4,5)P₃ binding protein, in Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ signaling. *J. Cell. Physiol.* **202**, 422-433, 2005.
- (10) Kouno, T., Mizoguchi, M., Tanida, I., Ueno, T., Kanematsu, T., Mori, Y., Shinoda, H., Hirata, M., Kominami, E. and Kawano, K.: Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. *J. Biol. Chem.* **280**, 24610-24617, 2005.
- (11) Deng, L., Sugiura, R., Ohta, K., Tada, K., Suzuki, M., Hirata, M., Nakamura, S., Shuntoh, H. and Kuno, T.: Phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase regulates fission yeast cell integrity through a phospholipase C-mediated protein kinase C-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 27561-27568, 2005.
- (12) Goto, H., Terunuma, M., Kanematsu, T., Misumi, Y., Moss, S.J. and Hirata, M.: Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA_A receptor β subunits. *Mol. Cell. Neurosci.* **30**, 197-206, 2005.
- (13) Horne, G., Maechling, C., Fleig, A., Hirata, M., Penner, R., Spiess, B. and Potter, B.V.L.: D-6-Deoxy myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate, a mimic of D-myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate: biological activity and pH-dependent conformational properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1262-1270, 2004.
- (14) Terunuma, M., Jang, I.-S., Ha, S.H., Kittler, J.T., Kanematsu, T., Jovanovic, J.N., Nakayama, K.I., Akaike, N., Ryu, S.H., Moss, S.J. and Hirata, M.: GABA_A receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein. *J. Neurosci.* **24**, 7074-7084, 2004.
- (15) Yamaguchi, T., Kubota, T., Kanematsu, T., Nakayama K.I., Hirata, M. and Yamamoto, T.: Hypersensitivity to pentylenetetrazole-induced convulsion in mice lacking the PLC-related inactive protein-1. *Brain Res.* **1025**, 237-240, 2004.
- [学会発表] (計 9 1 件)
- (1) Kanematsu, T., Shioi, S., Kiyoshima, T., Sakai, H. and Hirata, M.: Action of PRIP, an Ins(1,4,5)P₃ binding protein, in insulin secretion. Keystone Symposium Islet Biology, Snowmass, Utah, April 1-6, 2008
- (2) Hirata, M., Kanematsu, T. and Mizokami, A.: Finding of a novel signaling molecule, PRIP and exploring its cellular functions -Involvement in neuroscience and beyond- The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, February 18-19, 2007, Sendai
- (3) Hirata, M. and Kanematsu, T.: Finding of a new Ins(1,4,5)P₃ binding protein, PRIP and exploring its cellular functions -Involvement in neuroscience and beyond- Howard Hughes Medical Institute Janelia Farm Conference, Janelia Farm, Nov 4-7, 2007.
- (4) Hirata, M., Kuratani, A. and Kanematsu, T.: Role of PRIP in trafficking of GABA_A receptors. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 19-21, 2006, Kyoto.
- (5) Hirata, M.: Finding new proteins and dissecting its functions. Lecture in Pohang University of Science and Technology, May 18, 2005
- (6) Hirata, M. and Kanematsu, T.: PRIP, a new Ins(1,4,5)P₃ binding protein, its extension to neuroscience and more. 62nd KSBMB Annual Meeting in 2005, Seoul, May 19-20, 2005

- (7) Hirata, M., Yanagihori, S., Terunuma, M. and Kanematsu, T.: Protein phosphatase regulation by PRIP, PLC-related catalytically inactive protein: Significance in functional modulation of GABA_A receptors. The 46th International Symposium on "Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues. Bologna, October 3-4, 2005.
- (8) Kanematsu, T. and Hirata, M.: Phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase signaling complex regulates BDNF-modulated GABA_A receptor phosphorylation and membrane trafficking. The 4th Neuroscience Workshop in Kyushu. Hisayama, December 9-10, 2005.
- (9) Hirata, M.: PRIP, a molecule involved in Ins(1,4,5)P₃/Ca²⁺ and GABA signaling. The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium "New Aspect of Phospholipid Biology 2004" May 10-12, Kamakura Prince Hotel, 2004
- (10) Hirata, M., Matsuda, M., Sandra, F. and Matsuki, N.: Apoptosis of tumor cells caused by IP6. The 7th International Conference on Anticancer Research, October 25-30, Corfu, Greece, 2004

[図書] (計4件)

- (1) Hirata, M., Kanematsu, T. and Mizokami, A.: Involvement of PRIP, a new signaling molecule, in neuroscience and beyond oral health science. In "Interface Oral Health Science 2007" (Watanabe, M. and Okuno, O.eds) pp129-137, Springer, Tokyo, 2007
- (2) 兼松 隆、藤井 誠、平田 雅人: フェアウエスタン法 分子間相互作用解析ハンドブック (磯辺俊明、中山敬一、伊藤隆司編) pp. 35-39 羊土社 2007
- (3) 平田 雅人、兼松 隆、照沼 美穂: GABA受容体機能に関わる新しい分子「ブレインサイエンス・レビュー2004」伊藤正男・川合述史編 pp83-94、クバプロ 東京 2004

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a04/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 雅人 (HIRATA MASATO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 60136471

(2) 研究分担者

兼松 隆 (KANEMATSU TAKASHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 10264053

竹内 弘 (TAKEUCHI HIROSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 70304813

松田 美穂 (MATSUDA MIHO)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 40291520

姜 英男 (KANG YOUNGNAM)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 50177755