

論文の内容の要旨

論文題目 小脳プルキンエ細胞樹状突起スパイン形態形成に果たす 1 型 IP₃ 受容体の役割の解明

指導教員 真鍋俊也 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 菅原 健之

[序論]

イノシトール 3 リン酸受容体 (IP₃R) は細胞外の刺激に応じて産生される IP₃ をリガンドとする Ca²⁺チャネルである。小胞体膜上に局在する IP₃R は、細胞外の刺激に応じて小胞体から Ca²⁺を放出し細胞内 Ca²⁺濃度を制御している。IP₃R には 3 つのサブタイプが同定されており、1 型 IP₃R (IP₃R1) は中枢神経系の神経細胞に広く分布しており、特に小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する。これまでに、IP₃R1 ノックアウトマウスがてんかん様発作や小脳失調を示すことや、小脳における長期抑圧現象が消失していること、プルキンエ細胞樹状突起の形態異常を示すことが報告されており、IP₃R1 が小脳の神経機能に重要な役割を果たしていることが分かる。しかし、IP₃R1 ノックアウトマウスは生後 20 日前後で死亡してしまうことから、成熟後の脳において IP₃R1 が果たす役割は明らかにされていない。また、IP₃R1 は小脳においてプルキンエ細胞以外に顆粒細胞などにも発現しており、IP₃R1 ノックアウトマウスで観察された異常がプルキンエ細胞以外の細胞の IP₃R1 欠損に起因することも考えられることから、プルキンエ細胞の IP₃R1 が小脳の生理機能に果たす役割についても明らかにされていない。

そこで本研究では、プルキンエ細胞特異的に IP₃R1 を欠損するマウスを用いて、プルキンエ細胞の IP₃R1 が果たす役割を明らかにすることを目的とした。

[結果]

1) プルキンエ細胞特異的 $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスの小脳失調症状

プルキンエ細胞の IP_3R1 が果たす生理的役割を明らかにするために、 IP_3R1 タンパク質の翻訳開始メチオニンを含むエクソン3の両端に Cre 組換え酵素の認識配列 loxP を挿入したアレルをもつ IP_3R1^{flx} マウスと、プルキンエ細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する $L7^{Cre}$ トランスジェニックマウスを交配することにより、プルキンエ細胞特異的 IP_3R1 欠損 ($IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$) マウスを作成した。まず、ウェスタンブロット法及び免疫染色法を用いた解析により、 $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスではプルキンエ細胞特異的に IP_3R1 発現が消失していることが確認された。次に発達段階における IP_3R1 の発現について解析したところ、3週齢の $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスでは、 IP_3R1 の発現がほとんど減少していなかったが、6週齢以降になると大部分のプルキンエ細胞において IP_3R1 の発現が消失することがわかった。

これまでに、全身で IP_3R1 が欠損する Total IP_3R1 ノックアウトマウスがてんかん様発作と小脳失調を示すことが報告されているが、 $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスはてんかん様発作を示さず、重篤な小脳失調のみが観察された。この小脳失調は IP_3R1 の発現が消失する6週齢より観察され、週齢が進み IP_3R1 の発現が減少するにしたがって重篤化していった。このことから、プルキンエ細胞の IP_3R1 は、成熟動物において小脳の生理機能である協調運動の制御に必須であることがはじめて明らかになった。

2) $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞樹状突起スパインの形態形成異常

小脳失調を示すミュータントマウスでは、小脳の萎縮やプルキンエ細胞の脱落を伴うものが多く知られている。そこで、重篤な小脳失調を示す $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスの小脳皮質の形態について解析を行った。その結果、 $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスでは小脳の萎縮やプルキンエ細胞の脱落は観察されなかった。次に、プルキンエ細胞の IP_3R1 欠損がプルキンエ細胞の形態に与える影響を検討するために、プルキンエ細胞を Golgi 染色法により可視化した。その結果、10週齢のコントロールマウス ($IP_3R1^{flx/flx}$) のプルキンエ細胞は良く発達した樹状突起を形成しているのに対し、 $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞では、樹状突起の分岐が著しく減少していた。さらに、非常に興味深いことに10週齢の $IP_3R1^{flx/flx};$

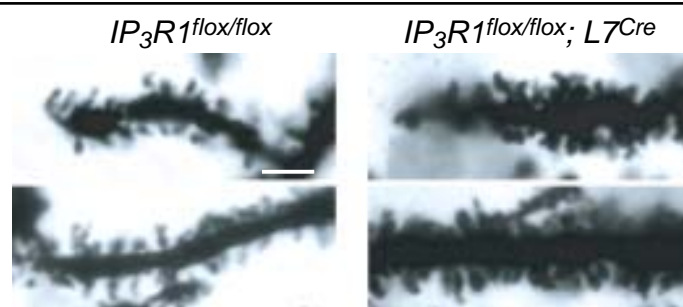


Fig. 1 $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスプルキンエ細胞樹状突起スパイン密度の増加

10週齢の $IP_3R1^{flx/flx}$ 及び $IP_3R1^{flx/flx}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞樹状突起スパインの形態 (スケールバー : 10 μ m)

$L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞樹状突起スパインの密度が $IP_3RI^{flox/flox}$ マウスに比べて2倍以上に増加していることを明らかにした (Fig. 1)。一方、 IP_3R1 がほとんど減少していない3週齢のマウスでは、 $IP_3RI^{flox/flox}$ マウスと $IP_3RI^{flox/flox}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞樹状突起スパインの密度に有意な差は見られなかった。これらの結果から、プルキンエ細胞の IP_3R1 は樹状突起スパインの正常な密度を維持するのに働いていることが示唆された。

3) プルキンエ細胞の樹状突起スパイン形態形成制御への CaMK II 活性の影響

カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (CaMK) は、シナプスにおける Ca^{2+} シグナルの重要なエフェクター分子である。海馬の神経細胞において CaMK ファミリーの一つである CaMK II が樹状突起スパインの形態形成の制御に重要な役割を果たしていることが知られている。一方プルキンエ細胞では、CaMK II が樹状突起スパインの形態形成の制御に関わっているかは未だ不明である。そこで、CaMK II の阻害剤である KN-93 を用いて CaMK II 活性の阻害がプルキンエ細胞樹状突起スパインの形態形成に与える影響を小脳培養細胞レベルで検討した。その結果、KN-93 処理によりプルキンエ細胞樹状突起スパインの密度がコントロールに比べて有意に減少することを明らかにした。また、形成されている突起の多くはフィロポディア様の細長い突起であった。これらの結果から、プルキンエ細胞においても CaMK II の活性が樹状突起スパインの形態形成の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

4) $IP_3RI^{flox/flox}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞における CaMK II 活性の亢進

CaMK II のサブタイプ (α , β , γ , δ) のうち、特に CaMK II α は小脳においてプルキンエ細胞特異的に発現している。そこで、 $IP_3RI^{flox/flox}; L7^{Cre}$ プルキンエ細胞の CaMK II α の活性化状態を T286 の自己リン酸化レベルを指標として、小脳の lysate を用いたウェスタンブロット法により解析した。その結果、 $IP_3RI^{flox/flox}; L7^{Cre}$ マウスの小脳において、CaMK II α の自己リン酸化レベルが有意に亢進していることを明らかにした。また、免疫組織染色による検討においても、 $IP_3RI^{flox/flox}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞では、CaMK II の自己リン酸化シグナルが強くなっていることが確認された。さらに、この CaMK II 活性の亢進を確認するために、プルキンエ細胞における CaMK II の基質である Homer3 のリン酸化状態について検討したところ、 $IP_3RI^{flox/flox}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞樹状突起スパインにおいて Homer3 のリン酸化レベルが上昇していることが明らかになった。以上の結果から、 $IP_3RI^{flox/flox}; L7^{Cre}$ マウスのプルキンエ細胞では、 IP_3R1 欠損により CaMK II 活性が亢進しており、プルキンエ細胞において IP_3R1 を介したシグナルが CaMK II の活性を抑制的に制御する機構に関与していることが示唆された。

5) プルキンエ細胞における CaMK II 活性の制御機構の解明

プルキンエ細胞における IP_3R1 を介した CaMK II 活性の制御機構を明らかにするために、小脳培養細胞を用いた検討を行った。そのために、 IP_3 - IP_3R1 シグナルの上流に位置し、グルタミン酸で活性化される mGluR1 の阻害剤である MCPG 存在下・非存在下でグルタミン酸刺激を行い、その後の CaMK II の自己リン酸化レベルを解析した。まず、コントロール

として小脳培養細胞をグルタミン酸で刺激したところ、CaMK II の自己リン酸化レベルの上昇が見られた。このCaMK II の自己リン酸化レベルの上昇は、MCPG 存在下でグルタミン酸刺激を行うことにより、さらに増強されることを明らかにした。このことから、プルキンエ細胞において mGluR1-IP₃-IP₃R1 シグナルが神経活動依存的な CaMK II の活性を抑制的に制御していることが示唆された (Fig. 2)。

[結論]

本研究において、プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損マウスが重篤な小脳失調を示すこと及びプルキンエ細胞の樹状突起スパイン密度の増加を示すことを明らかにした。また、プルキンエ細胞の正常な樹状突起スパインの形態制御に CaMK II の活性が重要な働きをすることを明らかにした。さらに、プルキンエ細胞において IP₃R1 を介した細胞内シグナルが CaMK II の活性を抑制的に制御する機構に関与していることを明らかにした。これらの結果から、IP₃R1 による CaMK II の活性制御がプルキンエ細胞樹状突起スパインの形態形成の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

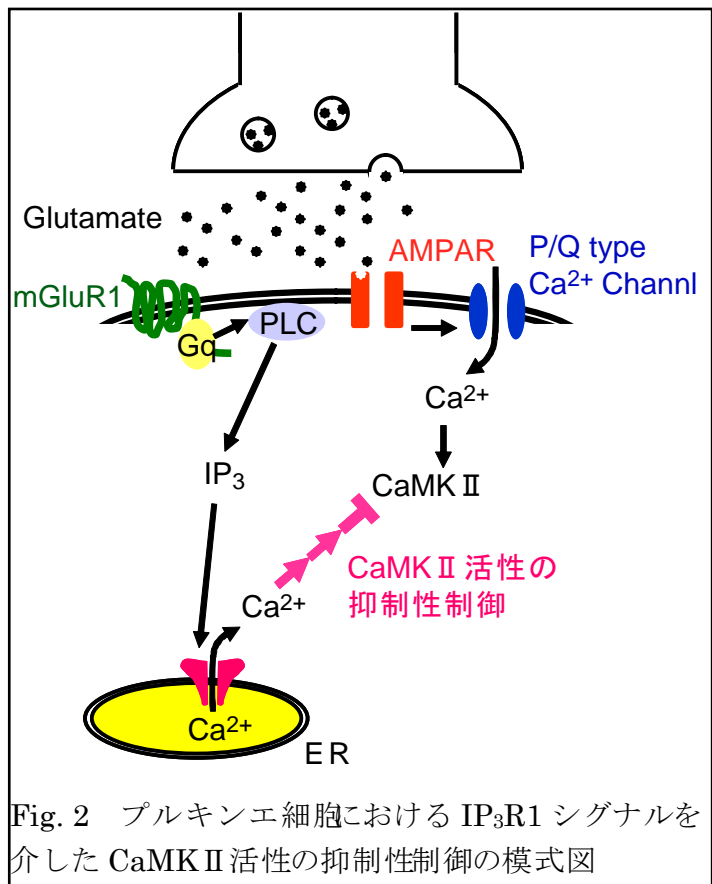


Fig. 2 プルキンエ細胞における IP₃R1 シグナルを介した CaMK II 活性の抑制性制御の模式図