

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430040

研究課題名(和文) 小脳プルキンエ細胞におけるリアノジン受容体を介した樹状突起形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells mediated by ryanodine receptors

研究代表者

田中 正彦(Tanaka, Masahiko)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60267953

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)：小脳のプルキンエ細胞におけるリアノジン受容体を介した樹状突起形成制御機構を明らかにするために、単一細胞エレクトロポレーションを用いたsiRNA導入やカルシウムイメージングなどの手法を用いた解析を進めた。プルキンエ細胞で発現するリアノジン受容体1型が樹状突起形成に重要な役割を果たし、その下流でCaM kinase IIa, IIb, IVが共通する基質をリン酸化することによって樹状突起形成を促進することが示された。一方で、顆粒細胞で発現するリアノジン受容体2型も脳由来神経栄養因子(BDNF)の分泌促進を通してプルキンエ細胞の樹状突起形成を促進することが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated mechanisms of dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells mediated by ryanodine receptors (RyRs). Using single-cell electroporation of siRNA and calcium imaging, we revealed that RyR type 1 expressed by Purkinje cells promotes dendritic differentiation of Purkinje cells through phosphorylation of the common substrates of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) IIa, IIb and IV. On the other hand, RyR type 2 expressed by granule cells was also found to promote dendritic differentiation of Purkinje cells through secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) from granule cells.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：リアノジン受容体 カルシウム プルキンエ細胞 樹状突起 小脳 siRNA 単一細胞エレクトロポレーション CaM kinase

1. 研究開始当初の背景

小脳のプルキンエ細胞は、脳内で最も複雑な樹状突起を形成する大型の神経細胞である。その樹状突起は生後の小脳発生過程で著しく伸長・分枝して発達し、膨大な数の顆粒細胞からの入力を受けて小脳神経回路の主要部分を構成し、小脳機能の基盤となる。プルキンエ細胞樹状突起の形成メカニズムについては、これまでに様々な研究が行われてきている (Tanaka, *Neurochem. Res.*, 2009)。特に、顆粒細胞との相互作用が重要であり (e.g., Baptista et al., 1994)、顆粒細胞から分泌されるグルタミン酸などの因子によって、複雑な形態の樹状突起が形成されることが明らかにされている (e.g., Hirai & Launey, 2000; Tanaka et al., *J. Neurosci.*, 2003; Tanaka et al., *Neuroscience*, 2006)。グルタミン酸受容体の下流では、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II (Tanaka et al., *Neuroscience*, 2006; Ohkawa et al., 2007) や IV (Ribar et al., 2000) が働くと考えられている。そのため、グルタミン酸受容体と CaMK をつなぐシグナルである細胞内カルシウム濃度の調節が、プルキンエ細胞の樹状突起形成において非常に重要である。

細胞内カルシウム濃度は、細胞外からのカルシウム流入や細胞内でのカルシウム放出によって上昇する。カルシウム流入を起こす種々の電位依存性カルシウムチャネルのノックアウトマウスが作られているが、それらのマウスにおけるプルキンエ細胞樹状突起の異常は報告されていない。一方、細胞内カルシウム放出チャネルの一種である IP₃ 受容体 (1型) のノックアウトマウスでは、プルキンエ細胞の樹状突起が形態異常を起こす (Hisatsune et al., 2006)。しかしこの異常は、プルキンエ細胞ではなく顆粒細胞で発現する IP₃ 受容体の欠損によるものであると考えられている。もう一種の細胞内カルシウム放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR) は、小脳ではプルキンエ細胞で 1 型 (RyR1) が強く、2 型 (RyR2) が弱く発現しているとともに、顆粒細胞で RyR2 が発現している。3 型 (RyR3) の発現は両細胞において非常に弱い。RyR1 と RyR2 のノックアウトマウスは出生直後または胎生期に死亡してしまうため、プルキンエ細胞の樹状突起形成への影響を調べることができない (Takeshima et al., 1994, 1998)。RyR3 のノックアウトマウスでは重篤な異常は現れず、プルキンエ細胞樹状突起の異常も報告されていない (Takeshima et al., 1996)。

2. 研究の目的

そこで申請者は、培養プルキンエ細胞における遺伝子発現抑制によって、RyR の樹状突起形成における役割を調べ始めた。その際には、申請者が近年開発した、単一細胞エレクトロポレーションによる siRNA 導入法

(Tanaka et al., *J. Neurosci. Meth.*, 2009; 田中, *バイオイメージング*, 2010; Miyata et al., *J. Neurosci.*, 2011; Tanaka, *Neuromethods*, 2012) を利用した。この手法は、siRNA を入れたガラス微小電極を単一細胞の表面に当ててエレクトロポレーションを行い、その細胞だけに siRNA を導入する方法である。複数種の細胞が存在する環境において特定の細胞だけに物質を導入できるというメリットがあるとともに、トランスフェクションが難しいことで知られるプルキンエ細胞においても siRNA 導入を確実に行うことができる。この手法による遺伝子発現抑制効果は、postmitotic な神経細胞であれば 2 週間以上持続することを確認している (Tanaka et al., *Neurochem. Res.*, 2011)。この手法を用いることによって、プルキンエ細胞の樹状突起形成 (特に分枝) においてプルキンエ細胞で発現する RyR1 が重要な役割を果たすことを明らかにした。それに加えて、顆粒細胞で発現する RyR2 もプルキンエ細胞の樹状突起形成 (特に分枝) を促進することがわかった。これらの研究成果を踏まえて、本研究では、RyR を介したプルキンエ細胞における樹状突起形成制御機構をさらに詳細に明らかにした。

具体的には、小脳細胞培養系において以下のような実験を行った。

(1) プルキンエ細胞で発現する RyR1 と RyR2 の関与：プルキンエ細胞で強く発現する RyR1 と弱く発現する RyR2 の関与の程度を比較検討した。

(2) RyR の下流シグナルの探索：カルシウム依存的に活性化する蛋白質リン酸化・脱リン酸化酵素やそれらの調節因子に着目した探索を行った。

(3) 顆粒細胞で発現する RyR2 の関与：顆粒細胞から RyR2 依存的に分泌されて、プルキンエ細胞の樹状突起形成を促進する因子を探索した。

(4) プルキンエ細胞で発現する IP₃ 受容体の関与：もう一種類の細胞内カルシウム放出チャネルである IP₃ 受容体については、ノックアウトマウスを用いた研究から、顆粒細胞で発現する IP₃ 受容体 (1型) はプルキンエ細胞の樹状突起形成に関与するが、プルキンエ細胞自身で発現する IP₃ 受容体 (1型) は関与しないと考えられている (Hisatsune et al., 2006)。しかし、プルキンエ細胞における IP₃ 受容体の欠損がリアノジン受容体によって補償される可能性もあるため、IP₃ 受容体と RyR を同時に発現抑制することで、IP₃ 受容体の寄与があるかどうかを検討した。

(5) プルキンエ細胞で発現するカルシウム透過性 AMPA 型受容体の影響：RyR と IP₃ 受

容体以外のカルシウムチャネルとしてカルシウム透過性 AMPA 型受容体の影響について検討を行った。AMPA 型受容体の4つのサブユニットのうち GluR2 を含む受容体はカルシウム透過性をもたない。成熟したプルキンエ細胞は GluR2 を発現するが、この発現を抑制することが樹状突起形成にどのような影響を及ぼすかを検討した。

(6) 単一細胞エレクトロポレーションを用いた遺伝子強制発現系の確立：単一細胞エレクトロポレーションによってプルキンエ細胞に発現プラスミドを導入して遺伝子の強制発現を行う実験系の構築を行った。

3. 研究の方法

(1) プルキンエ細胞に対する単一細胞エレクトロポレーションを用いた siRNA 導入

小脳細胞培養系 (Tanaka et al., Neuroscience, 2006) 中のプルキンエ細胞に対して、樹状突起形成に参与すると予想される遺伝子の siRNA を単一細胞エレクトロポレーション (Tanaka et al., J. Neurosci. Meth., 2009; 田中, パイオイメージング, 2010; Miyata et al., J. Neurosci., 2011; Tanaka, Neuromethods, 2012) を用いて導入した。siRNA と蛍光色素を入れたガラス微小電極を、パッチクランプの要領で狙った細胞に当てて加電し、siRNA と蛍光色素を細胞内に導入する。単一遺伝子の発現抑制だけでなく、関連して働くことが予想される複数の遺伝子を同時に発現抑制する実験も行った。10日間培養した後に固定し、染色して、標的遺伝子及びプルキンエ細胞マーカー (calbindin または IP₃ 受容体) に対する免疫染色を行って、標的遺伝子の発現抑制を確認した上でプルキンエ細胞樹状突起の形態を調べた。

(2) カルシウムイメージング

lumox dish (Greiner) に培養した小脳細胞培養系にカルシウム指示薬 fluo-3AM を負荷し、ケージドグルタミン酸 (*N*-(α -carboxy-2-nitrobenzyl)-L-glutamate; Molecular Probes) を加えた。共焦点レーザー走査顕微鏡でイメージングしながら UV レーザーを照射してグルタミン酸を生じさせることで刺激を行い、細胞内カルシウム濃度上昇を測定した。

(3) 顆粒細胞に対するトランスフェクション試薬を用いた siRNA 導入

小脳細胞培養系中の顆粒細胞に対して、トランスフェクション試薬 (INTERFERin, Polyplus transfection) を用いて siRNA を導入した。

(4) 培地中の BDNF 濃度の測定

小脳顆粒細胞培養系の培地中に分泌された BDNF の濃度を、ELISA (Promega) によ

って測定した。

(5) プルキンエ細胞に対する単一細胞エレクトロポレーションを用いた発現プラスミド導入

小脳細胞培養系中のプルキンエ細胞に対して、単一細胞エレクトロポレーションを用いて緑色蛍光蛋白質 (GFP) の発現プラスミドを導入し、GFP の発現を調べた。電極作成に用いるガラス管の内径、プラスミドの濃度や形状、印加電圧を変化させて、遺伝子強制発現に最適な実験条件を検討した。

4. 研究成果

(1) プルキンエ細胞で発現する RyR1 と RyR2 の関与

培養プルキンエ細胞に対して単一細胞エレクトロポレーションを用いて RyR1 及び RyR2 の siRNA を導入し、樹状突起形成への影響を調べた。RyR1 の siRNA 導入によって樹状突起形成が抑制されたのに対して、RyR2 の siRNA 導入による影響は見られなかった。RyR1 と RyR2 の siRNA を同時に導入しても、RyR1 siRNA 単独導入の効果が強めることはなかった。これらの効果は、別の配列の siRNA によっても再現されることを確認した。プルキンエ細胞における RyR の発現量は RyR1 が強く、RyR2 が弱いことを考えると、プルキンエ細胞の樹状突起形成には RyR1 が大きな役割を果たしているのに対して、RyR2 の役割は小さいと考えられた。また、RyR 抑制条件下において、グルタミン酸刺激に対するプルキンエ細胞内カルシウム濃度上昇が抑制されることも確認した。

(2) RyR の下流シグナルの探索

RyR の下流で活性化し樹状突起形成に影響を与えることが予想されるシグナル分子としてカルシウム依存的に活性化する蛋白質リン酸化・脱リン酸化酵素及びそれらの調節因子に着目し、培養プルキンエ細胞に対して単一細胞エレクトロポレーションを用いてそれらの siRNA を導入して、樹状突起形成への影響を調べた。

CaMK I β , II α , II β , IV の各 siRNA 及びそれらの組み合わせを導入したところ、単独の siRNA 導入による影響は現れなかったが、CaMK II α , II β , IV の siRNA を同時に導入すると樹状突起の分枝が抑制された。これより、RyR の下流で CaMK II α , II β , IV が働いて樹状突起形成を促進する可能性があること、その際には CaMK II α , II β , IV に共通する基質のリン酸化が重要な役割を果たすことが示唆された。

そこで、CaMK II α , II β , IV に共通する基質を探索し、微小管結合蛋白質 MAP2 がこれに該当することを明らかにした。

また、protein phosphatase-1 (PP-1) や protein kinase C (PKC) によって活性化される CPI-17 と、protein kinase A (PKA) に

よって活性化され calcineurin によって不活性化される DARPP-32 にも着目した。CPI-17 と DARPP-32 は PP-1 を抑制し、PP-1 は CaMKII を抑制するので、CPI-17 と DARPP-32 は間接的に CaMKII を活性化する。CPI-17 と DARPP-32 の各 siRNA 及びそれらの組み合わせの導入を試みたが、いずれの場合も樹状突起形成への影響は見られなかった。

(3) 顆粒細胞で発現する RyR2 の関与

小脳細胞培養系中の顆粒細胞に対してトランスフェクション試薬を用いて RyR2 の siRNA を導入すると、プルキンエ細胞の樹状突起形成が抑制された。RyR 抑制条件下では培養液中への脳由来神経栄養因子 (BDNF) の分泌が減少するとともに、この条件下で培養液中に BDNF を添加するとプルキンエ細胞の樹状突起形成が回復した。BDNF 以外の分泌因子について検討するために、RyR 抑制条件下で神経成長因子 (NGF) の添加も試みたが、プルキンエ細胞の樹状突起形成を回復させることはなかった。これらの結果から、顆粒細胞で発現する RyR2 も BDNF の分泌促進を通してプルキンエ細胞の樹状突起形成を促進する役割を果たすことが示された。

(4) プルキンエ細胞で発現する IP₃ 受容体の関与

培養プルキンエ細胞に対して単一細胞エレクトロポレーションを用いて IP₃ 受容体 (1 型) の siRNA を導入しても、樹状突起形成への影響は認められなかった。RyR1 と IP₃ 受容体 (1 型) の siRNA を同時に導入しても、RyR1 siRNA 単独導入の効果は強めることはなかった。これより、プルキンエ細胞で発現する IP₃ 受容体は樹状突起形成に関与しないことが示唆された。

(5) プルキンエ細胞で発現するカルシウム透過性 AMPA 型受容体の影響

培養プルキンエ細胞に対して AMPA 型受容体 GluR2 サブユニットの siRNA を導入して、AMPA 型受容体にカルシウム透過性をもたせた。GluR2 の siRNA を導入されたプルキンエ細胞では、グルタミン酸刺激に対する細胞内カルシウム濃度上昇が増加するとともに、樹状突起の伸長と分枝及びスパイン形成が抑制された。プルキンエ細胞の樹状突起形成過程では、RyR を介した促進性のカルシウムシグナルが働くとともに、GluR2 を発現することによって AMPA 型受容体のカルシウム透過性を抑制する調節機構も働くことによって、正常な樹状突起形成が実現することが示された。

(6) 単一細胞エレクトロポレーションを用いた遺伝子強制発現系の確立

培養プルキンエ細胞に対して単一細胞エレクトロポレーションを用いて発現プラス

ミドを導入して遺伝子の強制発現を行う実験系の構築を行った。GFP 発現プラスミド (5.5 kbp) を用いた強制発現を試みたところ、通常の方法によっては GFP が発現しなかった。しかし、通常の内径 (0.75 mm) よりも大きな内径 (0.94 mm) のガラス管から作製した微小電極を用いたり、プラスミドを制限酵素処理して小さく (3.3 kbp) することによって、GFP を強く発現させることに成功した。最適条件で発現させた細胞では、GFP の発現が 20 日以上持続した。

以上のように、本研究によって、プルキンエ細胞の樹状突起形成を促進する機構としてプルキンエ細胞で発現する RyR1 及び顆粒細胞で発現する RyR2 が重要な役割を果たすことや、それぞれの下流で働くシグナルや分泌因子が明らかになった。また、RyR を介した促進性のカルシウムシグナルだけでなく、GluR2 を発現することによる AMPA 型受容体のカルシウム透過性抑制調節機構も働くことによって、正常な樹状突起形成が実現することも示された。プルキンエ細胞の樹状突起形成における細胞内カルシウム濃度調節機構の重要性が示されたとともに、多様な細胞内カルシウム濃度調節機構がどのように統合されて樹状突起形成につながるのかという新たな課題も明らかになった。こうした研究が進展することで、プルキンエ細胞における細胞内カルシウム濃度調節機構の破綻によって生じる樹状突起形成異常や神経回路形成異常についての原因解明が進むことも期待される。そうした研究においては、本研究で用いた単一細胞エレクトロポレーションによる siRNA 導入や、本研究で確立した単一細胞エレクトロポレーションを用いた遺伝子強制発現といった手法が非常に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

田中正彦、The dendritic differentiation of Purkinje neurons: unsolved mystery in formation of unique dendrites, Cerebellum, 査読有、14 巻、2015、227-230

西川心、平嶋尚英、田中正彦、Optimization of single-cell electroporation protocol for forced gene expression in primary neuronal cultures, Molecular Biotechnology, 査読有、56 巻、2014、824-832

池谷実穂、山之上潔、望月雄司、小西尋文、田所哲、田中正彦、鈴木亮、平嶋尚英、Orai-2 is localized on secretory granules and regulates antigen-evoked Ca²⁺ mobilization and exocytosis in mast

cells、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、451 巻、2014、62-67

井上悠、長谷川靖司、坂貞徳、山田貴亮、伊達靖、水谷宏、中田悟、田中正彦、平嶋尚英、ZIP2 protein, a zinc transporter, is associated with keratinocyte differentiation、Journal of Biological Chemistry、査読有、289 巻、2014、21451-21462

大橋令、坂田真一、内藤安紗美、平嶋尚英、田中正彦、Dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells is promoted by ryanodine receptors expressed by Purkinje and granule cells、Developmental Neurobiology、査読有、74 巻、2014、467-480

〔学会発表〕(計 17 件)

田中正彦、グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の発現が小脳プルキンエ細胞樹状突起の正常な形成に必要である、Neuroscience 2015 (第 38 回日本神経科学大会)、2015 年 7 月 28 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

田中正彦、小脳プルキンエ細胞の発生過程に及ぼす GluR2 の発現抑制効果、MBSJ 2014(第 37 回日本分子生物学会年会)、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

田中正彦、Role of ryanodine receptor type 2 expressed by cerebellar granule cells in dendritic differentiation of Purkinje cells、Neuroscience 2014 (The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience)、2014 年 11 月 15 日、Washington, DC (U.S.A.)

田中正彦、小脳顆粒細胞で発現するリアノジン受容体 2 型がプルキンエ細胞の樹状突起発達において果たす役割、Neuroscience 2014 (第 37 回日本神経科学大会)、2014 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

田中正彦、単一細胞エレクトロポレーションを用いた培養小脳プルキンエ細胞における遺伝子強制発現、Neuro 2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会合同大会)、2013 年 6 月 20 日、京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ybu/HP/index/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正彦(TANAKA, Masahiko)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 60267953

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし