

令和 3 年 8 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09040

研究課題名(和文) GPCR間の機能的相互作用による難治性かゆみの制御

研究課題名(英文) Inter-GPCR interplay regulate intractable itch.

研究代表者

上窪 裕二 (Kamikubo, Yuji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80509670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)をはじめとする膜タンパク質は複合体を形成してお互いの機能を制御している可能性が示唆されている。本研究では、GPCR同士の相互作用による痛みとかゆみのクロストークの生理的・分子的メカニズムを解明し、かゆみの神経伝達の制御を目指すものである。本研究では、痛みやかゆみなどの感覚伝達に関わる代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)とB型ガンマアミノ酪酸受容体(GABA_BR)をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞株を作成し、その相互作用について評価を行った。その結果、これらのGPCRが複合体を形成し機能的に相互作用することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経伝達とその調節に関わる代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)とB型ガンマアミノ酪酸受容体(GABA_BR)の相互作用を明らかにした。その成果は、別個の機構を持つGタンパク質共役型受容体(GPCR)同士が複合体を形成し、お互いの機能を調節し合うことで単独では実現できないような高度な機能調節を行っていることを示すものである。GPCRは様々な疾患の治療標的であり、創薬ターゲットとして研究が進められている。本研究成果は、異種のGPCR同士が形成する複合体が新奇の創薬ターゲットとなり得ることを示すものであり、学術的・社会的に意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins rarely act alone, whereas molecular machines constructed from multiple interacting proteins play crucial roles in cells. Recently, many studies have suggested that interaction between neurotransmitter GPCRs may mediate diverse modalities of neural responses. The B-type GABA receptor (GABA_BR) and type-1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1) are GPCRs for GABA and glutamate, respectively and each of them plays distinct roles in controlling neurotransmission including itch and pain. Here, we examined how these GPCRs interaction using stable cell lines and nervous tissue. Our findings provide solid evidence that mGluR1 and GBR have the intrinsic abilities to form complexes and to mutually modulate signaling. These findings indicate that synaptic transmission relies on a network of proteins far more complex than previously assumed.

研究分野：薬理学

キーワード：GPCR 膜タンパク質 痛み 痒み シナプス伝達 ライブセル・イメージング GABA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

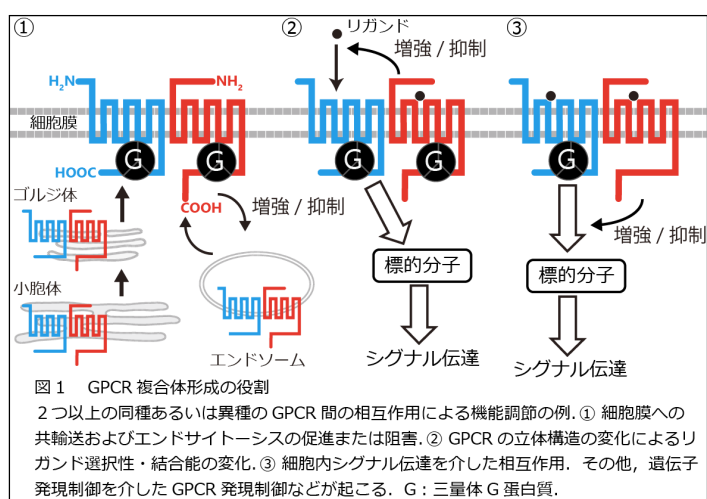
抗ヒスタミン薬抵抗性の難治性のかゆみは Quality of Life(QOL)を著しく低下させ自殺者ができるほど激しいものであり、医学的に重要な課題の1つである。かゆみの伝達に関わる独自の神経回路やかゆみ伝達に関わるガストリン放出ペプチド(GRP)受容体などの G タンパク質共役型受容体(GPCR)がかゆみの伝達に関わることなどが明らかになり(Sun YG ら Science, 2009), 欧米などでは専門の研究センターが設立されている。しかしながら、未だにかゆみの神経伝達とその制御方法についてはほとんど解明されていない。その一方で我々は痛みや冷覚などの感覚情報がかゆみの伝達を抑制することは経験的に知っており、感覚伝達のクロストークによるかゆみの制御機構が存在すると考えられている。

中枢および末梢神経系には様々な GPCR が発現し、様々な神経機能に関与している。近年の GPCR 研究の成果により、同種および異種の GPCR 同士が複合体を形成し、相互作用しあうことで単量体では実現できない高度な機能的な制御を行うことが報告されている。研究代表者らは、これまでに GPCR のヘテロ複合体形成によるシナプス伝達の制御に注目し、シナプス可塑性と記憶・学習の制御、および痛み伝達の制御について研究を行ってきた。その結果、痛みの伝達や記憶・学習に関わるアデノシン A1 受容体(A1 受容体)と代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR1)が細胞内ドメインで複合体を形成し、互いのシグナル伝達を抑制することを明らかにした。アデノシン A1 受容体は鍼灸治療による疼痛緩和に関わっている可能性が示唆されており、mGluR1 は痛みの伝達に関わっていることから、これらの相互抑制は痛みの伝達を増強または抑制すると考えられる。また研究の過程でこれらの GPCR がかゆみの伝達に関わる GRP 受容体と相互作用することを明らかにした。

米国の研究グループは、モルヒネによるかゆみ発現に異種 GPCR 間の複合体形成によるシグナル・クロストークが感覚伝達系を制御することを報告し(Liu XY ら Cell, 2011, Zhao ZQ ら Neuron, 2014), 注目されている。しかしながら感覚情報の神経伝達には多くの GPCR が関与しており、GPCR 同士の機能的相互作用による感覚伝達の制御システムについては解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者らは、かゆみの伝達などの感覚伝達に関わる GPCR が他の様々な GPCR と相互作用し、機能調節を受けているという仮説を立て、異種 GPCR 間の相互作用による痛みとかゆみのクロストークを明らかにし、その相互作用を制御することで難治性かゆみを制御することを目指した(図 1)。本研究で得られる成果は痛みとかゆみの神経伝達の分子メカニズムの解明とその制御法の確立につながり、学術的に重要であるだけでなく、慢性疼痛や難治性かゆみの緩和や治療指針の確立など臨床においても意義は大きい。



3. 研究の方法

相互作用が想定される GPCR の誘導型安定発現細胞株の作成を行った。細胞株の作成には T-REx-293 細胞株を用い、Flp-In システムと Jump-In システムを組み合わせることで複数の GPCR をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞株の作製に成功した。代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR1)と B 型ガンマアミノ酪酸受容体(GABA_BR)を誘導発現する細胞を用い、GPCR 間の複合体形成の有無について免疫共沈法などの生化学的解析とライブセル・イメージング法を組み合わせることで解析を行った。

mGluR1 は細胞内で G_q 型 G タンパク質と共役するため、活性化によってホスホリパーゼ C β (PLC β)が活性化される。活性化された PLC β は細胞膜のホスファチジルイノシトール二リン酸を加水分解し、ジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸(IP $_3$)を産生する。産生された IP $_3$ は小胞体膜に局在する IP $_3$ 受容体に作用しカルシウムイオンの遊離を促進する。そこで mGluR1 の機能評価にはカルシウムインジケータを用いた細胞内カルシウムイメージングを実施した。一方 GABA_BR は、細胞内で G_i/G_o 型 G タンパク質と共役するため、活性化によって

細胞内のアデニル酸シクラーゼの活性化を抑制する。アデニル酸シクラーゼは細胞内の ATP から cAMP の産生を行う酵素である。そこで、GABA_BR の機能評価については cAMP アッセイを用いて評価を行った。

さらに複合体形成が予測されている GPCR を誘導発現する細胞株を用いて核酸アプタマーの合成を実施した。

4. 研究成果

作成した細胞株や神経組織を用いて免疫共沈を行ったところ、mGluR1 と GABA_BR が複合体を形成している可能性が示唆された。さらに全反射照明蛍光 (Total Internal Reflection Fluorescence : TIRF) 顕微鏡イメージングによってこれらの GPCR が細胞膜表面で複合体を形成し、抗体を用いて一方の GPCR を集積することでもう一方の局在が変化することを明らかにした(図 2)。

カルシウムインジケーターである Fura 2AM を用いたカルシウムイメージングの結果から GABA_BR の活性化が mGluR1 のシグナル伝達を増強することが明らかとなった、さらにこの相互作用には GABA_BR と共役する G_i/G_o タンパク質が関与していない可能性が示唆された。さらに cAMP ホモジニアスアッセイの結果から、mGluR1 の活性化が GABA_BR のシグナル伝達を抑制する可能性が示唆された。つまり、mGluR1 の活性化は GABA_BR のシグナル伝達を抑制し、GABA_BR の活性化は mGluR1 のシグナル伝達を増強することが明らかになった(図 3)。

mGluR1 は小脳プルキンエ細胞などの細胞に局限して発現しており、小脳運動学習に関与している。一方 GABA_BR は中枢神経系に広く発現し、神経伝達の制御に関わっている。GABA_BR は脳内に定常的に存在する GABA や GABA の溢流で活性化される可能性がある。GABA_BR 受容体は睡眠や気分などと深くかかわっており、これらの GPCR の相互作用は学習・記憶や睡眠・覚醒サイクルなどの制御に関与している可能性がある。mGluR1 および GABA_BR は脊髄の後角にも多く発現しており、mGluR1 は痛みの伝達、GABA_BR は痛み伝達の抑制に関わっている可能性が示唆されていることから、これらの複合体形成による機能的な相互作用は痛みの伝達制御に関わっている可能性が考えられる(図 4)。

さらに GPCR 複合体の解析するための分子ツールの作製を目指し、改良型 Cell SELEX 法を用いたアプタマーの作成を行った。その結果、GPCR 異種複合体を認識する核酸アプタマーを得ることができたため、今後更なる検討を行う予定である。

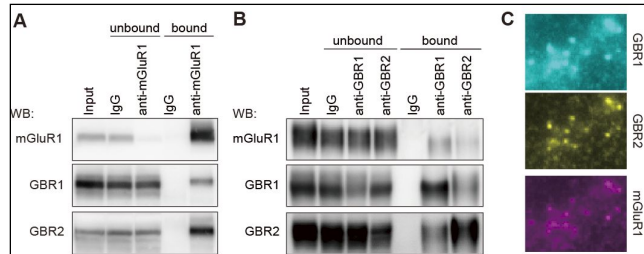


図 2 mGluR1 と GABA_BR の複合体形成

A: mGluR1 に対する抗体で免疫沈降したものを免疫プロット法で解析した。mGluR1 抗体で沈降されたものの中に GABA_BR (GBR1 および GBR2) が含まれる。B: GABA_BR に対する抗体 (anti-GBR1 および anti-GBR2) で免疫沈降したものを免疫プロット法で解析した。GABA_BR 抗体で沈降されたものの中に mGluR1 が含まれる。C: 表面ラベルした mGluR1 と GABA_BR (GBR1、GBR2) が細胞表面で共局在している。

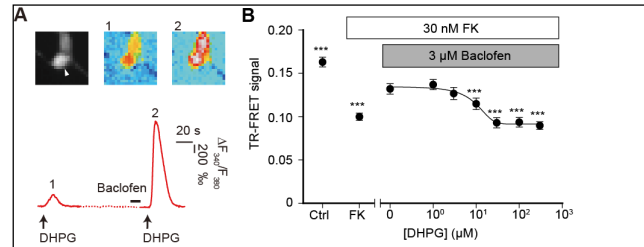


図 3 mGluR1 と GABA_BR の機能的相互作用

A: カルシウムイメージングによる mGluR1 シグナル伝達の評価。mGluR1 作動薬 (DHPG) によるカルシウム濃度上昇が GABA_BR 作動薬 (Baclufen) によって増強されている。B: cAMP ホモジニアスアッセイによる GABA_BR シグナル伝達の評価。Baclufen による作用が DHPG によって抑制されている。

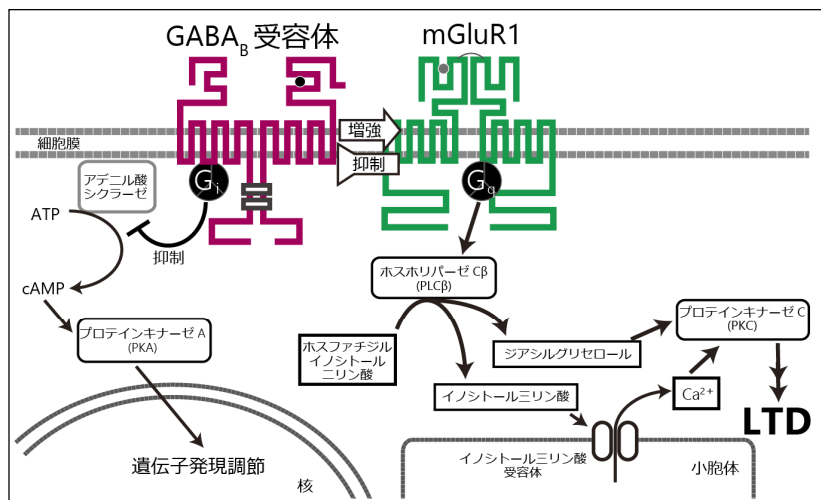


図 4 GABA_BR と mGluR1 の機能的相互作用

GABA_BR は、mGluR1 の機能を増強し、mGluR1 は GABA_BR の機能を抑制する。これらの GPCR は小脳のプルキンエ細胞上に発現しており、異種 GPCR 間相互作用は mGluR1 機能の調節を介して小脳 LTD の誘導を制御し、小脳依存的な運動学習を調節している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sou Yu-shin, Kakuta Soichiro, Kamikubo Yuji, Niisato Kazue, Sakurai Takashi, Parajuli Laxmi Kumar, Tanida Isei, Saito Hiromitsu, Suzuki Noboru, Sakimura Kenji, Maeda Yusuke, Kinoshita Taroh, Uchiyama Yasuo, Koike Masato	4. 巻 6
2. 論文標題 Cerebellar Neurodegeneration and Neuronal Circuit Remodeling in Golgi pH Regulator-Deficient Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 ENEURO.0427-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0427-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakairi Hakushun, Kamikubo Yuji, Abe Masayoshi, Ikeda Keisuke, Ichiki Arata, Tabata Toshihide, Kano Masanobu, Sakurai Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 G Protein-Coupled Glutamate and GABA Receptors Form Complexes and Mutually Modulate Their Signals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 567 ~ 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscemneuro.9b00599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takasugi Nobumasa, Araya Runa, Kamikubo Yuji, Kaneshiro Nanaka, Imaoka Ryosuke, Jin Hao, Kashiya Taku, Hashimoto Yoshie, Kurosawa Masaru, Uehara Takashi, Nukina Nobuyuki, Sakurai Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 TMEM30A is a candidate interacting partner for the -carboxyl-terminal fragment of amyloid-precursor protein in endosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0200988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masukawa Daiki, Koga Motokazu, Sezaki Anna, Nakao Yuka, Kamikubo Yuji, Hashimoto Tatsuo, Okuyama-Oki Yuki, Aladeokin Aderemi Caleb, Nakamura Fumio, Yokoyama Utako, Wakui Hiromichi, Ichinose Hiroshi, Sakurai Takashi, Umemura Satoshi, Tamura Koichi, Ishikawa Yoshihiro, Goshima Yoshio	4. 巻 2
2. 論文標題 L-DOPA sensitizes vasomotor tone by modulating the vascular alpha1-adrenergic receptor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e90903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.90903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂入伯駿, 上窪裕二, 阿部匡良, 池田圭祐, 一木新, 田端俊英, 櫻井隆
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体1型とGABAB受容体の複合体形成と機能的相互作用
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端俊英, 永松利一, 阿部匡良, 北村和希, 松井友希, 竹村諒, 坂入伯駿, 上窪裕二, 櫻井隆
2. 発表標題 歪みを最小化しながら神経生体信号を抽出する非線形フィルターの実装と性能評価
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上窪裕二, 山名智人, 井上由理子, 橋本祥江, 櫻井隆
2. 発表標題 ナノマテリアルによる酸化ストレスと神経細胞死
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部匡良, 池田圭祐, 一木新, 松岡希斗, 坂入伯駿, 上窪裕二, 櫻井隆, 田端俊英
2. 発表標題 B型GABA受容体は動的モジュレーターとして1型代謝型グルタミン酸受容体のリガンド感受性を亢進させる
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kamikubo, Kazue Niisato, Koichi Jingo, Hao Jin, Takashi Sakurai
2. 発表標題 Continuous inhibition of secretase regulates synapse formation
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hakushun Sakairi, Yuji Kamikubo, Masayoshi Abe, Kenta Matsuoka, Toshihide Tabata, Takashi Sakurai
2. 発表標題 Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) forms hetero-oligomer with other G-protein coupled receptors and they regulate their signal transduction each other at neurons
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上窪裕二、坂入伯駿、田端俊英、櫻井隆
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体の複合体形成とシグナル・クロストーク
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂入伯駿、上窪裕二、田端俊英、櫻井隆
2. 発表標題 中枢神経系に発現するGPCR間の異種複合体形成と機能的相互作用
3. 学会等名 第137回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増川太輝、古賀資和、涌井広道、上窪裕二、横山詩子、中村史雄、田村功一、梅村敏、櫻井隆、石川義弘、五嶋良郎
2. 発表標題 L-ドーパは血管の 1受容体を制御して交感神経機能を亢進させる
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松岡希斗、阿部匡良、坂入伯駿、上窪裕二、櫻井隆、田端俊英
2. 発表標題 強制発現系におけるmGluR1とGABABRの複合体形成と機能的相互作用
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kamikubo Y., Sakurai T.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 5
3. 書名 Co-immunoprecipitation Analysis of GPCR Complexes in the Central Nervous System. In: Odagaki Y., Borroto-Escuela D. (eds) Co-Immunoprecipitation Methods for Brain Tissue. Neuromethods, vol 144.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学大学院 細胞・分子薬理学 http://pharmacology.sakura.ne.jp/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	冨永 光俊 (Tominaga Mitsutoshi) (50468592)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関