

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700389

研究課題名(和文) IRBIT欠損マウスにおける精神神経疾患に類する行動異常の発症機序に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenic mechanism for neuropsychiatric disease-like abnormal behavior in IRBIT knockout mouse

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：IRBITノックアウトマウスにおいて見られる種々の行動異常の発症機構を解明するため、モノアミン産生および細胞内pH制御へのIRBITの寄与に関して検討を行った。その結果、モノアミン産生の鍵となるTyrosine hydroxylaseのリン酸化をCaMKIIの活性を介してIRBITが制御している事がわかった。また、神経細胞およびグリア細胞においてIRBIT欠損が細胞内pH制御の機能異常を引き起こす事も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：An IP3R binding protein termed IRBIT (IP3R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) that interacts with the IP3 binding core domain of IP3R and regulate the IP3 sensitivity of IP3R. Recently, we identified calcium/calmodulin-dependent kinase II alpha (CaMKIIalpha) as an IRBIT binding protein. In this study, we investigated the effect of IRBIT deletion on the monoamine (dopamine and norepinephrine) synthesis and intracellular pH regulation to explain the function of IRBIT in the central nervous system. We found that IRBIT regulated the phosphorylation state of TH by CaMKIIalpha. In addition, IRBIT contributed the regulation of intracellular pH by NBC1 in the neuron and astrocyte.

研究分野：脳神経科学

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 多動障害 モノアミン CaMKII NBC1 pH

1. 研究開始当初の背景

アービット (IRBIT, IP₃R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) は IP₃ 受容体 (IP₃R) からイノシトール 3 リン酸 (IP₃) により解離する分子として所属研究室において同定された分子量約 60kDa の蛋白質でセリンリッチ領域がリン酸化された IRBIT が IP₃ に擬態する事で IP₃R に対し IP₃ と競合的に結合し、IP₃R の Ca²⁺放出活性を調節する事が明らかにされた (Ando H 2006, Mol Cell. 22: 795-806.)。IRBIT による IP₃R の活性制御は細胞内 Ca²⁺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。

また、IRBIT の構造特性として、N 末端には種々のキナーゼによりリン酸化される多重リン酸化部位が存在し、様々なリン酸化状態をとる事で標的蛋白質を変え、種々の生理現象を制御する多機能因子であることが考えられている。

代表的な例として、現在までに、IRBIT はナトリウム重炭酸イオン共輸送体 (NBC1, Shirakabe K 2006, PNAS) や切断ポリアデニル化特異因子複合体 (CPSF complex, Kiefer H 2009, JBC) にリン酸化依存的に結合し、細胞内外の pH 環境や mRNA のプロセシング過程を調節することが明らかになってきた。

さらに、IRBIT は嚢胞性線維症の原因遺伝子である CFTR (Yang D 2009, J Clin Invest. 119: 193-202) や血圧制御に重要な WNK/SPAK kinase の活性制御 (Yang D 2011, J Clin Invest. 121: 956-65) にも関わっていることが報告されており、現在様々な分野で注目を集めている。

申請者は IRBIT が記憶学習において重要な働きを担う海馬神経細胞のスパインに豊富に存在している事に着目し、海馬抽出液から免疫沈降法および質量分析により IRBIT 新規相互作用分子を探索した。

その結果、記憶や学習の分子的基盤となり、神経可塑性に重要な役割を果たす calcium/calmodulin-dependent kinase II alpha (CaMKII) を IRBIT の新規相互作用分子として同定、IRBIT が CaMKII に結合し、その活性を制御することを明らかにした。この事は、IRBIT が海馬神経細胞において CaMKII 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 ノックアウト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結果 IRBIT ノックアウトマウスにおいて活動量の増加 (多動異常)、学習障害、社会行動異常等のいくつかの行動異常を発見した。IRBIT ノックアウトマウスにおいて見られるこれらの行動異常は、統合失調症や ADHD といった人の神経疾患に見られる症状と類似しており、その発症メカニズムを解明する事は、医学応用の点からも重要な課題である。

2. 研究の目的

申請者は、神経可塑性に重要な役割を果たす CaMKII を IRBIT の新規相互作用分子として同定し、*in vitro*、細胞内で IRBIT が CaMKII の活性を抑制的に制御することを明らかにした。さらに、全身で IRBIT を欠失した IRBIT ノックアウトマウスを作成し、行動解析において多動異常、学習障害、社会行動異常等の行動異常が見つかっている。これらの結果は IRBIT が海馬神経細胞において、CaMKII の活性を制御し、脳高次機能において重要な働きを担っている可能性を示唆している。しかしながら、IRBIT は神経系に着目しても、神経細胞だけでなく、グリア細胞にも豊富存在している。さらに、脳脊髄液の産生に寄与する脈絡叢にも強く発現している。また、前述したように、IRBIT は IP₃R, NBC1, CaMKII など様々な標的分子と結合し、その活性を制御している。よって、IRBIT ノックアウトマウスの行動解析において得られた行動異常が、どの部位で、どの様な分子メカニズムを介して生じているのかについては推測の域を出ない。さらに、IRBIT ノックアウトマウスにおいてみられる行動異常がどのような神経回路の変化に起因するのかを電気生理学的手法を用いて明らかにする事も必要となる。そこで、本研究課題は生化学的手法、細胞イメージング、脳の部位特異的に IRBIT を欠損した IRBIT コンディショナルノックアウトマウス作成等の手法を用いて、IRBIT ノックアウトマウスの行動異常の原因部位および分子メカニズムを解明する事で多動異常、学習障害、社会行動異常といった精神神経疾患の発症機序解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) モノアミン制御への IRBIT の関与
多動異常との関わりが多く報告されているモノアミン産生のボトルネックである Tyrosine hydroxylase (TH) の活性は CaMKII によるリン酸化の制御を受けている事が報告されている。そこで IRBIT の有無が TH のリン酸化に及ぼす影響を細胞レベルおよびノックアウトマウスの黒質サンプルを用いてウェスタンブロットまたは免疫染色法で評価する。また、ドーパミンニューロンで Cre 組み換え酵素を発現する DAT-cre マウスを用いてドーパミンニューロン特異的 IRBIT ノックアウトマウスを作成し、行動異常の原因となる原因部位の同定を目指す。

(2) グリア細胞における IRBIT の役割
IRBIT は神経細胞のみならず、グリア細胞に豊富にも存在している。脳切片および分散培養を用いた免疫染色法の結果、IRBIT と標的分子の一つである NBC1 が海馬および小脳のグリア細胞で共発現している事がわかった。NBC1 は細胞内外の pH 調節に重要な分子であり、シナプス間隙における pH 環境は NMDAR の活性調節を介して神経活動を制御する

(Mitchell Chesler, Physiol Rev, 2003)。これまでに NBC1 ノックアウトマウスを用いた研究から神経活動依存的なグリア細胞における pH 変化 (depolarization-induced alkalization, DIA) は主として NBC1 によって行われている事が報告されている (Svichar N 2011 J Neurosci.)。以上の事から、IRBIT がグリア細胞において NBC1 の活性制御を介し、神経可塑性に寄与する可能性が考えられる。そこで、IRBIT ノックアウトマウス由来神経細胞およびグリア細胞を培養し、細胞内 pH イメージングにより IRBIT 欠失が脱分極刺激誘導性の pH 変化 (DIA) に及ぼす影響を調べる。

(3) Long IRBIT による IRBIT 制御機構の解明

Long IRBIT は IRBIT と約 88% と高いホモロジーを持ち、IRBIT と IP_3R の結合に必須なアミノ酸残基を有するが、N 末端に特徴的な付加配列を持つため、 IP_3R と結合できない IRBIT のホモログである。Long IRBIT と IRBIT は C 末端ドメインでヘテロ複合体を形成し、Long IRBIT が結合した IRBIT は IP_3R との結合が阻害されると考えられている (Ando H 2009 J Neurochem.)。よって Long IRBIT は IRBIT とヘテロ複合体を形成する事で IRBIT と標的分子との相互作用を制御する IRBIT の制御分子であると期待される。申請者は細胞株に IRBIT と CaMKII を発現させ、免疫沈降法により相互作用を確認している。この実験系において IRBIT と共に Long IRBIT を発現させたところ、IRBIT と CaMKII の結合が阻害される事がわかった。この事は、 IP_3R のみならず、他の標的分子に関しても IRBIT と Long IRBIT のヘテロ複合体形成が IRBIT と標的分子の相互作用を制御している可能性を示唆している。そこで、Long IRBIT の有無が IRBIT と標的分子の相互作用に与える影響を評価し、Long IRBIT が IRBIT の標的選択性を決める因子である可能性を探索する。

4. 研究成果

(1) モノアミン制御における IRBIT の寄与について検討を行った。モノアミン産生の鍵となる Tyrosine hydroxylase (TH) の活性はリン酸化により制御されており、その一つに CaMKII によるリン酸化がある。そこで、IRBIT による CaMKII 活性制御が TH のリン酸化に及ぼす効果を細胞株実験系で検討した。CaMKII を安定発現させた HEK-293 細胞ならびに、内在性の TH、CaMKII を発現する PC-12 細胞を用い、基質として TH を発現させ、 Ca^{2+} ionophore により刺激したところ IRBIT 過剰発現により TH リン酸化が著しく抑制される事がわかった。また、PC-12 細胞に IRBIT を過剰発現したところ、内在性の TH リン酸化並びに 50mM KCl 刺激による TH のリン酸化上昇が IRBIT 過剰発現により抑制される事がわかった。これらの結果は IRBIT が

CaMKII の活性制御を介して TH のリン酸化を調節している事を示唆する。次に、IRBIT ノックアウトマウスの黒質線条体における TH のリン酸化状態を二重免疫染色により検討した。その結果、IRBIT ノックアウトマウスの黒質線条体において TH のリン酸化が亢進している事が分かった。この結果は IRBIT 欠失による TH リン酸化の亢進が過剰なモノアミン産生を誘導し、多動異常等の行動異常の原因になっている事が考えられる。また、現在 DAT-cre を用いたドーパミンニューロン特異的 IRBIT ノックアウトマウスの第一世代作成に成功した。今後このマウスを用いて行動実験を進めていく。

(2) IRBIT の標的分子の一つで細胞内 pH 調節に関わる NBC1 の機能制御を中心に神経細胞およびグリア細胞における IRBIT の役割について解析を行った。細胞内の酸性度 (pH) の制御は正常な細胞機能維持に必須であり、神経細胞およびグリア細胞においても神経活動依存的な pH 制御がなされている。そこで、IRBIT ノックアウトマウスおよび野生型マウスの海馬から調整した神経細胞およびグリア細胞混合培養系において、遺伝子発現解析および脱分極刺激応答性の細胞内アルカリ化 (DIA) の細胞内 pH イメージング解析を行った。その結果シナプス形成期に NBC1 の発現が著しく増加する事を見出した。

野生型神経細胞位において、シナプス形成後の培養神経細胞では脱分極刺激により、一過性の酸性化およびその後のアルカリ化 (DIA) が生じるが、シナプス形成期前の培養神経細胞では脱分極刺激による酸性化のみ誘導され、その後の DIA が起こらない事を見出した。

IRBIT ノックアウトマウス由来の海馬神経細胞を用いて同様の実験を行ったところ、シナプス形成の有無に関わらず、脱分極刺激による酸性化は確認されたが、その後の DIA が起こらない事を発見した。

グリア細胞においても、IRBIT ノックアウトマウス由来のグリア細胞は野生型にくらべて脱分極刺激応答性の DIA が減弱している事がわかった。

これらの事は神経細胞の成熟過程に伴う細胞内 pH 制御機構の発達およびグリア細胞による細胞内外の pH 制御に IRBIT が寄与している事を示している。

細胞内外の pH は NMDAR 等の pH 依存性の蛋白質の活性制御を介して神経可塑性等の神経細胞機能に寄与している事が考えられ、IRBIT ノックアウトマウスにおける行動異常の発症機構の原因となっている可能性がある。

(3) long IRBIT が IRBIT およびそのターゲット分子の活性制御に及ぼす効果の検討を行っ

た。本研究課題を進める過程で、human LongIRBITにはN末端の配列が異なる exon に置き換わった splicing variant が存在する事が遺伝子産物のシーケンス結果としてデータベース上に報告された。申請者は配列相同性からマウスにおける Long IRBIT splicing variant を探索した結果、2種の異なる N 末端を持つ splicing variant のクローニングに成功した(図1)。



図1 Long IRBIT splicing variant

さらに、細胞株発現系においてこれらの splicing variant が IRBIT および Long IRBIT とヘテロ多量体を形成する事、brain type NBC1 (bNBC1)との結合実験の結果、Variant 2 は IRBIT および Long IRBIT よりも bNBC1 に対して強い結合を示す事を見出した。次に、IRBIT ノックアウトマウスから調整した mouse embryonic fibroblast (MEF) 細胞に IRBIT および各 Long IRBIT variant を bNBC1 と共に遺伝子導入し、pH イメージングにより bNBC1 活性に及ぼす影響を評価した。その結果、Variant 2 は IRBIT と同程度以上に bNBC1 活性を上昇させ、Long IRBIT は単独では bNBC1 を活性化しない事がわかった。以上の事から、Long IRBIT も IRBIT と同様 bNBC1 活性制御において重要な役割を担っている事が明らかとなった。現在、2つの遺伝子を同時に発現可能な dual-expression vector を用いて IRBIT および longIRBIT variant を同時に発現させる実験系を確立しており、この実験系を用いて今後、ヘテロ多量体形成がターゲット分子制御に及ぼす効果を検討して行く。

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) Hideaki Ando, Katsuhiko Kawaai, Katsuhiko Mikoshiba, "IRBIT: A regulator of ion channels and ion transporters." *Biochim Biophys Acta*. 査読あり in press. 2014
doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.031.

(2) Seonghee Park, Nikolay Shcheynikov, Jeong Hee Hong, Changyu Zheng, Suk Hyo Suh, Katsuhiko Kawaai, Hideaki Ando, Akihiro Mizutani, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, George Seki, David Yule, Katsuhiko Mikoshiba, Shmuel Muallem, "Irbit Mediates Synergy Between Ca²⁺ and cAMP

Signaling Pathways During Epithelial Transport in Mice" *Gastroenterology*. 査読有り 145:232-41, 2013
doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.047.

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・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 5 5 3 6 5 3