総説

小胞体 Ca^{2+} シグナリングの変調による神経細胞死

大久保洋平

要約：中枢神経系における神経細胞の機能および生存においては、細胞内 Ca^{2+} 動態が適切に制御されていることが不可欠である。主要な細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体は、 Ca^{2+} の供給および取込を通じて、神経細胞においても細胞内 Ca^{2+} 動態制御に重要な役割を果たしている。小胞体 Ca^{2+} シグナリングの変調が、様々な病態における神経細胞死に関与することが示唆されており、アルツハイマー病を含めた神経変性疾患に関する新規メカニズムとして注目を集めている。本総説では、小胞体 Ca^{2+} シグナリングの変調と神経細胞死の関係について、我々の研究を含めた最新の知見を紹介する。また当該分野の研究推進のために不可欠である、小胞体内腔 Ca^{2+} 動態の可視化技術について、最近の進展を紹介する。

1. はじめに

Ca^{2+} は主要な細胞内セカンドメッセンジャーであり、神経細胞においても多くの機能および病態の発現を担っている。神経細胞における Ca^{2+} シグナリングにおいては、リガンド依存性および電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入だけでなく、細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体からの Ca^{2+} 放出も重要な寄与を果たしている。活動依存性に細胞外から過剰な Ca^{2+} が流入することが、興奮毒性による神経細胞死の主要な原因と見なされてきた。しかし近年、小胞体に依存する Ca^{2+} シグナリングの変調が、様々な病態における神経細胞死に関与することが示唆されている。よって、神経細胞における小胞体 Ca^{2+} シグナリングの変調機構の解析により、神経細胞死の新規メカニズムを解明し、さらに新規の治療標的の同定に至ることが期待される。本総説では、小胞体 Ca^{2+} シグナリングの変調が惹起する神経細胞死メカニズムに関して、我々の研究を含めた最新の知見を紹介する。また当該分野

の研究推進のためには、小胞体 Ca^{2+} 動態を直接的に解析することが不可欠である。これを可能にするための小胞体内腔 Ca^{2+} 動態可視化技術について、最近の進展を紹介する。

2. 神経細胞における小胞体 Ca^{2+} シグナリング

小胞体はタンパク質合成および輸送を担う細胞内小器官である一方、細胞内 Ca^{2+} ストアとしても重要な役割を担う。神経細胞において小胞体は軸索から樹状突起およびスパインに至るまで細管状のネットワークを張り巡らせており、細胞の各所で Ca^{2+} シグナリングに関与している。小胞体内腔の遊離 Ca^{2+} 濃度はミリ M 近くに達し、ナノ～マイクロ M レベルの細胞質と大きな濃度勾配を有しており、これが Ca^{2+} 放出の駆動力となっている。また小胞体内腔 Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} シグナリングに伴いダイナミックに変化し、小胞体の内腔および膜上に存在するタンパク質を制御する。

神経細胞の小胞体膜上には、イノシトール三リン酸 (IP_3) 受容体とリアノジン受容体の二種類の Ca^{2+} 放出チャネルが存在する。多様な神経伝達物質および神経栄養因子の受容体が IP_3 産生と共役しており、 IP_3 受容体の活性化に関与している (図 1)。リアノジン受容体は Ca^{2+} によって活性化され、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release : CICR) を惹起する。リガンド依存性および電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外 Ca^{2+} 流入により活性化されることで、 Ca^{2+} シグナリングに関与する (図 1)。また後述するように、一酸化窒素 (NO) は直接的にリアノジン受容体を活性化 (図 1)。

小胞体内腔の高濃度 Ca^{2+} の維持および Ca^{2+} 放出後の再充填は、小胞体 Ca^{2+} ポンプである sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) が担っている (図 1)。また Ca^{2+} 放出後の再充填については、小胞体 Ca^{2+} 枯

図1 神経細胞における小胞体 Ca^{2+} シグナリング

細胞膜および小胞体膜上の Ca^{2+} チャンネルおよび Ca^{2+} ポンプによって、小胞体内外の Ca^{2+} 動態が形成される。ER：小胞体。GPCR：Gタンパク質共役型受容体。IP₃：イノシトール三リン酸。IP₃R：イノシトール三リン酸受容体。NMDAR：N-methyl-D-aspartate 受容体。NO：一酸化窒素。nNOS：神経型 NO synthase。PLCβ：ホスホリパーゼ Cβ。PLCγ：ホスホリパーゼ Cγ。PS：プレセニリン。RTK：受容体型チロシンキナーゼ。RyR：リアノジン受容体。SERCA：sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase。STIM：stromal interaction molecule。VGCC：電位依存性 Ca^{2+} チャンネル。（文献 32 より改変）

渴によって惹起されるストア作動性 Ca^{2+} 流入という機構が存在する。小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度低下を検知して小胞体膜上の stromal interaction molecule (STIM) がクラスターを形成し、これが細胞膜上の Ca^{2+} チャンネル Orai を活性化することで Ca^{2+} 流入、そして SERCA を通じた再充填がなされる（図 1）。

3. 小胞体 Ca^{2+} 充填の変調とアルツハイマー病「 Ca^{2+} 仮説」

小胞体に関係する細胞内 Ca^{2+} シグナリングの変調がアルツハイマー病の病因の一つであるとする、「 Ca^{2+} 仮説」が提唱されている(1)。プレセニリンはアミロイド前駆体タンパク質切断酵素として知られ、家族性アルツハイマー病に関連する変異体が報告されている。よってプレセニリンは「アミロイド仮説」の重要な因子として広く研究されてきた。その一方で、プレセニリンが小胞体 Ca^{2+} シグナリングに関与し、それにより神経変性が惹起される機構が提唱されている。プレセニリンは小胞体膜上で Ca^{2+} 漏出チャンネルを形成しており（図 1）、家族性アルツハイマー病関連変異により Ca^{2+} 透過能が失われ、結果として小胞体に Ca^{2+} が過充填されることが報告されている(2)（図 2）。また変異プレセニリンにより SERCA 活性が異常に亢進され、その結果としても小胞体 Ca^{2+} 過充填が起こりうることを報告されている(3)。このプレセニリン変異依存性の小胞体 Ca^{2+} 過充填によりストア作動性 Ca^{2+} 流入が

図2 小胞体 Ca^{2+} シグナリングの変調と神経変性疾患

小胞体 Ca^{2+} 充填および Ca^{2+} 放出の変調と神経変性疾患の関連を示す。変異プレセニリンは、小胞体 Ca^{2+} 過充填およびストア作動性 Ca^{2+} 流入阻害を引き起こす。ハンチントン病や脊髄小脳失調症といったポリグルタミン病においては、原因タンパク質が IP₃ 受容体に結合し、過剰な活性化を引き起こす。てんかんなどの病態においては、nNOS により産生された NO がリアノジン受容体を活性化する。（文献 32 より改変）

阻害され（図 2）、細胞内 Ca^{2+} 恒常性の乱れによって樹状突起スパインの形態異常が引き起こされる(4-6)。これによってシナプス伝達が阻害され、記憶や認知機能の低下、さらには神経変性が惹起されると推測されている。

4. 小胞体 Ca^{2+} 放出の変調と神経変性疾患

IP₃ 受容体やリアノジン受容体を介した Ca^{2+} 放出が、過剰になる、または減弱されることが、神経変性疾患の要因となりうることを報告されている。変異プレセニリンを発現する細胞においては、IP₃ 受容体(7, 8)およびリアノジン受容体(9, 10)の活性や発現量が上昇することが報告されている。上述の小胞体 Ca^{2+} 過充填と併せてアルツハイマー病の要因となることが示唆される。

CAG リピートの異常伸長によるポリグルタミン病についても、複数の病態において小胞体 Ca^{2+} 放出の変調が報告されている。ハンチントン病の原因遺伝子であるハンチンチンにおいて CAG リピートが異常伸長し、ハンチンチンタンパク質にポリグルタミン鎖が挿入されることで、IP₃ 受容体 1 型との直接結合が引き起こされる(11)。この相互作用により IP₃ 受容体 1 型の IP₃ 親和性が上昇し、 Ca^{2+} 放出が過剰になる(11)（図 2）。この過剰な Ca^{2+} 放出により、ミトコンドリア依存性アポトーシスが線条体神経細胞で誘発されることが示唆されている(12)。

脊髄小脳失調症についても同様の機構が報告されている。脊髄小脳失調症 2 型および 3 型においては、アタキシン 2 および 3 タンパク質のポリグルタミン伸

長により、 IP_3 受容体 1 型との直接結合が引き起こされる (13–15). ハンチントン病の場合と同様に過剰な Ca^{2+} 放出が引き起こされ、神経細胞死が惹起されると考えられている (図 2). 脊髄小脳失調症 2 型モデルマウスにおいては、 IP_3 分解酵素を小脳プルキンエ細胞に過剰発現させることで症状が緩和されることが報告されており、 IP_3 - Ca^{2+} シグナリングの重要性が示されている (14). 脊髄小脳失調症 3 型モデルマウスにおいては、リアノジン受容体阻害薬であるダントロレンの投与で症状が緩和されることから、 IP_3 受容体 1 型だけでなくリアノジン受容体の過剰活性も病因のひとつと考えられる (15). また脊髄小脳失調症 15 型の患者においては、 IP_3 受容体 1 型遺伝子に欠失およびミスセンス変異が発見されており、 Ca^{2+} 放出の減弱も病因となりうることを示唆されている (16–18).

5. NO 依存性リアノジン受容体活性化による神経細胞死

興奮毒性による神経細胞死について、NO の関与が示唆されている. 中枢神経系において NO は神経型 NO synthase (nNOS) によって産生されるが (図 1), nNOS ノックアウトマウスにおいて、脳卒中やてんかんモデルにおける神経細胞死が抑制されることが報告されている (19–21) (図 2). NO が神経細胞死に関与するメカニズムとして、NO と活性酸素が反応することで発生するペルオキシナイトライト (ONOO^-) の細胞毒性が従来注目されてきた. 一方で、NO は特定のシステイン残基を S-ニトロシル化することで、様々なタンパク質の機能を制御する (22–24) (図 3A). リアノジン受容体 1 型についても、システイン残基の S-ニトロシル化により活性化され、 Ca^{2+} 放出が誘発されることが報告されていた (20, 25, 26) (図 3B). そこで我々は、このリアノジン受容体 1 型を介した NO 誘発性 Ca^{2+} 放出 (NO-induced Ca^{2+} release : NICR) (20) について、興奮毒性による神経細胞死への関与を検証した.

リアノジン受容体 1 型の S-ニトロシル化標的システイン残基である Cys-3636 をアラニンに置換したノックインマウス ($\text{Ryr1}^{\text{C3636A}}$ マウス) を作製した (27). このマウスから得た神経細胞においては、期待通り NICR が抑制されていた (図 3C). 興奮毒性を惹起するために、カイニン酸誘発性てんかんモデルを適用した. カイニン酸投与後のてんかん行動スコアにおいては、 $\text{Ryr1}^{\text{C3636A}}$ マウスは野生型マウスと同様であった (図 4A). しかし野生型マウスで観察される海馬 CA3 領域における神経変性が、 $\text{Ryr1}^{\text{C3636A}}$ マウスではほぼ完全に抑えられていた (図 4B). さらにリアノジン受容体阻害薬

図 3 リアノジン受容体の S-ニトロシル化により惹起される NO 誘発性 Ca^{2+} 放出 (NO-induced Ca^{2+} release : NICR) (A) タンパク質中のシステイン残基の S-ニトロシル化. (B) マウスリアノジン受容体 1 型の S-ニトロシル化標的システイン残基である Cys-3636. (C) 初代培養神経細胞における NICR. NO ドナーである NOC7 の投与により、野生型マウス (Ryr1^{WT}) から得た神経細胞において細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇が観察された. リアノジン受容体 1 型 Cys-3636 をアラニンに置換したノックインマウス ($\text{Ryr1}^{\text{C3636A}}$) から得た神経細胞においては、NICR は抑制された. (文献 27 および 32 より改変)

であるダントロレンを野生型マウスに投与することによっても、神経変性を抑えることができた (図 4B). 以上の結果は、NICR が興奮毒性による神経細胞死に関与することを示しており、さらに薬理的に NICR を阻害することで治療効果が得られることも確認された (27). NICR が神経細胞死を誘発するメカニズムの詳細は今のところ不明であるが、上記の IP_3 受容体 1 型過剰活性化と共通のメカニズムも期待される. また NICR が持続することにより小胞体の Ca^{2+} が枯渇すると考えられ、その影響についても検証が待たれる.

図4 てんかん発作に伴う NICR 誘発性神経変性

(A) カイニン酸 (KA) 投与により側頭葉てんかんを誘発し、発作行動をスコア化した。 *Ryr1*^{C3636A} マウスは野生型マウスと同様のてんかん発作を示した。またリアノジン受容体阻害薬であるダントロレン (Dan) はてんかん発作に影響を示さなかった。(B) カイニン酸誘発性てんかんに伴う神経変性を Fluoro-Jade C (FJC) 染色により評価した。野生型マウスでは、海馬 CA3 領域 (黄色枠) においてカイニン酸依存性に神経変性が観察され、それはダントロレンの投与により抑えられた。対照の CA1 領域 (白枠) において神経変性は観察されなかった。 *Ryr1*^{C3636A} マウスでは神経変性は観察されなかった。(文献 27 より改変)

図5 CEPIA による神経細胞小胞体内腔 Ca^{2+} 動態の可視化

(A) 既存のタンパク質型細胞質 Ca^{2+} プローブ (genetically encoded Ca^{2+} indicator: GECI) の Ca^{2+} 親和性を変異導入により低下させ、小胞体内腔 Ca^{2+} 濃度域に最適化することで CEPIA を開発した。(B) G-CEPIA1er による小脳プルキンエ細胞小胞体内腔 Ca^{2+} 動態の可視化。シナプス入力誘発性の Ca^{2+} 放出に伴い、小胞体内腔 Ca^{2+} 濃度の局所的かつ一過的な低下と回復が観察された。中心部からの距離により反応振幅縮小と遅延が認められた。この波上の伝播は局所的 Ca^{2+} 枯渇に続く Ca^{2+} 側方拡散を示しており、神経細胞の小胞体 Ca^{2+} 再充填における Ca^{2+} 側方拡散の重要性を示している。(C) 活動依存性小胞体 Ca^{2+} 過充填。 Ca^{2+} スパイクを惹起するシナプス入力依存的に、小胞体 Ca^{2+} の過充填が観察された。(文献 31 より改変)

6. 小胞体内腔 Ca^{2+} 動態可視化技術

上述のように、小胞体の Ca^{2+} 充填状態は神経細胞の生死を決定する因子になりうるということが明らかとなり、病態と小胞体内腔 Ca^{2+} 濃度の相関や因果関係の解明が急務である。また疾患に関連する異常な Ca^{2+} 放出が、小胞体の Ca^{2+} 充填状態に及ぼす影響も注目される。以上の研究を推進するためには、小胞体内腔の Ca^{2+} を直接検出する技術が不可欠である。蛍光タンパク質を基にした細胞質 Ca^{2+} プローブを改造し、小胞体内腔への局在と高い Ca^{2+} 濃度域への適合を達成した小胞体 Ca^{2+} プローブがこれまでに複数開発されてきた。これらのうちの一つを適用し、変異プレセニリンを発現する線維芽細胞において小胞体 Ca^{2+} の可視化解析が行われている(28)。しかし組織標本内や生体内の神経細胞における観察には、既存のプローブでは性能が十分ではなかった。

そこで我々は、小胞体 Ca^{2+} プローブ CEPIA (calcium-measuring organelle-entrapped protein indicators) を新規に開発した(29, 30) (図 5A)。CEPIA は既存のものと同様に蛍光タンパク質型プローブであるが、近年著しく性能が向上した細胞質 Ca^{2+} プローブを基にすることで、大幅な輝度と変化率の向上を達成した。CEPIA を用いることで、神経細胞において高解像度の小胞体内腔 Ca^{2+} 動態を画像化することが可能となった(31)。その成果の一部を紹介する。

G-CEPIA1er を小脳プルキンエ細胞に発現させ、シナプス入力に伴う小胞体内腔 Ca^{2+} 動態を可視化した。代謝型グルタミン酸受容体を介して IP_3 産生を惹起する平行線維入力により、樹状突起およびスパインにおいて小胞体内腔 Ca^{2+} 濃度の一過的な低下が観察された(図 5B)。この局所的な Ca^{2+} 枯渇の後の再充填については、小胞体ネットワーク内の Ca^{2+} の側方拡散が主に寄与しており、SERCA による取り込みの寄与は部分的であった(図 5B)。また細胞全体に Ca^{2+} スパイクを惹起する登上線維入力により、SERCA 依存的に小胞体 Ca^{2+} が過充填される様子も観察された(図 5C)。よって G-CEPIA1er により、従来不明であった神経活

動依存性小胞体内腔 Ca^{2+} 動態の詳細を明らかにすることが可能となった。CEPIA などの新規小胞体 Ca^{2+} プローブを用いることで、病態時の小胞体 Ca^{2+} 動態の変調を高解像度で明らかにすることが今後期待される。

7. おわりに

本総説において紹介した知見は、神経細胞死を伴う様々な病態において小胞体 Ca^{2+} シグナリングが新規の治療標的になり得ることを示唆している。NICR を一例とする新規小胞体 Ca^{2+} シグナリング機構の発見や、当該研究を推進させる新規小胞体 Ca^{2+} プローブの開発が、次世代の神経変性疾患治療に繋がることを期待したい。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Berridge MJ. *Pflügers Arch.* 2010;459:441-449.
- 2) Tu H, et al. *Cell.* 2006;126:981-993.
- 3) Green KN, et al. *J Cell Biol.* 2008;181:1107-1116.
- 4) Sun S, et al. *Neuron.* 2014;82:79-93.
- 5) Tong BC-K, et al. *Sci Signal.* 2016;9:ra89.
- 6) Zhang H, et al. *J Neurosci.* 2016;36:11837-11850.
- 7) Cheung K-H, et al. *Neuron.* 2008;58:871-883.
- 8) Cheung K-H, et al. *Sci Signal.* 2010;3:ra22.
- 9) Chan SL, et al. *J Biol Chem.* 2000;275:18195-18200.
- 10) Stutzmann GE, et al. *J Neurosci.* 2006;26:5180-5189.
- 11) Tang T-S, et al. *Neuron.* 2003;39:227-239.
- 12) Tang T-S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2602-2607.
- 13) Liu J, et al. *J Neurosci.* 2009;29:9148-9162.
- 14) Kasumu AW, et al. *J Neurosci.* 2012;32:12786-12796.
- 15) Chen X, et al. *J Neurosci.* 2008;28:12713-12724.
- 16) Knight MA, et al. *Neurobiol Dis.* 2003;13:147-157.
- 17) Hara K, et al. *Neurology.* 2008;71:547-551.
- 18) van de Leemput J, et al. *PLoS Genet.* 2007;3:e108.
- 19) Huang Z, et al. *Science.* 1994;265:1883-1885.
- 20) Kakizawa S, et al. *EMBO J.* 2012;31:417-428.
- 21) Parathath SR, et al. *Stroke.* 2007;38:1938-1945.
- 22) Hess DT, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:150-166.
- 23) Jaffrey SR, et al. *Nat Cell Biol.* 2001;3:193-197.
- 24) Nakamura T, et al. *Neuron.* 2013;78:596-614.
- 25) Porter Moore C, et al. *J Biol Chem.* 1999;274:36831-36834.
- 26) Sun J, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:11158-11162.
- 27) Mikami Y, et al. *EBioMedicine.* 2016;11:253-261.
- 28) McCombs JE, et al. *Mol Biosyst.* 2010;6:1640-1649.
- 29) Suzuki J, et al. *Nat Commun.* 2014;5:4153.
- 30) Suzuki J, et al. *Biophys J.* 2016;111:1119-1131.
- 31) Okubo Y, et al. *J Neurosci.* 2015;35:15837-15846.
- 32) Okubo Y, et al. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29:1147-1157.

Neuronal cell death induced by the disruption of endoplasmic reticulum-mediated Ca^{2+} signaling

Yohei Okubo

Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Abstract. For the function and survival of neurons in the central nervous system, it is indispensable that the intracellular Ca^{2+} dynamics are properly controlled. The endoplasmic reticulum (ER), a major intracellular Ca^{2+} store, plays an important role in the control of the intracellular Ca^{2+} dynamics in neurons through the supply and uptake of Ca^{2+} . It has been suggested that the disruption of ER Ca^{2+} signaling is involved in neuronal cell death in various pathological conditions. Therefore, the disruption of ER Ca^{2+} signaling has attracted attention as a novel mechanism for neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease. In this review, we introduce the latest findings including our research on the relationship between the disruption of ER Ca^{2+} signaling and neuronal cell death. In addition, we will introduce recent developments on the technology for visualizing intraluminal Ca^{2+} dynamics within the ER, which is indispensable for promoting research in this field.