

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590332

研究課題名(和文)IRBITによるアストロサイト内のpH-カルシウムシグナル連動調節機構解明

研究課題名(英文)Clarifying the role of IRBIT in the coupling regulation of intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> in astrocytes.

研究代表者

水谷 顕洋(MIZUTANI, Akihiro)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30242861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々がその存在を予想していたIRBITを介した細胞内HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度(細胞内pH)と細胞内Ca<sup>2+</sup>動態との連関した調節機構が、生体内、特に中枢神経系シナプス周囲を被覆するグリア細胞の突起部分で働いている可能性が示唆された。IP<sub>3</sub>受容体に高親和性に結合するHP-IRBITのリン酸化を担う酵素とそのリン酸化部位は同定できたが、IP<sub>3</sub>受容体に高親和性を示す真のHP-IRBITには、未だ同定されていない修飾反応の存在が示唆された。今後は、IRBITのグリア細胞における細胞内pHと細胞内Ca<sup>2+</sup>の連関的制御機構が、シナプス伝達、及び脳機能にどのような役割を果たしているかを、明らかにして行きたい。

研究成果の概要(英文)：IRBIT was in vitro phosphorylated by PKA on Ser62, Ser64, and Ser66, and the phosphorylations might be involved in the high affinity of high-phosphorylated IRBIT for IP<sub>3</sub>R. Indeed, IRBIT phosphorylated on Ser68, Ser71, Ser74 and Ser77 as well as on Ser62, Ser64, and Ser66 showed high-phosphorylated pattern revealed on Phos-Tag SDS-PAGE analysis. However, this densely phosphorylated IRBIT did not show high binding affinity to IP<sub>3</sub>R suggesting that additional phosphorylations on other sites or unidentified modifications are necessary for getting high affinity to IP<sub>3</sub>R.

In SLC4A4 deficient mice, an expression level of IRBIT protein was drastically reduced, and IRBIT in a soluble fraction was increased. Moreover, IRBIT was massively phosphorylated showing high affinity for IP<sub>3</sub>R. These results suggested that IRBIT was indeed phosphorylated in an NBCe1 activity dependent manner and could couple the intracellular pH homeostasis and Ca<sup>2+</sup> dynamics.

研究分野：神経生化学

キーワード：IRBIT multiple phosphorylation IP<sub>3</sub>R NBCe1

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内の pH 環境が、細胞内で生じる様々な生化学的反応、分子間相互作用に多大な影響を及ぼすことは言うまでもない。近年、こうした細胞内 pH 環境調節に関わる分子群が同定され、その細胞内局在から、細胞内の各コンパートメント内や細胞膜直下では、pH が決して均一ではなく、極めてダイナミックに変動・調節されていることが明らかになってきた。

我々が発見した IRBIT は、IP<sub>3</sub> 受容体、Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> co-transporter (NBCe1)等に結合し、これらの活性を調節するが、いずれも IRBIT の多重リン酸化を要する。興味深いことに、IP<sub>3</sub> 受容体、NBCe1 との結合性は、IRBIT の多重リン酸化パターンの違い (low-, intermediate-, and high-phosphorylated) によって識別されている可能性、即ち、IP<sub>3</sub> 受容体に高親和性を示す IRBIT は、high-phosphorylated form (HP-IRBIT) であるのに対して、NBCe1 に親和性が高いのは、intermediate- and high-phosphorylated form (IP-IRBIT and HP-IRBIT) であることが示されていた。また、HP-IRBIT は、細胞外液の pH と HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度とをいずれも上昇させた時に誘導されることも見いだしていた。

こうした状況から、IRBIT、IP<sub>3</sub> 受容体 NBCe1 いずれも豊富に発現している中枢神経グリア細胞、特に、シナプス周囲を被覆している領域では、これら 3 者がシナプス伝達に応じた IRBIT の多重リン酸化を介して連動して機能しているのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

IRBIT は、我々が発見した多機能リン酸化蛋白質で、IP<sub>3</sub> 受容体に結合することで細胞内カルシウムシグナルを負に調節し、NBCe1 を活性化することで細胞内の pH 上昇に加担する。最近、我々は細胞内/外の pH 変動に伴って IRBIT のリン酸化状態が変化すると共に、このリン酸化が IP<sub>3</sub> 受容体への結合親和性を決定することを見出した。これは、IRBIT が細胞内の pH 変動を自身のリン酸化状態変化として感知すると同時に、これを介して細胞内カルシウムシグナルを調節し得ることを示唆する。本研究の目的は、細胞内 pH 環境と細胞内カルシウムシグナルの IRBIT を介した連動した調節機構の存在とその分子基盤を明らかにすることである。

また、IRBIT のリン酸化を介した標的分子の連動的な調節には、IRBIT の N-末領域に存在する Ser/Thr rich region (STRR) における多重リン酸化の詳細なリン酸化部位決定と、それを担うリン酸化酵素/脱リン酸化酵素の同定が重要であり、これについても明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究は、IRBIT の STRR における多重リン酸化が細胞内 pH 環境変化を反映するもの

であり、このリン酸化を介して IP<sub>3</sub> 受容体の活性を制御することで、細胞内 pH 環境と細胞内カルシウムシグナルとの機能的連動調節に関与していることを示す。そこで、まず、IP<sub>3</sub> 受容体結合活性が高い HP-IRBIT に焦点を絞り、その細胞内 pH 上昇との関係性、リン酸化部位、産生にかかわるリン酸化酵素の同定、IP<sub>3</sub> 受容体の阻害活性等の解析を行い、HP-IRBIT に対するプローブの作成を行い、生理的実験の基礎を構築する。こうして得られた情報やプローブを利用して、マウス (WT とノックアウトマウス) から調製したマウス初代培養アストロサイトでの細胞内 pH/カルシウムの同時イメージングにより、HP-IRBIT を介した pH 上昇 (NBCe1)-IP<sub>3</sub> 受容体の機能的連動性を検証する。また、HP-IRBIT の脳内分布を解析し、IRBIT を介した細胞内 pH-細胞内カルシウムシグナル連動調節系の生理機能に迫る。

まず、HP-IRBIT の特性解析を中心に研究する。研究目的で示した様に、Phos-tag SDS-PAGE を用いると、IRBIT はそのリン酸化程度によって、hyper, moderate, low の 3 種類のリン酸化パターンに分離できる。細胞内 pH を上昇させる長時間の高浸透圧刺激や細胞外液 pH の上昇に伴って出現するのは、hyper リン酸化 IRBIT で、これが IP<sub>3</sub> 受容体と高親和性を示すことから、この hyper リン酸化 IRBIT が NBCe1-IP<sub>3</sub> 受容体の機能的連動調節に関与する可能性が最も高い。

次に、得られた情報をもとに、マウス初代培養アストロサイトでの細胞内 pH 調節と細胞内カルシウムシグナルとの IRBIT を介した機能的連動調節機構の検証を行う。初代培養アストロサイトを用いるのは、high K<sup>+</sup>処理にて、NBCe1C を介した pH 変化 (特に上昇) を観察できることと、ATP 等の刺激にて IP<sub>3</sub> 受容体タイプ 2 (IP3R2) を介したカルシウムシグナルを観察できること、そして、それぞれ NBCe1C、IP3R2 が、アストロサイトでは独壇場的に機能し、かつそれらのノックアウトマウス調達を確保出来ているからである。

### 4. 研究成果

(1) HP-IRBIT について:

リン酸化部位とリン酸化酵素の同定  
HP-IRBIT に関与するリン酸化は、in vitro リン酸化反応において、PKD/CK1 による Ser68, Ser71, Ser74, Ser77P のリン酸化に、更に PKA を加えることで達成されることを、Phos-tag PAGE による分析で明らかにした。STRR 内の各 Ser 残基を Ala に置換した変異 IRBIT を大腸菌に発現し、in vitro での PKA を用いたリン酸化実験により、PKA の IRBIT リン酸化部位は、Ser62, Ser64, Ser66 であることを明らかにした。

HP-IRBIT in vivo: Ser62, Ser64, Ser66 がリン酸化された HP-IRBIT が、in vivo で

も存在することを明らかにするために、リン酸化ペプチドを合成・抗原にして、抗リン酸化 IRBIT 抗体 (pSer6, pSer64, pSer66) を作製した。抗体の妥当性は、IRBIT と PKA の触媒部位を培養細胞に共発現させた細胞抽出液を用いて確認した。このリン酸化特異的抗体を用いて、マウス小脳の抽出液を Western blotting にて解析したところ、確かに、Ser62, 64, 66 がリン酸化された IRBIT が in vivo でも存在することを明らかにした。

Bia-Core による結合活性解析: 大腸菌に発現した GST と IP3R の IRBIT 結合領域との融合蛋白質 (GST-IP3R/IRBIT-BR) GST と NBCe1 の IRBIT 結合領域との融合蛋白質 (GST-NBCe1/IRBIT-BR) そして IRBIT を用いた結合実験では、IRBIT を PKD/CK1 でのみリン酸化したもの (IP-IRBIT) と、PKD/CK1 と PKA によってリン酸化したもの (HP-IRBIT) とで、GST-IP3R-BR に対する親和性を Bia-Core によって解析したところ、予想に反して、HP-IRBIT と IP-IRBIT との間で差が認められなかった。これまで、高浸透圧に曝した培養細胞から調製した抽出液中の IRBIT を用いて親和性を解析していたことを鑑みると、PKD/CK1、PKA 以外のリン酸化、あるいは、別の何らかの修飾反応が IRBIT に生じていて、それが IP3 受容体との親和性を高めている可能性が示唆された。

(2) IRBIT の CK2 によるリン酸化 :

IRBIT の CK2 による in vitro リン酸化 : IRBIT は、CK2 によってもリン酸化されること、そして、そのリン酸化部位が Ser80, Thr82, Ser84, Ser85 であることを、大腸菌から精製した IRBIT を用いた in vitro リン酸化実験から明らかにした。

CK2 リン酸化による標的分子との結合に及ぼす影響 : この CK2 によるリン酸化は、IRBIT と NBCe1 との結合に必須である。即ち、IRBIT が PKD/CK1 でリン酸化されるだけでは、NBCe1 と結合できないし、CK2 でリン酸化されるだけでも結合できず、PKD/CK1、CK2、両方のキナーゼでリン酸化されて初めて、NBCe1 と結合できるようになった。これは、IP3R との結合には、PKD/CK1 によるリン酸化のみで IRBIT が結合できるようになると対照的である。

生体内でも CK2 によるリン酸化が IRBIT の NBCe1 活性化に重要であることが、IRBIT 欠損マウスと CK2 阻害剤を用いたグリア細胞初代培養の細胞内 pH 測定実験から明らかになった。

(3) NBCe1 活性が IRBIT のリン酸化に及ぼす影響について :

SLC4A4 遺伝子欠損マウスにおける IRBIT の組織分布 : NBCe1 をコードしている SLC4A4 遺伝子を欠損しているマウスにおいて、IRBIT の中枢神経系における発現と局在

を検討したところ、このマウスでは、IRBIT 蛋白質の発現量が低下し、可溶性画分に多く回収された。この変化は、免疫組織学的解析にでも確認された。更に、興味深いことに、この欠損マウスでは、IRBIT のリン酸化が亢進し、IP3 受容体に高親和性を示す HP-IRBIT フォームが増加していた。こうした所見は、生体内でも NBCe1 の活性、つまりは細胞内の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度に応じて、IRBIT のリン酸化状態が調節されていること、そしてこのリン酸化によって、IP3R 受容体の活性を調節し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態を制御している可能性を示唆している。

【総括】SLC4A4 欠損マウスを解析することで、我々がその存在を予想していた、IRBIT を介した細胞内 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度 (細胞内 pH) と細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態との関連した調節機構が、生体内、特に中枢神経系シナプス周囲を被覆するグリア細胞の突起部分で働いている可能性が示唆された。IP3 受容体に高親和性に結合する HP-IRBIT のリン酸化を担う酵素とそのリン酸化部位は同定できたが、これだけでは、IP3 受容体に高親和性を示す真の HP-IRBIT そのものにはなっていない。今後は、未だ同定されていない IRBIT の修飾反応も明らかにしつつ、IRBIT のグリア細胞における細胞内 pH と細胞内 Ca<sup>2+</sup>の連関的制御機構が、シナプス伝達、及び脳機能にどういう役割を果たしているかを、明らかにしていきたい。

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 3 件)

IRBIT regulates CaMKIIa activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation.

Kawaai K, Mizutani A, Shoji H, Ogawa N, Ebisui E, Kuroda Y, Wakana S, Miyakawa T, Hisatsune C, Mikoshiba K.

Proc Natl Acad Sci U S A. 112(17):5515-20, 2015 doi: 10.1073/pnas.1503310112 査読有

IRBIT mediates synergy between Ca<sup>2+</sup> and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice.

Park S, Shcheynikov N, Hong JH, Zheng C, Suh SH, Kawaai K, Ando H, Mizutani A, Abe T, Kiyonari H, Seki G, Yule D,

Mikoshiba K, Muallem S.

Gastroenterology. 145(1):232-41, 2013 doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.047 査読有

Cot kinase promotes  $\text{Ca}^{2+}$   
oscillation/calcineurin-independent  
osteoclastogenesis by stabilizing NFATc1  
protein.

Kuroda Y, Hisatsune C, Mizutani A, Ogawa  
N, Matsuo K, Mikoshiba K.  
Mol Cell Biol. 32(14):2954-63, 2012 doi:  
10.1128/MCB.05611-11 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

2P-254 IRBIT の pNBC1 への結合と活性化  
には、IRBIT の casein kinase II によるリン  
酸化が必須である。

水谷顕洋、山田秀臣、山崎脩、関常司、御子  
柴克彦

第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月  
15 日 福岡(マリンメッセ福岡)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

水谷 顕洋 (MIZUTANI, Akihiro)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30242861

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

関 常司 (SEKI, Jouji)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30206619

河合 克宏 (KAWAAI, Katsuhiko)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究  
センター・研究員

研究者番号：00553653