

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26830051

研究課題名(和文)成熟小脳において神経回路を維持する1型IP3受容体を介した新たな制御メカニズム

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of IP3R1-mediated maintenance of cerebellar synaptic circuits in adults.

研究代表者

菅原 健之 (Sugawara, Takeyuki)

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・研究員

研究者番号：70584522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経軸索と興奮性シナプスを形成する樹状突起スパインの形態が正常にされることは、脳がその高次機能を発揮するために不可欠である。本研究では、成熟小脳のプルキンエ細胞において、1型イノシトール3リン酸受容体(IP3R1)の下流で活性化されたプロテインキナーゼC(PKC)により2型カルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素b(CaMKIIb)がリン酸化されること、さらにこのリン酸化シグナルがスパイン形態を制御するのに重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dendritic spines of neurons are postsynaptic sites receiving excitatory inputs from neuronal axons. Maintenance of proper distribution and morphology of spines in neurons underlies critical aspects of brain functions. In this study, we found that Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II b isoform (CaMKIIb) was phosphorylated by protein kinase C (PKC) under type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R1) signaling in cerebellar Purkinje cells, and which was involved in controlling the maintenance of Purkinje cell spines in mature cerebellum.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 プルキンエ細胞 スパイン イノシトール3リン酸受容体 細胞骨格

## 1. 研究開始当初の背景

我々の脳では、数千億個の神経細胞がシナプスを介して結合し、神経回路を形成している。興奮性シナプスは主に、神経細胞の樹状突起上にある無数のスパインと呼ばれる小さな突起に形成される。スパインにはグルタミン酸などの神経伝達物質に対する受容体が存在し、ほかの神経細胞から情報を受け取る部位であることから、記憶や学習など高次脳機能に極めて重要な構造である。また、統合失調症や自閉症などのさまざまな神経疾患においてスパインの形や数に異常が見られることから、神経疾患とスパインの形成を制御するメカニズムとの関連が注目されている。そのため、神経細胞のスパインがどのように制御されるのかを知ることは、脳機能の発現メカニズムや神経疾患の病態の解明において重要な課題となっている。このスパインは生後の発達に伴って形成され、神経回路が完成した成熟後は安定な構造になり、発達期にできた神経回路を維持するようになるが、近年の研究により、発達期のスパイン形成メカニズムが明らかになっていく一方で、成熟後の脳ではどのようなメカニズムでスパイン形態が維持されているのか、については十分に明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、小胞体膜上のカルシウムチャンネルであり、プルキンエ細胞に特に豊富に発現する 1 型イノシトール 3 リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R1) が、成熟小脳においてプルキンエ細胞のスパイン形成・維持に必須な分子であることを明らかにしている (Sugawara et al., J. Neurosci., 2013)。そこで本研究では、IP<sub>3</sub>R1 が如何にしてプルキンエ細胞のスパイン形成・維持を制御しているのか、その詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) PKC による CaMKIIβ のリン酸化の解析

2 型カルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素β (CaMKIIβ) は、アクチン繊維に結合し、アクチン繊維を束化・安定化することでスパインの形を制御する分子である。神経細胞内のシグナル伝達系において IP<sub>3</sub>R1 の主要な下流因子であるプロテインキナーゼ C (PKC) が CaMKIIβ をリン酸化するかを検討した。PKC 及び CaMKIIβ の精製タンパク質を用いた *in vitro* kinase reaction を行い、Phos-tag PAGE 及びウェスタンブロット法により解析した。また、リン酸化 CaMKIIβ を特異的に認識する抗体を作製し、これを用いて小脳神経細胞の分散培養系や小脳急性スライスで内在性タンパク質のリン酸化状態の変動をウェスタンブロット法及び免疫染色法により解析した。

### (2) リン酸化による CaMKIIβ のアクチン繊維結合・束化能への影響の解析

野生型及びリン酸化型変異 CaMKIIβ の精製タンパク質を用いた *In vitro* co-sedimentation assay 及び培養細胞発現系を使用して、PKC によるリン酸化が CaMKIIβ のアクチン繊維結合・束化能に及ぼす影響を解析した。

### (3) リン酸化による CaMKIIβ のプルキンエ細胞のスパイン形成への影響の解析

リン酸化型変異または非リン酸化型変異を導入した CaMKIIβ を EGFP と共に小脳スライス培養系のプルキンエ細胞に遺伝子銃を用いて発現させ、CaMKIIβ のリン酸化状態の変化がプルキンエ細胞のスパイン形態形成に及ぼす影響を形態学的に解析した。

### (4) IP<sub>3</sub>R1 欠損マウスのプルキンエ細胞におけるスパイン形態形成異常における CaMKIIβ リン酸化の関与の解析

IP<sub>3</sub>R1 欠損マウスの小脳に、CaMKIIβ とアクチン繊維の結合を阻害する薬物を浸透圧ポンプにより持続的に投与し、IP<sub>3</sub>R1 欠損によるスパイン形態形成の異常が回復するかを形態学的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) PKC による CaMKIIβ のリン酸化の解析

まず、IP<sub>3</sub>R1 を介したスパイン形態形成の制御機構において、IP<sub>3</sub>R1 の下流で関与し得る細胞内情報伝達系の探索を行った。本研究では特に PKC と CaMKIIβ に着目して研究を行った。精製タンパク質を用いた *In vitro* kinase assay の結果、PKC が CaMKIIβ を直接リン酸化することが分かった。また、小脳神経細胞の培養系や小脳スライスを用いて、PKC 活性化剤によりプルキンエ細胞の CaMKIIβ のリン酸化が亢進することが分かった。さらに、この PKC による CaMKIIβ のリン酸化反応は、神経刺激により亢進し、IP<sub>3</sub>R1 が欠損したプルキンエ細胞では欠失していることが明らかになった。

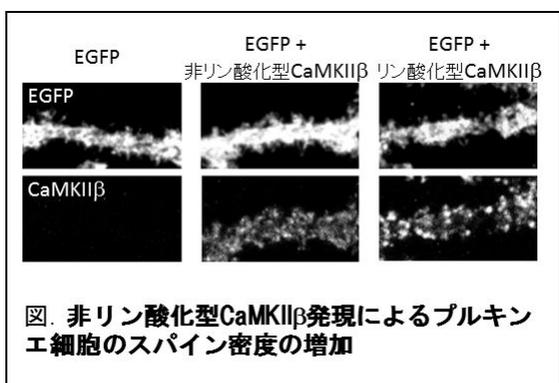
### (2) リン酸化による CaMKIIβ のアクチン繊維結合・束化能への影響の解析

CaMKIIβ は、スパイン内アクチン繊維を束化・安定化することでスパインの形を制御する分子であることから、次に、PKC によるリン酸化が CaMKIIβ のアクチン制御分子としての機能に及ぼす影響を調べた。リン酸化型変異 CaMKIIβ を用いた *In vitro* co-sedimentation assay の結果、リン酸化により CaMKIIβ のアクチン繊維束化能が阻害されることが分かった。また、HeLa 細胞への発現系を用いて、CaMKIIβ とアクチン繊維の結合を解析したところ、PKC でリン酸化されることにより、CaMKIIβ とアクチン繊維の

結合が阻害されることも分かった。

### (3) リン酸化による CaMKIIβのプルキンエ細胞のスパイン形成への影響の解析

さらに、この CaMKIIβのリン酸化状態の変化がプルキンエ細胞のスパイン形態形成に及ぼす影響について、小脳スライス培養系を用いて検討した。リン酸化型変異または非リン酸化型変異 CaMKIIβをプルキンエ細胞に発現させ、スパイン密度の変化を解析した。その結果、プルキンエ細胞に非リン酸化型 CaMKIIβを発現させることにより、IP<sub>3</sub>R1 欠損プルキンエ細胞と同様のスパインの形態異常(スパインの密度増加、伸長)が起こることが分かった。これに対し、リン酸化型を発現させた細胞ではこの効果は観察されなかった(図)。この結果は、IP<sub>3</sub>R1 の欠損による CaMKIIβのリン酸化反応の欠失がスパイン形態の異常に関与していることを示唆している。



### (4) IP<sub>3</sub>R1 欠損マウスのプルキンエ細胞におけるスパイン形態形成異常における CaMKIIβリン酸化の関与の解析

上記の結果から、IP<sub>3</sub>R1 が欠損したことにより起こるプルキンエ細胞のスパイン形態形成異常には、PKC によるリン酸化を介した CaMKIIβ-アクチン繊維の制御機構が消失していることが関与していると思われる。そこで、IP<sub>3</sub>R1 欠損マウスの小脳に CaMKIIβ-アクチン繊維の結合を阻害する薬物を投与することで、スパイン形態形成異常が回復するのかを検討した。その結果、阻害剤の投与により、IP<sub>3</sub>R1 欠損マウスのスパイン形態異常が野生型マウスと同様のレベルまで回復することが分かった。

以上より、成熟後の小脳プルキンエ細胞では、IP<sub>3</sub>R1-PKC シグナルによる CaMKIIβのリン酸化状態の変化がスパイン内のアクチン繊維の安定性を制御しており、スパインの形態を正しく制御するのに重要であるという、全く新たな機構を明らかにすることが出来た。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Takeyuki Sugawara, Chihiro Hisatsune, Le Dinh Tung, Tsutomu Hashikawa, Moritoshi Hirono, Soichi Nagao and Katsuhiko Mikoshiba.

IP<sub>3</sub>R1 regulates cerebellar circuits by maintaining the spine morphology of Purkinje cells in adult mice.

第 37 回日本神経科学会 2014.9.11-13 パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

〔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

菅原 健之 (Takeyuki Sugawara)

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・研究員

研究者番号：70584522

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：