

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08250

研究課題名(和文) 中枢神経における細胞内M1ムスカリン受容体の発現メカニズムと記憶・学習との関係

研究課題名(英文) Intracellular M1-muscarinic acetylcholine receptors in central nervous system

研究代表者

村松 郁延 (MURAMATSU, Ikunobu)

金沢医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：10111965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表的膜受容体であるムスカリン受容体(mAChR)の内、M1サブタイプは中枢神経細胞では細胞内にも存在し、記憶・学習と関係する海馬の長期増強に關与していることを発見した。細胞内M1サブタイプは、内在性アゴニスト・アセチルコリン(ACh)がトランスポーターを介して取り込まれた後、刺激されると思われた。シナプス内ACh濃度はAChエステラーゼだけでなく、ACh transporterおよびシナプス前M2/M3オートレセプターによっても調節されていた。本研究は、中枢における新規コリン伝達機構を明らかにするもので、高次脳機能の解明に繋がる結果と思われた。

研究成果の概要(英文)：M1-muscarinic acetylcholine receptors (M1-mAChRs) occur in not only cell surface but also intracellular sites in CNS neurons and are associated with long term potentiation (LTP) in hippocampus, which has been known to be related to learning and memory. Intracellular M1-mAChRs are activated by ACh, which is transported to postsynaptic neurons through putative ACh transporter. Synaptic ACh concentrations are regulated by ACh esterase, ACh transporter and presynaptic M2/M3 autoreceptors. The present study reveals a new aspect of cholinergic transmission in CNS.

研究分野：薬理学

キーワード：ムスカリン受容体 アセチルコリン コリン伝達機構 トランスポーター 記憶・学習

1. 研究開始当初の背景

中枢神経においてアセチルコリン(ACh)作動性 M1 ムスカリン受容体は、記憶・学習といった高次脳機能に関与している。近年我々は、細胞膜にのみ局在すると考えられていた M1 ムスカリン受容体が海馬や大脳皮質では神経細胞内にも存在し、膜受容体とは異なる機能をしているという極めて興味ある知見を得た(Journal Neurochemistry, 2011, 2013)。しかし、その詳細なメカニズムおよび生理的意義はまだ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

記憶、学習といった高次脳機能には、中枢コリン作動性神経が重要な役割を果たしている。しかし、コリン作動性神経が、どのような機序で記憶形成などを増強するのか、その分子メカニズムはいまだ十分に解明されていない。我々は、中枢アセチルコリン受容体のうちM1-ムスカリン受容体サブタイプが細胞膜だけでなく神経細胞内にも存在し、機能的受容体であることを発見した。そこで本研究では、1) M1ムスカリン受容体は、どのようなメカニズムで中枢神経細胞内に特異的に発現するのか(発現メカニズムの解明)、2) 細胞外AChは、どのようなプロセスを経て細胞内M1ムスカリン受容体を刺激するのか(AChトランスポーターの同定)、3) シナプス内ACh濃度はいかなる機序で調節されているか、に焦点を絞り検討して、新規コリン伝達機構を確立する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内ムスカリン受容体発現実験:

実験には、myc-tagged ムスカリン受容体を N1E 115神経芽細胞に発現させ、myc 抗体を用いて細胞内局在を調べた。また、各ムスカリン受容体のC末を入れ換えたキメラ受容体を作成し、どのサブタイプのC末が細胞内局在に重要か検討した。

(2) ACh取り込み実験:

AChの中枢神経細胞内への取り込みを、 $[^3\text{H}]\text{ACh}$ と脳切片をインキュベーションすることにより調べた。

(3) 表面灌流実験:

灌流チャンバーのボリュウムが50 μl という超微量表面灌流装置を考案し、脆弱な脳組織からの神経伝達物質を高感度で検出できる装置を開発した。そして、あらかじめ $[^3\text{H}]\text{choline}$ とインキュベーションした脳切片を用いて、電気刺激により惹起される $[^3\text{H}]\text{ACh}$ 遊離を測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞内M1-ムスカリン受容体の発現機序:

N1E 115細胞に5つのムスカリン受容体サブタイプを発現したところ、構成的細胞内分布を示したのはM1サブタイプのみで、他のサブタイプ(M2 M5)は細胞膜のみに局在した。しかし、M2 M5サブタイプのC末をM1サブタイプのC末に置換すると、M2 M5サブタイプも構成的に細胞内に分布するようになった。この結果は、M1サブタイプC末が細胞内分布に重要な役割を演じていることを示唆した。point mutationの研究から、M1サブタイプC末のトリプトファンを含むモチーフが細胞内分布に関与していることを明らかにした。抗体を用いて細胞膜のM1サブタイプを標識した後細胞を37 に戻すと、標識した膜のM1サブタイプはアゴニスト刺激なしでも急速に細胞内に移動し、細胞膜から消失した。この結果から、M1サブタイプの細胞内分布は、細胞膜と細胞内の平衡状態がインターナリゼーション側に優位に傾いている結果であると考えられた。さらに、M1サブタイプのインターナリゼーションは、dynamin、clathrinおよびadaptor protein 2に依存していることも明らかにした。

(2) AChトランスポーターの同定:

細胞内M1サブタイプが機能するためには、内

在性アゴニストAChは神経細胞内に取り込まなければならない。そこで実際にAChは細胞内に取り込まれるのか、 ^3H AChをトレーサーとして検討を加えた。ラット大脳皮質、線条体、海馬、小脳の切片はそのままでは ^3H AChを全く取り込まない。これは、AChエステラーゼ(AChE)で ^3H AChが瞬時に分解されてしまうためである。そこで脳切片をあらかじめ非可逆的AChE阻害薬で処置したところ、 ^3H AChの有意な取り込みが観察された。この ^3H ACh取り込みは温度および時間依存性であり、非放射性的AChやcarbachol, tetraethylammoniumなどで抑制された。また、この取り込みは中枢特異的であり、心臓や肝臓、腸など末梢組織では観察されなかった。さらに、 ^3H ACh取り込み活性は、コリン作動性神経支配の豊富な線条体だけでなく、ほとんど支配のない小脳でもほぼ同等に観察された。この結果から、 ^3H ACh取り込みはコリン神経終末への取り込みと関連しないことが示唆された。以上の結果から、中枢にはAChを特異的に取り込む機構(トランスポーター)の存在することが明らかとなった。

(3) シナプス内ACh濃度の調節:

中枢コリン作動性神経からの ^3H ACh遊離およびシナプス内ACh濃度調節機能を、開発した灌流装置を用いた調べた。その結果、 ^3H ACh遊離はシナプス前M2/M3ムスカリン受容体サブタイプによりネガティブフィードバックを受けていること、AChEIはAChの分解を抑制してシナプス濃度を上昇させるが、その効果が強すぎると二次的にフィードバック効果が強くなるためシナプス内ACh濃度は結果として減少すること、AChトランスポーターもシナプス内ACh濃度を減少させることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Ikunob Muramatsu, Junsuke Uwada,

Takayoshi Masuoka, et al. (2017) Regulation of synaptic acetylcholine concentrations by acetylcholine transport in rat striatal cholinergic transmission. *Journal of Neurochemistry*, 143:76-86.

DOI:10.1111/jnc.14127 (査読有)

Takayosi Masuoka, Makiko Kudo, Ikunobu Muramatsu, et al. (2017) TRPA1 channels modify TRV1-mediated current responses in dorsal root ganglion neurons. *Frontiers in Physiology*, 8: article 272.

DOI:10.3389/fphys.2017.00272 (査読有)

Junsuke Uwada, Takashi Yazawa, Ikunobu Muramatsu, et al. (2017) Activation of muscarinic receptors prevents TNF- α -mediated intestinal epithelial barrier disruption through p38 MAPK. *Cell Signalling*, 35: 188-196. (査読有)

Ikunob Muramatsu, Hatsumi Yoshiki, Junsuke Uwada, Takayoshi Masuoka, et al. (2016) Pharmacological evidence of specific acetylcholine transport in rat cerebral cortex and other brain regions. *Journal of Neurochemistry*, 139: 566-575. (査読有)

Takayoshi Masuoka, Makiko Kudo, Ikunobu Muramatsu, et al. (2016) Long-term activation of group 1 metabotropic glutamate receptors increases functional TRV1-expressing neurons in mouse dorsal root ganglia. *Frontiers Cellular Neuroscience*. 10: 79. (査読有)

Toshio Sekiguchi, Kenji Kuwasako, Ikunobu Muramatsu, et al. (2015) Evidence for conservation of the calcitonin superfamily and activity-regulating

mechanisms in the basal chordate
Branchiostoma floridae: insights into the
molecular and functional evolution in
chordates. *Journal of Biological Chemistry*.
291:2345-2356. (査読有)

Md Rafiqul Islam Khan, Junsuke Uwada,
Ikunobu Muramatsu, et al. (2015)
Activation of muscarinic cholinergic receptor
ameliorates tumor necrosis factor- α -induced
barrier dysfunction in intestinal epithelial cells.
FEBS Letters.
589: 3640-3647. (査読有)

Ikunobu Muramatsu, Hatsumi Yoshiki, et
al. (2015) Binding method for detection of
muscarinic acetylcholine receptors in
receptor's natural environment. In
*Muscarinic Receptor: From Structure to
Animal Models* (edited by J Myslivecek and
J Jakubik), *Neuromethods* vol 107: p69-81.
(査読有)

Junsuke Uwada, Ikunobu Muramatsu, et
al. (2014) Intracellular localization of
M1 muscarinic acetylcholine receptor through
clathrin-dependent constitutive internalization
via a C-terminal tryptophan-based motif.
Journal of Cell Science,
127: 3131-3140. (査読有)

〔学会発表〕（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村松 郁延 (MURAMATSU, Ikunobu)
金沢医科大学・医学部・客員教授
研究者番号： 10111965

(2)研究分担者

西尾 真友 (NISHIO, Matomo)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号： 80156041

益岡 尚由 (MASUOKA, Takayoshi)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 80509307