

平成23年 4 月 22 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008~2010

課題番号： 20500301

研究課題名(和文)

イノシトール3リン酸受容体が高次脳機能に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of IP₃ receptor in higher brain function

研究代表者

久恒 智博 (HISATSUNE CHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・研究員

研究者番号： 10321803

研究成果の概要(和文)：

イノシトール3リン酸受容体(IP₃R)は、小胞体からのカルシウム放出を制御し細胞内カルシウム動態に多大な影響を及ぼす重要なイオンチャネルの一つである。現在までに、IP₃R1、2、3の3つのサブタイプが報告されており、このうち IP₃R1 は、特に脳神経系に強く発現していることが知られている。本研究では、脳特異的 IP₃R1 欠損マウスを作製し、各脳領域(小脳、前脳、線条体)の IP₃R1 が高次脳機能に果たす役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Inositol trisphosphate receptor (IP₃R) is one of the important Ca²⁺ channels that release Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum (ER). There are three subtypes of IP₃R so far, and IP₃R1 is a major subtype in the central nervous systems. In this study, we constructed several brain-specific IP₃R1 conditional IP₃R1 mice and analyzed the role of IP₃R1 in the higher brain function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード: calcium, IP₃R, brain, dystonia, conditional knockout mice

1. 研究開始当初の背景

脳神経系における細胞内カルシウム動態の異常は、神経細胞死、てんかん、行動異常などをきたすことが知られており、細胞内カルシウム動態の適切な制御が高次脳機能の発揮に必須である。イノシトール3リン酸受容体(IP₃R)は、

小胞体からのカルシウム放出を制御し細胞内カルシウム動態に多大な影響を及ぼす重要なイオンチャネルの一つであり、3つのサブタイプのうち IP₃R1 は、特に脳神経系に強く発現していることが知られている。これまでに、IP₃R1 を欠損するマウス(IP₃R1KO)

が、運動失調、てんかん様発作、神経可塑性の異常など脳機能障害を起こすことを明らかにしていたが、各脳領域に発現する IP₃R1 とこれらの脳疾患とのより詳細な関係は、未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、小脳特異的、線条体神経特異的、及び前脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスを作成し、脳の各領域に発現する IP₃R1 を介したカルシウムシグナルと IP3R1K0 マウスに生じた各表現型（てんかん様発作、運動失調、生後 21 日までの死亡など）の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

loxP IP₃R1 allele をもったマウスを、様々な脳特異的 Cre トランスジェニックマウスと交配し、脳領域特異的 IP₃R1K0 マウスを作成した。

Cre トランスジェニックマウスは、プルキンエ細胞特異的に Cre recombinase を発現しているマウス (pcp-2/L7-Cre) (Barski, J. J et al. Genetics 28:93-98.)、及び、小脳特異的な Wnt-1-Cre トランスジェニックマウス (Danielian P. S., et al., Current Biol. 8:1323-1326)、前脳特異的に Cre を発現する Emx1-Cre (Iwasato T., et al. (2000) Nature 406, 726-731)、線条体神経特異的な Cre トランスジェニックマウスの 4 系統を用いた。このうち、線条体神経特異的 Cre トランスジェニックは orphan レセプター、GPR88 遺伝子のプロモーターの下流に Cre 遺伝子を配置した BAC clone をマウス受精卵にインジェクションして作製した。

次に作製した各種コンディショナル IP₃R1 マウスの脳凍結切片を作製し、抗体を用いて IP₃R1 の発現を免疫染色法にて明らかにした。また、各組織をホモジナイズし、ウエスタンブロット法を用いて IP₃R1 の発現をチェックし、組織特異的に IP₃R1 が欠損していることを確認した。

行動バッテリー解析は、理化学研究所の行動施設を利用し、マウスにとって負担の最も軽いもの（自発活動性の実験など）からはじめ、徐々に負担のかかる行動実験（学習など）を進めて行った。

プルキンエ細胞の自然発火活動の電気生理的測定は、急性小脳スライスを用いた *in vitro* の実験と、*in vivo* 麻酔および *freely moving* の条件下でタングステン電極を用いて行った。

4. 研究成果

小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウス

は、IP₃R1K0 マウスと全く同様の表現型を生じ、ジストニア症状を起こすことを明らかにした。そこで、小脳中脳における神経活動異常を神経活動のマーカーとなる *cfos* の発現で調べた結果、プルキンエ細胞に *cfos* の異常発現を認め、プルキンエ細胞の異常発火がジストニアをおこしていることが考えられた。

プルキンエ細胞には、顆粒細胞からの入力（平行線維）と、オリブ核からの入力（登上線維）がある。そこで、小脳プルキンエ細胞の活動を、まず、登上線維からの入力切断されている小脳急性スライスを用いて行った所、野生型に比べて顕著な違いは見当たらなかった。このことから、小脳顆粒細胞や抑制性ニューロンからの入力は、ほぼ正常であると考えた。

次に、登上線維からの入力が存在する *in vivo* でのプルキンエ細胞の活動を麻酔下で行った。その結果、小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスのプルキンエ細胞の発火頻度は野生型に比べて、有意に減少していることを明らかにした。また、小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスでは、プルキンエ細胞の律動性が野生型に比べて下がっている傾向が見られた。以前の研究で、登上線維からの入力、プルキンエ細胞の発火頻度や律動性を下げることが知られていることから、小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスでは、登上線維からの入力異常があることが考えられた。

さらにジストニア発症とプルキンエ細胞の神経活動の関係を明らかにするため、次に、無麻酔下でプルキンエ細胞の神経活動を測定し、行動との相関を明らかにすることにした。プルキンエ細胞の神経活動を生体内記録した結果、ジストニア発症とプルキンエ細胞の異常活動（発火頻度の低下）が相関することを明らかにした。発火頻度が低下したプルキンエ細胞の神経活動は、ハルマリンを腹腔内投与した際に起こる登上線維の入力パターンに似ていた事から、おそらく、オリブ核からのプルキンエ細胞への入力異常が小脳中脳特異的 IP₃R1 欠損マウスにジストニアを起こしている事が推定された。

次に、小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスにおいて小脳活動がジストニアを起こす原因になっているか確かめる為、小脳活動をグルタミンサン受容体阻害剤で抑えることにした。その結果、グルタミンサン受容体阻害剤を小脳に Infusion することにより、小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスのジストニア症状が緩和されることを明らかにした。小脳の不活化は、野生型マウスの小脳にグルタミン酸受容体の阻害剤を注入し阻害すると小脳失調を呈することで判断した。

次に、プルキンエ細胞の活動がジストニア発症に関わっているかさらに確認するため、遺伝学的にプルキンエ細胞を消失する Lurcher ミュータントマウスとの交配をおこなうことにより、小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスのプルキンエ細胞を欠失させることにした。

その結果、小脳中脳特異的 IP₃R1 欠損マウスのジストニア症状が完全に消失し、小脳失調のみ示すマウスになることを明らかにした。

以上の結果、小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスは、小脳を起点とするジストニアモデルとなることがわかった。おそらく、IP₃R1 を介したカルシウムシグナルが inferior olive の活性（同調）に関与していると思われる。

小脳中脳特異的に IP₃R1 を欠損したマウスの脳においてモノアミン(ドーパミン、ノルアドレナリンなど)の量に著しい変化が生じる事を明らかにした。

一方、プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損マウスは重篤な小脳失調と振戦のみを起こす事を明らかにした。このことから、小脳中脳特異的 IP₃R1 欠損マウスに生じたジストニア症状は、プルキンエ細胞以外の細胞の IP₃R1 が欠損することによることが示唆される。特に、プルキンエ細胞の発火頻度がオリブ核からの入力で変わることが知られている事や、前述のジストニアを起こしている際の神経活動の波形から、登上線維からの入力に異常があることが考えられた。

さらに、プルキンエ細胞の樹状突起スパインの異常増加がこのマウスにみられることを明らかにした。また、このマウスのプルキンエ細胞に発現するカルモジュリン依存性リン酸化酵素の活性が異常上昇していることを明らかにした。このスパインの増加は、カルモジュリン依存性リン酸化酵素の活性を薬剤で阻害することにより正常に戻ったことから、IP₃R1 の欠損がカルモジュリン依存性リン酸化酵素の活性上昇を招き、樹状突起スパインの増加をもたらしたことが予想された。

前脳特異的 IP₃R1 欠損マウスは、IP₃R1 欠損マウスでみられるような明らかな運動障害は全く見られなかった。また、前脳特異的 IP₃R1 欠損マウスの脳波は正常であり、IP₃R1KO マウスは、てんかんを起こしているのでは無く、ジストニア症状を起こしていることが明確になった。そこで、この前脳特異的 IP₃R1 欠損マウスの行動バッテリー（自発活動活性、オープンフィールド試験、明暗従来試験、高架十字迷路試験、聴覚性驚愕反応試験、恐怖条件付け試験、モリス水迷路、協調運動（フットプリント、回転棒テスト）を行った。その結果、ホームケージでの活動量の増加がみられることが分かった。しかし、オープンフィールド試験や高架十字迷路試験、明暗従来試験におけるマウスの活動量には変化がなかった為、新しい環境下では、その自発活動性の上昇が抑えられていることがわかった。さらに、前脳特異的 IP₃R1 欠損マウスは、恐怖に対する反応が下がっている事(高架十字迷路試験、明暗従来試験)、また、統合失調症の目安とされる、聴覚性驚愕反応試

験 (Prepulse inhibition) の低下などを示すことが明らかになった。

線条体特異的に発現する orphan receptor, GPR88 遺伝子のプロモーターの下流に Cre recombinase を配置したトランスジェニックマウスを作製し、このマウスに於いて Cre を発現する細胞種を詳細に明らかにした所、medium spiny neuron 特異的に Cre を発現することが分かった。

また、この GRP88-Cre トランスジェニックマウスを用いて、線条体特異的 IP₃R1 コンディショナルマウスを作製し、線条体特異的に IP₃R1 を欠失していることを免疫染色法、ウエスタンブロット法を用いて明らかにした。この線条体特異的 IP₃R1 欠損マウスも、見かけ上明らかな運動障害は認められなかった。

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 7 件)

1: Higo T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T, Mikoshiba K. Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP₃ receptor.

Neuron. 2010 Dec 9;68(5):865-78. 査読あり

2: Mizutani A, Kawaai K, Hisatsune C, Ando H, Michikawa T, Mikoshiba K. Isolation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associating proteins and selective knockdown using RNA interference.

Methods Mol Biol. 2010;645:133-41. 査読無し

3: Zhang S, Hisatsune C, Matsu-Ura T, Mikoshiba K. G-protein-coupled receptor kinase-interacting proteins inhibit apoptosis by inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated Ca²⁺ signal regulation.

J Biol Chem. 2009 Oct 16;284(42):29158-69. 査読あり

4: Kawaai K, Hisatsune C, Kuroda Y, Mizutani A, Tashiro T, Mikoshiba K. 80K-H interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors and regulates IP₃-induced calcium release activity.

J Biol Chem. 2009 284:372-80. 査読あり

5: Mikoshiba K, Hisatsune C, Futatsugi A, Mizutani A, Nakamura T, Miyachi K. The role of Ca²⁺ signaling in cell function with special reference to exocrine secretion.

Cornea. 2008 Sep;27 Suppl 1:S3-8. Review. 査読無し

6: Kuroda Y, Hisatsune C, Nakamura T, Matsuo K, Mikoshiba K. Osteoblasts induce Ca²⁺ oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 24;105(25):8643-8. 査読あり

7: Zhou H, Nakamura T, Matsumoto N, Hisatsune C, Mizutani A, Iesaki T, Daida H, Mikoshiba K. Predominant role of type 1 IP₃ receptor in aortic vascular muscle contraction.

Biochem Biophys Res Commun. 2008 Apr 25;369(1):213-9. 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

Chihiro Hisatsune and Katsuhiko Mikoshiba
Handbook of Neurochemistry and Molecular
Neurobiology

Chapter25: Signal molecules and Calcium: IP₃
receptor and Ca²⁺ signaling

2009: 565-580.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久恒 智博 (HISATSUNE CHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究
チーム・研究員

10321803

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者