戦略的創造研究推進事業

発展研究

(International Cooperative Research Project Solution Oriented Research for Science and Technology (ICORP-SORST))

カルシウム振動プロジェクト

(Calcium Oscillation Project)

研究終了報告書

(Final Report)

研究期間: 平成 18 年 1 月 1 日~ 平成 23 年 3 月 31 日

独立行政法人 科学技術振興機構

(Japan Science and Technology Agency (JST))

戦略的創造研究推進事業

発展研究

(International Cooperative Research Project Solution Oriented Research for Science and Technology (ICORP-SORST))

カルシウム振動プロジェクト

(Calcium Oscillation Project)

研究終了報告書

(Final Report)

研究期間: 平成 18 年 1 月 1 日~ 平成 23 年 3 月 31 日

独立行政法人 科学技術振興機構

(Japan Science and Technology Agency (JST))

1.	プロジェクトの概要 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
2.	研究実施の概要 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9
3.	研究構想 ••••••9
4.	研究実施内容 ••••••10
5.	研究の成果 ・・・・・・・・・・10
6.	類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ・・・・・25
7.	外部発表投稿集計表 ••••••26
8.	特許出願記録41
9.	研究期間中の主な活動 ・・・・・・・・・・・・42
10.	受 賞42
11.	Selected papers · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
12.	主要論文46
13.	関連論文48
14.	結び83

「発展研究 カルシウム振動プロジェクト」

1. プロジェクトの概要

(1)研究実施場所・所在地

- 平成18年1月1日~平成19年3月31日 東京大学医科学研究所 脳神経発生・分化分野内 〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
- 平成 19年4月1日~平成23年3月31日
 独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター発生神経生物研究チーム内及び研究本館217号室内 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

(事務所・所在地)

- 平成18年1月1日~平成19年3月31日 〒108-0071 東京都港区白金台3-14-4 LBビル8階
- 平成 19 年 4 月 1 日~平成 23 年 3 月 31 日 独立行政法人 理化学研究所 研究本館 217 号室内 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

(2)研究総括

御子柴 克彦

- 平成 18 年 1 月 1 日~平成 19 年 3 月 31 日 東京大学医科学研究所 脳神経発生・分化分野教授
- 平成 19 年 4 月 1 日~平成 23 年 3 月 31 日 独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター発生神経生物研究チーム チームリーダ

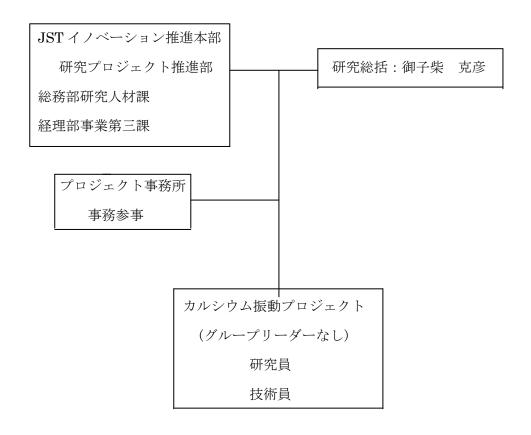
(3)研究期間

平成 18 年 1 月 1 日~平成 23 年 3 月 31 日

(4)研究組織及び人員配置 (グループ制設けず)

		研	究総括:御子柴 克彦	
氏 名	所 属	役 職	研究項目	従事期間
濱田耕造	JST	専任研究員	タンパク質レベルでのカルシウム 振動の発振機構の解明	平成 18 年 1 月~ 平成 23 年 3 月
張松柏	JST	専任研究員	IP3 レセプターの機能を制御する タンパク質の解明	平成 18 年 1 月~ 平成 19 年 10 月
山 崎 美 佳	JST	専任研究員	カルシウムシグナリングに関わる 分子の分子・細胞生理学的解明	平成 18 年 1 月~ 平成 21 年 3 月
樺山博之	理研・BSI 及び JST	兼務研究員及 び専任研究員	Macropinocytosis による神経突起 伸長の制御メカニズムの解明を 主に担当	平成 19 年 6 月~ 平成 19 年 10 月(理研) 平成 19 年 11 月~ 平成 23 年 3 月(JST)
安東 英明	JST	専任研究員	アービットタンパク質の構造 と機能の解析	平成 20 年 11 月~ 平成 23 年 3 月
河 合 克 宏	JST	専任研究員	細胞内カルシウム結合タンパク質 及び IP3 受容体結合タンパク質の 機能解析	平成 21 年 4 月~ 平成 23 年 3 月
山田 義之	JST	専任研究員	細胞内カルシウム動態の機能解析	平成 21 年 4 月~ 平成 23 年 3 月
井上 貴文	東大 医科研	兼務研究員	カルシウム振動の機能解析	平成 18 年 1 月~ 平成 19 年 3 月
中 村 健	順天堂大 医学部	兼務研究員	細胞内のカルシウム振動の機能解析	平成 18 年 1 月~ 平成 18 年 7 月(死亡)
道川貴章	東大 医科研 及び 理研・ BSI	兼務研究員	細胞内のカルシウム振動の機能解析 及びカルシウムシグナリングに関わ る分子の構造・機能解析を主に担当	平成 18年1月~ 平成 18年2月(東大) 平成 19年6月~ 平成 23年3月(理研)
久 恒 智 博	理研・ BSI	兼務研究員	脳におけるイノシトール三リン酸 受容体の役割の解析を主に担当	平成 19 年 6 月~ 平成 21 年 3 月
寺 内 明 子	JST	専任技術員	カルシウム振動の生理応答解析 の支援	平成 18 年 1 月~ 平成 23 年 3 月
戎 井 悦 子	JST	専任技術員	カルシウム振動の生理応答解析 の支援	平成 18 年 1 月~ 平成 19 年 3 月
		(石)	开究員等:延べ 13 名)	
事務所				
清 水 義 則	JST	事務参事	_	平成 18 年 1 月~ 平成 23 年 3 月

(5)研究組織図(グループ制設けず)



(6) 研究計画スケジュール

(6) 研究計画スケンュール							
項目	平. 17 ^を (3 カ	丰度	平成 18 年度	平成 19 年度	平成 20 年度	平成 21 年度	平成 22 年度
① IP ₃ とカルシウムを可視化する技術の開	月発 ←—						
② IP3受容体のチャネル開閉機構の解明	4						-
③ 3種の IP3受容体の IP3 結合親和性の決分子機構の解明	快定の						
④ IP3受容体の構造生物学的解析	4						-
⑤. 新規の代謝系の発見	4						
⑥ 内在性ウワバインによるカルシウム振振及びナトリウム・カリウムポンプK+-ATPase)と IP3受容体の結合部位の	(Na+, ←						
⑦ IP ₃ 受容体を介した BDNF(脳由来神経 因子)の分泌とニューロンの突起伸展の調	4						-
® IP3受容体の阻害剤の開発	•						
⑨ IP3受容体の細胞内トラフィッキングの)研究 ◀						-
⑩ IP3受容体とヒトの疾患	4						—
まとめ							+

(7) 研究予算(年度毎、費目別(*))

(単位:千円)

	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	平成21年度	平成22年度	合計
物品費	25,382	37,687	41,582	62,260	58,181	35,751	260,843
人件費	7,869	43,109	39,733	42,284	50,475	51,762	235,232
旅費	900	2,616	4,496	2,703	2,883	4,005	17,603
その他	798	3,028	1,190	757	461	482	6,716
合 計	34,949	86,440	87,001	108,004	112,000	92,000	520,394
(∗)H17~]	H21年度は実績額	額、H22年度)	は予算額を記述	載。			

(8) 研究設備

(8))研究設備									
符号	管	理番	号		物 品 名	数量	取得年	取得月		
1	995	80	0294	00	マイクロインジェクションシステム カールツアイス社製	1	1995	03		
2	9 5	80	0294	01	本体	1	1995	03		
3	995	80	0294	02	マイクロマニュピレーター		1995	03		
4	995	80	0294	03	トランスジェクター		1995	03		
5	996	80	0092	00	高速フレーム CCDカメラ PXL37米国フォトメトリックス社製	1	1996	02		
6	996	80	0892	00	生体分子分離解析システム	1	1996	10		
7	996	80	0892	01	スマートシステム	1	1996	10		
8	997	80	0061	00	走査型レーザ生物顕微鏡	1	1997	02		
9	997	80	0444	00	高速フレーム冷却CCDカメラ	1	1997	07		
10	997	80	0557	00	走査型レーザ生物顕微鏡	1	1997	08		
11	997	80	0655	00	走査型レーザ生物顕微鏡FLUOVIEW-2P	1	1997	10		
12	998	80	0145	00	走査型レーザ顕微鏡用クリンプトンアルゴンレーザー		1998	03		
13	0 1	20	0047	00	バイオクリーンベンチ(サンヨーM V-B13 1F)		2001	03		
14	001	20	0124	00	電気生理用アンプ(Axoclamp-2B)	1	2001	04		
15	001	20	0125	00	アイソレーションテーブルシステムITS-O (成茂科学器械研究所)	1	2001	04		
16	001	20	0126	00	A/Oインターフェイス(ITC-18)	1	2001	04		
17	001	20	01 7	0	マイクロマニプレータ(米国サッタ―社製 P-285)	1	2001	4		
18	001	20	138	00	マイクロマニプレータ(米国サッタ―社製MP-285)	1	2001	05		
19	001	20	0139	00	ステージ固定式正立顕微鏡(BX50WI-35FL/DIC2-CS)	1	2001	05		
20	001	20	0148	00	CO2インキュベータ(MCO-20AICサンヨー)	1	2001	06		
21	001	20	0149	00	メディカルフリーザー −20℃ (MDF-U536D)	1	2001	06		
2	001	20	0153	0	ヘッドステージ(CV-4)	1	2001	07		
23	001	20	0154	00	パッチクランプアンプ(Axopatch-ID)	1	2001	07		
24	001	20	0155	00	浜松ホトニクス社製 デジタルCCDカメラ C4742-95-12ER-SP)	1	2001	07		
25	001	20	0156	00	Data Cell社製Spapperデジタルカメラ用2mケーブル付(Dig-16-SP)	1	200	07		
26	001	20	0157	0	バイオメトラTグラジェントサーモサイクラー96	1	20 1	07		

						1	1	
28	002	20	0001	00	走査型レーザ顕微鏡用赤外レーザシステム(TP8001)	1	2002	01
29	002	20	0005	00	KrArレーザユニット	1	2002	01
30	002	20	0006	00	顕微鏡本体(BX61WI-F-S) 走査型レーザ顕微鏡仕様	1	2002	01
31	02	20	001	00	超低温槽(VT-78)	1	2 02	02
32	002	20	0014	00	CW-DPSSレーザ発振器(μ Green SML 532nm/50mW)	1	2002	02
33	002	20	0015	00	全反射蛍光顕微鏡システム用YAGレーザ投光管	1	2002	02
34	002	20	0029	00	オリンパスCマウントテレビ変倍装置(U-TVCAC)	1	2002	03
35	02	20	0068	00	オリンパス対物レンズ(Uplan Apo 60XW)	1	20 2	06
36	002	20	00 3	00	蛍光画像解析装置 (Odyssey)	1	2002	09
37	002	20	0077	00	高解像度デジタル/W冷却CCDカメラORCA-ER-1394 C4742-95-12ERG	1	2002	08
38	002	20	0080	00	デジタルカメラインターフェイス(M7791)	1	2002	09
39	002	20	0081	00	AQUACOSMOS用データ解析装置(C7746-1)	1	2002	09
4	002	20	0 89	0	小動物用イソフルレン麻酔器400(Univentor社)	1	2002	10
41	002	20	0090	00	サーマルサイクラー(0.2ml*96本)(PTC-1196) 米国エムジェイ社製	1	2002	10
42	002	20	0091	00	オリンパス対物レンズ(LUMPlan60XW)	1	2002	10
43	002	20	0094	00	高解像度デジタルB/W冷却CCDカメラ ORCA-ER-1394 C4742-95-12ERG	1	2002	1
44	02	20	009	00	バルブコントローラー (VC-66CS)	1	2002	11
45	002	20	0096	00	実験動物人工呼吸器(SN-480-7-10/3)	1	2002	11
46	002	20	0097	00	小動物体温保持装置(BWT-100)	1	2002	11
47	002	20	0098	00	フォーレン気化器	1	2002	11
48	002	20	0101	00	顕微鏡光学系フィルタ切替装置(C8214-XX)浜松ホトニックス㈱製	1	200	12
4	002	2	0 02	00	デジタルカメラインターフェイス (M7791浜松ホトニクス㈱製)	1	2002	12
50	002	20	0103	00	オリンパス電動顕微鏡コントロールボックス(BX-UCB)	1	2002	12
51	003	20	0005	00	ニコン製顕微鏡(E600FN本機)	1	2003	01
52	003	20	0006	00	オリンパス顕微鏡電動落射蛍光投光管(BX-RFAA)	1	2003	01
3	003	20	0007	00	オリンパス75Wキセノンランプ用トランス (AH2-RX-T-100)		2003	01
54	003	20	0008	00	キセノンスタータ(トランス) (75W)	1	2003	01
55	003	20	0009	00	オリンパスカ究用ステージ固定式正立顕微鏡(BX-51) 本体BX51WIF	1	2003	01
56	003	20	0010	00	浜松ホトニクス簡易透過光源シャッター制御ユニット	1	20 3	01
57	003	20	0011	00	トミー精工社製超音波発生機(UR-20P)	1	2003	1
58	00	20	0016	00	高解像度デジタルB/W冷却CCDカメラ(ORCAII-ER)	1	2003	03
59	003	20	0020	00	DAGE-MTIオンチップ精算コントローラー(InvestiGater)	1	2003	02
60	003	20	0021	00	卓上型空気ばね式除振台(AET-0806S(特))	1	2003	02
61	003	20	022	00	対物レンズ(CFI Flour 60×W)	1	2003	02
62	003	2	0024	0	アイソレーションテーブルシステム(ITS FN)	1	2003	02
63	003	20	0025	00	対物レンズ(CFI Plan Apo 100×)	1	2003	02
64	003	20	0026	00	高感度近赤外CCDカメラ(IR-1000)	1	2003	02

65	003	20	0149	00	4ch標準パワーラブシステム	1	2003	04
66	003	0	0153	00	温度コントローラー TC-324B		2003	06
67	003	20	0171	00	ニコン高精度デジタルカメラ DXM1200	1	2003	08
68	003	20	0172	00	TVズームレンズ	1	2003	08
69	003	20	0183	00	炭酸ガス培養装置 MI-IBC	1	2003	09
70	003	20	0198	00	PowerBookG4 15"Combo Drive パーソナルコンピューターApple社製	1	2003	11
71	003	20	0208	00	Power Book G4 15.2 1.25GHz-Jap n	1	200	01
2	03	20	0233	0	ORCA用解析装置	1	2004	02
73	004	20	0001	00	顕微鏡用高NA水浸対物レンズ(LUMFL60×W)	1	2004	02
74	004	20	0002	00	TILL用制御ボード	1	2004	02
75	004	20	0031	00	日新EM社製プラズマイオンボンバーダ (親水性処理装置) PIB-10型	1	2004	04
76	004	20	0051	00	キセノンスタータ 75W	1	004	
7	004	2	0 52	00	堂阪イーエム社製 リニアスライスラーPRO7	1	2004	06
78	004	20	0059	00	浜松ホトニクス製フィルタ切替装置(励起光)C8214-01	1	2004	07
79	004	20	0067	00	ThinkPad X40カスタマイズ、モテ、ル N371225	1	2004	08
80	004	20	0068	00	タイテック社製恒温振とう培養機小型バイオシューカー BR-23FP/MR	1	2004	08
81	004	20	095	00	対物レンズCFI S Fluor 40×H	1	2004	10
82	004	20	0100	00	蛋白質結晶自動観察装置(倒立型)	1	2004	11
83	004	20	0110	00	浜松ホトニックス社製 W-View光学系 A8509-11	1	2004	12
84	005	20	0004	00	タイテック社製恒温振とう培養機 BR-43FL/MR	1	2005	01
85	005	20	0005	00	SANYO社製バイオメディカルフリザー MDF-U537D	1	200	01
86	005	20	00 6	00	Ettan IPGphorII アマシャム	1	2005	01
87	005	20	0018	00	日立 分光蛍光光度計(本体のみ)F-2500	1	2005	02
88	005	20	0036	00	蛍光光度計専用パソコン(FL.Solusionソフト内臓日立ハイテク	1	2005	03
89	005	20	0037	00	浜松ホトニックス社製インターフェースボードM-7791-03	1	2005	03
90	005	2	0038	00	低温ザスサーキュレーターRTE-7 D1エムエス機器	1	2005	0
91	005	77	0014	00	顕微鏡高NAノーカバー水浸対物レンズ XLUM PlanF 120xW	1	2005	05
92	005	77	0015	00	バイオラット 165-1256JA ミニホールグルエリューター	1	2005	06
93	005	77	0016	00	Gene Pulser Xcell CEシステム バイオラット 165266 1J1	1	2005	06
94	005	77	0017	00	ブロックインキュベータ BI-535	1	2005	06
95	005	77	0018	00	モデル785バキュームブロッターシステム (バイオラット・ラボラトリーズ社製)165-U5001	1	2005	06
96	005	77	0019	00	アングルロータ 250ml×6本 TA-13 トミー精工 315	1	2005	06
97	005	77	0020	00	パワーパック3000温度プローブ付	1	2005	06
98	005	77	0031	00	オリンパス(株)全反射蛍光用投光管	1	200	07
99	005	77	00 2	00	日立 高速液体クロマトグラフ LaC hrom Elite KL P-0002	1	2005	07
100	005	77	0058	00	プロテイン分子構造模型 IN4K	1	2005	12
101	005	77	0059	00	プロテイン分子構造模型 IXZZ	1	2005	12
102	006	71	0176	00	対物レンズ CFI S Fluor 40xH	1	2006	02
				<u> </u>	I .	1		

103	006	71	0177	00	対物レンズ CFI S Flu r 40xSH	1	2006	02
104	006	71	0260	00	データ取得解析用コンピュータ PHYSIO-PC	1	2006	03
105	006	71	0261	00	インターフェイス Digidata1322A	1	2006	03
106	006	71	0262	00	光学実験用除振装置	1	2006	03
107	006	71	0263	00	浜松ホトニックス社製 W-View光学系〔Cameleon用〕 A8509-11	1	2006	03
108	006	71	0264	0	浜松ホトニックス社製 高感度デジタル/W冷却CCDカメラ ORCA-AG C4742-80-	1	2006	03
109	006	71	0265	00	オリンハ [°] ス㈱製 超音波リニアモータマイクロマニュヒ [°] ュレータ ON 2 ONU-31P	1	2006	03
110	006	71	0266	00	SUTTER社製 マイクロピペット・プラー P-97	1	20 6	03
111	006	71	0267	00	ライカマイクロシステムズ㈱製 振動刃ミクロトーム VT-1000S	1	2006	03
112	0 6	71	026	0	(㈱ナリシゲ社製 顕微鏡アイソレーションシステム ITS-02	1	2006	03
113	006	71	0331	00	FRET高速高感度システム IX81 オリンパス	1	2006	03
114	006	71	0393	00	タンパク質濃縮・脱塩用システム(GEへルスケアバイオサイエンス社製)	1	2006	06
115	006	71	0444	00	パソコン Let's note R5	1	2006	07
116	006	71	0445	00	バイオ光度計(日立ダイオードアレー型) U-0080D	1	2006	7
117	006	71	0509	00	マイクロロトフォアセル (BIO-RAD社製、170-2800)	1	2006	09
118	006	71	0550	00	Experion 電気泳動ステーション(プライミングステーション付)	1	2006	10
119	006	71	05 1	00	解析用PC(Experionソフトウェウ) BIO-RAD社製	1	2006	10
120	007	1	0163	00	MJ Mini サーマルサイクラー (バイオラット PTC1148)	1	2007	03
121	007	71	0171	00	フィジオテック社製シールドボックス TypeE	1	2007	05
122	007	71	0172	00	Warner Instruments社製 ヒーターコントローラーTC-324B	1	2007	05
123	007	71	0 88	00	3次元マイクロマニピュレーター NMN-25	1	2007	07
124	007	71	01 9	00	3次元マイクロマニピュレーター NMN-25	1	200	07
125	0 7	71	0194	0	フィシ゛オテツク社製 暗幕シールト゛ホ゛ックス(2フォトンセット用) Type 2-photn	1	2007	08
126	007	71	0196	00	微量高速冷却遠心機 MX-301 ㈱トミー精工	1	2007	10
127	007	71	0197	00	スルー測定用ミラー 位置調整機構付 A8912-10	1	2007	10
128	007	71	0209	00	蛋白質結晶自動観察装置 CRYSTAL Pro アップグレード	1	007	11
129	0 8	1	0005	00	動的光散乱測定器:DynaPro Titan TC Wyatt Technology	1	2008	01
130	008	71	0016	00	卓上型超遠心機用ロータ TLS-55ロータベックマン・コールター㈱社製	1	2008	01
131	008	71	112	00	クロマトチャンバー TRC-760 ㈱テイオン社製	1	2008	05
132	008	71	0113	00	Workstation Red Hat Linux OS プリロードモデル xw9400/CT H・P(耕社	1	2008	05
133	008	71	0132	00	フラクシュンコネクター FRC-950(GEヘルスケアハ イオサイエンス(株社製)	1	2008	07
134	008	71	0133	00	フラクイショネーションキット (GE^ルスケアバイオサイエンス(株社製)	1	2008	07
135	008	71	0134	00	DeskTop PCセット (GEヘルスケアハ イオサイエンス(株社製)	1	2008	07
136	008	71	135	00	Monitor PH/C900 18-1107-76 (GEヘルスケアハ イオサイエンス(㈱社製)	1	2008	07
137	008	71	0136	00	タンパク質精製装置:AKTApurifier10 (GE^ルスケアバイオサイエンス)	1	2008	07
138	008	71	01 1	00	カルシウムイオン濃度測定装置 : CAF-110(日本分光)	1	2008	08
139	008	71	0142	00	ニューロン測定装置(ニコン)	1	2008	08
140	0	71	0143	00	Z軸位置検出エコンダー ME-10 (マイクロブライトフィールド㈱社製)	1	2008	08

141	008	71	0144	00	コンピュータワクステーションPC-50 (マイクロブライトフィールド(株社製)	1	2008	08
142	008	71	0164	0	BioLogic LP Coreシステム (BioRad㈱社製)	1	2008	11
143	008	71	0165	00	Hummingbird フラクションコレクター (電装産業㈱社製)		08	11
144	0 9	1	0001	00	16X 対物レンズ (ニコン社製)		2009	01
145	009	71	0002	00	分割1次像カメラポート U-SIP	1	2009	01
146	009	71	0003	00	CFP/YFP FRET フィルタセット XF88 2	1	2009	01
147	009	71	0053	00	ママキシマイザー M・BR-022UP (TAITEC社製)	1	2009	04
148	009	71	0060	00	MacBook Pro 15インチ	1	200	0
149	009	1	0061	00	MacBook Pro 15インチ	1	2009	05
150	009	71	0066	00	テーブルトップ遠心機 8420 (久保田商事㈱社製)	1	2009	06
151	009	71	0067	00	MacBook Pro 15インチ	1	2009	06
152	009	71	0069	00	超低温フリーザ: REVCO ULT-2586-5SIJD Bタイプ (米国サーモフィッシャーサイエンティフィック社)		2009	07
153	00	71	0073	00	三次元電動マニプレータ:LN mini25 UNIT/MRE(Luigs & Neumann社)	1	2009	08
154	009	71	0074	00	化学・生物発光検出機:LAS-4000mini (富士フイルム)	1	009	08
155	009	71	0075	00	マイクロマニプレータ:MP-285(米国sutter社)	1	2009	09
156	009	71	0076	00	パッチクランプ用増幅器: MultiClamp700B (モレキュラーデバイス社)	1	2009	9
157	009	71	0079	00	デジタルマイクロスコープ:COOLSCOPE II 低倍率タイプセット (ニコン)	1	2009	10
158	009	71	0082	00	Veriti200 サーマルサイクラー (Applied Biosystems社製)	1	2009	12
159	010	71	0019	00	IX-正倒立落射蛍光投光管ユニット IX-UPRIGHT-UNIT	1	2010	02
160	010	71	0 0	00	IX-正倒立フォーカシングユニット IX-UP IGHT-FOCUS	1	2010	02
161	010	71	0021	00	Current Amplifier SR570 (Stanford Research Systems社製)	1	2010	02
162	010	71	0022	00	Data Acquisition Interface ITC-18 (HAKA社製)	1	2010	02
163	010	71	0033	00	Current Amplifier SR570 (Stanford Research Systems社製)		2010	04

2. 研究実施の概要

細胞内のカルシウム濃度が周期的にゆっくり変動する現象を「カルシウム振動」と呼ぶ。研究総括はこれまで、細胞内小胞体カルシウムチャネル「 IP_3 受容体(イノシトール三リン酸受容体)」がカルシウム振動の発振装置であることを証明し、受精、背側と腹側の決定、ホルモンや消化酵素の放出、免疫、遺伝子発現、神経突起の伸展制御、および記憶学習といった高次神経機能など、広範な生理機能にこのカルシウム振動が関わっていることを明らかにしてきた。本プロジェクトは、カルシウム振動の産生機構を解明し、カルシウム振動が生物機能に果たす役割を明らかにしてゆく。カルシウム振動の原因分子 IP_3 受容体の特性を生化学、物理化学、構造生物学、細胞生物学など様々な角度から検証することにより、カルシウム振動発振機構を明らかにしていく。 IP_3 受容体には 20 以上の機能調節分子が結合していたがこれらがどのようにカルシウムの働きを制御するかを解明し、細胞機能との対応を明らかにした。さらに、カルシウムの生命現象における役割を理解するために、遺伝子特異的欠損マウスの作製や阻害剤開発を進めた。最終的には、カルシウム振動の異常により引き起こされる病気の治療・予防・診断法の確立を目指した。

現在までに、IP3受容体の構造、チャネル開口機構、タイプ特異的 IP3結合親和性の決定の分子機構, IP3受容体の細胞内トラフィッキング機構などを明らかにした。

また、 IP_3 受容体から放出される新規に発見し命名したタンパク質「IRBIT」を介した新規の代謝系を明らかにした。更にカルシウムが神経細胞突起の伸展を制御していることを明らかにし、ヒトの疾患と IP_3 受容体の機能を関連づけることができた。研究の過程において、 IP_3 を細胞内で可視化する技術の開発に成功し、 IP_3 受容体とそれに関連する新たな阻害剤の開発も行った。また、世界最高感度のカルシウムセンサーの開発にも成功した。

更に、1型 IP3 受容体遺伝子欠損動物では、強度の運動失調を起こすことを明らかにし、マウスの突然変異も見出されたが、ヒトでも変異家系が見出された。一方、2型、3型のダブル変異では外分泌障害を引き起こし、シェーグレン症候群と同様な症状を呈し、血中に IP $_3$ 受容体の抗体も検出されるなどヒト疾患とも深く関わっていることが明らかとなった。

3. 研究構想

1983 年に IP_3 依存的に細胞内の袋(細胞内小胞体)からカルシウムが放出されることが報告されたが、その機構は全く不明であり、全世界中で IP_3 の標的分子を追い求めていた。研究総括は行動異常をおこす突然変異マウスを解析することにより、欠落する膜蛋白質 (P400 と命名)が IP_3 受容体であることを発見し、分子量約 31 万の巨大膜蛋白質の全構造を世界ではじめて決定し、その後、 IP_3 受容体そのものが四量体形成するカルシウムチャネルであることを示した (Nature 1989)。また IP_3 受容体がカルシウム振動の発振装置であることを証明した ($Science\ 1992$)。さらに、3種のアイソフォーム全構造も決定し($Cell\ 1993$, $Receptors\ \&\ Channels\ 1994$)、 IP_3 受容体を介したカルシウム振動が関わる生命現象の数々を明らかにしてきた。

本プロジェクトでは、 $\underline{CODNNシウム振動がどのような機構で生じるのか、また調節されるのか、そしてCODNNシウム振動がどのような生理機構をひきおこすのか、更にカルシウム振動発振分子「<math>\underline{IP_3}$ 受容体」の特性を明らかにしてゆく。 $\underline{IP_3}$ 受容体はダイナミックな構造変化を引き起こし、分解酵素で断片化しても再集合して機能を回復したり、細胞内を動き回るなど、従来の教科書的記載とは異なるユニークな分子であることを明らかにしている。

そこで、この IP_3 受容体のユニークな性質を分子・細胞レベルで解析して、 IP_3 受容体がカルシウム振動をいかにして引き起こすのか、その分子メカニズムを解明する。これによりカルシウム振動に基づく生命現象の基本的原理が理解できるばかりでなく、得られる成果に基づいて疾患モデル動物を作製することができ、さらにはその障害により引き起こされる病気の治療・予防・診断法も確立することが可能になると期待される。

この研究のためには生化学的、構造生物学的、遺伝学的、細胞生物学的手法が重要であり、以下のテーマの下研究を遂行した。

- 1. IP3とカルシウムを可視化する技術の開発
- 2. IP3 受容体のチャネル開閉機構の解明
- 3. 3種の IP3 受容体の IP3 結合親和性の決定の分子機構の解明
- 4. IP3 受容体の構造生物学的解析
- 5 .新規の代謝系の発見
- 6. 内在性ウワバインによるカルシウム振動発振及びナトリウム・カリウムポンプ (Na+, K+-ATPase) と IP3 受容体の結合部位の決定
- 7. IP3 受容体を介した BDNF(脳由来神経成長因子)の分泌とニューロンの突起伸展の調節
- 8. IP3 受容体の阻害剤の開発

- 9. IP3 受容体の細胞内トラフィッキングの研究
- 10. IP3受容体とヒトの疾患

4. 研究実施内容

研究実施方法

本プロジェクトでは小胞体のカルシウムチャネルである IP_3 受容体に焦点をあて、その構造・機能相関の解析を行いながら、 IP_3 受容体の引き起こす多様な生理機能を調べ、種々の細胞機能の発現メカニズムを解明する。方法としては、生化学的、分子生物学的、構造生物学的、電気生理学的手法を中心としながら、各種の生物物理学的手法を積極的かつ効果的に導入した。このような多様なアプローチが必要不可欠であった。本プロジェクトでは多様な研究集団を構成しているがグループ制は設けず常に情報交換出来る様に全員が一丸となって研究を進めた。

5.研究の成果

(1) IP₃とカルシウムを可視化する技術の開発

(1-1) IP₃センサー (IRIS-1) の開発

 IP_3 とカルシウム振動との関係を明らかにするためには、 IP_3 の挙動を正確に捉えることが必要である。我々の成果として得られた IP_3 受容体の 3 次元 X 線結晶構造解析の結果 (Nature 2002) をもとに、 IP_3 結合ドメインのアミノ末端(N 末端)に ECFP(青色蛍光タンパク質)とカルボキシ末端(C 末端)に Venus(ヴィーナス:黄色蛍光タンパク質)を融合させたタンパク質で、 IP_3 と結合することで ECFP・Venus 間の $FRET(蛍光共鳴エネルギー移動; Pluorescence Resonance Energy Transfer) 効率が変化し、蛍光特性が変わることを利用した <math>IP_3$ 指示薬を開発した。この融合タンパク質を IRIS (IP_3 Receptor-based IP_3 Sensor)(ギリシャ神話で虹の女神のことを指す)と命名した (J.Cell.Biol.2006)。

さらに我々は、 IP_3 結合ドメインの C 末端を短くすることで検出感度を 5%から 25%と 5 倍にさせることに成功した(IRIS-1 と命名した)。また IRIS-1 の開発にあたり、結合活性が強すぎると、本来の IP_3 の濃度変化、さらには Ca^{2+} の濃度変化を変えてしまう恐れがある。そのため IRIS は IP_3 に対する特異性を下げずに、結合活性を元よりも 10 倍程度弱くなるように改変した。

我々の観察よりスパイク状に急峻な濃度変化を起こすカルシウムに比べ、 IP_3 が比較的ゆっくりと濃度変化することから、その下流で働く IP_3 受容体によってアナログ的な IP_3 シグナルがカルシウムスパイクというパルスシグナルに変換されていることが示された (*J.Cell Biol. 2006*)。

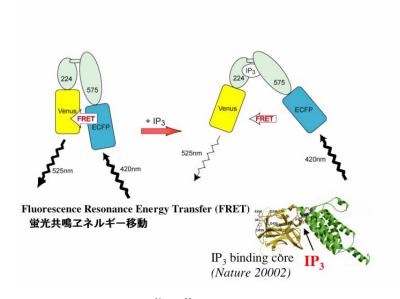


図 1. IP₃指示薬(*J.Cell Biol.* 2006) IP₃R-based IP₃ Sensor (IRIS) は IP₃ 受容体の IP₃ 結合コアーを用いて作成した。

IRIS という名はギリシャ神話のにじ(虹)の女神という意味を持っている。 IP_3 結合部位を使って蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法による IP_3 可視化技術の開発に成功した。

(1-2) 新規 IP。センサー (IRIS-2) の開発

IRIS-1 は現在報告されている IP $_3$ センサーの中で最も蛍光変化率が大きいが、生体内の IP $_3$ 濃度変化を捉えるためには、更なる感度の増大が必要である。また蛍光の波長の変更や、蛍光蛋白質自身の性質を変えることで、用途を広げることが期待できる。

IRIS-2 とその改変体である IRIS-2.3 は蛍光蛋白質として monomeric EGFP を用いており、細胞内でのセンサーの多量体形成を防いでいる。また IRIS-1 に用いたドナーの ECFP に比べて EGFP は蛍光強度が強い。これらの点から新しいセンサーは、一分子イメージングでの使用に向いているということが予測される。特に IRIS-2.3 は IP $_3$ へのアフィニティーが高い点から、一分子イメージングに有効と考えられる。更に IRIS-2.3 は受精卵のように低濃度の IP $_3$ 濃度上昇が制御する細胞現象の可視化への適用が期待される(未発表データ)。

(1-3) 細胞内のカルシウムポンプ活性の可視化

細胞内カルシウム濃度は IP₃受容体のようにカルシウム濃度を上昇させるカルシウム放出チャネルと主に小胞体に局在するカルシウム濃度を下げるカルシウムポンプの活性のバランスによって制御されている。しかしこれまでカルシウムポンプが生細胞内においてどのようなダイナミックな活性変化をしているのか全く明らかになっていなかった。そこで我々は FRET を用いてカルシウムポンプの一つ SERCA の活性を可視化し、カルシウム振動中の SERCA 活性を測定した。

SERCA には 3 つの細胞質側ドメイン(A、P、N)があり、活性変化に伴う構造変化によって A と N ドメインの距離が大きく変化することが知られている。pig SERCA2a の N 末(A ドメイン)に FRET の ドナーとして ECFP を、577 と 578 番目のアミノ酸 (N ドメイン)の間に FRET のアクセプターTC-FlAsH 結合サイトとして Tetra-cystein-tag を融合した遺伝子を作製し、F-L577 と命名した。F-L577 の測定はすべて蛍光顕微鏡を用いて行った。F-L577 の特性を調べるために、F-L577 を発現した細胞を膜透過性にし、知られている SERCA の主な 4 つの状態(E1-Ca²+、E1-ATP、E2P、E2)に固定し、その時の蛍光特性を測定した。

次にカルシウムポンプ活性と FRET 変化を同時に測定するために、F-L577 を発現した細胞の小胞体内腔にカルシウムセンサーMg-Indo-1 を導入した。細胞膜を透過性にし、カルシウムと ATP の入った還流液を細胞に与えたところ、FRET 変化と小胞体でのカルシウム濃度上昇が同時に観測された (未発表データ)。

F-L577 を発現させた細胞にアゴニストである ATP を与えると、カルシウム振動が観察された。この時 FRET 変化もカルシウム振動と同期して振動していた。さらにカルシウム振動時の FRET 変化量をカルシウム濃度に対してプロットすると S 字曲線を描き、Hill の式で Fit することができた。SERCA には 2 つのカルシウム結合部位があるが、この時の Hill 係数は 6 と予想外に高い協同性を示した。以上の結果から、SERCA は細胞内のカルシウム濃度が上昇すると素早く感知して、小胞体内にカルシウムを取り込む働きをしていることが明らかになった。カルシウムは様々な細胞生理機能を制御するが、細胞質のカルシウム濃度が高い状態が続くと逆に細胞機能に悪影響を与えることが知られている。それを防ぐためにも、カルシウム濃度上昇によるポンプ活性の急激なスイッチングがなされていることが推測される (未発表データ)。今回開発した F-L577 は S-ERCA の活性を蛍光変化によって測定することのできる新規技術である。

SERCA は遺伝性の心臓病の原因遺伝子の一つであり、癌に関わっていることが報告され、更には抗マラリア薬のターゲット分子の一つでもある。このような病気を改善するための分子標的薬のスクリーニングを行うためには本技術のように蛍光変化測定で容易に SERCA 活性を測定する技術は非常に有用である。

(1-4)アポトーシスセンサーの開発

細胞は細胞外刺激により一過的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇 $(Ca^{2+}$ スパイク)を生じ、受精、シナプス可塑性、細胞死などの様々な細胞応答を示す。そのため、 Ca^{2+} スパイクの強度や総放出量、頻度には個々の応答を誘導する情報が含まれており、それらの情報が伝播解読され個々の適した応答が生じると考えられる。ヒトやマウスなどではアポトーシスにおいても細胞内 Ca^{2+} が重要な役割を担っているが、どのような細胞内 Ca^{2+} 動態によりアポトーシスが生じるのか明らかにされていない。 Ca^{2+} アポトーシスと細胞内 Ca^{2+} 動態の直接的な関係を解明するには、 Ca^{2+} 1 つの細胞内でアポトーシスと細胞内 Ca^{2+} 1 可能を同時に観察しなければならない。

既存の FRET(蛍光共鳴エネルギー転移)を利用したアポトーシスセンサーは、同じく FRET を利用した 細胞内 Ca^{2+} センサーと同じ蛍光タンパク質ペア (ECFP-Venus) を使用しているため、同時観察すること ができなかった。そこで、アポトーシスセンサーの蛍光タンパク質ペアを ECFP-Venus から、点変異導入 により改良した改良型 FP615 と FP570 に変えることで、細胞内 Ca^{2+} センサーと同時観察が可能な実験系の確立を目指した。この新たな蛍光タンパク質ペアを使用することで in vitro で 290%の変化率を持つアポトーシスセンサーを作製することに成功し、1 つの細胞内で細胞内 Ca^{2+} 動態とアポトーシスを同時観測

することに成功した(未発表データ)。この同時観察系を用いてニワトリ B 細胞の免疫応答時に見られるアポトーシス誘導時の細胞内 Ca^{2+} 動態を観察した結果、生細胞とアポトーシスを誘導する細胞では異なる細胞内 Ca^{2+} 動態が生じることが分かった(未発表データ)。そこで、今後はさらなる解析を行い、ニワトリ B 細胞の免疫応答時に見られるアポトーシス誘導における細胞内 Ca^{2+} 動態の情報符号化機構の解明を目指す。

(1-5)最高感度のカルシウムセンサーの開発

これまでのカルシウムセンサーは、培養細胞や組織切片を用いて<u>時間オーダー</u>での測定しか可能でなかった。今回、既に開発されていた。Genetically engineered カメレオンを更に改良して世界最高感度のカルシウム指示薬を開発することに成功した(*Nature Methods* 2010)。これにより、<u>日、月オーダーでのin</u> vivo のイメージングが個体レベルで観察が出来る事になり、画期的なツールとなると考えている。

(2) 受容体のチャネル開閉機構の解明

a.構造の解析

我々は、**IP₃ が結合する IP₃-binding core** の構造は三次元 X 線結晶構造の解析により明らかにした (*Nature 2002*)。その **N 端末にある配列**をとり除くだけで IP₃-binding core とチャネル部位があっても チャネル活性が消失することからこの部位を **Suppressor domain** のとなづけた。此の部分の結晶化を行い、三次元 X 線結晶構造を解明した (*Molecular Cell 2005*)。

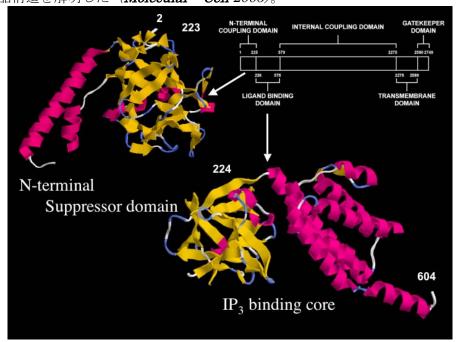


図 2 IP₃ 受容体の IP₃ 結合コア(IP₃ binding core)とその N 端末にあるサプレッサードメイン (N-terminal Suppressor domain)の三次元 X 線結晶解析像

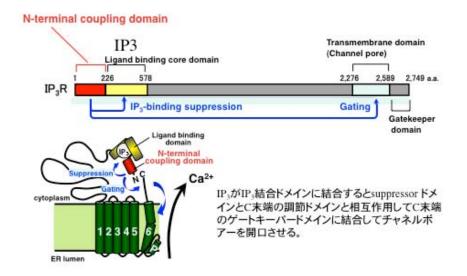


図 3. IP。受容体の構造とチャネルの開口モデル (1)

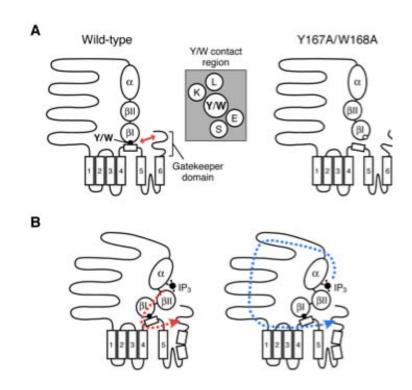


図 4. IP3 受容体の構造とチャネルの開口モデル (2)

サプレッサードメインの Tyr167 (1 型 IP $_3$ 受容体), あるいは Trp168 (IP $_3$ 受容体 2 型、3 型) IP $_3$ 受容体膜貫通領域の M4-M5 リンカーと直接結合し、膜貫通領域から約 2000 残基離れたアミノ末端領域を膜貫通領域の近傍に配置させている。

A: 正常な IP_3 受容体(左)、Y/W に変異を入れたものでは M4-M5 リンカーと直接結合できない(左)。 $B: IP_3$ が結合すると構造変換が起きて構造変換が<mark>赤(右)、と青(左)の両方の経路を経てチャネルの開口へと導く。</mark>

b. チャネル開閉機構のメカニズムの研究成果

 IP_3 受容体のアミノ末端領域は IP_3 結合親和性の調節とチャネル開口の両方に必須であるが、両機能は別々のアミノ酸残基群によって担われていた。今回、チャネル開口に必須なアミノ酸残基として 1 型 IP_3 受容体のサプレッサードメイン中の Tyr-167 を同定した(図 4(2))。隣接する Lys-168, Leu-169 もチャネル開口に関与していた。 2 型、3 型 IP_3 受容体では Tyr-167 に相当する残基が Trpであったが、3 型の Trp-168 もチャネル開口に必須であり、この領域の機能は IP_3 受容体のタイプにかかわらず保存されていることが示唆された。Tyr-167/Trp-168、Glu-20/Glu-19、Ser-217/Ser-218 (1 型/3 型) は IP_3 受容体膜貫通領域の M4-M5 リンカーと直接結合し、膜貫通領域から約 2000 残基離れたアミノ末端領域を膜貫通領域の近傍に配置させていることが示唆された。その結果、アミノ末端領域の Tyr-167/Trp-168 残基はカルボキシル末端領域の構造をチャネル開口可能な状態に保っており、 IP_3 結合シグナルをチャネル開口へと誘導する仕組みが明らかになった (J.Biol.Chem. 2010-1, J.Biol.Chem. 2010-2, Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology 2009) (図 4(2))。

(3) 3種の IP₃ 受容体の IP₃ 結合親和性の決定の分子機構の解明

 IP_3 受容体は 3 種類存在し、 IP_3 は各々結合能が異なる。各タイプは各々特有な細胞に発現して、その細胞特有な機能を有している。そこで、各タイプに特有な N-末端側のサプレッサー配列を含んだ IP_3 結合コアの IP_3 結合親和性は、全長を発現させた各タイプの IP_3 受容体と親和性はほぼ同じであった。 (*J. Biol. Chem. 2007*)、(*J. Neurochem. 2007*)。三種の IP_3 受容体のアイソフォームの IP_3 結合コア(IP_3 binding core)をとり出して、その IP_3 結合親和性を調べると三種のアイソフォームともに全く変化がなかった。上記(2)のテーマで結晶構造を解いた Suppressor domain の各タイプと IP_3 結合コアとのキメラタンパク質をつくると Suppressor domain 依存的に IP_3 結合親和性がみいだされた。これらの結果から各タイプの Suppressor domain が各タイプの IP_3 結合親和性を決定していることを証明した (*J. Biol. Chem. 2007*)、(*J. Neurochem. 2007*)。

(4) IP。受容体の構造生物学的解析

今回 IP_3 受容体は抗体を用いることが精製ステップの重要な点であったが、抗体に結合した IP_3 受容体を通常は pH を変える事により遊離させていた。しかし、今回 IP_3 受容体を当研究室で変性させずに生理的な条件で精製した。すなわち抗体を作製した抗原ペプチドを大量に加えることにより、pH を変えずに抗体からより生理的な条件で変性させることなく IP_3 受容体を溶出することに成功した。そのために試験管内で、 Ca^{2+} の存在下と非存在下で可逆的に構造変化を示すアロステリックタンパク質であることを明らかにした(図 4)、 $(J.Biol.Chem.\ 2003)$ 、 $(J.Neurochem.\ 2007)$ 。

この精製 IP₃ 受容体の極低温電子顕微鏡像(京大 藤吉教授と産総研 佐藤博士との共同研究)を Ca²⁺非存在下で構造を極低温電子顕微鏡により IP₃ 受容体の溶液中での構造を明らかにした (*J. Mol. Biol.2005*)。

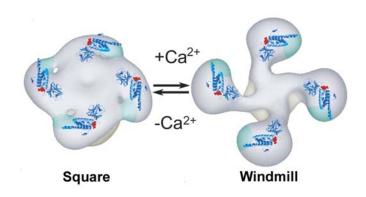


図 5. 1型 IP3 受容体のアロステリックな構造変化

ネガティブ染色した電子顕微鏡像(約 3000 粒子)を使い、当研究室にて行った single particle analysis による三次元構造のデータ。 (*J. Biol. Chem.* 2003, *J. Neurochem.* 2007)

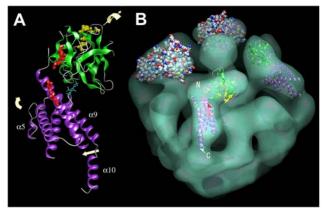


図 6. IP₃ 受容体の三次元構造 (極低温電子顕微鏡像)(京大藤吉教授との共同研究) (Ca²⁺非存在下) (*J. Mol. Biol.2005*)(*J. Neurochem. 2007*)

(5) 新規の代謝系の発見

a) IP。の擬似物質(アービット)の発見

従来 IP_3 の役割は IP_3 受容体を介して、 Ca^{2+} 放出のみと考えられていた。しかし IP_3 の役割は Ca^{2+} 放出のみならず、新しい分子の放出をしていることを明らかにした (*Molecular Cell ,2006*)。 IP_3 受容体の IP_3 結合コアーに結合していて、 IP_3 により溶出される 60kDa の分子量のタンパク質として発見して IRBIT (アービット) (IP_3 receptor binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate)と命名した。これまで $IP_3 \rightarrow IP_3$ 受容体 $\rightarrow Ca^{2+}$ 放出というスキームが知られていたが、これに加えて $IP_3 \rightarrow IP_3$ 受容体 $\rightarrow P$ $\rightarrow P$

IP₃ 擬態、IRBIT(IP₃R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) (J. Biol. Chem. 2003) (Molecular Cell 2006) IP₃ 結合コアー IP₃ 受容体 IP₃ 受容体 IP₃ 受容体 IP₃ 受容体 IP₃ 受容体 IP₃ ではIRBIT 放出 IP₃ で表達します。 IP₃ ではIRBIT 放出 IP₃ で表達します。 IP₃ である。 IP₃

図 7. IP3の働きは Ca²⁺を放出するのみでなく、新規に発見して命名した IRBIT を放出。 (*Molecular Cell. 2006*)

b)アービット(IRBIT)の働き

i) IRBIT は IP3 受容体の働きを抑制する

精製した IRBIT と IP3 受容体を用いた in vitro での実験で、IRBIT が IP3によって IP3 受容体 から解離することを確認した。また、逆に IRBIT が IP3 受容体の IP3 結合を抑制することを見いだした。これまでの研究から IRBIT は IP3 受容体の IP3 結合領域に結合するということが分かっていたため、これらの結果から IRBIT と IP3 は IP3 受容体上の同じ場所に互いに競合して結合することが明らかとなった。さらに、IRBIT が IP3 受容体と結合し、その IP3 結合を抑制するためには IRBIT のリン酸化が必要であることを明らかにし、リン酸化部位を同定した。

これまでに IP_3 受容体の IP_3 結合領域にある 12 個のアミノ酸が IP_3 との結合に必須であることが明らかになっている。これら 12 個のアミノ酸に変異を導入して IRBIT との結合に及ぼす影響を調べたところ、12 個のアミノ酸のうち 10 個ものアミノ酸が IRBIT との結合に必須であることが明らかとなった。この結果は、 IP_3 と IRBIT は IP_3 受容体の共通の領域にある共通のアミノ酸を認識して結合していることを示している。すなわち、IRBIT は IP_3 と非常に類似した様式で IP_3 受容体と結合することが明らかとなった。このことは、IRBIT のある一部分の構造が IP_3 の構造を模倣している可能性があることを示唆している。

次に、IRBIT が IP $_3$ 受容体の活性に及ぼす影響を解析した。*in vitro* での Ca $^{2+}$ 放出実験により、リコンビナント IRBIT は、IP $_3$ の働きによる Ca $^{2+}$ 放出を顕著に抑制した。さらに RNA 干渉法により培養細胞の IRBIT の発現を減少させると、IP $_3$ 受容体からのカルシウム放出がおこりやすくなった。これらの結果から、IRBIT は IP $_3$ 受容体の活性を抑制することが明らかとなった

(*Molecular Cell,2006*)。カルシウム振動に対する効果を総合すると、 IP_3 によるカルシウム振動の高さと頻度を調節していた。

c) アービット(IRBIT)の三次メッセンジャーとしての働き

アービット(IRBIT)の更に新しい働きはその下流の分子の探索により明らかとなった。

i)ナトリウム・重炭酸共輸送体1及び CFTR 輸送体の活性化

IRBIT の別の標的分子は膵臓タイプのナトリウム・重炭酸イオン・共輸送体 1 (pancreas type Na+,bicarbonate cotransporter 1, pNBC 1) であった。アービット(IRBIT)は pNBC 1 を活性化した。 すなわち pNBC 1 は、膵臓のみでなく、全身に発現する分子で、既にこの変異により、白内障、緑内障、低身長、知能障害などがおきることが知られている。即ちアービットは酸・塩基平衡とカルシウムを直接リンクさせる分子であり、カルシウムシグナルと pH バランスをつなげる最初の報告となった (Proc. Natl. Acad. Sci., 2006)。 更に最近 CFTR のイオンとランスポーターの〉活性化をも引き起こしていることが明らかとなった (J. Clinical Investigation 2009)。

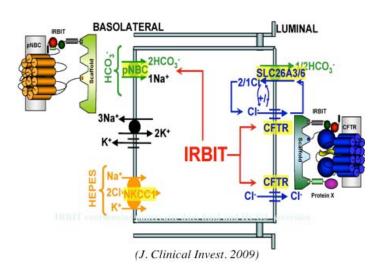


図8 IRBIT によるナトリウム・重炭酸共輸送体1及び CFTR 輸送体の活性化

更に IRBIT が標的として結合する分子を詳細に解析したところ、以下の分子を発見した。

ii) RNA 合成に関わる分子:

Cleavage and polyadenylation specificity factor (ポリ A シグナルのうしろを切ってポリ A をつける因子) に結合しポリ A 伸長をアービットが抑制することを証明した(*J. Biol..Chem.* 2009)。

Signal recognition particle 14 はシグナルシーケンスを認識して小胞体へ移行させる分子であるが、IRBITが直接結合することを証明した。これらの事実は、これまで小胞体でのカルシウムシグナルと、蛋白質合成は独立の現象と考えられていたが、両者が IRBIT を介してリンクしていることを示しており、新しい概念を提出することが出来たと考える。

iii) IRBIT のリン酸とその機能

IRBIT と IP3受容体との結合を解析したところ、a)この結合は、IRBIT の多重リン酸化を必要とする、b)IP3受容体上の IP3結合領域に IRBIT が結合する、c)IP3結合に重要なアミノ酸が、IRBIT との結合にも重要である。膵臓型 Na+/HCO3 共輸送体、mRNA poly(A)付加反応に関わる Fiplにも結合するが、これらの活性を調節することを明らかにした。重要なことは、これらの相互作用が全て IRBIT の多重リン酸化依存的であることであり、多重リン酸化領域内には種々のクラスのリン酸化酵素認識部位が存在することから、IRBIT は、細胞の置かれている状況を自身の多重領域のリン酸化パターンに変換し、それによって複数の標的分子活性を調節する分子である可能性を示唆している。今後は、IRBIT の多重リン酸化パターンと標的分子との相互作用選別に関与するのか否か?を明らかにしながら、IRBIT が、細胞内環境を自身のリン酸化状態に反映することで、細胞内のカルシウムシグナル、pH 調節、そして、遺伝子発現を、統合的に調節する分子として働く可能性について明らかにしていく。

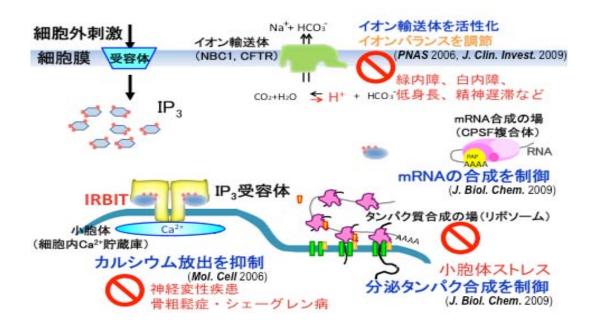


図9 IP3の擬リガンドとしての IRBIT の発見による新しい情報伝達経路と 多様な機能とその障害によってひきおこされる多様な病態

iv)80K-H の発見(J. Biol Chem..2009)

 IP_3 受容体の C 末端が IP_3 受容体活性調節に重要な役割を果たしている。 IP_3 受容体の C 末端に注目し、その相互作用蛋白質を yeast two-hybrid screening 法により検索し、 IP_3 受容体の新規相互作用蛋白質 80K-H を同定し、その完全長配列のクローニングに成功した。80K-H の領域を検討した結果、365 番目から 418 番目のアミノ酸に相当する部位が 1 型 IP_3 受容体結合に必要十分である。また、80K-H は 2 型 IP_3 受容体および 3 型 IP_3 受容体とも結合する。80K-H への結合に関わる 1 型 IP_3 受容体の領域についても pull-down 法により検討した結果、1 型 IP_3 受容体の 2637 番目から 2651 番目のアミノ酸に相当する領域が 80K-H への結合に必要であった。この領域はすべての IP_3 受容体のタイプで非常によく保存されており 80K-H が同じ結合様式ですべての IP_3 受容体タイプと結合すると考えられる。1 型 IP_3 受容体および 80K-H はともに小胞体様の網目構造を示したことから小胞体上で共局在しているといえる。

80K-H 過剰発現細胞では ATP 誘導性の Ca^{2+} 放出量を有意に上昇した。80K-H 発現抑制により優位に Ca^{2+} 放出量が減弱した。80K-H 蛋白質を混合したマイクロソームにおいて IP_3 誘導性の Ca^{2+} 放出量が有意に増加した。これらの実験結果および前述の相互作用解析結果から 80K-H は IP_3 受容体の C 末端に結合することで IP_3 受容体の Ca^{2+} 放出活性を亢進させると考えられる。

80K-H はプルキンエ細胞において発現は認められなかったが、より詳細な細胞内局在について検討するため、胎齢 18 日目のマウス海馬から培養神経細胞を調製し、免疫染色法により検討を行った。その結果、80K-H は海馬神経細胞の細胞体において 1 型 IP_3 受容体と共局在しており、また樹状突起の一部でも共局在していた。これらの実験結果から、80K-H が 1 型 IP_3 受容体活性調節を介して海馬神経細胞における神経可塑性発現に寄与している可能性が考えられる($\emph{J. Biol. Chem. 2009}$)。

(6) 内在性ウワバインによるカルシウム振動発振及びナトリウム・カリウムポンプ(Na⁺, K⁺-ATPase)と IP₃ 受容体の結合部位の決定

ウワバインは内在性ステロイドとして我々の生体内にある。ウワバインが腎尿細管等でゆっくりとしたカルシウム振動をひきおこす際に、 IP_3 を吸収する IP_3 スポンジを細胞内へ導入してもカルシウム振動が起きるため、 IP_3 の産生とは別に IP_3 受容体が Na^+ , K^+ -ATPase と直接結合していることを予測させた。そこで我々は IP_3 受容体と Na^+ , K^+ -ATPase のどの部位が結合するかを調べるため両分子での結合部位を特定した。その結果、 IP_3 受容体のN 末端と結合することを明らかにした。 Na^+ , K^+ -ATPase は生理学の教科書にあるように細胞内の Na^+ , K^+ -イオンの濃度をコントロールして細胞内のイオン濃度勾配と興奮性を決定する重要なポンプである。この Na^+ , K^+ - ATPase と IP_3 受容体とが直接結合することを発見した

Na,K ATPase Extracellular PM Cooh Cytoplasmic Ca2+ Lumenal

図10. ウワバインによる Na⁺,K⁺ ATPase の N-末端と IP₃ 受容体のリガンド 結合部位の相互作用を介した細胞内カルシウムイオン振動 (*J.Biol.Chem. 2006*)

Na+, K+-ATPase は、膜の興奮性を維持するため Na+を細胞外に多く、K+を細胞内に低濃度に保つために重要な意味を持つ。生理学の教科書の原点になるホジキン・ハックスレーのモデルの重要な役割を果している。Na+, K+-ATPase と IP $_3$ 受容体が結合することは、このモデルに IP $_3$ 受容体が関わっていることを示唆する重要なデータである。

(7) IP。受容体を介した BDNF(脳由来神経成長因子)の分泌とニューロンの突起伸展の調節

小脳の顆粒細胞は、細胞外刺激に応じて、樹状突起伸展に重要な働きをする神経栄養因子の一つ「BDNF」を産生することが知られている。また一方、この細胞外刺激が 1型 IP3 受容体を介してカルシウムを放出する可能性があることから、Ca²+放出と BDNF の発現の関係に着目した。その結果、1型 IP3 受容体を欠損した組み換えマウスの顆粒細胞では、細胞外刺激に応じたカルシウム貯蔵庫からの Ca²+の放出がほとんどないことが分かり、また刺激に応じた BDNF の発現上昇も少ない。さらに BDNF を 1型 IP3 受容体欠損型の小脳の培養細胞に添加すると、1型 IP3 受容体欠損型のプルキンエ細胞の樹状突起伸展の低下が正常に戻ることも分かった。

野生型のプルキンエ細胞が非常に整然とした美しい樹状突起伸展を示すのに対し、1型 IP3受容体 欠損型のプルキンエ細胞の樹状突起伸展は大きく乱れ、樹状突起の枝分かれが減少していた。また、 電子顕微鏡による観察の結果、1型 IP3受容体欠損型の小脳顆粒細胞の軸索の末端には、神経伝達物 質を含むと思われる顆粒が異常に蓄積していることが分かった(J.Neurosci. 2007)。

神経栄養因子のBDNF が軸索末端からの神経伝達物質の放出を調節するという研究と合わせると、 顆粒細胞で IP₃ 受容体を介して作られた BDNF が、顆粒細胞自身の軸索に作用して神経伝達物質の 放出を制御していると考える。生体内でプルキンエ細胞の樹状突起の伸展が、<u>小脳顆粒細胞に発現</u> する 1型 IP₃ 受容体を介して、BDNF の分泌を調節して、小脳プルキンエ細胞の突起形成やシナプ ス形成を制御していることを初めて明らかにした (J.Neurosci. 2007)。

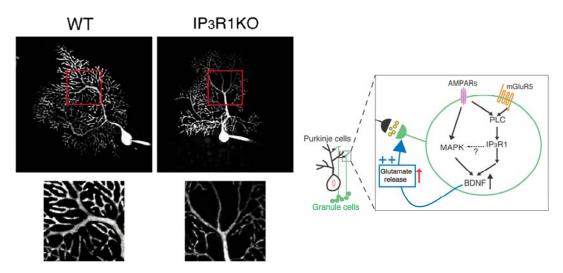


図11. IP₃ 受容体ノックアウトマウス生体内の BDNF の分泌障害に伴う プルキンエ細胞の異常な樹状突起の形態 (*J. Neurosci. 2007*)

(8) IP。受容体の阻害剤の開発

我々は IP_3 受容体の機能を阻害する細胞膜透過性の化合物 2-APB(2-aminoethyldiphenyl borinate) のスクリーニングに成功した。2-APB を加えることにより、 IP_3 受容体とそれに付随するカルシウム動態が阻害されることを明らかにした。J.Biochem.122,498-505(1997)に発表したが、400 以上の citation となっている。これは現在国際的にスタンダードな阻害剤として使用され、シグマ社からも発売されている(パテントは当時取らなかった)。既にマラリア原虫においてはメラトニンがカルシウム動態に関与していることが明らかとなった。 (J.Pineal.Research~2007, ブラジルのグループとの共同研究)。

(8-1) 膜透過性カルシウム阻害剤の合成

2-APB は IP₃ 受容体阻害剤としてスクリーニングにより発見したが、同時に IP₃ 受容体からの Ca²⁺放出に伴い、細胞外からの Ca²⁺流入(容量性 Ca²⁺流入)を阻害することを発見した。そこで、1000 近い化合物を当研究室において合成して、スクリーニングした結果、容量性 Ca²⁺流入の阻害に関して 2-APB よりも 100 倍位 IC50 の低い化合物を得ることに成功した。 (DPB161-AE,DPB162-AE,DPB163-AE) (Goto et al., *Cell Calcium* 2010, Suzuki et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 2010, Ozaki et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 2010)。 現在、IP₃ 受容体に特異的に作用する化合物を得るために合成とスクリーニングを開始している (図 13)。

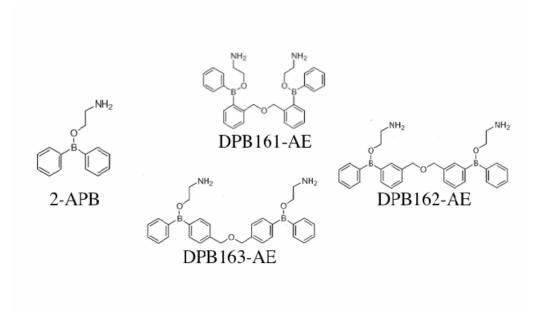


図12. 膜透過性カルシウム阻害剤の合成 (Cell Calcium, 2010, Bioorg Med Chem Lett. 2010)

(8-2) トランスグルタミナーゼの活性を阻害できれば、慢性炎症や神経変性などの難病の治療薬や予防に役立つことが予想される。しかし、まだ良い阻害剤がなかった。このトランスグルタミナーゼに注目し阻害剤となる新規化合物の合成に取り組んだ。多種の化合物の効果を一度に網羅的に測定できる測定法を開発し、化合物の構造と阻害効果の関係を調べ考察し、さらによい阻害剤を合成することに成功した。6-アミノケトン化合物にトランスグルタミナーゼ阻害活性があることを見出した。 $1C_{50}$ =0.082 μ M の世界一高い活性を示す化合物であった($Bioorganic\ Med\ Chem\ Lett$, 2010(a), 2010(b), 2011)。

(9) IP3 受容体の細胞内トラフィッキングの研究

1) IP。 受容体 mRNA を含む mRNA 顆粒の樹状突起内輸送の可視化

(J. Biol. Chem. 2004), (J. Neurochem. 2006, 2007) (J. Cell Sci. 2004)

我々が発見し命名した RNA 結合タンパク質 SYNCRIP (hnRNP Q1/NSAP1)が mRNA 顆粒の構成 要素であることを、プロテオミクス解析と細胞生物学的手法を用いて明らかにした。その過程で、蛍光タンパク質を用いて 1 型 IP3 受容体の mRNA を可視化し、IP3 受容体 mRNA が SYNCRIP を含む mRNA 顆粒で輸送されることを示唆するデータを得た。本研究の成果は、1 型 IP3 受容体 mRNA の 樹状突起における局所的翻訳が、カルシウムチャネルである IP3 受容体タイプの局在を制御し、カルシウムシグナルの空間的制御を担っている可能性を示している。

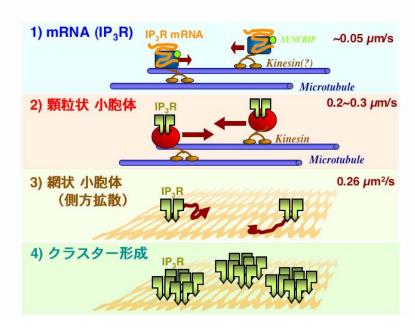


図 13. 4 種類の IP₃ 受容体の運搬(トラフィッキング)機構 (J. Biol. Chem. 2004)(J. Neurochem. 2006, 2007)(J. Cell Sci. 2004)

2) 分子モーターにより樹状突起内を輸送される, vesicle 状小胞体の発見

(J. Cell Sci. 2004), (J. Neurochem. 2006, 2007).

教科書によると、細胞内カルシウムストアである 「小胞体」は隅々まで一様に張り巡らされた網状の構造であるとされている。しかし本研究では、それに加えて樹状突起内をダイナミックに輸送される「vesicle 状小胞体」が存在することを発見した。Vesicle 状小胞体の輸送は微小管およびモータータンパク質 kinesin 依存的であることも確認した。さらに、vesicle 状小胞体は IP_3 受容体などの内在性の小胞体タンパク質を持ち、網状 ER と同様に細胞内カルシウムストアとして機能する能力を持つことも証明した。Vesicle 状小胞体は海馬神経細胞のカルシウムウエーブの開始点となる樹状突起の分岐点に多く存在することから、局所的なカルシウムシグナルの制御に役立つと予想される。

3) 1 型 IP₃ 受容体の側方拡散制御機構の発見

(J. Biol. Chem. 2004, Biochem. Biophys. Res. Comm. 2006)

海馬スライスの錐体細胞に発現させた GFP-1型 IP $_3$ 受容体(GFP-IP $_3$ R1)の動態を、樹状突起とスパインにおいて蛍光退色後回復法(FRAP 法)を用いて解析した。 IP $_3$ 受容体は小胞体の膜上を側方拡散によってダイナミックに動いていることを示した。さらに、1型 IP $_3$ 受容体には細胞骨格 F-アクチンと 4.1N(1型 IP $_3$ 受容体結合タンパク質)に依存した、固有の側方拡散制御機構が存在することが明ら

かになった。F-アクチンと 4.1N による 1 型 IP_3 受容体の拡散の制御は、F-アクチンの多い領域で 1 型 IP_3 受容体が働く際に、 Ca^{2+} 放出の空間的制御に関わる可能性がある。

次に小脳プルキンエ細胞内で調べたところ、 IP_3R1 は小胞体の ER 膜上で 2 次元拡散運動を行っているが、その運動はアクチン骨格の存在によって遅くなることを発見した。また、グルタミン酸受容体の活性化により細胞内のカルシウム濃度を上昇させたとき、スパイン内でのみアクチン細胞骨格の密度が増加し、 IP_3R1 の動きが遅くなることも示した。本研究の結果は、顆粒細胞—プルキンエ細胞間のシナプス長期抑圧誘導時に、プルキンエ細胞スパイン内でアクチン細胞骨格の増加を介して 1 型 IP_3 受容体の拡散運動が制限されることで、結果的に長期抑圧の定着に必要不可欠なスパイン内のカルシウムシグナルの増加を引き起こしている可能性を示唆するものである(I **Neurochem.** 2010)。

4) IP。受容体のクラスタリング機構の解析

(J. Biol. Chem. 2005a, J. Biol. Chem. 2005b), (J. Neurochem. 2006, 2007)

 IP_3 受容体には、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加するとクラスターを形成する(クラスタリング)という興味深い性質があることが報告されている。本研究では、 IP_3 受容体クラスタリングの時間経過と分子機構を詳細に解析した。変異体 IP_3 受容体を用いた実験により、 IP_3 受容体クラスタリングには $\underline{IP_3}$ 結合にともなう受容体の構造変化が必要であることを突き止めた。これは、 \underline{JJJJ} が必要であることを突き止めた。これは、 \underline{JJJJ} が必要容体がクラスターを形成することを示した世界初の報告である。

(10) IP。 受容体とヒトの疾患

(10-1) 小脳失調と1型 IP。受容体

2 型の IP3 受容体の欠損は重篤な小脳失調をひきおこすことは、我々が作製した遺伝子欠損マウス (Nature 1996)で明らかである。マウスで突然変異による異常が 2 つ報告されている。ヒトでは 2 家系 欠失変異による家系が報告されている。2 型、3 型の IP3 受容体のダブル欠損マウスでは唾液分泌障害、 涙腺分泌障害、膵液分泌障害がおきる。そこで全く同じ症状を呈するシェーグレン症候群の患者やリューマチの患者を含めた 2,000 人ちかくの自己免疫疾患患者を検索したところ、50%以上の確率で血清中に IP3 受容体抗体が検出された (Clin.Rheumatol. 2007, Modern Rheumatol. 2007)。各々の自己免疫疾患のタイプにより IP3 受容体の各々の異なるエピトープの抗体が産生されていた。これらの事実は自己免疫疾患患者の血清を用いて、診断薬としても使用しうる可能性があることを示している。

また、2型、3型 IP3受容体は、鼻粘膜においても分泌に対して重要な役割を果たしていると考えられた。IP3受容体の抗体により、鼻粘膜は染色されなかったが、鼻中幅に分泌腺があり、そこが染色された。おそらく、この分泌腺より分泌された物質が、鼻粘膜の維持の為に重要であるものと考えられる。加齢とともに鼻粘膜の変性が始まるが、この事実は IP3 受容体が鼻粘膜の維持に重要であることを示している(*European. J. Neurosci.* 2008)。

(10-2) 心臓発生、心肥大における IP₃ 受容体の役割 (*Plos One* 2010) 心臓発生

先天性心疾患は、出生の約1%、流産の約10%に認められる比較的頻度の高い先天異常の1つで、 日本では年間10,000人以上の子供が心臓に何らかの病気を持って生まれる。

1型および2型 IP_3 受容体の胎生期の発現様式を観察した。その結果、1型 IP_3 受容体は胎生早期から胎仔全体に発現し、2型 IP_3 受容体は心臓特異的に、特に心臓の内側の心内膜細胞から発現し始め、のちに心臓全体に発現することが分かった。単独の IP_3 受容体ノックアウトマウスには、心臓をはじめとする臓器発生異常が認められないことを確認していた。そこで今回、1型と2型 IP_3 受容体を同時にノックアウトしたマウス(ダブルノックアウトマウス)を作製したところ、ダブルノックアウトマウスでは、心房と心室の間の部分(房室管)の間葉系細胞の数が著しく減って心内膜床の発生異常を起こすことを発見した。また、ダブルノックアウトマウスの房室管を取り出し、シャーレ内で培養すると、上皮間葉転換の過程が十分に起こらなかった。さらに、ダブルノックアウトマウスの心臓では、NFATc1の核内への移行の程度が低下していることや脱リン酸化型 NFATc4 の量が減っていることから、カルシニューリンの活性が低下していることを推測することができた。

ダブルノックアウトマウスの心内膜床発生異常が、カルシニューリンの活性低下によるものかを検証するために、ダブルノックアウトマウスの房室管組織に、アデノウイルスベクターを用いて活性化されたカルシニューリンを恒常的に強制発現すると、上皮間葉転換の過程が回復し、間葉系細胞の数が有意に増加した。

1つの心房と1つの心室だけを持つゼブラフィッシュでも、胎生期に房室管に弁が形成される。ゼブ

ラフィッシュの胚に、 IP_3 受容体の阻害薬を加えると、房室管の上皮間葉転換が抑制され、弁の発生異常を引き起こした。 IP_3 受容体は、進化的に下等な動物からヒトまで広く発現し、心内膜床の発生に重要な役割を担うことを証明することになった。

今回、先天性心疾患の中でも頻度の高い心室中隔欠損、心房中隔欠損、心内膜床欠損などの疾患や弁の形成異常の一部に、 IP_3 受容体を介する細胞内カルシウムシグナルによるカルシニューリンの活性化が関与することが明らかとなった(図 15)。

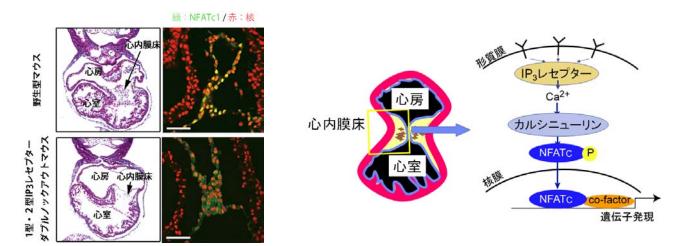


図 14 1型・2型 IP。受容体ダブルノックアウトでは心内膜床の発生異常が生じる

- (左図) 1型・2型 IP3 受容体ダブルノックアウトマウスでは、心内膜床内の間葉系細胞の数が著しく減少している。
- (右図) 1 型・2 型 IP3 受容体ダブルノックアウトマウスでは、心内膜細胞の NFATc1 は核内へ移 行せず 細胞質内にとどまっている。
- 図 15 (右) 心臓発生における IP3 受容体を介するシグナルカスケード 1 型・2 型 IP3 受容体を介する細胞内カルシウムシグナルは、カルシニューリンを活性 化することにより心内膜床発生を制御する。

心肥大(Circulation Res. 2010)

慢性心不全は、ヨーロッパの先進国において死亡原因の第一位を占める治療の困難な疾患で、心臓の 収縮拡張障害を主たる臨床的特徴としている。慢性心不全では、心肥大や心筋組織の線維化が観察され、 これらの病理学的変化が病態の進行に深くかかわっていると考えられている。

アンジオテンシン II 受容体や 8 アドレナリン受容体などの G タンパク質共役受容体は、刺激を受けると心肥大を引き起こすため、慢性心不全の病態形成において重要な役割を果たしていることが知られている。心臓では、これらの受容体を刺激すると IP_3 を生成し、この IP_3 によって IP_3 受容体が活性化され、細胞内のカルシウム貯蔵庫である小胞体からカルシウムイオンを放出する。 IP_3 受容体には 3 つのタイプがあり、いずれも心臓で発現していますが、中でも 2 型 IP_3 受容体の発現が優位であると考えられている。

(1) 心筋特異的 2型 IP3 受容体過剰発現マウスの作製と解析

心筋特異的に 2 型 IP_3 受容体を過剰発現するマウスを作製し、表現型を解析したところ、12 週齢で心肥大を示した。このマウスから単離した成体心筋細胞を用いて、 IP_3 受容体を介するカルシウムイオンの流出を調べた。G タンパク質共役受容体の1 つであるエンドセリン受容体を刺激して IP_3 を生成すると、カルシウムトランジエントの増大を観察した。この結果から、過剰発現した 2 型 IP_3 受容体が IP_3 感受性カルシウムチャネルとして機能していることが分かった。

心筋細胞において IP_3 を生成するアンジオテンシン 2 受容体持続刺激や8 アドレナリン受容体持続刺激によっても、2 型 IP_3 受容体過剰発現マウスは過大な心肥大反応を示した。これらの結果は、2 型 IP_3 受容体を介するカルシウムイオンの流出が、生体における心肥大を引き起こすことを示している。

(2) 心筋特異的 IP3 スポンジ過剰発現マウスの作製と解析

心筋特異的に IP_3 スポンジを過剰発現し、心筋における IP_3 受容体を介するカルシウムイオンの流出を抑制するマウスを作製した。このマウスでエンドセリン受容体刺激により IP_3 を生成すると、2 型 IP_3 受容体からのカルシウムイオン流出を抑制した。これは、エンドセリン刺激で生成した IP_3

が IP₃ スポンジに捕捉され、2型 IP₃ 受容体の活性化が抑制されていることを示している。

 IP_3 スポンジ過剰発現マウスは、アンジオテンシン II 受容体持続刺激や 8 アドレナリン受容体持続刺激に対しても、肥大反応の減弱を示した。これらの結果から、2 型 IP_3 受容体の活性化を抑制すると、生体における心肥大が抑えられることを確認できた。

(3) 生体心における IP3 受容体による心肥大へのカルシニューリンの関与

転写因子 NFAT は、カルシニューリンによって活性化され、心肥大を引き起こす。 IP_3 受容体を介したカルシウムイオンの流出による心肥大に、カルシニューリンが関与しているかどうかを、2型 IP_3 受容体過剰発現マウスで調べた。このマウスで NFAT の転写活性を測定したところ、転写活性の上昇が認められ、カルシニューリンが活性化していることが分かった。これは、2型 IP_3 受容体からのカルシウムイオンの流出がカルシニューリンを活性化し、心肥大を引き起こす可能性を示している。現在、慢性心不全の予後を改善するのに有効な治療薬として、B 受容体遮断薬とアンジオテンシン 変換酵素阻害薬が有効とされている。この2つの薬剤は、G タンパク質共役受容体刺激を抑制することでその効果を発揮する。今回、G タンパク質共役受容体刺激が引き起こす心肥大において、 IP_3 受容体が重要な役割を果たしていることが判明した。心不全の予後を改善する新しい薬剤の開発が期待される。

(10-3) 骨形成における IP3 受容体の役割 (Proc. Natl. Acad. Sci. 2008)

骨粗鬆症をはじめとする骨疾患は現代社会の大きな克服課題であり、骨疾患の早期原因究明・新規治療薬の開発が望まれている。現在、破骨細胞の分化を制御する機構が分子レベルで次々と明らかにされている。その研究成果から、破骨細胞の分化には転写因子 NFATc1 が必須な分子であることが明らかになった。

本研究では、以下の2つの方法で破骨細胞の分化誘導を比較した。

- 1. RANKL+M-CSF 添加による破骨細胞の分化(単独培養方法)
 - マウス骨髄由来の細胞に、精製された可溶型RANKL とM-CSF を加えて培養液中で約1週間培養し、分化を誘導するもので、破骨細胞の単独培養法である。
- 2. 骨芽細胞による破骨細胞の分化(共存培養方法)

マウス骨髄由来の細胞と**骨芽細胞**をビタミン D_3 存在下で共培養し、骨芽細胞が提示する RANKL を利用して破骨細胞の分化を誘導する。破骨細胞と骨芽細胞の共存培養法で、単独培養よりも、より生体内に近い状態であると考えられている。

マウスの破骨細胞と骨の解析にあたっては、マウスの大腿骨の切片を作製し、その切片内の破骨細胞を分化した破骨細胞が赤色に染める TRAP 染色法を用いて標識し、一定面積における破骨細胞数を数えた。骨密度はマイクロ CT を用いて計測した。 野生型と各サブタイプの IP_3R ノックアウトマウスの破骨細胞を用いて単独培養を行うことにより、破骨細胞には2型と3型の IP_3 受容体が発現しており、このうち2型が最も多く発現していることを明らかにした。さらに、2型 IP_3 受容体をノックアウトした細胞は、破骨細胞の単独培養法では分化が著しく阻害されること、RANKL 刺激によるカルシウムオシレーション、および NFATc1 の活性化 (核内移行) が起こらないことを突き止めた。これらの結果から、RANKL添加によって観察されるカルシウムオシレーションには2型 IP_3 受容体が必須であること、さらに今までの知見と同様に、カルシウム/カルシニューリン/NFATc1 というシグナル経路が阻害されると、破骨細胞の分化が妨げられることが判明した(図 15)。

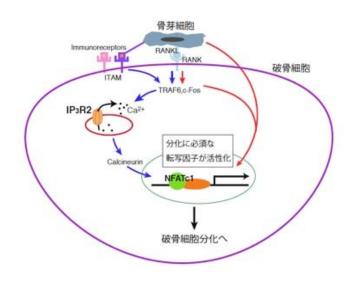


図15 骨形成に於ける情報伝達系

←細胞内カルシウム依存的な分子機構

←本研究で発見された細胞内カルシウム非存的な分子機構

(10-4) レドキシンセンサーとしての ERp44 の発見 (Cell 2005)

地球上の生物は、絶えず活性酸素種や様々なストレスによって生み出される酸化ストレスの危険に曝されている。長い進化の過程で、生物は、生体内の酸化還元(レドックス)状態を制御するレドックス制御機構を発達させることで、それらのストレスに対応し、生体内の恒常性を維持することに成功してきた。

今回、我々は ERp44 と呼ばれるタンパク質が、細胞内でカルシウム伝達に関与している 1型 IP3 受容体に結合し、そのカルシウム放出活性を制御し、レドックス機構を制御することを見いだした。このことにより、レドックス制御と IP3 受容体を介したカルシウム情報伝達が、深く関連していることが初めて示された。細胞内の小胞体と呼ばれる器官でレドックス状態を認識する分子の発見は初めてで、しかも IP3 受容体と直接連携してカルシウムを制御しているという、この発見の意義は細胞内の酸化ストレス還元メカニズムを解明する点で大変大きい。 ERp44(Thioredoxin family)は小胞体内の酸化還元状態をセンスしてカルシウム依存的に IP3 受容体の活性を制御する。IP3 受容体の小胞体内向腔の Cysteine は ERp44 による IP3 受容体の不活性化に必須で ERp44 制御は IP3 受容体活性を亢進し、また、ERp44 の過剰発現はアポトーシスを制御することを明らかにした。

最近、1型 IP3 受容体のカルシウム放出活性の異常がアルツハイマー病やハンチントン病の発症に関与していることが報告され、また、レドックス状態の制御不全が、加齢に伴う様々な老化現象を引き起こす一因と考えられている。ERp44 を過剰発現させると細胞死を抑制するという結果も含めて、今回の発見が、新たな細胞内シグナル伝達経路の発見にとどまらず、医学・健康科学において応用されることが期待される。

Reduction Low Ca²⁺ ER Oxidation High Ca²⁺

図16 酸化還元制御とカルシウムシグナリングは共にリンクしている。

(10-5) 1型 IP。 受容体と結合するシャペロン GPR78 と神経変性 (Neuron 2010)

小胞体ストレスは、神経細胞死ひいては神経変性疾患を引き起こすと考えられている。また小胞体ストレスは、細胞内カルシウム情報伝達系の制御不全を引き起こすことが知られている。しかしながら、小胞体ストレスにおける、異常カルシウムと細胞死の関係は未だ不明である。そこで、小胞体ストレスによる神経細胞死における 1型 IP_3 受容体の関与を調べたところ、ストレス下では 1型 IP_3 受容体の機能が損なわれることが分かった。更に 1型 IP_3 受容体欠損マウスを用いた実験により、1型 IP_3 受容体の機能喪失は、小胞体ストレス状況下で、神経細胞死を引き起こすことが分かった。小胞体ストレス下での 1型 IP_3 受容体の機能低下の理由を調べたところ、1型 IP_3 受容体と GRP78 との機能的結合が阻害されることが分かった。 GRP78 は、IP3R1 の4量体形成を制御し、1型 IP_3 受容体のチャンネル機能を促進する蛋白質である。この制御は、ATP の分解によって生じるエネルギーを必要とすることが分かった。 $ハンチントン病のモデルマウスでは、小胞体ストレス下と同様に、1型 <math>IP_3$ 受容体と GRP78 の結合が阻害され、1型 IP_3 受容体のカルシウム放出機能が低下していることが分かった。これらの結果から、小胞体ストレス下では、 GRP78 による制御が抑制されるため 1型 IP_3 受容体の機能が低下し、神経細胞死が誘導されることが示された。

6. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

世界で最初に IP_3 受容体の cDNA クローニングやタンパク質解析に成功した為、現在、国内では我々がリードして研究をすすめている。海外では我々が報告した論文のデータを元にして実験計画を練っている段階であるため、オリジナリティーは常に我々にあり、常に先行していると考える。新しく発見した IP_3 受容体に結合するタンパク質については、海外のグループも重要と考えているらしく、我々を追従する形で研究が進められている。 IP_3 受容体の機能を修飾する有機化合物の合成も順調に進んでおり、海外からも多くのリクエストが来ている。当初の設問であった、 IP_3 受容体がどのようにして多様な機能を有するかは、 IP_3 受容体が単なるカルシウムチャネルでないことである。すなわち IP_3 受容体はいわゆるスキャフォールドタンパク質として Signaling Hub の役割をもっており、約 20 以上のタンパク質と結合していることである。しかも、各々の細胞で、含まれているタンパク質は異なっているために、細胞毎に多様でユニークな働きを持つものと考えられる。

7. 外部発表投稿集計表

		合 計	口 頭 発 表	ポスター 発 表	講演	論	総説・書籍	メデイア 発 表
	国内	0	0	0	0	0	0	0
平成 17 年度	国外	0	0	0	0	0	0	0
	合計	0	0	0	0	0	0	0
	国内	27	2	1	15	0	5	4
平成 18 年度	国外	17	2	0	5	10	0	0
	合計	44	4	1	20	10	5	4
	国内	8	1	1	6	0	0	0
平成 19 年度	国外	23	8	2	1	12	0	0
	合計	31	9	3	7	12	0	0
	国内	14	1	1	10	0	0	2
平成 20 年度	国外	14	3	0	2	9	0	0
	合計	28	4	1	12	9	0	2
	国内	22	6	8	5	0	2	1
平成 21 年度	国外	14	1	1	4	8	0	0
	合計	36	7	9	9	8	2	1
	国内	11	1	5	2	0	1	2
平成 22 年度	国外	24	8	1	0	13	2	0
	合計	35	9	6	2	13	3	2
	国内	82	11	16	38	0	8	9
合 計	国外	92	22	4	12	52	2	0
	合計	174	33	20	50	52	10	9

平成18年度外部発表記録

1 1/4/4.1	LO平度外部分				
NO	発表年月	題目	発表学会誌 投稿雑誌名	発表者	備考
1	2006.4	IP ₃ レセプター: 発見から構造生物学的・ 生物物理学的解析へ	平成18年度東京大学大学院 薬品作用学特論 「脳神経科学研究の最前線」	御子柴 克彦	特別セミナー
2	11	Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells	The Journal of Cell Biology (No173,755-765,2007) (2006年6月5日号)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論 文
3	II	Distinct Role of the N-terminal Tail of the Na,K-ATPase Catalytic Subunit as a Signal Transducer	The Journal of Biological Chemistry (Vol.281,No31,.21954-21962) (2006年8月4日号)	張松柏等 (共同研究)	II
4	2006.5	カルシウムがひも解く生命の神秘	特別講義 「ポストゲノム時代の 先端分子医学」	御子柴 克彦	講義
5	11	Short-term potentiation at the parallel fiber-Purkinje cell synapse	Neuroscience Research (2006年5月号)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論 文
6	II	IRBT, an inositol 1,4,5- trisphosphate receptor-binding protein specifically binds to and activates pancreas-type Na+/HCO3 cotransporter 1(pNBC1)	Proceedings of the National Academy of Sciences (No103,9542-9547) (2006年6月20日号)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	IJ
7	II	カルシウム振動のメカニズムの 一端を解明	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (The Journal of Cell Biology)	理 研 (共同発表)	プレス発表

NO	発表年月	題目	発表学会誌 投稿雑誌名	発表者	備考
8	2006.6	分子生物からみた脳の発達	第48回 (千葉県浦安市:東京ベイホテル東急)	御子柴 克彦	特別講演
9	IJ	細胞内pHバランスの新たな 制御機構の解明 (pHの異常に起因する病気の 治療につながる可能性)	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (Proceedings of the National Academy of Sciences)	JST (共同発表)	プレス発表
10		細胞内カルシウムの制御:	平成18年度東京大学大学院	御子柴 克彦	講義
	n	IP₃受容体/カルシウムチャネルの 構造とその生理機能	医学共通講義□ 神経科学入門 21世紀COEプログラム 「脳神経医学の融合的研究拠点」		
11	11	$IRBT$ suppresses IP_3 receptor activity by competing with IP_3 for the common binding site on the IP_3 receptor	Molecular Cell (No22,1-12,2006) (2006年6月23日号)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
12	IJ	細胞内のカルシウムチャネルに 情報伝達を邪魔する"偽結合体" を発見 -IP3受容体にIP3と競合して結合する タンパク質「アービット」の機能を 解明-	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (Molecular Cell) (2006年6月23日号)	理 研 (共同発表)	プレス発表
13	II	細胞内カルシウム動態と生理機能	日本麻酔科学会 第53回学術集会 (神戸市)	御子柴 克彦	特別講演
14	"	IP₃ receptor and Ca²+ signaling	第20回 国際生化学・ 分子生物会議 (国立京都国際会館)	御子柴 克彦	シンホ゜シ゛ウム
15	11	脳と心の形成 〜遺伝子レベルで解明されはじめた 脳と心の形成〜	Newtonムック ここまで解明された脳と 心のしくみ pp44-51.2006	御子柴 克彦	総説
16	2006.7	${ m IP_3receptor/Ca^{2+}channel}$ in cell signaling	2006 FASEB Summer Research Conferences Calcium and Cell Function (アメリカ:コロラド)	御子柴 克彦	シンポシ゛ウム
17	II	Short-term potentiation at the parallel fiber-Purkinje cell synapse	第29回 日本神経科学大会 (国立京都国際会館)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	ポスター
18	2006.8	IP ₃ レセプター/Ca ²⁺ : 発見から新しいシグナリング 概念の確立へ	第18回 高遠・ 分子細胞生物学シンポジウム (長野県伊那市高遠町)	御子柴 克彦	特別講演
19	II	細胞内ダイナミクス	第3回 バイオサイエンスの最先端 (神奈川県逗子市: 湘南国際村)	御子柴 克彦	n
20	11	カルシウムチャネルとしてのIP ₃ 受容体の生理機能	実験医学 Vol 45 No45 pp665-672.2006	御子柴 克彦	総説
21	2006.9	4.1N binding regions of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	Biochemical and biophysical Research Communications 342(2006) 573-576	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
22	11	inositol 1,4,5-trisphosphate (IP ₃) receptors and their role in neuronal cell function	Jounal Neurochemistry 2006,97 1627-1633	御子柴 克彦	n
23	11	細胞内カルシウムと 細胞の生理と病態	第9回 名古屋アポトーシス 研究会 (名古屋大学医学部)	御子柴 克彦	特別講演

NO	発表年月	題 目	発表学会誌 投稿雑誌名	発表者	備考
24	2006.9	IP ₃ receptor/Ca ²⁺ channel: from its discovery to establishment of a new concept	仅備粧応石 UCSF Neuroscience Retreat (アメリカ・サンフランシスコ)	御子柴 克彦	特別講演
25	11	1%のカルシウムの働き	現代化学 No426.pp14-18.2006	御子柴 克彦	総説
26	II	分子から読み解く精神機能と疾患	第28回 日本生物学的精神医学会 (名古屋市)	御子柴 克彦	特別講演
27	2006.10	脳神経系における分子 - 形態 - 機能連関 - 正常と異常の解析から	日本生化学会関東支部例会 /新潟2006 (旭町総合研究棟(COEt゙ハ)	御子柴 克彦	招待講演
28	II	神経細胞の"樹状突起"を形成 する仕組みに新たな知見 -顆粒細胞中のIP3受容体が神経 ネットワークの形成に関与-	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (The Journal of Neuroscience)	理 研 (共同発表)	プレス発表
29	n	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1in granule cells, not in purkinje cells,regulates the dendritic morphology of	The Journal of Neuroscience 26(42),10916-10924 (2006年10月28日号)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
		purkinje cells through brain- derived neurotrophic factor production			
30	II	Visualization of Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by atomic force microscopy	Nuroscience Letter 391(3),102-107 2006	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
31	11	パネルディスカッション: 医学教育の将来構想について	慶應義塾大学医学部 21世紀COEプログラム	御子柴 克彦	シンホ゜シ゛ウム
32	"	細胞内カルシウムチャネル (IP₃受容体)発見への道	現代化学 No427.pp47-51.2006	御子柴 克彦	総説
33	2006.11	IP ₃ receptor/Calcium channel: from discovery to establishing a new physiological concept	Dept.of Biological Chemistry University of Padova	御子柴 克彦	特別講演
34	2006.11	Organelles containing inosotol trisphosphate receptor tepe 2 in adrenal medullary cells	The Journal of Physi- ological Sciences Vol 56 No6.pp1-6.2006	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
35	2006.12	Molecular dynamics of brain development and differentiation	5 th Venetian Institute of Molecular Medicine (イクリア : Bertinoro)	御子柴 克彦	特別講演
36	2007.1	2-Aminoethyl diphenylborinata analogues:Selective inhibition for store-operated Ca ²⁺ entry	Biochem.Biophys Res.Commun 352.pp277-282.2007	中村健等	論 文
37	11	細胞内カルシウム動態研究の最前線	大阪市立大学講義 特別セミナー(大阪市)	御子柴 克彦	特別講演
38	II	思いもよらないIP₃受容体の 細胞内での素顔	現代化学 No430.pp61-56.2007	御子柴 克彦	総説
39	2007.2	Role of Ca ²⁺ signaling in cell function in special reference to salivary gland and exocrine secretion	2006.Gordon Research Conferences on Salivary on Glands and Exocrine Secretion (Ventura.USA)	御子柴 克彦	キーノート レクチャー
40	11	IP ₃ receptor/Ca ²⁺ channel: Role in development and cell signaling	Calcium Signals and Developmental Patterning (The Royal Society) (London.UK)	御子柴 克彦	シンポシ゛ウム
41	n	カルシウムがひもとく 生命の神秘	DNA研究会 東海大学校友会館 (神奈川)	御子柴 克彦	特別講演

NO	発表年月	題目	発表学会誌 	 	備考
110	九双十八) <u>(2</u>	投稿雑誌名	九女日	E-1- EHV
42	2007.3	カルシウム動態と細胞内 シグナル伝達機構	第80回 日本薬理学会年会	御子柴 克彦	特別講演
43	11	カルシウムイオンと シグナル伝達	第84回 日本生理学会大会 荻原生長記念レクチャー (大阪国際交流センター)	御子柴 克彦	IJ
44	n	カルシウムと細胞情報伝達 - IP3 レセプターの構造・ 機能とその細胞機能 -	国際シンポジウム 「バイオサイエンスの最前線」 (東京・パレスホテル) 主催:東大医科研 共催:カルシウム振動プロジェクト 理研	御子柴 克彦	講演

平成19年度外部発表記録

十八人	19年度外部	光			
NO	発表年月	題 目	発表学会誌	発表者	備考
	·		投稿雑誌名		
1	2007.4.21	神経発辰におけるリチウムと カルシウムイオンの作用	リチウム研究会 (東京)	御子柴 克彦	特別講演
2	2007.5.1	Molecular basis of the inoform- specific ligand binding affinity of inositol 1,4,5-trishosphate receptors	Jounal Biol Chem. 252(17) 12755-12764 2007	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
3	2007.5.17	カルシウムイオンとシグナル伝達	日本神経学会 特別講演 第6回 重症筋無力症治療フォーラム (名古屋国際会議場)	御子柴 克彦	招待講演
4	$2007.5.25$ ~ 26	IP_3 receptors/ Ca^{2+} channel and its role in cell function	Nobel Forum symposium on phosphorylated inositols (スウェーデン・カロリンスカ研究所)	御子柴 克彦	特別講演
5	2007.6.7 ~9	IP ₃ receptors/Ca ²⁺ channel and cell signaling	The University of Manchester (イギリス)	御子柴 克彦	口頭発表
6	$2007.6.14$ ~ 15	神経細胞の生理学 〜脳神経系の発生・分化の 分子機構の解明〜 細胞内情報伝達とカルシウム	京都大学特別講義 (京都市)	御子柴 克彦	招待講演
7	2007.7.8 ~12	Molecular basis of the inoform- specific ligand binding affinity of inositol 1,4,5-trishosphate receptors	ティルトン大学 ニューハンプシャー州 (アメリカ)	御子柴 克彦	ポスター
8	2007.8.7	Inositol 1,4,5-trishosphate receptors are autoantibody target antigens in patients with Sjogren's syndrome and other systemic rheumatic diseases	Mod Rheumatol 17.(2) 137-143 2007	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
9	$2007.9.10$ ~ 12	A role of Disable-1 as a transcription factor in Reelin signaling	第50回 日本神経化学会(横浜大会)	御子柴 克彦	口頭発表
10	2007.9.12	今後の新しい展開に向けて Towards further development of the signaling field	Neuro2007 (横浜市)	御子柴 克彦	招待講演
11	$2007.9.16$ ~ 24	${ m IP}_3$ receptor	Pasteur Institut (フランス・パリ)	御子柴 克彦	口頭発表
12	$2007.10.16$ ~ 21	IP ₃ receptor/Ca ²⁺ channel	14 th Congress of Ca ²⁺ Binding Proteins and Ca ²⁺ Function in Health and Disease	御子柴 克彦	口頭発表
13	$2007.10.30$ ~ 11.2	IP ₃ receptor/Ca ²⁺ channel: role in cell function	The 4 th Meeting of International Redox Network (韓国・済州島)	御子柴 克彦	口頭発表
14	2007.11.2 ~3	Abnormal Taste Perception in Mice Lacking the Type3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor	The 5 th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forun 2007)	久恒 智博 等 (共同研究)	口頭発表
15	$2007.11.4 \sim 7$	${ m IP_3}$ receptor/ ${ m Ca^{2+}}$ channel and its role in cell signaling	Inositide Signaling Symposium (アメリカ・ワシントン)	御子柴 克彦	口頭発表

				1	- 1
NO	発表年月	題目	発表学会誌	発表者	備考
			投稿雑誌名		
16	$2007.11.22$ ~ 23	Calcium signaling and cell function	Karolinska Institutet-RIKEN-BSI First Joint Symposium	御子柴 克彦	口頭発表
17	2007.11.26	イノシトール1,4,5・三リン酸受容体 のアミノ末端カップリングドメイン においてリガンド結合抑制と チャネルゲーティングに必須な アミノ酸残基の同定	BSI Retrert 2007 (長野県軽井沢市)	山崎 美佳	ポスター
18	2007.11.30	The role of Ca ²⁺ signaling in cell function with special reference to exocrine secretion	The 13 th Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club (京都市)	御子柴 克彦	招待講演
19	2008.1.25	Structure of IP ₃ receptor/Ca ²⁺ channel and its cell function	Fukuoka Symposium on Molecular Soft Interactions at Biomembrane Interface (福岡市・九州大学)	御子柴 克彦	招待講演
20	2008.2.2 ~6	2-dimensional spatial profile of IP ₃ R-Dependent Elementary Ca ²⁺ Event	Joint 52 nd Annual Meeting of the Biophysical Society and 16 th IUAPB International Biophysics Congress (Long Beach California)	道川 貴章 (共同研究)	口頭発表
21	2008.3.24	The IP ₃ receptor/ Ca ²⁺ channel and its cellular function	Biochem Soc Symp 2007.74.p9-22	御子柴 克彦	論 文
22	2008.3.24	IP_3 receptor/ Ca^{2+} channel: from discovery to new signaling concepts	J Neurochem 2007.102 p1426-46	御子柴 克彦	論文
23	2008.3.24	From Ca ²⁺ in muscle contraction to IP ₃ receptor/ Ca ²⁺ signaling in memory of Setsuro Ebashi	Biochem Biophys Res Commum 369.(2208).p57-61	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論 文
24	2008.3.24	Type 2 and type 3 inositol 1.4.5-trisphosphate(IP ₃) Receptors promote the diffrentiation of granule cell precursors in the postnatal cerebellum	J Neurochem 2008.105 p1153-1164	二木 啓 等 (共同研究)	論 文
25	2008.3.24	$ m Predominant\ role\ of\ type\ 1$ $ m IP_3\ receptor\ in\ aortic\ vascular$ $ m muscle\ contraction$	Biochem Biophys Res Commum 369.(2008).p213-219	中村 健等 (共同研究)	論文
26	2008.3.24	Up-regulated PAR-2mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes	The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Vol.320.No2.p516-524.2007	中村 健 等 (共同研究)	論 文
27	2008.3.24	Human malarial parasite, Plasmodium falciparum,displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the P.falciparum cell cycle	Journal of Pineal Research 2007.43 p360-364	御子柴 克彦等 (共同研究)	論 文
28	2008.3.24	Ligand-induced conformational changes via flexible linkers in the amino-terminal region of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	J.Mol.Biol 2007.373 p1269-1280	御子柴 克彦等 (共同研究)	論文

NO	発表年月	題目	発表学会誌 投稿雑誌名	発表者	備考
29	2008.3.24	Cyclin-dependent kinase 5 is required for contorol of neuroblast migration in the postnatal subventricular Zone	The Journal of Neuroscience 2007.11.27 27(47).p12829-12838	御子柴 克彦等 (共同研究)	論文
30	2008.3.24	Abnormal taste perception in mice lackling the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	The Journal of Biological Chemistry 2007.12.21 282.51.p37225-37231	御子柴 克彦等 (共同研究)	論文
31	2008.3.24	Regulatory mechanism of IP3 receptor type1 lateral diffusion in neurons	1st European Synapse Meeting (フランス・ボルドー)	御子柴 克彦	ポスター

平成 20 年度外部発表記録

NO	発表年月	題目	発表学会誌	発表者	備考
.,,	22177	A II	投稿雑誌名	7077 1	VIII 3
1	2008.4.1	Syntaxin 6 regulates nerve growth factor -dependent neurite outgrowth	Neuroscience Letters 436(2008) 340-344	樺山 博之 等 (共同研究)	論文
2	2008.5.7	Role of the insP3 receptor and calcium signaling in development and brain function and disorders	Accademia Nazionale dei Lincei "The calcium signal: on the tracks of Setsuro Ebashi" (イタリア・ローマ)	御子柴 克彦	口頭
3	2008.5.14	Phosphorylation of Homer3 by calcium/calmodulin dependent kinase II Regulates a coupling state of its target molecules in Purkinje cells	The Journal of Neuroscience May 14,2008 28(20) p5369-5382	二木 啓 等 (共同研究)	論文
4	2008.5.14	細胞内Ca2+動態と IP3レセプター	自治医科大学大学院 医学研究科 開設周年記念特別講演会 (栃木県・自治医科大学)	御子柴 克彦	講演
5	2008.5.15	神経研究の今後:分子から病態へ	日本神経学会総会 特別シンポジウム 一神経疾患の解明と治療ー (横浜市)	御子柴 克彦	講演
6	2008.5.19	Homerのリン酸化が神経活動に 伴うシナプス後部構造の柔軟化 を担う	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (Journal of Neuroscience)	理研 (共同発表)	プレス発表 (資料配布)
7	2008.6.4	Osteoblasts induse Ca ²⁺ oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis	Proceedings of the National Academy of Sciences June 24,2008,vol105,no25 p8643-8648	久恒 智博 等 (共同研究))	論文
8	2008.6.6	骨を吸収する細胞である破骨細胞の 新しい分化機構を発見	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (Proceedings of the National Academy of Sciences)	JST (共同発表)	プレス発表 (資料配布)
9	2008.6.10	Recent advances in IP ₃ receptor/calcium signaling	Linkopings Universitet (リンシュピング大学:スウェーデン	御子柴 克彦	講演
10	2008.6.11	Recent advances in IP ₃ receptor/calcium signaling	カロリンスカ研究所 (スウェーデン)	御子柴 克彦	講演
11	2008.6.19	Recent progress of brain research	Science and technology meeting at European Union (東京)	御子柴 克彦	講演
12	2008.6.23	Decreased olfactory mucus secretion and nasal abnormality in mice lacking type 2 and 3 IP_3 receptors	European Journal of Neuroscience Vol.27no21,pp.2665-2675,2008	御子柴 克彦 (共同研究)	論文
13	2008.7.9	タイプ3 IP3 受容体欠損マウス における味覚異常	第31回 日本神経科学大会	久恒 智博等 (共同研究)	ポスター
14	2008.7.9	The role of Ca2+ Signaling in cell function with special reference to exocrine secretion	The 13th Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club (京都市)	御子柴 克彦	講演
15	2008.8.22	脳の神秘へ挑む	Shujitsu Science Café (岡山市)	御子柴 克彦	講演
16	2008.8.29	Ca ²⁺ induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse	Molecular and Cellular Neuroscience 40(2009)27-38	樺山 博之 等 (共同研究)	論文
17	2008.9.17	Role of calcium ions in development, brain function and disorders	Seminaire Departmental (パリ:パッスール研究所)	御子柴 克彦	口頭

NO	発表年月	題 目	発表学会誌	発表者	備考
1.0			投稿雑誌名		<i>V</i> 13 3
18	2008.9.19	Role of calcium ions in development, brain function and disorders	Sherrington Lecture 20th Annual Conference, University of Liverpool,UK: Promoting a Global Science Culture (イギリス・リバプール大学)	御子柴 克彦	口頭
19	2008.9.19	The role of Ca2+ signaling in cell function with special reference to exocrine secretion	Coenea Vol.28 No.8 Suppl.1 Sep 2008	久恒 智博 等 (共同研究)	論文
20	2008.10.13	Molecular genetic analysis of neurode generative disorders	第16回 精神医学的遺伝学世界会議 (大阪市・大阪国際コンバンジョンセンター)	御子柴 克彦	口頭
21	2008.10.14	脳神経障害の発症と病因の分子機構	関東地区脳血管障害懇話会 (東京)	御子柴 克彦	講演
22	2008.10.15	IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO3-secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct	The Journal of Clinical Inverstigation Vol.119No.1 p193-p202 2009	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
23	2008.11.13	脳神経科学の研究戦略 一神経疾患解明と創薬を目指して一	かわさきサイエンス& テクノロジーフォーラム2 (川崎市)	御子柴 克彦	講演
24	2008.11.19	細胞内のCa2+イオンと生命現象	慶応義塾大学医学部 横浜三四会総会	御子柴 克彦	講演
25	2008.11.28	La production d' oscillations calciques par la recepteur a IP3 : une propriete essentielle des	東京大学	御子柴 克彦	講演
26	2009.1.19	80K-H Interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors and regulates IP3-induced calcium Release activity	The Journal of Biological Chemistry Vol.284.No1, 1月2日.2009	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
27	2009.3.12	An IRBIT homologue lacks binding activity to nositol 1,4,5-trisphosphate receptor to the unique N-terminal annendage	The Journal of Neurochemistry Vol.109.No2, p539-50 安東 英明 等 (共同研究)		論 文
28	2009.3.13	Mechanism of brain development and disorders	システム神経生物学 スプリングスクール (京都市)	御子柴 克彦	講演

平成21年度外部発表記録

	* + + + □	HE I	発表学会誌	3 7% 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	/++: - 1 /-
NO	発表年月	題 目	投稿雑誌名	発表者	備考
1	$2009.5.7$ ~ 12	Molecular and cellular mechanism of brain development	Neroscience Seminar WCU (韓国・国立ソウル大学)	御子柴 克彦	講演
2	2009.6.5	IP ₃ 受容体とCa ²⁺ シグナリング	スウェーデン カロリンスカ研究所 ワークショップ	御子柴 克彦	講演
3	2009.6.6	抑制性神経伝達を制御する新たな分子メカニズムを発見ーシナプスにおける受容体の側方散GABA作動性シナプス伝達効率を決める一	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (Neuron Vol6.No2 670-682, 2009	理研 (共同発表)	プレス発表 (資料配布)
4	2009.6.8	Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABA _A R diffusion dynamics	of inhibitory neurotransmission Vol6.No2 based on GABAAR diffusion 670-682,2009		論文
5	2009.6.16	脳神経系の発生と分化の 分子・細胞生物学的解析 - IP3受容体の発見と その解析を中心として-	第129回 奈良医学会	御子柴 克彦	招待講演
6	2009.6.15	定量的 high throughput DNA シークエンサーを用いた 神経分化におけるmicroRNA の網羅的発現解析	平成21年度 生理学研究所 研究会 「シナプス可塑性の 分子的基盤」	安東 英明	口頭
7	2009.6.21	Analysis of gene expression changes associated with long-lasting synaptic enhancement in hippocampal slice cultures after repetitive exposures to glutamate	第52回 日本神経化学会大会 (栃木県 伊香保温泉: ホテル天坊)	河合 克宏 等 (共同研究)	口頭
8	2009.6.21 ~26	Non-concerted calcium releases from multiple sites generate individual calcium puffs in intact cells	Gordon Research Conferences - Calcium Signalling - Italy Lucca(Barga)	道川 貴章等 (共同研究)	ポスター
9	2009.6.30	Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca ²⁺ release via acid store IP ₃ receptors	PNAS Vol106.No26 10758-10763 6.30,2009	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論 文
10	2009.7.2	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate (IRBIT),associates with component of the mRNA 3 processing machinery in a phosphoryation-dependent manner and inhibits polyadenylation	J Biol Chem Vol.284 No.16 10694-705 2009	安東 英明 等 (共同研究)	論文
11	2009.7.8	Discovery of IP ₃ receptor: Biochemical,structural feature and its role in development	Neroscience Seminar WCU (韓国・国立ソウル大学)	御子柴 克彦	講演
12	2009.7.9	IP3 receptor/Ca ²⁺ channel: New signaling cascade in brain function and disease	Neroscience Seminar WCU (韓国・国立ソウル大学)	御子柴 克彦	講演
13	2009.7.27 ~8.1	Ca ²⁺ induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse	第36回 国際生理学会 (京都:京都国際会館)	樺山 博之 (共同研究)	ポスター

NO	発表年月	題目	発表学会誌 投稿雑誌名	発表者	備考
14	2009.7.27 ~8.1	Calcium dynamics through IP ₃ receptor	第36回 国際生理学会 (京都:京都国際会館)	御子柴 克彦	口頭
15	2009.7.27 ~8.1	IP ₃ receptor/Ca ²⁺ signaling in various physiological functions	第36回 国際生理学会 (京都:京都国際会館)	御子柴 克彦	口頭
16	2009.9.3	中枢神経系の発生と分化 - IP ₃ 受容体の発見と その機能の解明 -	内藤財団時報 第84号 P18−25. 9. 21	御子柴 克彦	総説
17	$2009.9.16$ ~ 18	アデノウイルスベクターを 用いた細胞腫特異的な 外来遺伝子導入法の確立	第32回 日本神経科学大会 (名古屋:名古屋国際会議場)	山田 義之 等 (共同研究)	ポスター
18	$2009.9.16$ ~ 18	IRBITの中枢神経系に おける分布について	第32回 日本神経科学大会 (名古屋:名古屋国際会議場)	安東 英明 等 (共同研究)	ポスター
19	2009.9.18 ~19	生体内における破骨細胞分化は カルシウムオシレーション依存的 及び非依存的メカニズムによって 制御されている	第10回 運動器科学研究会 The 10th Locomotor Science Meeting	御子柴 克彦 等 (共同研究)	ポスター
20	2009.10.10	カルシウムがひもとく生命の神秘	学習院大学生命科学シンポジウム 「生命の秘密を解く鍵を求めて 第6回」	御子柴 克彦	招待講演
21	2009.10.16	G-protein-coupled receptor kinase-interacting proteins inhibit apoptosis by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor -mediated Ca ²⁺ signal regulation	Jornal of Biological Chemistry Vol284,No42,2009 29158-29169	張 松柏 (前研究員)等 (共同研究)	論文
22	2009.10.23	Knockdown of Ca _v 2.1 calcium channels is sufficient to induce neurological disorders observed in natural occurring Cacna la mutants in mice	Biochemical and BiophysicalResearch Communications 390,2009 1029-1033	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
23	$2009.10.21$ ~ 24	IP ₃ 受容体 Ca ²⁺ チャネルと 細胞間接着の機能的接点	第82回 日本生化学会大会 (神戸市:神戸国際会議場)	御子柴 克彦	口頭
24	2009.10.21 ~24	イノシトール三リン酸受容体 カルシウム放出チャネル の開口機構	第82回 日本生化学会大会 (神戸市:神戸国際会議場)	道川 貴章 等 (共同研究)	ポスター
25	$2009.10.21$ ~ 24	IP ₃ 受容体結合タンパク質IRBIT のホモログ Long-IRBIT の 発現・機能解析	第82回 日本生化学会大会 (神戸市:神戸国際会議場)	安東 英明等 (共同研究)	ポスター
26	2009.10.30 ~11.1	アストロサイトにおける カルシウムシグナルの 空間的制御機構の解明	第47回 日本生物物理学会 (徳島県:徳島文理大学)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	ポスター
27	2009.11.15 ~21	IP ₃ Iigand gated Ca ²⁺ channel : Structure and its variety of physiological and pathological functions	16 th Symposium on Ca ²⁺ -Binding Proteins and Ca ²⁺ Function in Health and Disease (チリ・プーコン)	御子柴 克彦	口頭
28	2009.11.27	Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate(2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca ²⁺ entry via STIM proteins	Cell Calcium 47,2010 1-10	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論 文

NO	発表年月	題目	発表学会誌	発表者	備考	
	3277777	,_ ,.	投稿雑誌名	, , , , ,	, ·	
29	2009.12.9 ~12	Ca ²⁺ induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse	第32回 日本分子生物学会年会 (横浜市:パシフィコ横浜)	樺山 博之 (共同研究)	ポスター	
30	2009.12.22	Potent transglutaminase inhibitors, aryl β -aminoethyl ketones	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20,2010 1141-1144	濱田 耕造 等 (共同研究)	論文	
31	2010.1.11	Synthesis of bisboron compounds and their strong inhibitory activity on store-operated calcium entry	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20,2010 1395-1398	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文	
32	2010.1.23	中枢神経系の発生と分化 - IP ₃ 受容体の発見と その機能の解明 -	第20回 日本病態生理学会 (奈良県:奈良県立医科大学)	御子柴 克彦	招待講演	
33	2010.1.28	脳神経の機序解明から 生体の謎にせまる - 分子からみたin vivo サイエンス-	実験中央研究所 2010年 新春セミナー (神奈川県:川崎市)	御子柴 克彦	招待講演	
34	2010.2.1	日本の科学技術の現状と提言	学術の動向 2010.2月号 御子柴 克 96-100		総説	
35	2010.2.14	カルシウムがひもとく 生命の神秘	会津医学会講演会 (福島県: 会津若松市)	御子柴 克彦	招待講演	
36	2010.3.28 ~30	細胞内カルシウムイオンの 調節機構及び生理機能の解明 — その病態時の治療薬の 開発をめざしてー	日本薬学会 第130年会	御子柴 克彦	口頭	

平成22年度外部発表記録

— hX.	22年度外部	完衣 記述			
NO	発表年月	題 目	発表学会誌	発表者	備考
110	2020 73	Z) I	投稿雑誌名	九次日	ν ια 3
1	2010.5.29	脳の研究と日仏交流	日仏生物学会 第172回例会 (東京:日仏会館)	御子柴 克彦	招待講演
2	2010.6.1	Isolation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Associating Proteins and Selective Knockdown Using RNA Interference	Methods in Molecular Biology, Vol.645 p133-p141.2010 Inositol Phosphates and Lipids -Methods and Protocols- (Humana Press)	御子柴 克彦 等 (共同研究)	総説
3	2010.6.1	Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in Purkinje cells in regulated by calcium and actin filaments	Journal of Neurochemistry 2010.Vol 114 No6 p1720-p1733	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
4	2010.6.1	Expression of the IP ₃ R1 promoter-driven <i>nls-LacZ</i> transgene in purkinje cell parasagittal arrays of developing mouse cerebellum	Journal of Neuroscience Research 2010 Vol 88.No13 p2810-p2825	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
5	$2010.6.13$ ~ 18	IP ₃ R structure and function	Calcium and Cell Function (アメリカ・コロラド)	御子柴 克彦	口頭
6	2010.7.8	心不全治療の新しいターゲット を発見	プレス発表(投込み) 理研と共同発表 (Circulation Research)	理研 (共同発表)	プレス発表
7	$2010.9.2 \\ \sim 4$	mGluR5 拡散制御による アストロサイト突起における mGluR5の局在とmGluR アゴニストに対する高感受性 の維持	NEURO 2010 (神戸コンベンションセンター)	御子柴 克彦	ポスター
8	$2010.9.2 \\ \sim 4$	蛍光タンパク質Ca²+センサー による哺乳類神経細胞の 活動記録法	NEURO 2010 山田 義元 (神戸コンベンションセンター) (共同発表		ポスター
9	2010.9.6 ~9	IP ³ receptor : the structure- function and its role in cell function and disease	11 th Meeting of the European Calcium Society (ポーランド・ワルシャワ大学)	御子柴 克彦	口頭
10	$2010.9.14$ ~ 15	新規蛍光タンパク質Ca2+センサー Yellow Cameleon-Nanoを用いた 哺乳類神経ネットワークの解析	理研BSIリトリート2010 (埼玉県・森林公園)	山田 義之 (共同発表)	ポスター
11	2010.9.17	Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca ²⁺ indicators yellow Cameleon-Nano	Nature Methods 2010 Vol7.No9 p729-p732	山田 義之 等 (共同研究)	論 文
12	2010.9.17	Defective membrane expression of the Na ⁺ -HCO ₃ - cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine	PNAS 2010 Vol107No36 p15963-p15968	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
13	2010.9.17	Tyr-167/Trp-168 in type 1/3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates functional coupling between ligand binding and channel opening	J Biol Chem 2010 285(46).36081-36091	山崎 美佳 等 (前 研究員) (共同研究)	論文
14	2010.9.17	Structural studies of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor:Coupling ligand binding to channel gating	J Biol Chem 2010 285(46).36092-36099	山崎 美佳 等 (前 研究員) (共同発表)	論文

	T				
NO	発表年月	題 目	発表学会誌	発表者	備考
			投稿雑誌名		
15	2010.9.17	Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis	PLos One 2010 Vo5No9 pe125001-pe1250010	中村健等(前研究員)(共同研究)	論文
16	2010.9.17	Discovery of IP ₃ receptor and its role in health and disease	ソウル国立大学医学部 セミナー (韓国・ソウル市)	御子柴 克彦	口頭
17	2010.9.17	Significance of calcium homeostasis in neurological disorders	ソウル国立大学医学部 レクチャー (韓国・ソウル市)	御子柴 克彦	口頭
18	$2010.9.20$ ~ 22	Ca ²⁺ 振動形成におけるホスホリパーゼ CB1及びB4の異なる役割	第48回 生物物理学学会年会	御子柴 克彦 等 (共同研究)	ポスター
19	2010.9.21	中枢神経系の発生と分化— IP3 受容体の発見と その機能の解明	日本病態生理学会雑誌 2010 Vol9.No1 p51-p58	御子柴 克彦	総説
20	2010.10.11	Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP ₃ receptor	Karolinsk Institute Seminar カロリンスカ研究所 (スウェーデン)	御子柴 克彦	口頭
21	2010.10.15	Brain damage:How to protect from ER stress?	カロリンスカ研究所 200年特別記念シンポジウム 特別講演会 (日本:スウェーデン大使館)	御子柴 克彦	口頭
22	2010.11.10	Cyclin-Dependent kinase 5 他 2件	Handbooks of Neurochemistry and Molecular Neurobiology	御子柴 克彦 (Editor)	総説
23	2010.11.13 ~17	IP3受容体の構造と機能	The Society for Neuroscience Annual Meeting 2010 (アメリカ・サンディエゴ)	御子柴 克彦	口頭
24	2010.11.13 ~17	Evaluating the performance of genetically encoded calcium indicators expressed in mammalian neurons	The Society for Neuroscience Annual Meeting 2010 (アメリカ・サンディエゴ)	山田 義之 (共同研究)	ポスター
25	2010.11.15	Potent transglutaminase inhibitors dithio 6- aminoethyl ketones	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (掲載日未定)	濱田 耕造 等 (共同研究)	論 文
26	2010.12.9	Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP ₃ receptor	Neuron 68,1-14 2010.12.9	濱田 耕造 等 (共同研究)	論 文
27	2010.12.9	細胞のストレス応答機構の 分子メカニズムが明らかに ー ストレスによるIP3受容体の 機能破壊が、神経細胞死 による脳障害を引き起す ー	文部科学省プレス室 理研と共同発表 (Neuron 68, 1-14、2010.12.9)	理研 (共同発表)	プレス発表 (投込み)
28	2010.12.10	Analysis of the regulatory mechanism of Ca ²⁺ oscillations with a npvel IP ₃ R model that reproduces(4P-1248) cytosolic IP ₃ dynamics	第83回 日本生化学会大会 第33回 日本分子生物学会年会 合同大会	道川 貴章 等 (共同研究)	ポスター
29	2011.1.20	Mechanism regulating Ca ²⁺ signaling by muscarinic acetylcholine	Journal of Biological Chemistry (掲載日未定)	濱田 耕造 等 (共同研究)	論文
30	2011.1.20	Gin modification of IP ₃ receptor by transglutaminase controls Ca ²⁺ signaling and autophagy	Cell (掲載日未定)	濱田 耕造 等 (共同研究)	論 文

NO	発表年月	題目	発表学会誌	発表者	備考
NO	光衣平方	KK []	投稿雑誌名	光衣石	VIII 79
31	2011.1.20	The IP ₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli	Circulation Research 107.659-666 2010	御子柴 克彦 等 (共同研究)	論文
32	2011.1.31	Syntaxin 1B suppresses macropinocytosis and semaphorin 3A-induced growth cone collapse	Journal of Neuroscience (掲載日未定)	樺山 博之 等 (共同研究)	論文
33	$2011.1.31$ ~ 2.2	Gating mechanism of IP ₃ receptor and ER stress-induced brain damege	Karolinsk Institute Seminar カロリンスカ研究所 (スウェーデン)	御子柴 克彦	口頭
34	2011.2.7 ~2.10	Structure and Function of the IP ₃ receptor and its diverse cell function. ER stress-induced brain damege	Special Neuroscience Research Seminar Johns Hopkins University (アメリカ・ボルチモア)	御子柴 克彦	口頭
35	2011.3.18 ~20	Intracellular calcium dynamics : its physiology and pathology	第75回 日本循環器学会 学術集会 (横浜市・パシフィコ横浜)	御子柴 克彦	招待講演

8. 特許出願記録

О. МИ	山阴记꺃				1	1	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
出願国*	日本	PCT	日本	PCT	日本	PCT	日本
出願番号	特願 2008-207315	PCT/JP2009/ 064206	特願 2009-255518	PCT/JP2010/ 058411	特願 2010-090527	_	特願 2011-005797
発明の名称	ホウ素化合物 及びその用途	蛋白質架橋 阻害剤	蛋白質架橋 阻害剤 及びその用途	蛋白質架橋 阻害剤 及びその用途	トランスク゛ルタミナーセ゛ によるIP3レセフ゜ター の修飾	トランスケ゛ルタミナーセ゛ によるIP ₃ レセフ゜ター の修飾	小胞体カルシウムATP アーゼ動態指示薬 及びその利用
出願日	2008/8/11	2009/8/11	2009/11/6	2010/5/19	2010/4/9	2011/4 出願予定	2011/1/14
出願人1	JST	JST	JST	JST	JST	JST	JST
出願人2	理化学研究所		理化学研究所				理化学研究所
出願人3							
出願人4							
出願人5							
発明者1	御子柴 克彦	御子柴 克彦	御子柴 克彦	御子柴 克彦	御子柴 克彦	御子柴 克彦	御子柴 克彦
発明者2	濱田 耕造	濱田 耕造	濱田 耕造	濱田 耕造	濱田 耕造	濱田 耕造	松浦徹
発明者3	寺内 明子	寺内 明子	寺内 明子	寺内 明子	寺内 明子	寺内 明子	佐藤 嘉名与
発明者4	貫名 信行	貫名 信行	貫名 信行	貫名 信行			
発明者5	後藤 純一	後藤 純一	後藤 純一	尾崎 庄一郎			
発明者6	尾崎 庄一郎	尾崎 庄一郎	尾崎 庄一郎	後藤 純一			
発明者7	鈴木 商信	鈴木 商信	鈴木 商信	鈴木 商信			
発明者8	戎井 悦子	戎井 悦子	戎井 悦子	戎井 悦子			
発明者9							
発明者10							
発明者1 所属機関	JST	JST	JST	JST	JST	JST	JST
発明者2 所属機関	JST	JST	JST	JST	JST	JST	理化学研究所
発明者3 所属機関	JST	JST	JST	JST	JST	JST	理化学研究所
発明者4 所属機関	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所			
発明者5 所属機関	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所			
発明者6 所属機関	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所			
発明者7 所属機関	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所			
発明者8 所属機関	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所	理化学研究所			
発明者9 所属機関							
発明者10 所属機関							
備考 (成果 実施など)							
JSTの技術 移転DB (J-STORE) への掲載	J-STORE 掲載済み	可	J-STORE 掲載済み	可	可	可	可

9. 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
なし				

(2)招聘した研究者等

氏 名 (所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

10. 受 賞

NO	受賞年月	授与機関	受 賞 内 容	受賞者名	備考
1	2009.1	内藤記念科学技術財団	第40回 内藤記念科学振興賞	御子柴 克彦	
2	2009.3	日本学士院	日本学士院賞	御子柴 克彦	

11. Selected papers

(1) IP₃とカルシウムを可視化する技術の開発

(1-1) IP₃センサー (IRIS-1) の開発

Toru Matsu-ura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Atsushi Miyawaki, Manabu Yoshida and Katsuhiko Mikoshiba

Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells J. Cell Biol No173,755-765,2007

(1-2) 最高感度のカルシウムセンサーの開発

Kazuki Horikawa , Yoshiyuki Yamada , Tomoki Matsuda , Kentarou Kobayashi , Mitsuhiro Hashimoto , Toru Matsu-ura , Atsushi Miyawaki , Katsuhiko Mikoshiba and Takeharu Nagai

Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators yellow Cameleon-Nano Nature Methods Vol7.No9, 729-732, 2010

(2) 受容体のチャネル開閉機構の解明

チャネル開閉機構のメカニズムの研究成果

Haruka Yamazaki, Jenny Chan, Mitsuhiko Ikura, Takayuki Michikawa, and Katsuhiko Mikoshiba Tyr-167/Trp-168 in type 1/3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates functional coupling between ligand binding and channel opening J.Biol.Chem. 285(46).36081-36091.2010-1

Jenny Chan , Haruka Yamazaki , Noboru Ishiyama , Min-Duk Seo , Tapas K.Mal , Takayuki Michikawa , Katsuhiko Mikoshiba and Mitsuhiko Ikura

Structural studies of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: Coupling ligand binding to channel gating J.Biol.Chem. 285(46).36092-36099.2010-2,

(3) 3種の IP₃ 受容体の IP₃ 結合親和性の決定の分子機構の解明

Miwako Iwai, Takayuki Michikawa, Ivan Bosanac, Mitsuhiko Ikura and Katsuhiko Mikoshiba Molecular basis of the inoform-specific ligand binding affinity of inositol 1,4,5-trishosphate receptors *J. Biol. Chem. 252(17) 12755-12764 2007*

Katsuhiko Mikoshiba

IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts

J. Neurochem 2007.102. 1426-46

Chihiro Hisatsune, Keiko Yasumatsu, Hiromi Takahashi-Iwanaga, Naoko Ogawa, Yukiko Kuroda, Ryusuke Yoshida, Yuzo Ninomiya and Katsuhiko Mikoshiba

Abnormal taste perception in mice lackling the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor *J.Biol.Chem. 282(51) 37225-37231 2007.12.21*

Akira Futatsugi, Etsuko Ebisui and Katsuhiko Mikoshiba

Type 2 and type 3 inositol 1.4.5-trisphosphate (IP₃) receptors promote the diffrentiation of granule cell precursors in the postnatal cerebellum

J.Neurochem 2008.105.1153-1164

(4) 新規の代謝系の発見

a) IP3の擬似物質(アービット)の発見

Hideki Ando, Akihiro Mizutani, Helene Kiefer, Dai Tsuzurugi, Takayuki Michikawa and Katsuhiko Mikoshiba

IRBT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor *Molecular Cell 22.795-806. 6.23.2006*

b) アービット(IRBIT)の三次メッセンジャーとしての働き

Dongki Yang, Nikolay Shcheynikov, Weizhong Zeng, Ehud Ohana, Insuk So, Hideki Ando, Akihiro Mizutani, Katsuhiko Mikoshiba and Shmuel Muallem

IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₈-secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct

J. Clinical Inverstigation 119(1)193-202 2009

c) RNA 合成に関わる分子:

Helene Kiefer, Akihiro Mizutani, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Hideki Ando, Yukiko Kuroda and Katsuhiko Mikoshiba

Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate (IRBIT) associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphoryation-dependent manner and inhibits polyadenylation $J \, Biol \, Chem \, 284(16). \, 10694-10705 \, .2009$

d) IRBIT のリン酸とその機能:80K-H の発見

Katsuhiko Kawaai, Chihiro Hisatsune, Yukiko Kuroda, Akihiro Mizutani, Tomoko Tashiro and Katsuhiko Mikoshiba

80K-H Interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors and regulates IP₃-induced calcium release activity J. Biol. Chem .284(1) 1.2.2009

(5) 内在性ウワバインによるカルシウム振動発振及びナトリウム・カリウムポンプ(Na⁺, K⁺-ATPase)と IP₃ 受容体の結合部位の決定

Songbai Zhang、Seth Malmersjo、Juan Li、Hideki Ando、Oleg Aizman、Per Uhlen、Katsuhiko Mikoshiba and Anita Aperia

Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer *J.Biol Chem* .281(31),.21954-21962.8.4. 2006

(6) IP3 受容体を介した BDNF(脳由来神経成長因子)の分泌とニューロンの突起伸展の調節

Yuki Hirota, Toshio Ohshima, Naoko Kaneko, Makiko Ikeda, Takuji Iwasato, Ashok B.Kulkarni, Katsuhiko Mikoshiba, Hideyuki Okano and Kazunobu Sawamoto

Cyclin-dependent kinase 5 Is required for contorol of neuroblast migration in the postnatal subventricular Zone J. Neurosci. 27(47).12829-12838.11.27.2007

(7) IP。受容体の阻害剤の開発

Flavio H.Beraldo, Katsuhiko Mikoshiba and Cella R.S.Garcia

Human malarial parasite Plasmodium falciparum, displayts capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blcks the signal transduction pathway of melatonin action on the P.falciparum cell cycle

J. Pineal Research 43.360-364.2007

(7-1) 膜透過性カルシウム阻害剤の合成

Jun-ichi Goto, Akonobu Z.Suzuki, Shoichiro Ozaki, Nagisa Matsumoto, Takeshi Nakamura, Etsuko Ebisui, Andrea Fleig, Reinhold Penner, Katsuhiko Mikoshiba

Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate(2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca²⁺ entry via STIM proteins Cell Calcium 47. 1-10.2010

Shoichiro Ozaki, Etsuko Ebisui, Kozo Hamada, Jun-ichi Goto, Akinobu Z.Suzuki, Akiko Terauchi, Katsuhiko Mikoshiba

Potent transglutaminase inhibitors, arvl 8-aminoethyl ketones

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20, 1141-1144. 2010

Akinobu Z.Suzuki, Shoichiro Ozaki, Jun-ichi Goto, Katsuhiko Mikoshiba

Synthesis of bisboron compounds and their strong inhibitory activity on store-operated calcium entry Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20, 1395-1398.2010

(8) IP3 受容体の細胞内トラフィッキングの研究

1) IP₃ 受容体 mRNA を含む mRNA 顆粒の樹状突起内輸送の可視化

Katsuhiko Mikoshiba

Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors and their role in neuronal cell function J.Neurochem 97.1627-1633.2006

2) 1 型 IP。受容体の側方拡散制御機構の発見

Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba 4.1N binding regions of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 Biochem. Biophys. Res. Comm 342. 573-576. 2006

Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Takafumi Inoue and Katsuhiko Mikoshiba Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in Purkinje cells in regulated by calcium and actin filaments

J.Neurochem 114 (6).1720-1733. 2010.

(9) IP3 受容体とヒトの疾患

(9-1) 小脳失調と1型 IP。受容体

Kiyomitsu Miyachi, Miwako Iwai, Kouichi Asada, Ichiro Saito, Raleigh Hankins, Katsuhiko Mikoshiba

Inositol 1,4,5-trishosphate receptors are autoantibody target antigens in patients with Sjogren's syndrome and other systemic rheumatic diseases Mod Rheumatol 17(2).137-143 2007

(9-2) 心臓発生、心肥大における IP₃ 受容体の役割 心臓発生

Keiko Uchida, Megumi Aramaki, Maki Nakazawa, Chihiro Yamagishi, Shinji Makino, Keiichi Fukuda, Takeshi Nakamura, Takao Takahashi, Katsuhiko Mikoshiba, Hiroyuki Yamagishi

Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis Plos. One 5(9) e12500. 2010

心肥大

Hiroyuki Nakayama, Iiona Bodi, Marjorie Maillet, Jaime De Santiago, Timothy L.. Domeier, Katsuhiko Mikoshiba, John N. Lorenz, Lothar A.Blatter, Donald M. Bers

The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli Circulation Research 107.659-666. 2010

(9-3) 骨形成における IP。 受容体の役割

Yukiko Kuroda, Chihiro Hisatsune, Takeshi Nakamura, Koichi Matsuo and Katsuhiko Mikoshiba Osteoblasts induse Ca²⁺ oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis *PNAS* 105(25).8643-8648.June 24,2008

(9-4) 1型 IP₃受容体と結合するシャペロン GPR78 と神経変性

Takayasu Higo, Kozo Hamada, Chihiro Hisatsune, Nobuyuki Nukina, Tsutomu Hashikawa, Mitsuharu Hattori, Takeshi Nakamura, and Katsuhiko Mikoshiba

Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP3 receptor Neuron 68.1-14.Dece 9.2010

(9-5) 神経変性と IP3 受容体

Kozo Hamada, Akoko Terauchi, Kyoko Nakamura, Takayasu Higo, Nagisa Matsumoto, Chihiro Hisatsune, Takeshi Nakamura, Katsuhiko Mikoshiba

Gin modification of IP3 receptor by transglutaminase controls Ca^{2+} signaling and autophagy Cell (掲載日未定)

12. 主要論文 01/01/2006 - 03/31/2011

Chihiro Hisatsune, Yukiko Kuroda, Takumi Akagi, Takashi Torashima, Hirokazu Hirai, Tsutomu Hashikawa, Takafumi Inoue and Katsuhiko Mikoshiba

Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 in granule cells not in purkinje cells regulates the dendritic morphology of purkinje cells through brain-derived neurotrophic factor production *J. Neurosci.* 26(42).10916-10924.10.18.2006

Kyoko Shirakabe, Giuseppina Priori, Hideomi Yamada, Hideaki Ando, Shoko Horita, Toshiro Fujita, Ichiro Fujimoto, Akihiro Mizutani, George Seki and Katsuhiko Mikoshiba

IRBIT an Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein specifically binds to and activates pancreas-type Na+/HCO₃: cotransporter 1(pNBC1) PNAS 103(25).9542-9547.June 20,2006

Hideki Ando, Akihiro Mizutani, Helene Kiefer, Dai Tsuzurugi, Takayuki Michikawa and Katsuhiko Mikoshiba

IRBT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor Molecular Cell 22.795-806. 6.23.2006

Songbai Zhang、Seth Malmersjo、Juan Li、Hideki Ando、Oleg Aizman、Per Uhlen、Katsuhiko Mikoshiba and Anita Aperia

Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer J.Biol Chem 281(31),.21954-21962.8.4. 2006

Katsuhiko Mikoshiba

Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors and their role in neuronal cell function J.Neurochem 97.1627-1633.2006

Toru Matsu-ura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Atsushi Miyawaki, Manabu Yoshida and Katsuhiko Mikoshiba

Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells J. Cell Biol No173,755-765,2007

Miwako Iwai, Takayuki Michikawa, Ivan Bosanac, Mitsuhiko Ikura and Katsuhiko Mikoshiba Molecular basis of the inoform-specific ligand binding affinity of inositol 1,4,5-trishosphate receptors J. Biol. Chem. 252(17) 12755-12764 2007

Jenny Chan, Andrew E.Whitten, Cy M.Jeffries, Ivan Bosanac, Tapas K.Mal, Jennifer Ito, Horea Porumb, Takauki Michikawa, Katsuhiko Mikoshiba, Jill Trewhella and Mitsuhiko Ikura Ligand-induced conformational changes via flexible linkers in the amino-terminal region of the inositol 1,4,5-trishosphate receptor J.Mol.Biol 373.1269-1280 2007

Chihiro Hisatsune, Keiko Yasumatsu, Hiromi Takahashi-Iwanaga, Naoko Ogawa, Yukiko Kuroda, Ryusuke Yoshida, Yuzo Ninomiya and Katsuhiko Mikoshiba

Abnormal taste perception in mice lackling the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor *J.Biol.Chem. 282(51) 37225-37231 2007.12.21*

Akihiro Mizutani, Yukiko Kuroda, Akira Futatsugi, Teiichi Furuichi and Katsuhiko Mikoshiba Phosphorylation of homer3 by calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates a coupling state of its target molecules in purkinje cells *J. Neurosci.* 28(20).5369-5382.5.14.2008

Yukiko Kuroda, Chihiro Hisatsune, Takeshi Nakamura, Koichi Matsuo and Katsuhiko Mikoshiba Osteoblasts induse Ca²⁺ oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis *PNAS* 105(25).8643-8648.June 24, 2008

Hiroko Bannai, Sabine Levi, Claude Schweizer, Takafumi Inoue, Thomas Launey, Victor Racine, Jean-Baptiste Sibarita, Katsuhiko Mikoshiba and Antoine Triller

Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmition based on GABAAR diffusion dynamics Neuron 62.1-13.June 11.2009

Dongki Yang, Nikolay Shcheynikov, Weizhong Zeng, Ehud Ohana, Insuk So, Hideki Ando, Akihiro Mizutani, Katsuhiko Mikoshiba and Shmuel Muallem

IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₃-secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct

J. Clinical Inversigation 119(1)193-202 2009

Helene Kiefer, Akihiro Mizutani, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Hideki Ando, Yukiko Kuroda and Katsuhiko Mikoshiba

Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate (IRBIT) associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphoryation-dependent manner and inhibits polyadenylation *J Biol Chem* 284(16). 10694-10705.2009

Haruka Yamazaki, Jenny Chan, Mitsuhiko Ikura, Takayuki Michikawa, and Katsuhiko Mikoshiba Tyr-167/Trp-168 in type 1/3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates functional coupling between ligand binding and channel opening J.Biol.Chem. 285(46).36081-36091.2010-1

Jenny Chan , Haruka Yamazaki , Noboru Ishiyama , Min-Duk Seo , Tapas K.Mal , Takayuki Michikawa , Katsuhiko Mikoshiba and Mitsuhiko Ikura

Structural studies of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: Coupling ligand binding to channel gating J.Biol.Chem. 285(46).36092-36099.2010-2

Jun-ichi Goto, Akonobu Z.Suzuki, Shoichiro Ozaki, Nagisa Matsumoto, Takeshi Nakamura, Etsuko Ebisui, Andrea Fleig, Reinhold Penner, Katsuhiko Mikoshiba

Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate(2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca²⁺ entry via STIM proteins

Cell Calcium 47. 1-10.2010

Keiko Uchida, Megumi Aramaki, Maki Nakazawa, Chihiro Yamagishi, Shinji Makino, Keiichi Fukuda, Takeshi Nakamura, Takao Takahashi, Katsuhiko Mikoshiba, Hiroyuki Yamagishi Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis *Plos. One* 5(9) e12500. 2010

Hiroyuki Nakayama, Iiona Bodi, Marjorie Maillet, Jaime De Santiago, Timothy L.. Domeier, Katsuhiko Mikoshiba, John N. Lorenz, Lothar A.Blatter, Donald M. Bers

The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli Circulation Research 107.659-666. 2010

Takayasu Higo, Kozo Hamada, Chihiro Hisatsune, Nobuyuki Nukina, Tsutomu Hashikawa, Mitsuharu Hattori, Takeshi Nakamura, and Katsuhiko Mikoshiba

Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP₃ receptor Neuron 68.1-14.Dece 9.2010

Kazuki Horikawa , Yoshiyuki Yamada , Tomoki Matsuda , Kentarou Kobayashi , Mitsuhiro Hashimoto, Toru Matsu-ura , Atsushi Miyawaki , Katsuhiko Mikoshiba and Takeharu Nagai Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators yellow Cameleon-Nano Nature Methods 7.9. 729-732, 2010

13. 関連論文

Takafumi Inoue, Akinori Kuruma, Jun-ichi Goto and Katsuhiko Mikoshiba

Short-term potentiation at the parallel fiber-purkinje cell synapes Neuroscience Research 5.2006

Katsuhiko Mikoshiba

Viaualization of Inositol 1,4,5-triphosphate by atomic force microscopy

Neuroscience Letter 391(3).102-107.2006

Katsuhiko Mikoshiba

Organelles containing Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 2 in adrenal medullary cells J. Physiological Sciences 156(6).1-6.2006

Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba

4.1N binding regions of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1

Biochem. Biophys. Res. Comm 342. 573-576. 2006

Takeshi Nakamura, Katsuhiko Mikoshiba

2-Aminoethyl diphenylborinata analogues: Selective inhibition for store-operated Ca²⁺ entry *Biochem. Biophys Res. Commun 352.277-282.2007*

Katsuhiko Mikoshiba

IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts J. Neurochem 102.1426-46. 2007.

Katsuhiko Mikoshiba

The IP₃ receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function Biochem.Soc.Symp. 74.9-22.2007

Yuki Hirota, Toshio Ohshima, Naoko Kaneko, Makiko Ikeda, Takuji Iwasato, Ashok B.Kulkarni, Katsuhiko Mikoshiba, Hideyuki Okano and Kazunobu Sawamoto

Cyclin-dependent kinase 5 Is required for contorol of neuroblast migration in the postnatal subventricular Zone J. Neurosci. 27(47).12829-12838.11.27.2007

Flavio H.Beraldo, Katsuhiko Mikoshiba and Cella R.S.Garcia

Human malarial parasite Plasmodium falciparum, displayts capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blcks the signal transduction pathway of melatonin action on the P.falciparum cell cycle J. Pineal Research 43.360-364.2007

Tatsuaki Nishiyama, Takeshi Nakamura, Kumi Obara, Hiroko Inoue, Kenji Mishima, Nagisa Matsumoto, Minoru Matsui, Toshiya Manabe, Katsuhiko Mikoshiba and Ichiro Saito

Up-regulated PAR-2-Mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes J. Phamacology. Experimental. Therapeutics 320.516-524.2007

Kiyomitsu Miyachi, Raleigh Hankins, Minoru Ihara, Akira Miyamoto, Tetsurih Okano, Miwako Ieai, Katsuhiko Mikoshiba, Mavin J.Fritzler

Acase of limited cutaneous systemic sclerosis developing anti-mitochondria antibody positive primary biliary cirrhosis after acute myocardial infacrion Clin.Rheumatol. 26.1571-1574.2007

Jenny Chan, Andrew E.Whitten, Cy M.Jeffries, Ivan Bosanac, Tapas K.Mal, Jennifer Ito, Horea Porumb, Takayuki Michikawa, Katsuhiko Mikoshiba, Jill Trewhella and Mitsuhiko Ikura Ligand-induced cinformational changes via flexible linkers in the amino-terminal region of the Inositol 1,4,5-triphosphate receptor J.Mol.Biol 373.1269-1280.2007

Kiyomitsu Miyachi, Miwako Iwai, Kouichi Asada, Ichiro Saito, Raleigh Hankins, Katsuhiko Mikoshiba

Inositol 1,4,5-trishosphate receptors are autoantibody target antigens in patients with Sjogren's syndrome and other systemic rheumatic diseases Mod Rheumatol 17(2).137-143 2007

Katsuhiko Mikoshiba

From Ca²⁺ in muscle contraction to IP₃ receptor/Ca²⁺ signaling in memory of Setsuro Ebashi *Biochem.Biophys.Res* 369.57-61.2008

Songbai Zhang, Takeshi Nakamura, Nagisa Matsumoto, Chihiro Hisatsune, Akihiro Mizutani, T. Iesaki, H.Daida and Katsuhiko Mikoshiba

Predominant role type 1 ${\rm IP}_3$ receptor in a ortic vascular muscle contraction

Biochem. Biophys Res. Commun 369.213-219.2008

Hirouki Kabayama, Naoko Tokushige, Makoto Takeuchi, Katsuhiko Mikoshiba

Syntaxin 6 regulates nerve growth factor-dependent neurite outgrowth

Neuroscience Letter 436.340-344.2008

Akira Futatsugi, Etsuko Ebisui and Katsuhiko Mikoshiba

Type 2 and type 3 inositol 1.4.5-trisphosphate (IP₃) receptors promote the diffrentiation of granule cell precursors in the postnatal cerebellum

J.Neurochem 105.1153-1164. 2008.

Nanaho Fukuda, Mika Shirasu, Koji Sato, Etsuko Ebisui, Kazushige Touhara and Katsuhiko Mikoshiba

Decreased olfactory mucus secretion and nasal abnormality in mice lacking type 2 and type 3 IP₃ receptors European.J. Neurosci. 27.2665-2675.2008

Katsuhiko Mikoshiba, Chihiro Hisatsune, Akira Futatsugi, Akihiro Mizutani, Takeshi Nakamura and Kiyomitsu Miyachi

The role of Ca²⁺ signaling in cell function with special reference to exocrine secretion Coenea 27(8).Supp. 1, Sep.2008

Katsuhiko Kawaai, Chihiro Hisatsune, Yukiko Kuroda, Akihiro Mizutani, Tomoko Tashiro and Katsuhiko Mikoshiba

80K-H Interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors and regulates IP₃-induced calcium release activity J. Biol. Chem .284(1) 1.2.2009

Hirouki Kabayama, Takeshi Nakamura, Makoto Takeuchi, Hirohide Iwasaki, Masahiko Taniguchi, Naoko Tokushige, Katsuhiko Mikoshiba

Ca²⁺ induces macropinocytosys via F-actin depolymerization during growth cone collapse *Mol. Cellular. Neurosci.* 40.27-38.2009

Hideaki Ando, Akihiro Mizutani, Katsuhiko Mikoshiba

An IRBIT homologue lacks binding activity to Inositol 1,4,5-triphosphate receptor to the unique N-terminal annendage J. Neurochem 109(2).539-550.2009.

Julia V.Gerasimenko, Gyorgy Lur, Mark W.Sherwood, Etsuko Ebisui, Alexei V.Tepikin, Katsuhiko Mikoshiba, Oleg V.Gerasimenko and Ole H.Petersen

Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca²⁺ release via acid store IP₃ receptors PNAS 106(26).June 30.2009

Songbai Zhang, Chihiro Hisatsune, Toru Matsu-ura and Katsuhiko Mikoshiba

G-protein-coupled receptor kinase-interacting proteins inhibit apoptosis by Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated Ca^{2+} signal regulation

J.Biol Chem 284(42),.29158-29169.octo 16. 2009

Hiromitsu Saito, Motohiro Okada, Takafumi Miki, Minoru Wakamori, Akira Futatsugi, Yasuo Mori Katsuhiko Mikoshiba, Noboru Suzuki

Knockdown of Ca_v2.1 calcium channels is sufficient to induce neurological disorders observed in natural occurring *Cacnala* mutants in mice Biochem Biophy Res commu 390.1029-1033.2009

Shoichiro Ozaki, Etsuko Ebisui, Kozo Hamada, Jun-ichi Goto, Akinobu Z.Suzuki, Akiko Terauchi, Katsuhiko Mikoshiba

Potent transglutaminase inhibitors, aryl 6-aminoethyl ketones

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20, 1141-1144. 2010

Akinobu Z.Suzuki, Shoichiro Ozaki, Jun-ichi Goto, Katsuhiko Mikoshiba

Synthesis of bisboron compounds and their strong inhibitory activity on store-operated calcium entry Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20, 1395-1398.2010

Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Takafumi Inoue and Katsuhiko Mikoshiba

Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in Purkinje cells in regulated by calcium and actin filaments

J.Neurochem 114 (6).1720-1733. 2010.

Daisuke Furutama, Noriyuki Morita, Riya Takano, Yukiko Sekine, Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Kanehiro Hayashi, Yuriko Mishima, Katsuhiko Mikoshiba, Richard Hawkes and Teiichi Furuichi Expression of the IP₃R1 promoter-driven *nls-LacZ* transgene in purkinje cell parasagittal arrays of developing mouse cerebellum *J. Neurosci.Res* 88.2810-2825.2010

Masashi Suzuki, Wim Van Paesschen, Ingeborg Stalmans, Shoko Horita, Hideomi Yamada, Bruno A.Bergmans, Eric Legius, Florence Riant, Peter De Jonghe, Yuehong Li, Takashi Sekine, Takeshi Igarashi, Ichiro Fugimoto, Katsuhiko Mikoshiba, Mitsunobu Shimadzu, Masaaki Shiohara, Nancy Braverman, Lihadh AI-Gazali, Toshiro Fujita and George Seki

Defective membrane expression of the Na⁺-HCO₃ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine PNAS~107(36).15963-15968.Sep~7.2010

Akinobu Z.Suzuki, Shoichiro Ozaki, Jun-ichi Goto, Katsuhiko Mikoshiba

Synthesis of bisboron compounds and their strong inhibitory activity on store-operated calcium entry Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20, 1395-1398.2001

Shoichiro Ozaki, Etsuko Ebisui, Akinobu Z.Suzuki, Kozo Hamada, Akiko Terauchi, Katsuhiko Mikoshiba

Potent transglutaminase inhibitors dithio 6-aminoethyl ketones

Bioorganic Medicinal Chemistry Letters (掲載日未定)

Kyoko Nakamura, Takeshi Nakamura, Kozo Hamada, Minoru Matsui, Akiko Terauchi, Takao Okada and Katsuhiko Mikoshiba

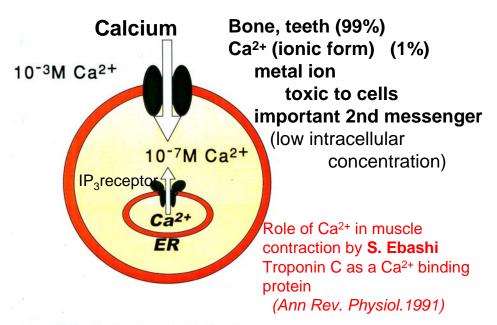
Meshanism regulating Ca²⁺ signaling by Muscarinic acetylcholine receptors in pancreatic acinar cells J.Biol Chem (掲載日未定)

Hiroyuki Kabayama, Makoto Takeuchi, Masahiko Taniguchi, Naoko Tokushige, Shunji Kozaki, Akihiro Mizutani, Takeshi Nakamura and Katsuhiko Mikoshiba

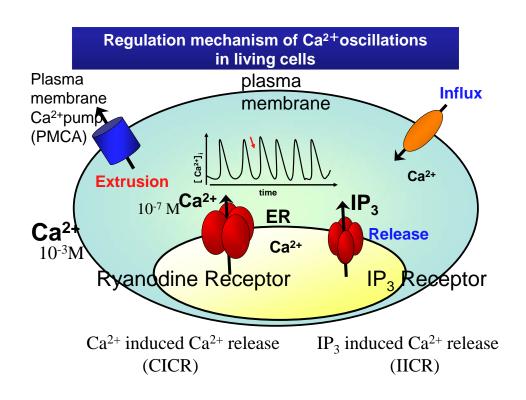
Syntaxin 1B suppresses macropinocytosis and semaphorin 3A-induced growth cone collapse J. Neurosci (掲載日未定)

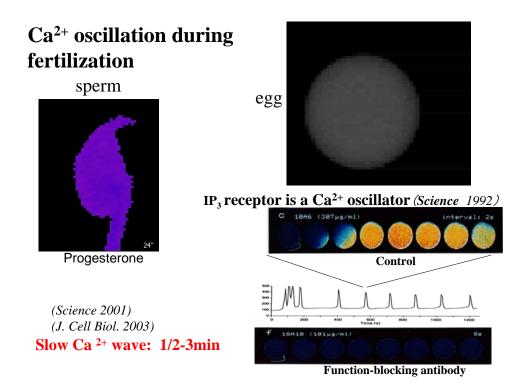
Kozo Hamada, Akoko Terauchi, Kyoko Nakamura, Takayasu Higo, Nagisa Matsumoto, Chihiro Hisatsune, Takeshi Nakamura, Katsuhiko Mikoshiba

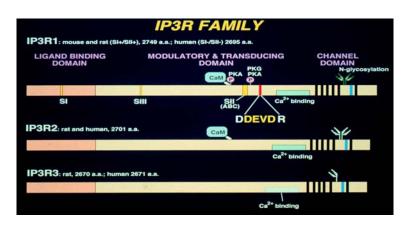
Gin modification of IP3 receptor by transglutaminase controls Ca^{2+} signaling and autophagy Cell (掲載日未定)



ER: Endoplasmic Reticulum

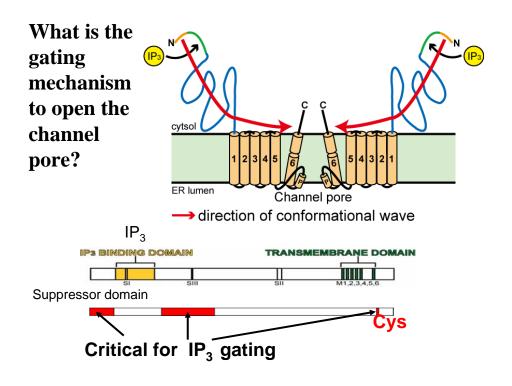


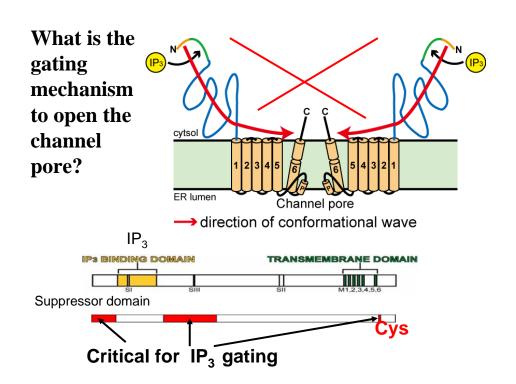


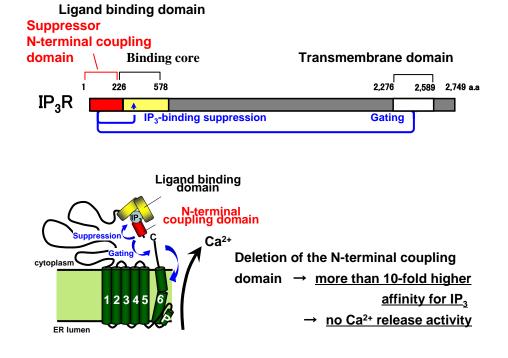


Three types $Mouse IP_3 R$ (1,2,3) $Human IP_3 R$ (1,2,3) $Xenopus laevis IP_3 R$ (1) $C. elegans IP_3 R$ $Drosophila IP_3 R$ $Starfish IP_3 R$

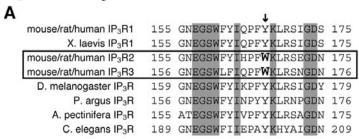
Variety of physiological/pathological phenomena regulated by IP₃ receptor Nature 1989 Science 1997 Nature 2002 J. Cell Biol. 1996 Cell 1993 Science 1992 Neuron 2010 Science 2001 J. Cell. Biol. 2003 Cell 2005 Development ER stress Fertilization Science 200 Taste, Olfaction Neural plasticity Science 1998 Neurosci 1998 Neurosci 1998 Neuron 1999 Nature 2000 Science Sig. 2009 Calcium release Sjogren's syndrome Xerostomia, dry eye Osteoporosi Modern Rheumatol. 2008 Huntington's PNAS 2008 Acute Alzheimer's disease pancreatitis disease Neuron 2010 PNAS 2009

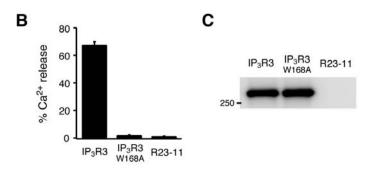


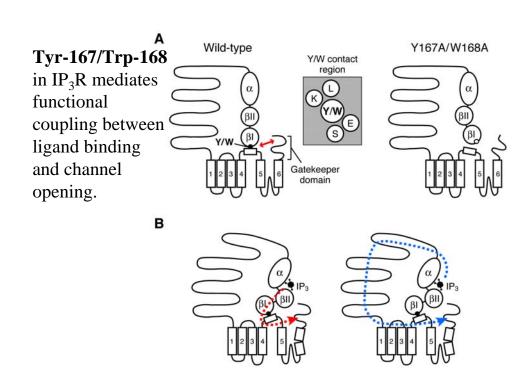


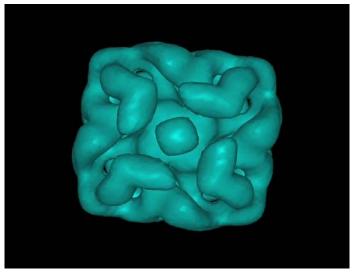


Alignment of of the sequence around Tyr-167/Trp-168 in IP₃Rs





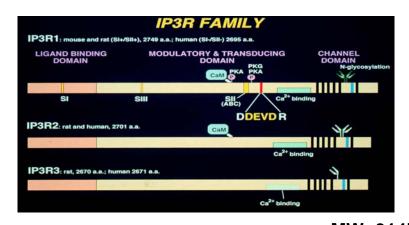




Unique structure of IP₃ receptor with pores on the surface and vacancy in the luminal part demonstrated by cryoEM 3-D structure is convenient for the scaffold function.

How to determine IP₃ binding affinity of each type of IP₃ receptor (1, 2, 3)

Suppressor domain was critical for isoform specificity.



Three types Mouse IP₃ R (1,2,3)
Human IP₃R (1,2,3)

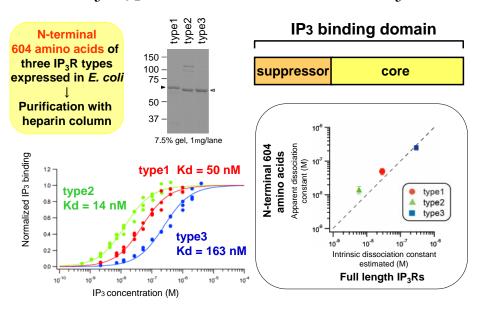
Xenopus laevis IP₃R (1)

C. elegans IP₃R

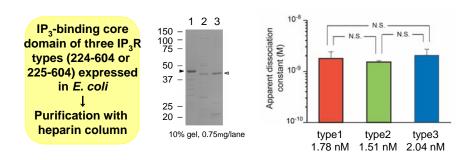
Drosophila IP₃R

Starfish IP₃R

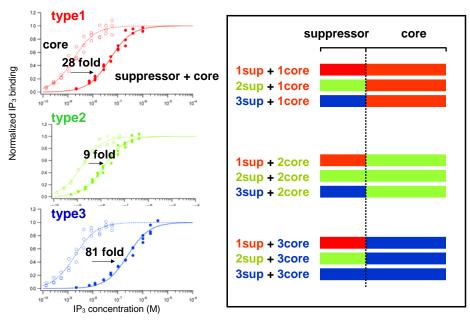
IP_3 -binding affinity of the N-terminal 604 amino acids of three IP_3R types correlates well with whole IP_3Rs .

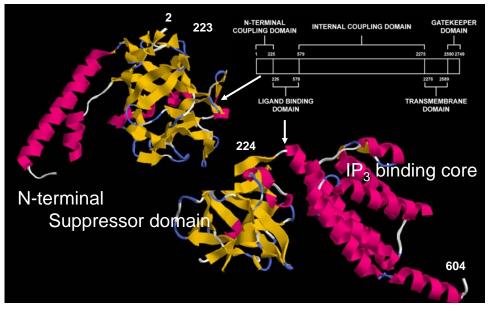


IP_3 -binding affinity of the IP_3 -binding core domain of three IP_3R types are similar.



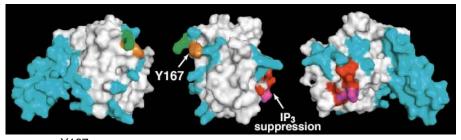
${\rm IP_3\text{-}binding\ suppression\ causes\ isoform\text{-}specific\ IP_3\text{-}}$ binding affinities





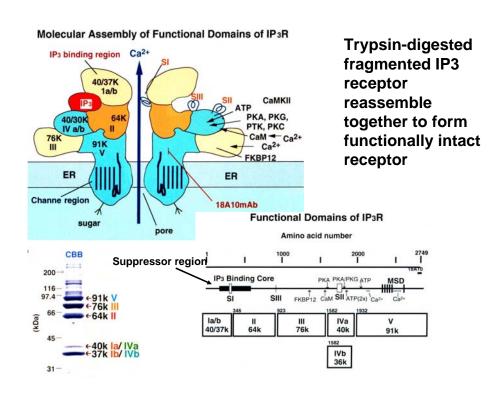
IP₃-binding suppressor domain makes isoformspecific IP₃-binding affinity of each IP₃ receptor

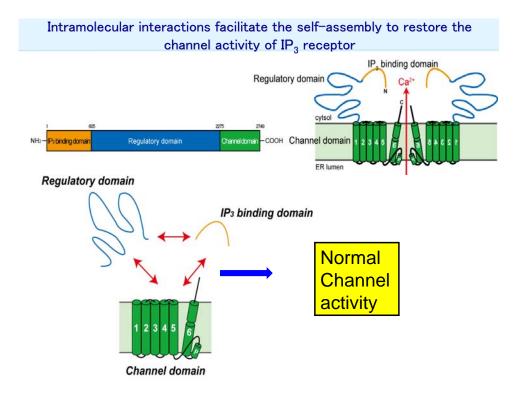
Y167 (essential for channel opening) locates on the opposite surface to the determinant residues for IP₃ suppression



orange: Y167 magenta: V33 and D34 red: L30, L32, R36, and K127

Mutated or deleted residues, which were not essential for the Ca²⁺ release activity were indicated in green (K168) or cyan (the others)

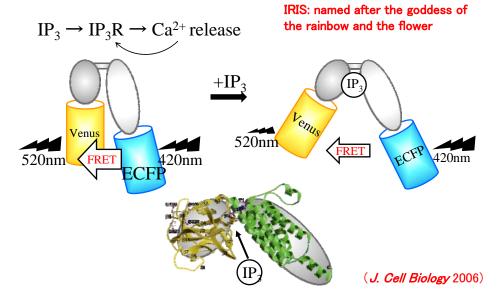




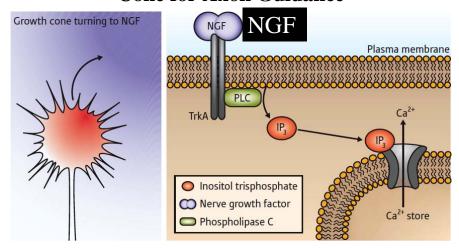
Novel IP₃ indicator: <u>I</u>P₃<u>R</u>-based <u>I</u>P₃ <u>sensor</u> (IRIS)

ightarrow Visualizing $\ensuremath{\mathsf{IP}}_3$ dynamics by using

Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET)



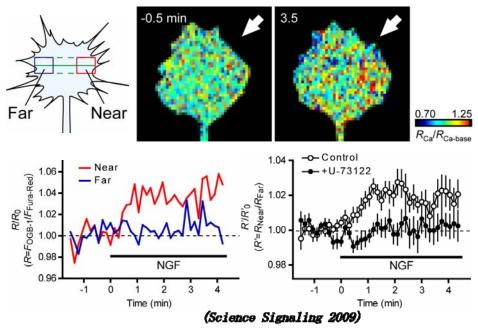
Locally Produced IP₃ Polarizes the Growth Cone for Axon Guidance



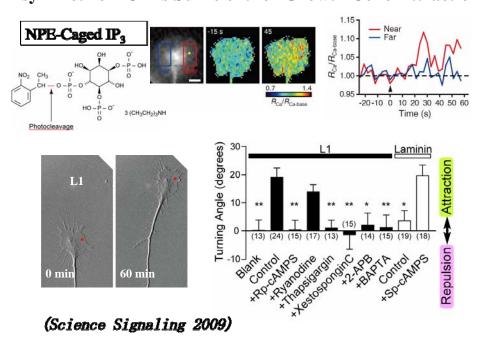
Akiyama et al., Science Signaling (2009)

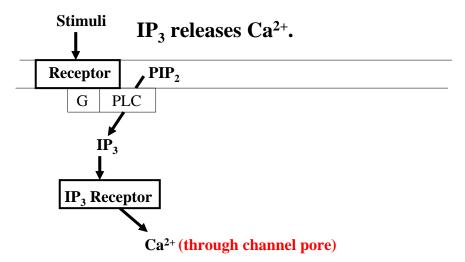
Control of Neuronal Growth Cone Navigation by Asymmetric Inositol 1,4,5-Trisphosphate Signals

Asymmetric Ca²⁺ Elevations in Response to NGF Gradient



Asymmetric IICR is Sufficient for Growth Cone Attraction

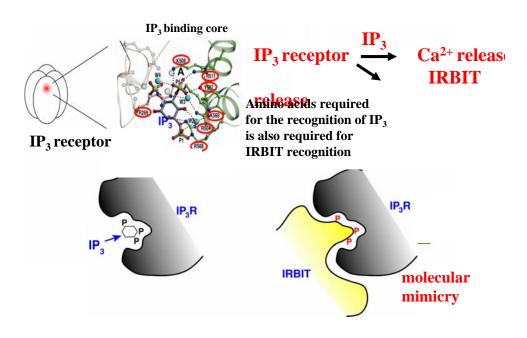




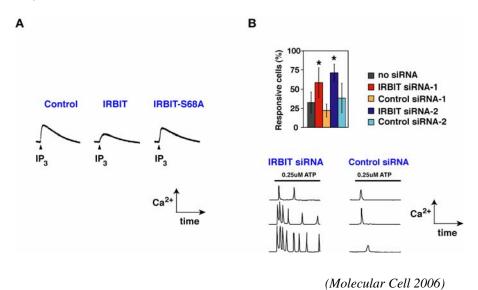
Question:

Is the role of IP₃ only to release Ca²⁺ through channel pore?

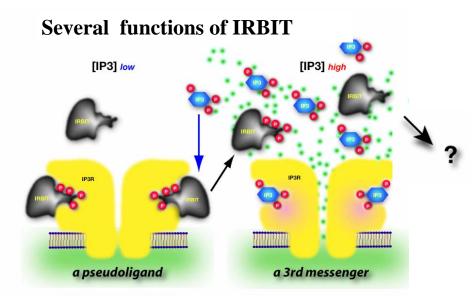
Pseudoligand of IP₃R, IRBIT(<u>I</u>P₃R <u>b</u>inding protein released with <u>i</u>nositol 1,4,5-<u>t</u>risphosphate (Molecular Cell 2006)



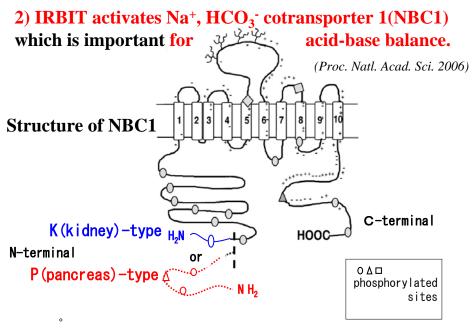
1) IRBIT inhibits Ca²⁺ release and Ca²⁺ oscillation



(moteether cen 2000)

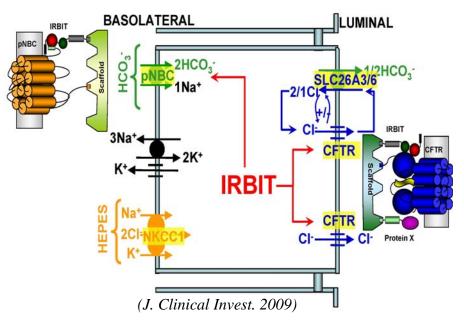


1) IRBIT inhibits Ca²⁺ oscillation. (Molecular Cell 2006)



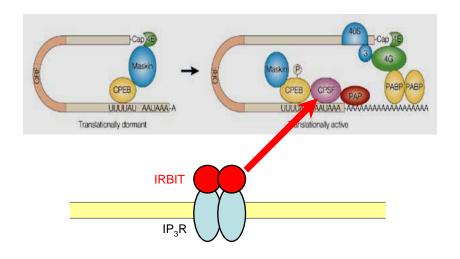
Diseases; Cataracta Glaucoma Low body weight Mental retardation

IRBIT coordinates fluid and HCO3- secretion

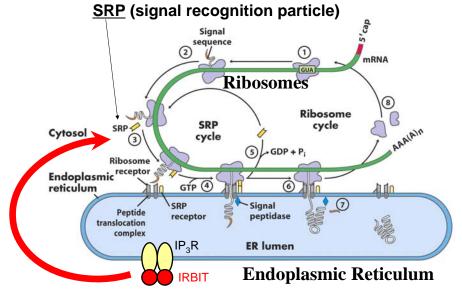


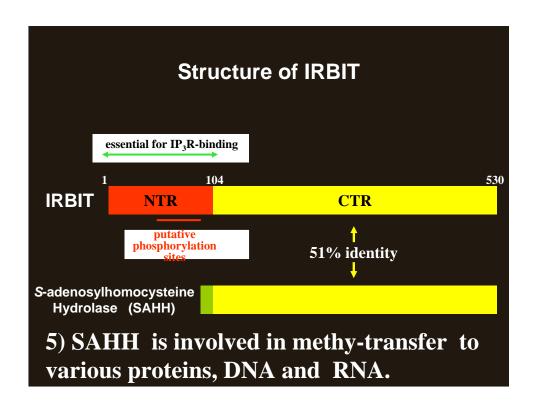
3) IRBIT binds to <u>Cleavage and</u> <u>Polyadenylation Specificity Factor (CPSF)</u>

(It regulates polyadenylation)

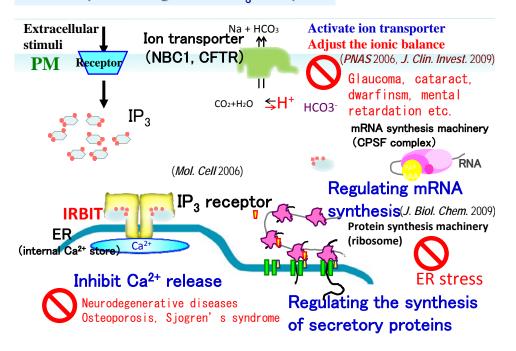


4) IRBIT regulates the **synthesis of secreted proteins** by interacting with

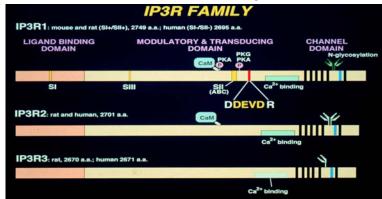




IRBIT: a pseudo-ligand for IP₃ receptor



Loss of function of IP₃ receptors



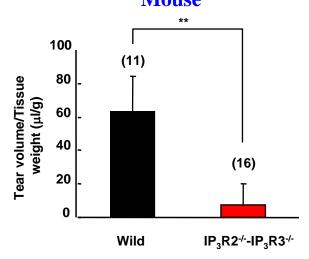
Three types $\begin{array}{c} \text{Mouse IP}_3\,\text{R} & (1,2,3) \\ \text{Human IP}_3\text{R} & (1,2,3) \\ \hline Xenopus \ laevis \ \text{IP}_3\text{R} & (1) \\ \hline \text{Single gene} & \begin{array}{c} C. \ elegans \ \text{IP}_3\text{R} \\ Drosophila \ \text{IP}_3\text{R} \\ \text{Starfish IP}_3\text{R} \end{array} \end{array}$

Role of IP₃ receptor (type 2, 3) in exocrine function

Deficit: Saliva secretion Pancreatic juice

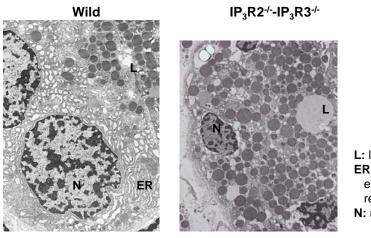
(*Science* 2005)

Effect on Tear Secretion in IP₃R2-/--IP₃R3-/Mouse



Tear secretion was significantly decreased in IP₃R2^{-/-}-IP₃R3^{-/-} mice. Un-paired t-test; ***p*<0.0001

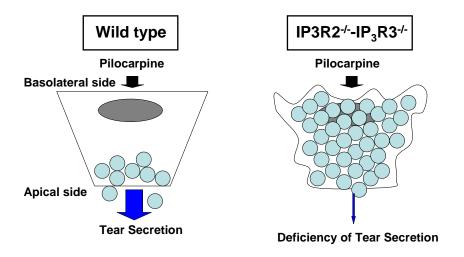
Electron Micrographs of Lacrimal Gland of Wild-type and $IP_3R2^{-/-}$ - $IP_3R3^{-/-}$ Mouse



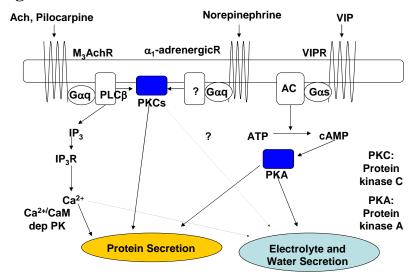
L: lumen
ER: rough
endoplasmic
reticulumn
N: nucleus

(X2,000) Abnormal accumulation of secretory granules was observed in acinar cells of IP3R2^{-/-}-IP3R3^{-/-} mouse.

Defeciency Model of Tear Secretion in IP₃R2-/--IP₃R3-/- Mouse



Signal Network of Tear Production in Lacrimal Gland



Ach: acetylcholine

IP₃R: Inositol1,4,5-Triphosphate Receptor VIP: vasoactive intestinal peptide

Dry mouth, dry eye and pancreatic juice secretion deficit; Sjogren syndrome

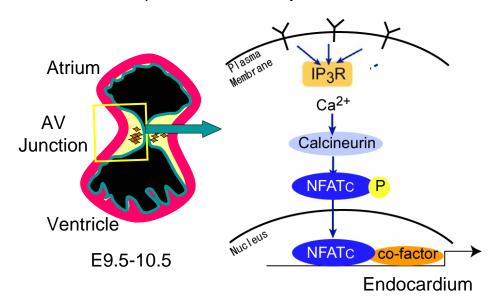
- 1. Antibodies against IP₃Rs are <u>positive</u> in the <u>sera of about 50% of the patients</u>.
- 2. Immunoassay of IP₃Rs can be an <u>diagnostic</u> tool for Sjogren Syndrome.

(Modern Rheumatology 2007)

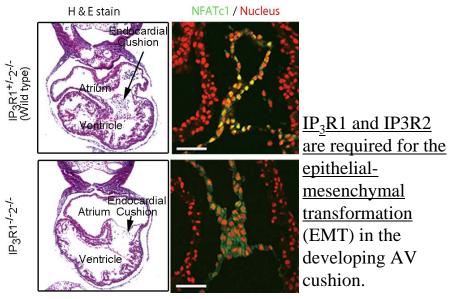
Loss of function of IP₃ receptors in heart :

1) <u>Abnormal cardiogenesis</u> in <u>IP₃ receptor 1 and 2 deficient</u> mice

Calcineurin/NFATc signaling is essential for Epithelial Mesenchymal Transformation



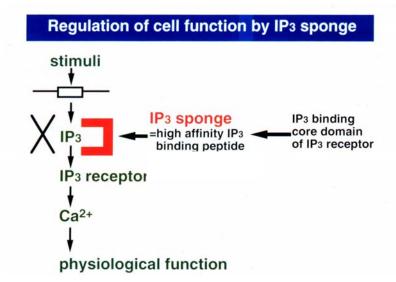
Abnormal cardiogenesis in IP_3 receptor 1 & 2 deficient mice: abnormal development of <u>endocardial atrium cushion</u> and embryo die about eleventh embryonic day.



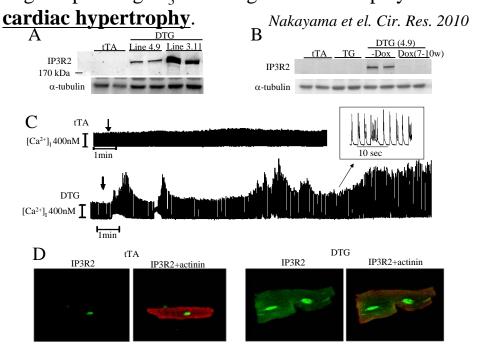
IP₃ receptors and heart function:

2) Overexpression of IP₃ R2 and IP₃ sponge

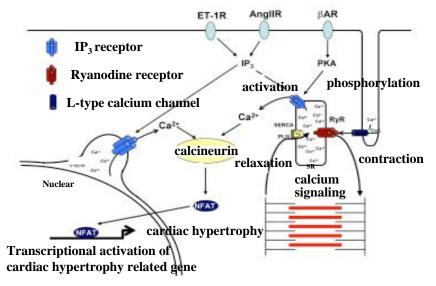
(Nakayama et al. Circulation Res 2010)



High-expressing IP₃R2 transgenic mice display



Role of IP₃ receptor in cardiac hypertrophy

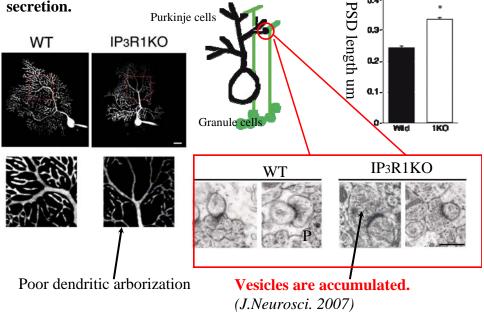


(Nakayama et al. Cir Res 2010)

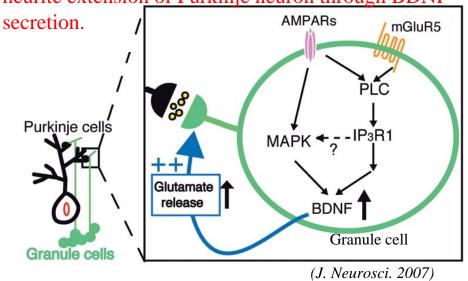
Loss of functional mutation of IP₃ receptor type 1

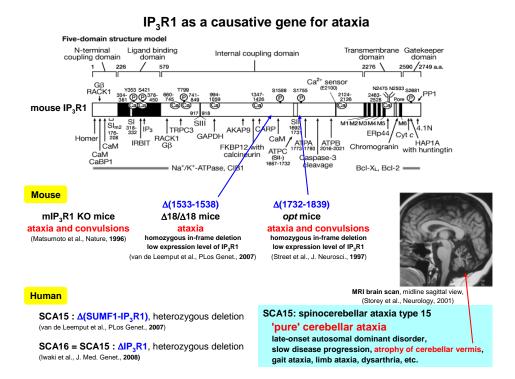
IP₃R1 as a causative gene for ataxia N-terminal Ligand binding coupling domain Internal coupling domain Transmembrane Gatekeeper domain domain 2590 /2749 a.a. Ca²⁺ sensor mouse IP₃R1 GAPDH RBIT Gβ CaM CaBP1 Bcl-X_L, Bcl-2 = Mouse Δ(1533-1538) Δ(1732-1839) mIP₃R1 KO mice ∆18/∆18 mice opt mice ataxia and convulsions ataxia ataxia homozygous in-frame deletion low expression level of IP₃R1 homozygous in-frame deletion low expression level of IP₃R1 (Matsumoto et al., Nature, 1996) (van de Leemput et al., PLos Genet., 2007) (Street et al., J. Neurosci., 1997) MRI brain scan, midline sagittal view Human (Storey et al., Neurology, 2001) SCA15: spinocerebellar ataxia type 15 $\textbf{SCA15}: \underline{\Delta(\textbf{SUMF1-IP}_{3}\textbf{R1})}, \, \text{heterozygous deletion}$ 'pure' cerebellar ataxia (van de Leemput et al., PLos Genet., 2007) late-onset autosomal dominant disorder, SCA16 = SCA15 : $\triangle IP_3R1$, heterozygous deletion slow disease progression, atrophy of cerebellar vermis, gait ataxia, limb ataxia, dysarthria, etc. (Iwaki et al., J. Med. Genet., 2008)

IP₃ receptor 1 in granule cells is involved in neurite extension of Purkinje neuron through BDNF secretion. Purkinje cells IP3R1KO WT



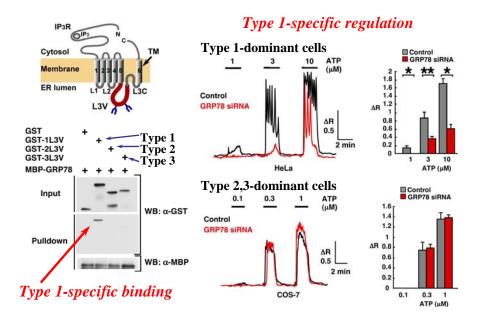
IP₃ receptor type 1 in granule cells is involved in neurite extension of Purkinje neuron through BDNF



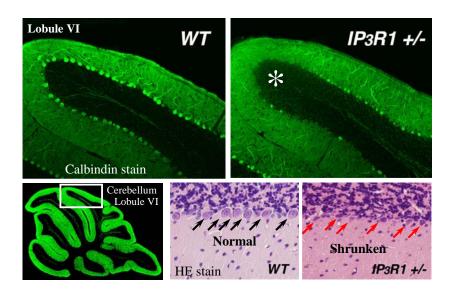


Chaperone and IP₃ receptor

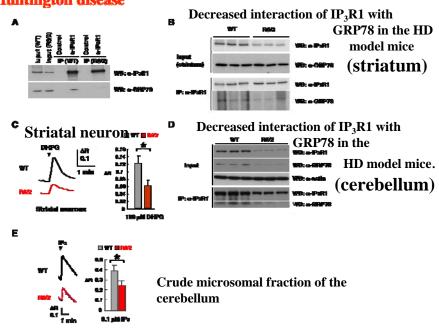
GRP78 Knockdown Inhibits IP₃R1-Mediated Ca²⁺ Release.



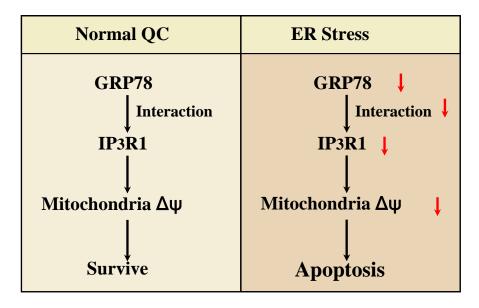
The Loss of IP₃R1 Function Enhances ER Stress-Induced Neuronal Death

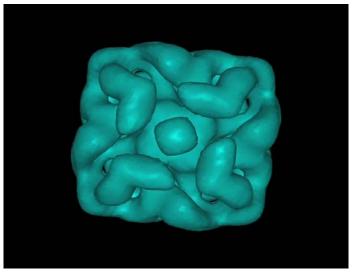


IP₃R1-GRP78 interaction is inhibited in the model mice of the Huntington disease

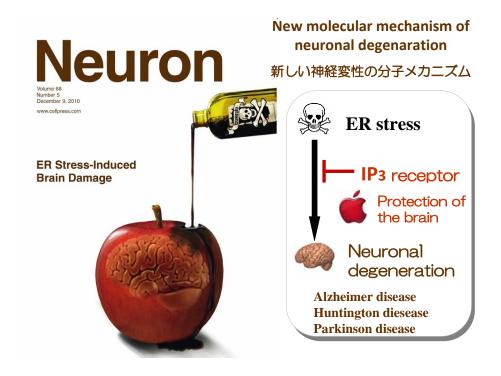


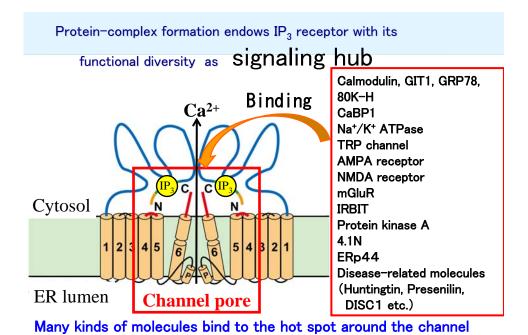
Proposed Model for ER Stress Signaling via IP3R1-GRP78 Interaction





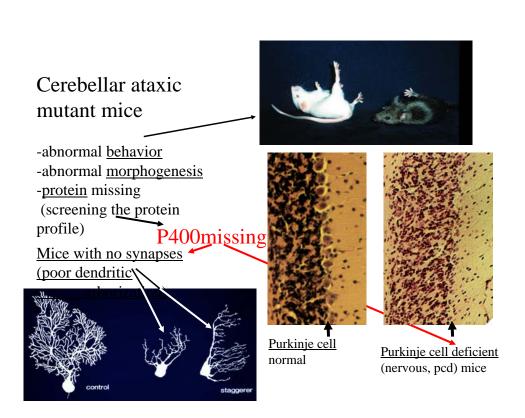
Unique structure of IP_3 receptor with pores on the surface and vacancy in the luminal part demonstrated by cryoEM 3-D structure is convenient for the scaffold function . (J. Mol.Biol.2004)



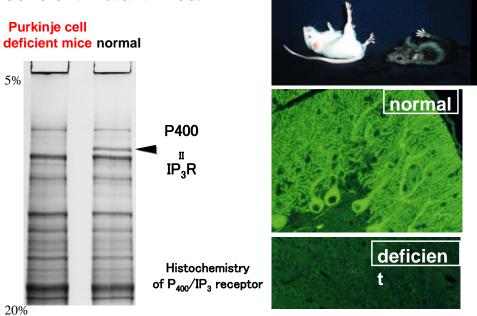


pore to control the channel gating in a cooperative manner.

Functional diversity



P400 is missing in Purkinje cell Abnormal behaviour deficient mutant mice.



14. 結び

すべてのテーマについて予想以上の成果を出しており、現時点では細胞内のカルシウム貯蔵庫である小胞体から細胞質へIP3受容体を介して放出されるカルシウム放出が細胞内で濃度変化を示してカルシウム振動を起こすことが解り、そのカルシウム放出の分子機構を解明できた。

しかも、そのカルシウム放出が様々な多様な機能を引き起こすことが明らかになってきた。IP3受容体は単なるカルシウム放出チャネルでなく、多くの機能分子を結合する、いわゆる「スキャフォールドタンパク質」であることが明らかになったことは大きな成果であり、細胞毎にその組合せが異なることにより各細胞での特有な機能が引き起こされることが明らかとなった。

これまでのプロジェクトにおいて、若手研究者達は既成概念にとらわれることなく、自由な発想で精力的に各自の研究を進めていることは大変評価に値する。

今後はカルシウム振動の分子機構をさらに理解するとともに、研究成果のパテント、実用化、医学分野への応用を推進していきたいと考えている。

現在までにここまでの成果が得られたことはICORP及びSORSTにおける10年間の長きにわたりご理解と絶え間ないサポートして頂いたJST並びに関係者各位のおかげである。

深く感謝するとともに、更なる成果が得られるためにも、引き続きご支援をお願いしたい。