

審査の結果の要旨

氏名 菅原 健之

本研究は、中枢神経系に広く分布し、脳機能に重要な役割を果たしていると考えられる 1 型イノシトール 3 リン酸受容体 (Type1 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor: IP₃R1) の機能を明らかにするために、IP₃R1 が特に豊富に発現している小脳プルキンエ細胞特異的に IP₃R1 を欠損するマウスを作成、解析したものであり、以下の結果を得ている。

1. IP₃R1 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 *IP₃R1^{lox}* 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、目的のプルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損マウスを作成した。このマウスの IP₃R1 の発現について解析したところ、プルキンエ細胞特異的に IP₃R1 の発現が消失していることが確認できた。さらに、プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損マウスの発達段階における IP₃R1 発現について検討したところ、6 週齢以降に大部分のプルキンエ細胞で IP₃R1 の発現が消失することがわかった。
2. これまでに、全身で IP₃R1 を欠損する 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が報告されているが、プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損マウスは、6 週齢より小脳失調のみを示すことがわかった。IP₃R1 ノックアウトマウスが生後 20 日前後で死亡することから、成熟脳において IP₃R1 が果たす生理的役割はこれまで明らかにされていなかったが、本研究により、プルキンエ細胞の IP₃R1 が成熟小脳において、協調運動の制御に必須な分子であることがはじめて明らかにされた。
3. プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損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が、プルキンエ細胞樹状突起形態に異常が観察され、樹状突起の分岐が著しく減少していることがわかった。さらに驚くべきことに、プルキンエ細胞の樹状突起スパイン密度がコントロールマウスに比べて 2 倍異常に増えていることが明らかになった。このことから、プルキンエ細胞の IP₃R1 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働きをしていることが明らかになった。
4. 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 II (CaMK II) は、シナプスにおける重要なエフェクター分子であり、海馬の神経細胞では樹状突起スパインの形態形成制御に重要な分子であることが知られている。本研究では、小脳培養細胞を CaMK II 阻害剤で処理することにより、プルキンエ細胞の樹状突起スパイン密度が減少することを示した。このことから、プルキンエ細胞においても CaMK II を介した樹状突起スパインの形態形成制御機構が存在することが示唆された。
 5. プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 欠損マウスのプルキンエ細胞における CaMK II の活性状態について、CaMK II の T286/287 残基の自己リン酸化を指標として解析を行った。その結果、プルキンエ細胞特異的 IP₃R1 ノックアウトマウスのプルキンエ細胞ではカルシウムチャネルである IP₃R1 が欠損しているにもかかわらず、予想に反して CaMK II の自己リン酸化レベルが亢進していることを明らかにした。さらに、プルキンエ細胞における CaMK II の基質である Homer3 タンパク質のリン酸化レベルがプルキンエ細胞特異的 IP₃R1 ノックアウトマウスのプルキンエ細胞樹状突起スパインにおいて上昇していることを明らかにした。これらの結果から、プルキンエ細胞では IP₃R1 を介したシグナルが CaMK II 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。
 6. 小脳培養細胞を用いた検討により、1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) –IP₃–IP₃R1 シグナルが神経活動依存的な CaMK II の活性化に対して抑制的に働くことを示した。

以上、本論文はプルキンエ細胞の IP₃R1 が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、また、プルキンエ細胞樹状突起スパインの形態形成制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、IP₃R1 を介したシグナルが CaMK II 活性の抑制性制御に関与していることを示し、IP₃R1 が CaMK II 活性の制御を介してプルキンエ細胞樹状突起スパインの形態形成の制御に働いているという全く新しい機構が存在する可能性を示した。本研究は、今後の脳研究の発展に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。