

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221002

研究課題名(和文) シナプス可塑性・神経機能と神経発達制御におけるIP3受容体の役割

研究課題名(英文) Role of IP3 Receptor in the Regulation of Synaptic Plasticity, Neuronal Function and Neuronal Development

研究代表者

御子柴 克彦 (Mikoshiba, Katsuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：30051840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 170,000,000円

研究成果の概要(和文)：IP3受容体(IP3R)による小胞体内腔からのCa²⁺放出がシナプス可塑性に関わるか大きな論争があった。プルキンエ神経特異的欠損マウスを作製しIP3R1が神経細胞のCaMKII/アクチン骨格/スパイン形成を制御することを初めて解明した(PNAS)。IP3R1の伝令RNA輸送が長期増強を制御し(Nature Neurosci)、グリアのIP3R2が神経機能を調節すること(Nature Commun)、IP3Rを制御するERp44が蛋白質品質管理を担うこと(Mol Cell)も発見した。IP3RによるGABA受容体制御など本研究期間内にIP3Rがシナプス可塑性を制御する多数の決定的証拠を得た。

研究成果の概要(英文)：IP3 receptor (IP3R)-deficient mice exhibit cerebellar ataxia, epileptic seizure-like symptom and retardation of neuronal development. However, it was a longstanding controversy if IP3R/Ca²⁺ signaling is involved in neuronal plasticity. We generated knock-out mice of all IP3R isoforms (IP3R1-3), and knock-out mice with region- or neuron-specific deletion of IP3R1. Mice lacking IP3R1 in Purkinje neurons demonstrated regulation of CaMKII/actin cytoskeleton/spine formation by IP3R1 (PNAS). LTP regulation by transport machines of IP3R1-coding mRNA (Nature Neurosci), modulatory roles of glial IP3R2 on gliotransmitter release to regulate neuronal functions (Nature Commun, J Clinical Invest), protein quality control by IP3R-associating ERp44 (Mol Cell) were also discovered. Much evidence, including GABA receptor regulation (Cell Rep) and apoptosis regulation by IP3R-bound IRBIT (eLIFE, PNAS), strongly indicates that IP3R controls synaptic plasticity.

研究分野：神経化学

キーワード：IP3受容体 神経回路 カルシウムイオン (Ca²⁺) スパイン シナプス可塑性 長期増強 アストロサイト IP3

1. 研究開始当初の背景

イノシトール三リン酸(IP₃)受容体(IP₃R)は、細胞内のカルシウム(Ca²⁺)貯蔵庫である小胞体の膜上にあるイオンチャネルであり、細胞外の刺激に応じて小胞体からCa²⁺を放出する。研究代表者は1970年代にパスツール研究所でJ.P. Changeux教授と共にP400というタンパク質の研究を行い、それが運動失調症状を呈する突然変異マウスの小脳で激減していることを見出した。帰国後P400がIP₃Rであることを発見し、1989年世界に先駆け小脳のIP₃R 1型アイソフォーム(IP₃R1)をコードする完全長cDNAのクローニングに成功した(Nature 1989)。3種のアイソフォーム全構造も決定した(Cell 1993)。IP₃レセプターを阻害するとCa²⁺振動と受精が停止することから、IP₃レセプターがCa²⁺振動の発振装置であることを初めて証明した(Science 1992)。受精後4細胞期の背側と腹側の決定(Science 1997, Nature 2002)や、神経の突起伸展に関わること(Science 1998)や突起の左右の方向転換(Science Signaling 2009)また心臓の発生や肥大(PLoS ONE 2010, Circulation Res 2010)に関わる事を示した。IP₃レセプター1の遺伝子欠損マウスを作製して発育障害や小脳失調を示すこと(Nature 1996)、学習・行動やシナプス可塑性に異常がおきること(Nature 2000)を発見した。本研究ではシナプス可塑性・神経機能、神経発達制御におけるIP₃Rの役割とメカニズムの解明を目指した。

(1)IP₃R 欠損マウスの作製とその解析

研究代表者らはIP₃R1の機能を知るためIP₃R1欠損マウスを世界に先駆け作製した。IP₃R1が欠損すると小脳失調や痙攣様発作を起こし(Nature 1996)、神経可塑性に異常があることを報告した。しかし、IP₃R1欠損マウスは生後20日前後で死亡するので、IP₃受容体がどのようなメカニズムで神経発達を制御するのか全く不明であり、IP₃Rが痙攣様発作を起こす分子メカニズムも未知であった。グリア細胞に発現するIP₃Rがシナプス可塑性・神経機能、神経発達制御に関わるも不明であった。

(2)海馬LTPにおけるIP₃Rの役割

海馬の長期増強(LTP)はシナプス可塑性・記憶・学習の素過程である。高頻度刺激(HFS)によるCA1神経のLTP誘導には、シナプス前終末のNMDA受容体を介したCa²⁺流入、mGluRを介したIP₃-Ca²⁺シグナリングが寄与する。研究代表者らはCA1入力のテタヌス刺激(100Hzで10又は100パルス)で誘導される海馬LTPがIP₃R1欠損マウスで促進していることを発見した。しかし、詳細なメカニズムは不明であった。

(3)IP₃R制御因子の役割

IP₃Rを制御する様々な因子を同定した。IP₃を擬態する偽リガンドであるIRBITを発見し命名した(Mol Cell 2005)。IRBITは標的分子と結合し、電解質輸送、分泌、mRNAの成熟、そしてゲノム安定化に寄与する。しかし、IRBITが最も豊富に存在する脳における神経機能は不明であった。

神経変性疾患のモデルマウスの脳および初代培養神経でCa²⁺シグナル伝達の異常を発見

した(Neuron 2010)。この機構にERシャペロンGRP78とERp44(Cell 2005)によるIP₃R制御が関与することを明らかにした。

(4)IP₃-Ca²⁺シグナリングの新しい観察技術

細胞内IP₃濃度を検出するFRETインディケータIRISを開発した(J Cell Biol 2006)。生きた細胞内のIP₃動態を可視化できる画期的な方法である。IRIS-1は現在報告されているIP₃センサーの中で最もIP₃結合時の蛍光変化が大きく感度が高い。ERにCa²⁺を濃縮するCa²⁺ポンプ(SERCA)の構造変化を可視化するCa²⁺センサー(F-L577)を開発した(JBC 2011)。IP₃Rの構造変化をリアルタイムでモニタできるFRETセンサーも開発済みである(PNAS 2011)。世界最高感度の蛍光タンパク質Ca²⁺センサー(YC-Nano)の開発・神経細胞への応用に成功し(Nature Methods 2010)、ウイルスベクターで脳内に発現させ多光子顕微鏡を用い*in vivo*イメージングを行う実験系を確立した。

(5)IP₃Rの動作メカニズム

IP₃Rの「IP₃結合コア」とそれを負に調節する「サブレッサー領域」を同定し、X線結晶構造解析で各々の構造を決定した(Nature 2002, Mol Cell 2005)。研究代表者らはIP₃受容体の精製標品を負(ネガティブ)染色して電子顕微鏡(電顕)で観察し、IP₃結合部位がCa²⁺を透過するチャネル領域から離れていることを提案した(JBC 2003)。しかし、「IP₃がIP₃受容体に結合し、物理的にどのようにしてチャネルを開けるのか」という最も根本的なIP₃Rの動作メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではシナプス可塑性・神経機能、神経発達制御におけるIP₃受容体の役割とそのメカニズムを解明するため、個体レベルから近原子レベルに至る未解明で独創性の高い以下の目的を設定し研究を行った。

(1)IP₃R欠損マウスの作製とその解析

神経回路は樹状突起上に存在する「スパイン」のシナプス結合により形成される。スパインは生後に発達し回路完成後に安定化する。一部のスパインは成熟後も学習/記憶/環境により再編成される。本研究はスパインの発達や成熟におけるIP₃Rの役割を解明する。

IP₃R1を全身で欠損させたマウス(IP₃R1欠損マウス)は、痙攣様発作を起こす。しかし、この発作が脳のどの領域の神経活動の異常により生じるのかメカニズムは不明であった。本研究ではこの痙攣様発作を誘発する脳部位や神経回路を特定することを目指す。

興奮性・抑制性シナプスにより神経回路の情報処理は安定化されている。GABAA受容体は抑制性シナプスで中心的役割を担い、脳内GABA作動性回路は臨界期可塑性に不可欠である。GABAA受容体は側方拡散により細胞膜上を動きシナプス内に入りし神経細胞の興奮に伴いシナプス後膜から散逸する(Neuron 2009)。しかし、GABAA受容体の集積メカニズムは不明であった。本研究ではシナプス後膜におけるGABAA受容体の集積メカニズムにおけるIP₃Rの役割の解明を目指す。

「経頭蓋直流電気刺激法(tDCS)」は、頭蓋骨の上から極めて微弱な直流電気を流して脳を刺激する方法で、鬱症状の改善、運動機能障害のリハビリテーション、記憶力の向上の効果がある。

しかしメカニズムは不明であった。これまで tDCS がシナプス伝達を増強することが報告されていた。本研究では グリア細胞の IP_3 - Ca^{2+} シグナリングに注目し tDCS によるシナプス増強機構を解明する。

(2)海馬 LTP における IP_3R の役割

藤井らは HFS (100 パルス 100Hz) の前に低頻度刺激 (LFS) を行うと LTP 誘導が抑えられる現象 "LTP サプレッション" を見出した。 IP_3R1 欠損マウスの海馬 CA1 ニューロンでは、HFS の前に LFS (1000 パルス 1 Hz) をプレコンディショニングし起こる LTP サプレッションが減衰することを見出した。本研究では 海馬 CA1 ニューロンを用いてプレコンディショニング機構における IP_3R の役割を解明する。

(3) IP_3R 制御因子の役割

脳神経系における IRBIT の機能を解明するため IRBIT を欠損させた遺伝子改変マウスを作成した。 更に、IRBIT の新たなターゲット分子の同定と機能解析を試みた。本研究では が IP_3R の制御因子である IRBIT が脳内モノアミン系神経伝達物質の合成を制御するメカニズムを解明する。

アポトーシスは細胞内 Ca^{2+} によって制御される。 IP_3R の関与は周知だが IRBIT の役割は不明であった。アポトーシスを促進又は抑制する Bcl-2 ファミリーのうち Bcl2l10 の作用メカニズムは不明であった。本研究は IP_3R が存在する小胞体-ミトコンドリア間 Ca^{2+} 動態とそれを制御する IRBIT 及び Bcl2l10 がどのようにアポトーシスを制御するか解明する。

(4) IP_3 - Ca^{2+} シグナリングの新しい観察技術

マーモセットは小型で扱い易い霊長類で、遺伝子改変も可能なので注目されている。高次脳機能における IP_3R の研究にはマーモセットの神経活動記録技術が有効である。これまで一般に麻酔下マーモセットが使われていたが、麻酔時と覚醒時では神経活動に大きな違いがある。本研究は 覚醒状態のマーモセットの神経活動を神経細胞レベルで観察する技術開発に取り組んだ。

細胞内 IP_3 濃度を検出する IRIS や Ca^{2+} センサーの感度や特異性などを改良するため ハイスループットに展開可能な迅速・簡便なスクリーニングシステムの構築を目指した。

(5) IP_3R の動作メカニズム

IP_3R の細胞質ドメインにある IP_3 結合コアがチャネルの近位に位置して直接コンタクトしチャネルを開く説と、アロステリックな構造変化によりチャネルが開く説があった。本研究では X線結晶構造解析と機能解析により IP_3 が結合しどのような物理的機序によりチャネルを開くのか解明する。

3. 研究の方法

これまで未解決であった難易度の高い目的を達成するため、国内外の高度な専門技術を積極的に取り入れ以下の方法で行った。

(1) IP_3R 欠損マウスの作製とその解析

研究グループは、成熟後の脳でプルキンエ細胞の IP_3R1 が果たす役割を解明するため、プルキンエ細胞だけで IP_3R1 を欠損させた遺伝子改変マウス(プルキンエ細胞特異的 IP_3R1

欠損 コンディショナル (cK0) マウス) を作成した。プルキンエ細胞特異的 IP_3R1 欠損 cK0 マウスの IP_3R1 発現量を確認し細胞形態と運動学習について解析した。

IP_3R1 欠損マウスで見られる癲癇様発作を起こす脳部位や神経回路を特定するために、(a)海馬/大脳皮質だけで IP_3R1 を欠損させたマウス(海馬/大脳皮質 K0 マウス)、(b)大脳基底核の主要な構成要素である線条体 だけで IP_3R1 を欠損させたマウス(線条体 K0 マウス)、(c)小脳/脳幹だけで IP_3R1 を欠損させたマウス(小脳/脳幹 K0 マウス) を作製し解析した。自由行動下の小脳/脳幹 K0 マウスプルキンエ細胞の神経活動を記録しジストニアを調べた。プルキンエ細胞を持たない Lurcher マウスと K0 マウスを交配し実験した。

ラット及び IP_3R 遺伝子組み換えマウスの海馬培養神経細胞を用いた。量子ドットを用いた1分子イメージング法により、光学顕微鏡を超える解像度で細胞膜上の GABAA 受容体の側方拡散を解析した。

アストロサイトとニューロンの細胞内 Ca^{2+} 動態をリアルタイムで観測できる遺伝子改変マウスを作製し、tDCS 前後の大脳皮質の Ca^{2+} 動態を計測した。

(2)海馬 LTP における IP_3R の役割

雄ハートレイ系モルモット (, 4-6 週齢) 海馬から $500 \mu m$ スライスを作成し海馬 CA1 ニューロン興奮性シナプス後電位 (EPSP) スローブ (S-EPSP) と 集合スパイク (PS) アンプリチュード (A-PS) を測定した。LTP 誘導は 100 パルス 100Hz の高周波数刺激 (HFS) を用い、LTP サプレッションは 1000 パルス 1Hz の低周波数刺激 (LFS) を用いた。

(3) IP_3R 制御因子の役割

共免疫沈降法と質量分析法を用いマウス脳組織から IRBIT と相互作用する新しい分子を探索した。野生型と IRBIT 欠損マウスからそれぞれ培養した海馬神経細胞を解析した。IRBIT 欠損マウスを用いて行動解析を行なった。IRBIT の発現量がチロシンヒドロキシラーゼの活性に及ぼす影響を調べた。

細胞分画法とブルーネイティブゲル電気泳動法で解析 IRBIT- IP_3R 複合体を解析した。ゲノム編集技術を用いて、IRBIT 欠損細胞を作製した。IRBIT 欠損細胞にアポトーシス刺激を加え解析した。IRBIT 欠損細胞の小胞体-ミトコンドリア接触部位を電子顕微鏡で観察した。IRBIT 欠損細胞における小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入量を測定した。

(4) IP_3 - Ca^{2+} シグナリングの新しい観察技術

覚醒状態のマーモセットを固定する観察装置を独自に開発した。マーモセットをうつ伏せにし手足/首/胴体を固定した。頭部固定具と観察装置とをつなぎ頭部を固定し、観察画面のプレを抑えた。固定時間を徐々に長くし観察装置に慣らすトレーニングを確立した。観察装置へ抵抗を示さない個体に対して、蛍光 Ca^{2+} センサー (GCaMP6) を大脳皮質体性感覚野の神経細胞に発現させ実験した。

GCaMP6, mCherry- IP_3 sponge (mCherry-m49) とネガティブコントロール mCherry- IP_3 sponge (mCherry-m30), IRIS-1 とネガティブコントロール IRIS-1 Dmut を大腸菌ペリプラズムに発現させるため TorA 融合プラスミドを構築しハイスルー

ブット実験に供した。アガロースプレートの大腸菌 GCaMP6s の 蛍光観察を共焦点顕微鏡で行った。

(5) IP₃R の動作メカニズム

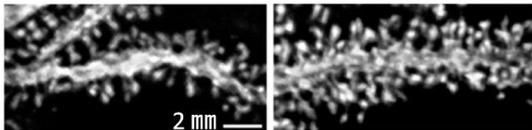
遺伝子工学を用いて IP₃ 結合部位からチャネル部位につながる細胞質側の領域を昆虫細胞で大量に発現・精製し、その結晶化を試みた。試行錯誤を重ね 2,217 個のアミノ酸残基から構成される IP₃ 受容体細胞質ドメインの結晶を作製することに成功した。続いて、大型放射光施設「SPring-8」を使い X 線結晶構造解析を行った。更に IP₃ 存在下・非存在下での結晶化条件を見つけ出し X 線結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

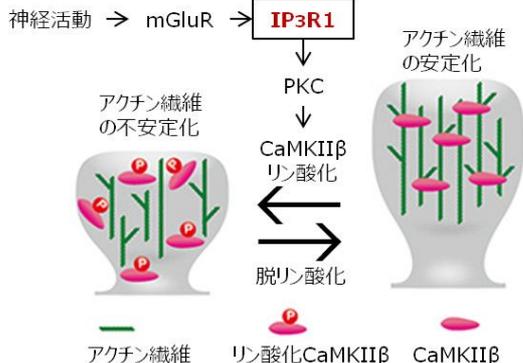
(1) IP₃R 欠損マウスの作製とその解析

プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損 cKO マウスではプルキンエ細胞のスパインが異常に増えスパインの形が長くなることを発見した(*J Neurosci*, 2013)(下図)。小脳が担う眼球

野生型マウス IP₃R1欠損cKOマウス



運動を解析したところ、IP₃R1 欠損 cKO マウスでは運動学習ができないことを見つけた。更に、CaMKII とアクチン細胞骨格に着目し、IP₃R1 欠損 cKO マウスのプルキンエ細胞でみられたスパイン形態の異常が回復するかどうかを調べた。CaMKII によるアクチン安定化を阻害すると IP₃R1 欠損 cKO マウスのプルキンエ細胞のスパイン形態の異常が正常に回復することを発見した(*PNAS*, 2017)。神経活動依存的な PKC による CaMKII のリン酸化が、プルキンエ細胞のスパイン発達を抑制し、この機構が小脳の神経回路を正しく維持する新たなシナプス可塑性モデルを提唱した(下図)。統合失調症や自閉症でスパイン形態異常があるのでこれらの病態解明に本成果が役立つ。



小脳と脳幹に発現する IP₃R1 を欠損させると、オリブ核を介したプルキンエ細胞への情報の入力が異常になり、ジストニアを発症することを見出した(*Front Neural Circuits*, 2013)。大脳基底核の線条体を介した神経活動異常が、ジストニア発症に関わると考えられてきたが、今回の成果により従来と異なる発症メカニズムが明らかとなった。特定難病疾患である脊髄小脳変性症

(SCA15/16)の原因遺伝子として、IP₃R1 が 2004 年に同定された。本研究成果は SCA15/16 の治療に役立つと考えられる。

量子ドットで神経細胞膜上の GABAA 受容体の動きを 1 分子レベルで追跡したところ、IP₃R からの Ca²⁺放出が、GABAA 受容体の動きを抑え、GABAA 受容体の安定性を高めることが分かった(*Cell Rep*, 2015)。NMDA 受容体の Ca²⁺流入は GABAA 受容体の動きを促すが、IP₃R 受容体は逆に GABAA 受容体の動きを抑え、Ca²⁺が両方向性制御を担うことが示された。

tDCS によって大脳皮質のアストロサイトの細胞内 Ca²⁺濃度が一過的に上昇することを発見した。tDCS 後に視覚刺激に対するニューロン応答が大きくなりシナプス伝達の増強が起こることを見出した。一方、IP₃R2 欠損マウスでは tDCS 刺激に対する応答の増強が消失した(*Nature Commun*, 2016)。tDCS はノルアドレナリン放出を促進しアストロサイトの IP₃R2 を介した Ca²⁺上昇を起こしシナプス伝達を増強すると考えられた。

(2) 海馬 LTP における IP₃R の役割

海馬 CA1 シナプスにおける脱長期増強誘導は LTP を誘導した後に低頻度刺激を与えると増大したシナプス伝達効率が元に戻る現象である。本研究では脱長期増強誘導においてプレコンディショニングで活性化される分子メカニズムについて IP₃R が関与することを発見した(*Brain Res*, 2016)。更に、LTP サプレッションの分子メカニズムにも IP₃R が関与することを明らかにした(*Neurosci*, 2015; *Learn Mem*, 2016)。

(3) IP₃R 制御因子の役割

IP₃R を制御する IRBIT が脳内で CaMKII に結合しリン酸化機能を抑制することを発見した(*PNAS*, 2015)。IRBIT 欠損マウスで CaMKII が活性化されドーパミン産生の律速酵素チロシンヒドロキシラーゼのリン酸化を促進し脳内ドーパミン含量を増加させることも明らかとなった。IRBIT 欠損マウスの行動解析は多動障害および過剰接触を示した。更に IRBIT のスプライスバリエントが標的となる標的分子選択性を決める事も明らかにした(*PNAS*, 2017)。

アポトーシスは神経変性の素過程である。MAM(小胞体-ミトコンドリア接触部位)がミトコンドリアへの Ca²⁺流入を担いアポトーシスを制御すると考えられている。ゲノム編集技術を利用し IRBIT 遺伝子を欠損したヒト細胞を作製・解析した結果、IRBIT 欠損細胞はアポトーシスが起りにくく、MAM の構造異常が見られ小胞体-ミトコンドリアへの Ca²⁺流入が低下した(*eLIFE*, 2016)。更に Bcl2l10 が IP₃R の Ca²⁺放出活性を阻害しアポトーシスを抑制すること、IRBIT が Bcl2l10 の抗アポトーシス作用を抑制することを見いだした。IRBIT が MAM の形成や安定化を促進しアポトーシス誘導を調節することを示唆する。

神経細胞において統合失調症関連分子である DISC1 が IP₃R1 の mRNA をシナプスに輸送し制御していることを解明した(*Nature Neurosci*, 2015)。DISC1 は統合失調症多発家系を用いた解析により同定された遺伝子である。本研究では、DISC1 欠損マウスを用いて DISC1 が IP₃R1 などのシナプス制御タンパク質をコードする mRNA と直接結合し、シナプスへの RNA 輸送を制御しているこ

とを解明した。DISC1 と mRNA の結合が LTP に不可欠であることも見出した。LTP の形成には RNA 顆粒により mRNA が樹状突起と輸送されるが、RNA 顆粒の構成因子 RNG105 を胎仔期後期以降、脳で欠損させた RNG105 コンディショナル欠損 (cKO) マウスを作製し、mRNA を神経細胞から長く伸びた樹状突起へ局在化させる因子、RNG105 が必須であることを明らかにした (*eLIFE*, 2017)。

細胞内の小胞体に存在し、IP₃R を制御する ERp44 が血圧制御に重要な役割を果たすことを発見した (*Mol Cell*, 2015)。分泌/膜タンパク質は、リボソームで合成され小胞体内腔に入り折り畳まれる。ERp44 を欠損させたマウスを作成し解析した結果、ERp44 欠損マウスでは、血圧を上げる作用を持つアンジオテンシン II の安定性が野生型マウスに比べて減少し低血圧を示した。野生型マウスでは、アンジオテンシン II を分解する ERAP1 が ERp44 とジスルフィド結合して小胞体内腔に保持されるが、ERp44 欠損マウスでは ERAP1 が内腔に保持されず細胞外に分泌され血中のアンジオテンシン II が分解し低血圧を起こすことを解明した。敗血症モデルでは ERp44-ERAP1 が増加し血圧低下を抑制することが明らかとなった。

IP₃R を制御する新しいアロステリック機構を発見しその阻害メカニズムを解明した (*PNAS*, 2014)。IP₃R に作用してアロステリック変化を阻害する酵素を探索しタンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼを同定した (特許取得済み, 日本/米国)。これが IP₃ 受容体のサブユニット間を架橋しアロステリック変化を阻害することを発見した。この制御がオートファジーに関与することも明らかにした。神経変性疾患のリンパ球やモデルマウスなどの実験で、この阻害メカニズムが神経変性に関与することが示唆された。

ATP 依存的に Ca²⁺イオンを小胞体に濃縮するポンプである SERCA2b の小胞体内腔部位にはレドックス (酸化還元) 制御を受ける 2 つのシステイン残基が存在し酸化されジスルフィド結合を形成する。本研究ではジスルフィド還元酵素 ERdj5 が、SERCA2b のジスルフィド結合を還元し SERCA2b の Ca²⁺の取り込みを活性化することを見出した (*PNAS*, 2016)。ERdj5 は、小胞体内の Ca²⁺濃度が低いときは、SERCA2b を活性化し、濃度が十分高くなると、SERCA2b から解離して SERCA2b を不活性化した。ERdj5 を介したフィードバック機構が小胞体内 Ca²⁺の恒常性維持機構に寄与することが示唆された。

(4) IP₃-Ca²⁺シグナリングの新しい観察技術

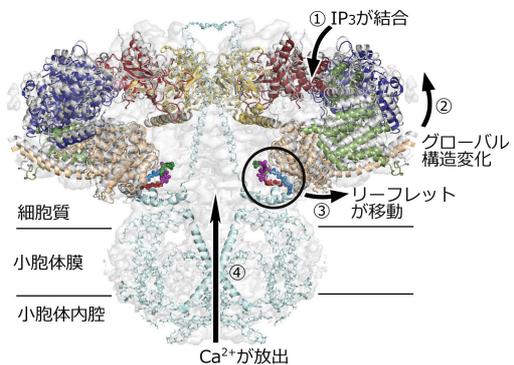
蛍光 Ca²⁺センサー (GCaMP6) をマウス胚神経細胞特異的に発現し体性感覚刺激応答を無麻酔科で長期間記録することに初めて成功した (*Sci Rep*, 2016)。神経応答をマクロ蛍光顕微鏡で観察した結果覚醒時では強い応答が観察できたが、麻酔時ではほぼ観察されなかった。マクロ蛍光顕微鏡で応答が確認された領域を 2 光子顕微鏡で観察した結果、覚醒時に比べ麻酔時ではほとんど確認できなかった。開頭手術後 28 日目と 50 日目に、刺激

を与えた感覚応答地図を比較し感覚応答地図が長期間安定に保持されていることを確認した。

効率的に遺伝子コード型蛍光センサーを開発するために、大腸菌を用いた遺伝子コード型蛍光センサーのハイスループットスクリーニング法を確立した (*Cell Calcium*, 2016 ; 特許出願中)

(5) IP₃R の動作メカニズム

IP₃R の動作原理を、X 線結晶構造解析と変異体の機能解析により解明した (*PNAS*, 2017)。X 線結晶構造解析によって IP₃ 存在下・非存在下と欠失変異体の結晶構造を決定し、IP₃ が結合して生じる構造変化の経路を見いだした。遺伝子操作でこの経路に変異を入れ機能解析を行い、IP₃ 結合部位からチャネル部位までの経路を決定した。ユニークな小葉型構造 (リーフレット) がチャネルを開く構造変化の伝達部位であること分かり、IP₃ が受容体に結合してからチャネルを開けるまでの動作原理を解明した (下図)。今回明らかにしたゲート機構は、IP₃R が関わる疾病の治療や予防に役立つことが期待できる。



5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線) [雑誌論文] (計 96 件)

- 1) Sugawara T, Hisatsune C, Miyamoto H, Ogawa N, Mikoshiba K. "Regulation of spinogenesis in mature Purkinje cells via mGluR/PKC-mediated phosphorylation of CaMKIIbeta." *PNAS* 2017; 114: E5256-E65. doi: 10.1073/pnas.1617270114. 査読あり
- 2) Hamada K, Miyatake H, Terauchi A, Mikoshiba K. "IP₃-mediated gating mechanism of the IP₃ receptor revealed by mutagenesis and X-ray crystallography." *PNAS* 2017; 114(18): 4661-6. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1701420114.
- 3) Kawaai K, Ando H, Satoh N, Yamada H, Ogawa N, Hirose M, Mizutani A, Bonneau B, Seki G, Mikoshiba K. "Splicing variation of Long-IRBIT determines the target selectivity of IRBIT family proteins." *PNAS* 2017; 114(15): 3921-6. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1618514114.
- 4) Tobe BT, (中略), Mikoshiba K, Sidman RL, Halpain S, Haggarty SJ, Goshima Y, Snyder EY. "Probing the lithium-response pathway in hiPSCs implicates the phosphoregulatory set-point for a cytoskeletal modulator in bipolar pathogenesis." *PNAS* 2017; 114(22): E4462-E71. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1700111114.
- 5) Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H. "Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain." *Nature Commun* 2016; 7:11100. 査読あり doi: 10.1038/ncomms11100.
- 6) Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S,

- Nabekura J. "Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain." *J Clin Invest* 2016; 126(5): 1983-97. 査読あり doi: 10.1172/JCI82859.
- 7) Bonneau B, Ando H, Kawaai K, Hirose M, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K. "IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact." *eLIFE* 2016; 5. 査読あり doi: 10.7554/eLife.19896.
- 8) Ushioda R, Miyamoto A, Inoue M, Watanabe S, Okumura M, Maegawa KI, Uegaki K, Fujii S, Fukuda Y, Umitsu M, Takagi J, Inaba K, Mikoshiba K, Nagata K. "Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5." *PNAS* 2016; 113(41): E60 55-63. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1605818113.
- 9) Tsuboi D, Kuroda K, Tanaka M, Namba T, Iizuka Y, Taya S, Shinoda T, Hikita T, Muraoka S, Iizuka M, Nimura A, Mizoguchi A, Shiina N, Sokabe M, Okano H, Mikoshiba K, Kaibuchi K. "Disrupted-in-schizophrenia 1 regulates transport of ITPR1 mRNA for synaptic plasticity." *Nature Neurosci* 2015; 18(5): 698-707. doi: 10.1038/nn.3984 査読あり
- 10) Hisatsune C, Ebisui E, Usui M, Ogawa N, Suzuki A, Mataga N, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K. "ERp44 Exerts Redox-Dependent Control of Blood Pressure at the ER." *Mol Cell* 2015; 58(6): 1015-27. 査読あり doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.008.
- 11) Tohmonda T, Yoda M, Iwawaki T, Matsumoto M, Nakamura M, Mikoshiba K, Toyama Y, Horiuchi K. "IRE1alpha/XBP1-mediated branch of the unfolded protein response regulates osteoclastogenesis." *J Clin Invest* 2015; 125(8): 3269-79. 査読あり doi: 10.1172/JCI76765.
- 12) Bannai H, Niwa F, Sherwood MW, Shrivastava AN, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Levi S, Triller A, Mikoshiba K. "Bidirectional Control of Synaptic GABAAR Clustering by Glutamate and Calcium." *Cell Rep* 2015; 13(12): 2768-80. 査読あり doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.002.
- 13) Kawaai K, Mizutani A, Shoji H, Ogawa N, Ebisui E, Kuroda Y, Wakana S, Miyakawa T, Hisatsune C, Mikoshiba K. "IRBIT regulates CaMKIIalpha activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation." *PNAS* 2015; 112(17): 5515-20. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1503310112.
- 14) Klar J, Hisatsune C, Baig SM, Tariq M, Johansson AC, Rasool M, Malik NA, Ameer A, Sugiura K, Feuk L, Mikoshiba K, Dahl N. "Abolished InsP3R2 function inhibits sweat secretion in both humans and mice." *J Clin Invest* 2014; 124(11): 4773-80. 査読あり doi: 10.1172/JCI70720.
- 15) Hamada K, Terauchi A, Nakamura K, Higo T, Nukina N, Matsumoto N, Hisatsune C, Nakamura T, Mikoshiba K. "Aberrant calcium signaling by transglutaminase-mediated posttranslational modification of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." *PNAS* 2014; 111(38): E3966-75. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1409730111.
- 16) 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. "Irbt mediates synergy between Ca²⁺ and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice." *Gastroenterology* 2013; 145(1): 232-41. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.047. 査読あり
- 17) Sugawara T, Hisatsune C, Le TD, Hashikawa T, Hirono M, Hattori M, Nagao S, Mikoshiba K. "Type 1 inositol trisphosphate receptor regulates cerebellar circuits by maintaining the spine morphology of purkinje cells in adult mice." *J Neurosci* 2013; 33(30): 12186-96. 査読あり doi:10.1523/JNEUROSCI.0545-13.2013
- [学会発表] (計 92 件)
(招待講演 58 件/国際学会 48 件)
- 1) **Gordon Research Conference** [招待講演] 2018, Ventura, CA, 米国, Mikoshiba K
- 2) **Nobel Forum mini-symposium on Brain Aging** [招待講演] 2017, スウェーデン, Mikoshiba K
- 3) **28th Ion Channel Meeting**, [特別講演] 2017, Sète, France, Mikoshiba K
- 4) **38th Congress of the International Union of Physiological Sciences-IUPS 国際生理科学連合大会**, 2017 [基調講演], ブラジル, Mikoshiba K
- 5) **Cutting edge Concepts in Calcium Signaling Symposium** Saarland University, [特別講演] 2016, ハンブルグ, ドイツ, Mikoshiba K
- 6) **FASEB Science Research Conference** [招待講演] 2016, ポルトガル, Mikoshiba K
- 7) **The Dr. Martin Rodbell Memorial Lecture** 2013 (The National Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS, NIH) North Carolina, 米国 [招待講演], Mikoshiba K
- [図書] (計 3 件)
- [産業財産権]
出願状況 (計 6 件)
取得状況 (計 10 件)
名称: 神経細胞の伸長制御方法
発明者: 御子柴克彦 樺山 博之
権利者: 理化学研究所, 番号: US9314501B2
出願年月日: 平成 28 年 4 月 19 日
国内外の別: 米国
- [その他]
- 1) 平成 29 年 8 月 48 回国際生理科学連合の国際理事に選出
- 2) 平成 26 年 [TBS テレビ] 「最新脳科学ミステリー」生命 38 億年スペシャル「人間とは何だ」(4 時間番組) 総編集: 御子柴克彦
- 3) 平成 25 年 12 月 レジオン・ドヌール勲章シュヴァリエ (フランス国)
- 4) 平成 25 年 6 月 国際抗酸化学会特別賞(パスツール研究所・フランス国)
- [研究室ホームページ]
http://www.riken.jp/research/labs/cbs/dev_neurobiol/
6. 研究組織
(1) 研究代表者
御子柴 克彦 (Mikoshiba Katsuhiko)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号: 30051840