

論文の内容の要旨

論文題目 Regulatory mechanism of lateral diffusion of IP₃ receptor type 1
in neuronal dendrites

和訳 神経細胞樹状突起における IP₃ 受容体タイプ 1 の拡散制御

指導教員 御子柴克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 深津 和美

[緒言]

細胞内カルシウム (Ca²⁺) は細胞内メッセンジャーとして、様々な細胞機能に重要な役割を果たしている。細胞内 Ca²⁺は細胞外からの流入に加え、細胞内の Ca²⁺貯蔵部位である小胞体から放出されることにより供給される。小胞体からの Ca²⁺放出を担うチャネルの一つにイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) 受容体 (IP₃ 受容体) がある。IP₃ 受容体は細胞外刺激によって産生される IP₃ と特異的に結合して活性化され、Ca²⁺を放出する。この IP₃ 受容体を介した Ca²⁺シグナルは受精、細胞増殖、発生、筋収縮、分泌、シナプス可塑性など様々な生命機能に必須である。

IP₃ 受容体は 4 量体を形成し、3 種類のアイソフォーム IP₃ 受容体タイプ 1, 2, 3 (IP₃ 受容体 1、IP₃ 受容体 2、IP₃ 受容体 3) が存在する。IP₃ 受容体 2、IP₃ 受容体 3 は様々な細胞種にユビキタスに発現している。IP₃ 受容体 1 は中枢神経系、特に小脳プルキンエ細胞に強く発現している。IP₃ 受容体 1 欠損ミュータントマウスでは重篤な運動失調が見られる。また神経細胞では、IP₃ 受容体 1 からの局所的な Ca²⁺放出が神経突起伸長、海馬の長期増強の維持、小脳の長期抑圧の誘導に必要な不可欠であることが明らかになっている。しかし、Ca²⁺貯蔵庫である小胞体自身は神経細胞全体に一様に張り巡らされており、特定の部位

で局所的におこる Ca^{2+} 放出がどのように空間的に制御されているのかは、未だに明らかにされていない。

近年、生きた細胞内でタンパク質の動態をリアルタイムで観察することにより、神経伝達物質受容体の形質膜上での側方拡散が神経活動依存的に変化し、受容体のシナプスへの局在を促すことを示唆する結果が報告されている。そして、この側方拡散制御がシナプス可塑性の誘導に関わる可能性も指摘されている。

そこで、私は IP_3 受容体 1 も小胞体膜上でダイナミックに動態を変化させており、しかもその動態を制御する機構が存在するのではないかとの仮説を立て、 IP_3 受容体 1 の小胞体膜上での側方拡散とその制御機構の解析を行った。

[結果]

1) 小胞体膜における IP_3 受容体 1 の側方拡散

ラット海馬の初代培養神経細胞に、 IP_3 受容体 1 の GFP 融合タンパク質を発現させ、樹状突起の小胞体膜上における IP_3 受容体 1 の側方拡散を、共焦点顕微鏡下で蛍光退色後回復法 (FRAP 法) により解析した。比較対照として小胞体膜上の Ca^{2+} ポンプである SERCA の GFP 融合タンパク質も同様に観察した。その結果 IP_3 受容体 1、SERCA 共に小胞体膜上を拡散していることが明らかとなった。さらにこれまで二次平面での培養細胞の小胞体膜上のタンパクに対して使われてきた拡散定数の計算式を、神経細胞の樹状突起という管状の構造に適用する新しい解析方法を確立し、 IP_3 受容体 1、SERCA の拡散定数を求めた。その結果 IP_3 受容体 1 の拡散定数は SERCA に比べて有意に小さいことが明らかとなった。

2) IP_3 受容体 1 の拡散制御機構の解明

2-1) アクチン骨格による IP_3 受容体 1 の拡散制御

細胞膜上のタンパクの拡散の制御には細胞骨格、特にアクチンが関与していることが明らかになっている。 IP_3 受容体 1 の拡散定数は SERCA に比べて有意に小さいことから、 IP_3 受容体 1 の拡散制御には細胞骨格が関与している可能性が考えられた。そこで、微小管を脱重合させる薬剤処理を行った所、 IP_3 受容体 1、SERCA 共に拡散定数が減少した。これより微小管は小胞体膜上のタンパクの動態に関与する可能性が示唆された。またアクチンの関与について解析

した所、IP₃受容体 1 の拡散定数はアクチンを脱重合すると増加し、安定化すると減少する結果が得られた。SERCA については拡散定数の変化は見られなかった。これよりアクチンを介した IP₃受容体 1 特異的な拡散制御機構が存在し、アクチンは IP₃受容体 1 の拡散を抑制する方向に働いていると予想された。

2-2) 4.1N タンパクによる IP₃受容体 1 の拡散制御

アクチンと IP₃受容体 1 が直接結合することは知られていないので、拡散の制御にはアクチンと IP₃受容体 1 をつなぐリンカータンパクの存在が考えられた。

リンカータンパクの候補として、IP₃受容体 1 結合タンパクである 4.1N が挙げられた。4.1N は膜骨格タンパクである 4.1 タンパクの神経型ホモログであり、海馬を含む中枢神経系の神経細胞に発現していることが分かっている。4.1N はアクチン-スペクトリン結合配列を持っており、4.1N の C 末端 (CTD) が IP₃受容体 1 の C 末端細胞質内領域に結合する。また 4.1N は犬腎臓上皮細胞由来の MDCK 細胞において IP₃受容体 1 の側底膜領域へのトランスロケーションに関与することが明らかになっている。

そこで 4.1N が IP₃受容体 1 の拡散に関与しているか明らかにするために、以下の実験を行った。IP₃受容体 1 との結合領域は持っているが、アクチン-スペクトリン結合配列を欠損させたドミナントネガティブ型(4.1N-CTD)を作成し、海馬神経細胞に IP₃受容体 1 と共発現させた。その結果、IP₃受容体 1 の拡散定数が増加した。これは 4.1N-CTD が IP₃受容体 1 と内在性 4.1N との結合を競合阻害したことにより、IP₃受容体 1 がアクチンによる拡散制御を受けることができなくなったためであると考えられた。この結果は、アクチンによる IP₃受容体 1 の拡散制御には 4.1N がリンカータンパクとして働いている可能性を示唆している。

次に IP₃受容体 1 内の 4.1N 結合配列が拡散制御に関与しているかどうか検討した。IP₃受容体 1 の 4.1N 結合配列として IP₃受容体 1 の C 末端 14 アミノ酸 (CTT14aa) が同定されている。そこで IP₃受容体 1 の CTT14aa を欠損したミュータントを発現させ、拡散を解析した所、IP₃受容体 1 よりも拡散定数が有意に大きいことが分かった。また CTT14aa 配列のペプチドを過剰発現させると、IP₃受容体 1 の拡散定数が有意に増加した。さらに IP₃受容体 1 の CTT14aa が拡散の制御に関与していることを確認するために以下の実験を行った。IP₃受容体

のサブタイプの一つである IP₃ 受容体 3 は分子量は IP₃ 受容体 1 とほぼ同じであるが、4.1N には結合しないことが明らかとなっている。そこで IP₃ 受容体 3 についても海馬神経細胞での拡散の解析を行ったところ、IP₃ 受容体 3 の拡散定数は IP₃ 受容体 1 に比べて有意に大きいことが明らかとなった。次に IP₃ 受容体 3 に CTT14aa をつないだキメラタンパク (IP₃ 受容体 3-CTT14aa) を作成した。IP₃ 受容体 3-CTT14aa は、4.1N と結合する性質を持つようになり、拡散定数が IP₃ 受容体 1 と同程度まで減少した。またアクチンの脱重合実験により、IP₃ 受容体 3-CTT14aa の拡散定数は有意に増加した。これは、IP₃ 受容体 3-CTT14aa がアクチンによる拡散制御を受けるようになったためであると考えられる。これより CTT14aa は IP₃ 受容体 1 の拡散制御に関与していることが明らかとなった。

また IP₃ 受容体 1 の 4.1N 結合配列として CTT14aa 以外に C 末端細胞質内中間領域 (CTM1) が報告されているので、この配列が IP₃ 受容体 1 の拡散制御に関与しているかどうかを検討した。CTM1 配列のペプチドを過剰発現させると CTT14aa 配列の過剰発現実験と同様に、IP₃ 受容体 1 の拡散定数が有意に増加した。

以上の結果より、神経細胞の樹状突起ではアクチン骨格と 4.1N による IP₃ 受容体 1 特異的な拡散制御機構が存在する可能性が示された。

[結論]

本研究では神経細胞樹状突起において IP₃ 受容体 1 の小胞体膜上での側方拡散とその制御機構の分子メカニズムを詳細に解析した。その結果、小胞体膜上のタンパクである IP₃ 受容体 1 は、その拡散が制御されていること、またその制御にはアクチン骨格系が関与しており、さらに IP₃ 受容体 1 結合タンパクとして同定された 4.1N がアクチンと IP₃ 受容体 1 をつなぐリンカータンパクとして働いていることを明らかにした。これは小胞体膜上でもタンパクの拡散制御機構が存在することを示した新しい知見である。

神経細胞においては IP₃ 受容体 1 からの時間的・空間的に制御された Ca²⁺ 放出が、様々な神経活動に重要な役割を持っている。この Ca²⁺ 放出の空間的な制御に、本研究により明らかにされた IP₃ 受容体 1 の拡散制御機構が深く関わっている可能性が考えられる。