

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570190

研究課題名（和文）新規に発見した IRBIT の中枢神経系におけるマスター調節因子としての機能解明

研究課題名（英文）Functional elucidation of IRBIT, a master regulator in the central nervous system

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

研究成果の概要（和文）：IRBIT 蛋白質は、神経細胞間のシグナル伝達が行われるシナプスを覆うグリア細胞突起に豊富に発現している。IRBIT は、細胞内 Ca²⁺シグナル調節分子である IP₃ 受容体と、細胞内 pH 環境調節分子である Na⁺/HCO₃⁻共輸送体（NBC1）とに、いずれもリン酸化依存的にそれらの活性を制御するが、IP₃ 受容体活性調節能を有する IRBIT のリン酸化パターンと、NBC1 活性調節能を有するそれとは、異なることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：IRBIT is highly expressed in the glial processes facing and/or ensheathing synaptic clefts. IRBIT interacts with both IP₃ receptor and NBC1 in its phosphorylation dependent manner, and modulates their functions. The phosphorylated residues on IRBIT which binds to IP₃R with high affinity were revealed to differ from those of IRBIT which binds to NBC1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分科；生物科学・細目；分子生物学

キーワード：IRBIT, 多重リン酸化領域、細胞外環境応答

1. 研究開始当初の背景

(1) IRBIT 分子は、IP₃ 受容体の IP₃ 結合部位に結合し、IP₃ 受容体の IP₃ 感受性を調節すると同時に、NBC1 にも結合しこの共輸送活性を亢進する。ずれとの結合にも、IRBIT の Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 の最低 4 つの Ser 残基のリン酸化を必用とするが、この 4 つのリン酸化だけでは、親和性の点から不十分で、IP₃ 受容体、或いは、NBC1 に対する高親和性結合に必要な、IRBIT の他の部位のリ

ン酸化の関与が、大腸菌から精製した IRBIT 蛋白質を試験管内リン酸化反応で、Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 のみをリン酸化したものと、Sf9 細胞から精製した IRBIT の IP₃ 受容体・NBC1 との結合実験により示唆されていた。

(2) Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 の 4 か所のリン酸化部位以外のリン酸化部位に関しては、決定されておらず、また、IP₃ 受容体高親和性の IRBIT と NBC1 高親和性の IRBIT と

の間で、そのリン酸化部位が異なるのか否か？機能的な側面から言い換えれば、ある細胞内の環境があり、その時にとっている IRBIT のリン酸化状態が、IP3 受容体にも NBC1 にも同様な親和性をもって相互作用するのか、はたまた、細胞内環境が変化に対応するように、IRBIT のリン酸化状態も変化し、それによって、ある時は IP3 受容体により相互作用し、またある時は NBC1 により相互作用するのか？ということ、全く解析がすすんでいなかった。

(3) IRBIT 分子が、中枢神経系に豊富に発現していることは、Western blotting による IRBIT 蛋白質の発現パターンから明らかになってきたが、中枢神経系などの領域に、そしてどの細胞に発現しているのかは、詳細に検討されていなかった。また、IP3 受容体、NBC1 との分布の比較検討に関してもなされておらず、

2. 研究の目的

本研究では、IP3 受容体、及び、NBC1、それぞれに高親和性に結合する IRBIT を個別に精製し、そのリン酸化部位を決定することで、IP3 受容体に高親和性を示す IRBIT と、NBC1 に高親和性を示す IRBIT との間に、IRBIT のリン酸化状態に関して差異があるのかどうかを明らかにする。また、中枢神経系での IRBIT の発現領域・発現細胞を決定する。標的分子に高親和性に結合する際に重要なリン酸化部位を潰した遺伝子改変マウスを作製し、これらリン酸化が、IP3 受容体、NBC1 の機能に及ぼす影響を個体レベルで解析する。こうして、IRBIT とその多重リン酸化が、IP3 受容体・NBC1 活性の調節を介して、中枢神経系の機能維持に如何に関与しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

計画した方法：

(1) <生化学的アプローチ> 各標的分子に高親和性に結合する IRBIT のリン酸化部位決定

- ① 各標的分子の IRBIT 結合部位をアフィニティカラムとして用いて、各標的分子に特異的に結合する IRBIT を生体組織(脳)から精製する。
- ② 精製した IRBIT のリン酸化部位を LC-MS/MS で同定する。
- ③ 同定したリン酸化部位から関与するリン酸化酵素を想定し、阻害剤、siRNA を用いた実験から確認する。

(2) <免疫組織学的アプローチ> 中枢神経系での IRBIT 発現領域・発現細胞の決定、及び、リン酸化 IRBIT の発現・局在部位の決定

- ① IRBIT 抗体を用いた免疫組織学的解析から、マウス脳における IRBIT の発現部位及び発現細胞を決定する。
- ② リン酸化 IRBIT 抗体を用いた免疫組織学的解析から、マウス脳における IRBIT の発現部位及び発現細胞を決定する。

(3) <遺伝子変異マウスを用いた生理学的アプローチ>リン酸化部位ノックインマウスの作製とその解析

- ① 上記(1)で確定したリン酸化部位情報を基に、各標的分子に重要なリン酸化部位を Ala に置換したマウスを作製する。
- ② このノックインマウスの行動・神経活動・高次脳機能等を解析する。
- ③ このノックインマウスから調製した初代培養細胞を用いて、細胞内 Ca²⁺シグナル動態、細胞内 pH 環境に関して解析する。

4. 研究成果

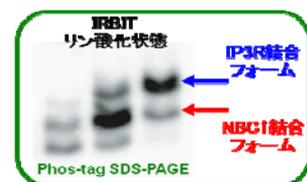
(1) 各標的分子に高親和性に結合する IRBIT のリン酸化部位決定：

IRBIT リン酸化部位の当初、上記研究方法に示した方法に従って、IRBIT を GST-IP3R/IP3BD (IP3 受容体の IP3/IRBIT 結合領域を GST 融合蛋白質として大腸菌に発現精製したもの)、及び、GST-pNBC1/N (NBC1 の IRBIT 結合領域を GST 融合蛋白質として大腸菌に発現・精製したもの) とを固相化したアフィニティカラムを用いて、マウス小脳の粗抽出画分から精製した IRBIT や、Sf9 細胞から同様に精製した IRBIT を各種プロテアーゼを用いて切断し、得られたペプチド断片を、MALDI、ESI、両イオン化方法で、解析を試みたが、結局、IRBIT のリン酸化部位を直接決定することが出来なかった。これは、恐らく、IRBIT のリン酸化部位が、N-末のごく限られた領域に集中しているために、リン酸化ペプチドあたりのリン酸基数が多くなってしまい、イオン化効率が極めて悪かったのではないかと、考えている。

こうした状況から、LC-MS/MS による解析は諦め、他の様々なアプローチを試みたところ、phos-tag SDS-PAGE を用いて IRBIT のリン酸化状態を解析

することで、IP3 高親和性の IRBIT リン酸化フォームと NBC1 高親和性の IRBIT リン酸化フォームとを分離することに成功した(右上図)。

この phos-tag SDS-PAGE による IP3 受容体高親和性 IRBIT リン酸化フォームの検出方法を利用した IRBIT の N-末に存在する多重リン酸化領域に存在する Ser/Thr 残

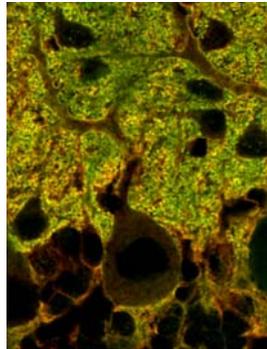


基の網羅的な Ala 置換変異体の解析で、IP3 受容体高親和性リン酸化部位フォーム形成に關与するアミノ酸残基をほぼ決定したが、確認作業が必要である。

(2) 中枢神経系での IRBIT 発現領域・発現細胞の決定、及び、リン酸化 IRBIT の発現・局在部位の決定：

マウス脳組織を用いた免疫組織学的解析から、IRBIT は、中枢神経全般に発現していることを明らかにした。更に、IRBIT は神経細胞より、グリア細胞(大脳皮質・海馬では、アストロサイト；小脳では、Bergmann glia 細胞)の突起部分、特に、シナプス周囲に局在していること、そして、IP3 受容体よりは、NBC1 とこうしたグリア細胞の突起部分に強く共局在していることを明らかにした。(下図)また、IRBIT リン酸化フォームのリン酸化抗体を用いた免疫組織学的解析では、現時点では、

Ser68/Ser71 がリン酸化された IRBIT を認識する抗体のみが、免疫組織学的解析に使用可能であり、これによって、IRBIT 抗体で得られた所見とほぼ同様のシグナルパターンを中枢神経組織で得た。従って、中枢神経系で NBC1 と共局在している IRBIT は、少なくとも Ser68/Ser71 残基がリン酸化されていると考えられた。

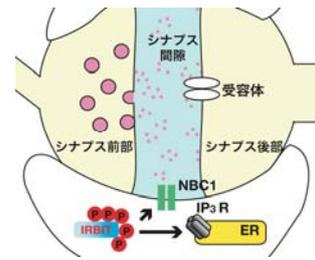


(3) リン酸化部位ノックインマウスの作製とその解析：

上述したように、IP3 受容体高親和性 IRBIT のリン酸化部位の同定に、多大な時間を費やしたこと、そして、Ser68/Ser71 のリン酸化は、IP3 受容体との結合にも NBC1 との結合にも重要なリン酸化部位であることから、この部位を Ala 置換したノックインマウス作製はあまり意味がないことから、当初計画していたノックインマウスの作製は、行えなかった。従って、生理的な実験系による IRBIT の IP3 受容体と NBC1 とのリン酸化を介した調節機能が中枢神経系の機能維持において果たす役割については、今後の課題としたい。

本研究で得られた、IRBIT がそのリン酸化パターンの違いによって、標的分子との相互作用を変化させることと、IRBIT が NBC1 とともに、シナプス周囲のグリア細胞突起部分に強く発現・局在しているという研究結果から、下記に述べる可能性について今後は追及していきたいと考えている。すなわち、神経

伝達に伴って刻一刻と変化するシナプス間隙の環境変化は、グリア細胞の突起部分に存在する種々の受容体、チャンネル、輸送体分子等によっ



て感知され、それはグリア突起部分に存在する IRBIT のリン酸化パターン変化として変換される(右上図)。そして、このリン酸化パターンの変化(=シナプス間隙の環境変化)によって、NBC1 の活性、或いは、IP3 受容体の IP3 感受性を変化させ、シナプス間隙、或いは、グリア細胞内の Ca²⁺動態、pH 環境調節瞬時に微調整することで、健康なシナプス伝達の維持・あるいはシナプス可塑性発現に關与している可能性について追及していきたい。

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)

1. Kabayama H, Takeuchi M, Taniguchi M, Tokushige N, Kozaki S, Mizutani A, Nakamura T, Mikoshiba K. Syntaxin 1B suppresses macropinocytosis and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *J Neurosci.* 2011 18;31(20):7357-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2718-10.2011 査読有
2. Yang D, Li Q, So I, Huang CL, Ando H, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K, Thomas PJ, Muallem S. IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway. *J Clin Invest.* 2011 121(3):956-65. doi: 10.1172/JCI43475 査読有
3. 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. doi:
10.1007/978-1-60327-175-2_9 査読無

〔学会発表〕（計1件）

水谷 顕洋、御子柴 克彦、IRBITの多重リン酸化領域におけるリン酸化パターンによって、IRBITの標的分子との相互作用が規定される。
第84回日本生化学会大会 平成23年9月22日、
国立京都国際会館

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