

## 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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700402

研究課題名（和文） IP<sub>3</sub>受容体疑似リガンド分子IRBITによるCaMKII $\alpha$ 活性制御機構の解明研究課題名（英文） Regulation of CaMKII $\alpha$  by IP<sub>3</sub>R-pseudoligand IRBIT

研究代表者

河合 克宏 (KAWAII KATSUHIRO)

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：00553653

研究成果の概要（和文）：

IRBITによるCaMKII $\alpha$ 活性制御の分子機構およびその生理的意義を明らかにし、脳神経系におけるIRBITの役割を解明するため、*in vitro* kinase assay, 細胞株発現系、培養神経細胞およびIRBITを全身で欠損したIRBIT KOマウスを用いてIRBITがCaMKII $\alpha$ 活性に及ぼす効果を検討した。いずれの実験系においてもIRBITがCaMKII $\alpha$ 活性を抑制する事を明らかにした。さらにIRBIT KOマウスが学習行動試験や社会性行動試験等の行動実験において行動異常を示す事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：An IP<sub>3</sub>R binding protein termed IRBIT (IP<sub>3</sub>R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) that interacts with the IP<sub>3</sub> binding core domain of IP<sub>3</sub>R and regulate the IP<sub>3</sub> sensitivity of IP<sub>3</sub>R. Recently, we identified calcium/calmodulin-dependent kinase II alpha (CaMKII $\alpha$ ) as an IRBIT binding protein. In this study, we investigated the effect of IRBIT on the CaMKII $\alpha$  activity and analyzed IRBIT KO mice to explain the function of IRBIT in the central nervous system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：IRBIT, CaMKII, brain, knockout mice

1. 研究開始当初の背景  
アービット (IRBIT, IP<sub>3</sub>R binding protein released with inositol 1,4,5-

trisphosphate)はIP<sub>3</sub>受容体(IP<sub>3</sub>R)からイノシトール3リン酸(IP<sub>3</sub>)により解離する分子として同定された分子量約60kDaの蛋白質で、

N 末端側に特徴的なセリンリッチ領域、C 末端側にコイルドコイル領域および NAD<sup>+</sup>結合領域を持つ。また IRBIT の C 末端はアミノ酸代謝酵素の一つである S-adenosylhomocysteine hydrolase/AHCY と 51%の相同性を持つが、酵素活性は有しておらず IRBIT の機能については全く未知であった。(Ando H et al. 2003, JBC, 278: 10602-10612)。

近年、セリンリッチ領域がリン酸化された IRBIT が IP<sub>3</sub> に擬態する事で IP<sub>3</sub>R に対し IP<sub>3</sub> と競合的に結合し、IP<sub>3</sub>R の Ca<sup>2+</sup>放出活性を調節する事が明らかにされた(Ando H et al. 2006, Mol Cell. 22: 795-806.)。IRBIT による IP<sub>3</sub>R の活性制御は細胞内 Ca<sup>2+</sup>振動の高さと頻度を定める重要な因子であると考えられている。

さらに、IRBIT が細胞膜上の Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter 1 (pNBC1) の活性を制御し細胞内外の pH 環境を調節する事を明らかにした(Shirakabe K et al. 2006, PNAS, 103: 9542 - 9547. )。

IRBIT は当初、小脳マイクロソーム画分から IP<sub>3</sub>R の相互作用分子として同定され、脳に豊富に存在している事がわかっている。しかしながら、これまで脳神経系に重点を置いた研究は報告がなく、脳神経系における IRBIT の役割については未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

我々は IRBIT が記憶学習において重要な働きを担う海馬神経細胞に豊富に存在している事を見出した。この事は IRBIT が記憶学習の基盤現象と考えられる神経可塑性に寄与している可能性を示唆する。また、IRBIT は IP<sub>3</sub>R の Ca<sup>2+</sup>放出活性を調節するだけでなく、pNBC1 の活性を制御し pH 環境調節を行うといった様に、相互作用相手を変える事で多機能に働く分子である。よって IP<sub>3</sub>R, pNBC1 だけでなく未知の蛋白質との相互作用によりこれまで知られていない新たな機能を脳神経系において担っている可能性が考えられる。本研究では、海馬における IRBIT 新規相互作用分子として同定した calcium/calmodulin-dependent kinase II alpha (CaMKII α) に着目し、IRBIT による CaMKII α 活性制御の可能性について検討し、IRBIT の神経可塑性における役割を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸菌および昆虫細胞発現系を用いて精製 IRBIT ならびに精製 CaMKIIα を作成し、In vitro kinase assay を用いて IRBIT が CaMKIIα 活性に及ぼす効果を検討した。

(2) 細胞株ならびに培養神経細胞を用いて IRBIT を過剰発現または発現抑制した際の CaMKII α 活性を評価し、細胞内での IRBIT による CaMKII α 活性制御を評価した。

(3) IRBIT を全身で欠失させた IRBIT KO マウスの作成と表現型解析

IRBIT KO マウスを用いて、胎児由来線維芽細胞(MEF 細胞)および培養神経細胞を調製し、IRBIT 欠失が CaMKII α 活性に及ぼす効果を培養細胞レベルで検討した。

IRBIT KO マウスを用いた細胞組織学的解析および行動学的解析により神経発生および脳高次機能における IRBIT の機能を解析した。

## 4. 研究成果

IRBIT による CaMKII α 活性制御の分子機構を解明するため、大腸菌または昆虫細胞を用いて IRBIT および CaMKII α の精製タンパク質を調整し、CaMKII α によりリン酸化される事が知られている Homer3 の精製蛋白質および Homer3 のリン酸化特異的抗体を用いて IRBIT が CaMKII α 活性与える効果を評価した。

その結果、In vitro kinase assay において、IRBIT 添加量依存的に Homer3 のリン酸化が抑制される事がわかった。この結果は IRBIT が CaMKII α の活性を抑制的に制御している事を示唆している。

次に、合成ペプチドを基質として放射性同位体を用いた in vitro kinase assay により IRBIT が CaMKII α の活性に及ぼす効果を種々の条件で定量的に評価した。IRBIT, 基質、カルモジュリン(CaM)および ATP 濃度を変える事で IRBIT の阻害様式について解析したところ、低濃度の IRBIT 存在下において、IRBIT は CaM に対し競合阻害様式を示し、基質、ATP に関しては非競合阻害様式であった。この事から IRBIT は CaM と競合的に CaMKII α に結合することで活性を抑える働きをしている事がわかった。

この結果は、CaMKII α の調節領域に IRBIT が結合すること、また結合した IRBIT が過剰量の Ca<sup>2+</sup>/CaM により溶出されるという結合実験の結果ともよく一致している。

しかしながら、高濃度の IRBIT 存在下では、IRBIT は CaM に対し単純な競合阻害ではなく、複合阻害様式を示したことから、高濃度の IRBIT 存在下では単純な結合阻害に加えて何らかの協同するメカニズムが存在している事を示唆している。CaMKII α は自身のリン酸化状態により正の制御(Thr286 のリン酸化)および負の制御(Thr305/306 のリン酸化)を受ける。また、IRBIT および CaMKII α はいずれも単量体ではなく、多量体で存在すると考えられていることから IRBIT による CaMKII α

の活性制御においても正または負の共同性が存在することが考えられる。高濃度 IRBIT 存在下での複合阻害様式について理解するためにはこれらの要素を考慮したより詳細な解析および多量体を考慮した計算モデル解析等が必要である。現在までに、表面プラズモン共鳴を用いた定量的相互作用解析システムを用いて IRBIT と CaMKII $\alpha$  の結合を検出する事に成功し、見かけ上の結合強度を算出する事ができた。さらに、この結合が Ca<sup>2+</sup>/CaM の添加により濃度依存的に阻害される事もわかった。これらの定量的な実験系を用いて結合と CaMKII $\alpha$  の活性を定量的に評価し、IRBIT による CaMKII $\alpha$  活性制御機構をより詳細に解析していく事が今後の課題である。

次に、CaMKII $\alpha$  を安定的に発現する HEK-293 細胞を樹立し細胞レベルで IRBIT の効果を検証した。IRBIT を過剰発現または siRNA により発現抑制した結果、IRBIT 過剰発現により CaMKII $\alpha$  の活性が抑制され、IRBIT 発現抑制により CaMKII $\alpha$  の活性が亢進する事がわかった。これらの結果は、細胞内においても IRBIT が CaMKII $\alpha$  と CaM の結合を競合阻害することで、その活性を抑える事を示唆している。

次に、IRBIT による CaMKII $\alpha$  活性制御機構が脳神経系に果たす役割を解析するため、IRBIT ノックアウトマウスの作成を行った。IRBIT ノックアウトマウスの作成は、Cre-loxP システムを用いる事で全身または部位特異的に IRBIT 遺伝子を欠損できる様にデザインした。

IRBIT 遺伝子のイントロン内に loxP 配列を導入した IRBIT loxP マウスの樹立を PCR 法およびサザンブロッティング法で確認した。

IRBIT loxP マウスと卵形成時から Cre 組み換え酵素を発現する EIIa-Cre マウスを交配する事で、全身で IRBIT 遺伝子を欠失する IRBIT KO マウスの作成に成功した。

IRBIT KO マウスにおける IRBIT 蛋白質の欠失は、ウェスタブロッティング法で確認した。

IRBIT KO マウスの各部位から組織染色用切片を作成し、HE 染色ならびに脳においてはニッスル染色を用いて形態学的解析を行ったところ、臓器形成段階における明らかな異常は確認されなかった。

次に、IRBIT KO マウスの胎児を用いたマウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF 細胞) を樹立し、IRBIT KO MEF 細胞における CaMKII $\alpha$  の活性を、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した CaMKII $\alpha$  活性プローブ “Camui $\alpha$ ” を用いて調べた。

その結果、前述した HEK-293 細胞を用いた

実験の結果と一致して、IRBIT KO MEF 細胞において CaMKII $\alpha$  の活性が有意に亢進していた。さらに、IRBIT KO MEF 細胞における CaMKII $\alpha$  の活性亢進は、外因性の IRBIT を発現させることでコントロールレベルまで抑えられた。

さらに、IRBIT KO マウス胎児を用いた初代海馬培養神経細胞を調整し、活性化型 CaMKII $\alpha$  (T286 リン酸化 CaMKII $\alpha$ ) を特異的に認識する抗体を用いて CaMKII $\alpha$  の活性化レベルを解析した。その結果、IRBIT KO マウスから調整した海馬培養神経細胞において活性化型 CaMKII $\alpha$  の割合が増加していることがわかった。また、Camui $\alpha$  を海馬培養神経細胞に導入し、NMDA 刺激により生じる CaMKII $\alpha$  活性化を観察したところ、IRBIT KO マウスから調整した海馬培養神経細胞において CaMKII $\alpha$  活性化が有意に亢進していることがわかった。

次に、IRBIT KO マウス海馬組織サンプルを調製し、ウェスタンブロット法により CaMKII $\alpha$  の自己リン酸化ならびに、CaMKII $\alpha$  によりリン酸化される事が報告されている GluR1 の Ser831 のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いて GluR1 のリン酸化レベルを比較したところ、IRBIT KO マウスの海馬組織において CaMKII $\alpha$  および GluR1 のリン酸化が亢進していた。これらの結果から、IRBIT が海馬神経細胞において CaMKII $\alpha$  活性を制御し、記憶や学習等の脳高次機能に大きな役割を果たす事が期待される。

そこで、IRBIT KO マウスおよびコントロールマウスを用いて、種々の行動解析を行った。その結果、自発活動活性、オープンフィールド試験、聴覚性驚愕反応試験、バーンズ迷路、T 字型迷路、恐怖条件付け試験などの試験において IRBIT KO マウスが行動異常を示す事を明らかにした。

これらの結果は海馬神経細胞において IRBIT が CaMKII $\alpha$  の活性制御を介して記憶学習といった脳高次機能に寄与する事を示唆しており、IRBIT による CaMKII $\alpha$  の活性制御の障害が学習障害、社会性異常といった人における脳発達障害等に関わっている事が考えられる。

## 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 2 件)

① Katsuhiko Kawaai, Keiko Tominaga-Yoshino, Tomoyoshi Urakubo, Naoko Taniguchi-Ishigaki, Yasumitsu Kondoh, Hideo Tashiro, Akihiko Ogura, Tomoko Tashiro, Analysis of gene expression changes associated with

long-lasting synaptic enhancement in hippocampal slice cultures after repetitive exposures to glutamate. J Neurosci Res. 88(13):2911-22. (2010) 査読あり

② Akihiro Mizutani, Kastuhiro Kawaai, Chihiro Hisatsune, Hideaki Ando, Takayuki Michikawa, and Katsuhiko Mikoshiba Isolation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associating proteins and selective knockdown using RNA interference. Methods in Molecular Biology, 645:133-41. (2010) 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

① 河合 克宏、富永(吉野)恵子、浦久保知佳、谷口 直子、近藤 恭光、田代 英夫、小倉 明彦、田代 朋子、繰り返しグルタミン酸刺激誘発性の長期神経可塑性に伴うアクチン骨格の再編成、第54回日本神経化学学会大会、2011年9月27日、瑠璃光(石川県金沢市)

② Tomoyoshi Urakubo, Katsuhiko Kawaai, Akihiko Ogura, Keiko Tominaga-Yoshino, Expression and distribution of GluR1 subunit of glutamate receptor during development of long-lasting synaptic enhancement coupled with synaptogenesis, 日本神経科学学会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 克宏 (KAWAII KATSUHIRO)

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：00553653