

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15020

研究課題名(和文) Behavioral analyses and ligand screening toward the identification of the physiological roles of an orphan metabotropic receptor Prrt3

研究課題名(英文) Behavioral analyses and ligand screening toward the identification of the physiological roles of an orphan metabotropic receptor Prrt3

研究代表者

陳以珊(Chen, I-Shan)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・特任助教

研究者番号：40757770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Prrt3はGタンパク質共役受容体のFamily Cに属するオーファン代謝型受容体であり、その生理機能は未解明のままである。我々はこれまで、マウスの脳にPrrt3が大量発現していることを見出した。本研究では、Prrt3の機能に関する手がかりを得るために、ホモのPrrt3遺伝子破壊マウスを作用し、網羅的行動解析を行った。その結果、空間記憶に関するテストの成績が野生型マウスより衰えていることが明らかとなった。また、Prrt3のリガンドの同定のために、数百個の小分子化合物を用いたスクリーニングを行った結果、生理的リガンドとしての作用を持つ物質は見つからなかった。さらなる実験が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々のこれまでの研究から、マウスの脳におけるPrrt3の発現パターンやPrrt3遺伝子破壊マウスの空間記憶の異常等を観察した。これらの実験結果により、Prrt3は脳機能において重要な役割を果たしていることが強く示唆された。本研究の研究成果は、Prrt3の生理機能の理解を深めるとともに、脳の機能障害を引き起こす新規の分子機構の理解にも繋がると想定される。また、Prrt3はそれに関する病気の新規治療薬標的分子として働くことも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Prrt3 is an orphan metabotropic receptor of family C GPCR and the physiological functions of Prrt3 are unknown. We have observed that Prrt3 is highly expressed in mouse brain. In the present study, we aim to identify the role of Prrt3. We created homozygous Prrt3 knockout (KO) mice and performed behavioral analyses. By Barnes probe test to analyze the spatial memory, we observed that the scores of Prrt3 KO mice in terms of (1) Latency (2) Error (3) Distance to the target hole were worse than that of wild-type mice. In the course of screening of a small-molecule library towards the identification of Prrt3 ligands, we failed to figure out its physiological ligands. Further experiments are necessary to solve the puzzle.

研究分野：イオンチャネル・受容体

キーワード：新規受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) Proline rich transmembrane protein 3 (Prprt3) は G タンパク質共役受容体 (GPCR) の Family C に属するオーファン代謝型受容体である。Prprt3 は大きな N 末細胞外領域と 7 回膜貫通部位の構造を持つことがゲノム情報により明らかとなったが、その生理的役割と分子機能は未解明のままである。

(2) 所属研究室のこれまでの研究により、以下の実験結果を観察した。

Prprt3 抗体を作成し、Prprt3 は野生型マウスの脳に大量発現していることを明らかにした(図 1 左側)。また、Prprt3 遺伝子破壊 (KO) マウスを作成し、脳における Prprt3 の発現欠失を確認した(図 1 右側)。

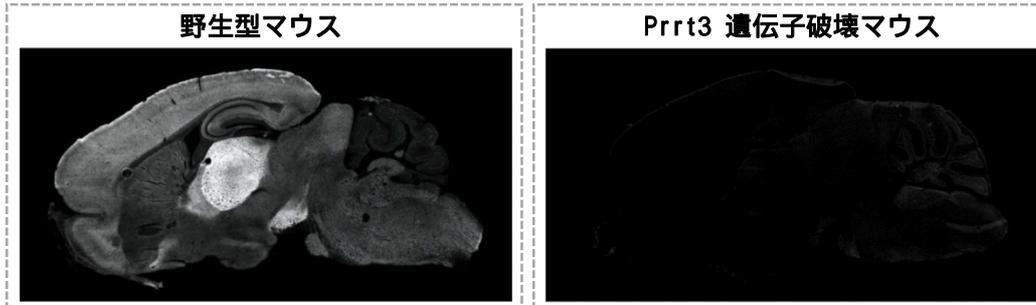


図 1. マウスの脳における Prprt3 の発現パターン (北海道大学・渡辺研究室・今野先生より)

Prprt3 KO ホモマウスは 1 週間以内に高率に死亡したため、やむを得ず KO ヘテロマウスを用いて網羅的行動解析を行った。その結果、空間記憶の長期保持および恐怖条件付け記憶の長期保持が低下していることを明らかにした。また、Prprt3 遺伝子の Flox マウスと Emx1-Cre マウスの交配により得られた、大脳興奮性神経細胞特異的 KO ホモマウスを用いた行動解析を行った結果、空間記憶の長期保持には異常はみられなかったが、恐怖条件付け記憶の長期保持が低下していることを観察した。

Western blot (WB) 法により、マウス脳に N 末端細胞外領域が根元付近で切断された Prprt3 受容体が多数存在することを明らかにした。また、共免疫沈降法と WB 法により、HEK293 細胞における Prprt3 の発現は、プロタンパク質転換酵素 Furin との共発現により部分的に切断されたことが示唆された。切断部位の同定のため変異体を用いた解析を行った結果、Prprt3 アミノ酸残基 Arg343 と Arg345 が切断部位に当たる可能性が高いとことが明らかとなった。

免疫共沈タンパク質の質量分析の結果に $G_{i/o}$ が含まれていることが分かった。また、Prprt3 と G_i 結合型の G タンパク質依存性カリウム (GIRK) チャネルをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法により検討した結果、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストで知られている Oxotremorin-M (Oxo-M) は、Prprt3 を介して GIRK チャネルの電流増加作用を示すことが明らかとなった。しかし、アセチルコリンによる電流増加作用は観察されない。以上の結果から、Prprt3 は G_i 共役型受容体であることが強く示唆されたが、生理的リガンドは不明なままである。

2. 研究の目的

Prprt3 の生理機能や分子機構に関する学術論文はいまだに報告されていない。我々は、Prprt3 の生理的リガンドおよびその活性を制御する分子機構、また中枢神経系における Prprt3 の生理的役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

Prprt3 の生理機能の全体像の理解を深めるため、以下の実験を行った。

(1) 異なる方法による Prprt3 KO ホモマウスの作成

所属研究室は過去に、KOMP Repository (UC Davis, USA) 由来の Targeted ES 細胞を用いて Prprt3 KO マウスを作成したが、KO ホモマウスは 1 週間以内に高率に死亡し、生存した場合でも明らかに体が小さかった。やむを得ず KO ヘテロマウスを用いて網羅的行動解析を行った。しかし、その後の Microarray 解析により近傍遺伝子の発現レベルの大きな変化が認められたため、KO ホモの高い致死性および KO ヘテロの行動異常が、真に Prprt3 遺伝子の KO によるものか確定できなかった。そこで、改めて、Prprt3 遺伝子の Flox マウスを作成し、Actb-Cre マウスとの交配により、新たに KO ホモマウスを得ることを試みた (新潟大学・崎村研究室より協力)。Flox マウス由来の KO ホモマウスは、高い致死性を示さず、体が小さいこともなく、また近傍遺伝子の発現レベルの大きな変化も認められなかった。KO ホモマウスの Prprt3 タンパク質の完全欠如は、WB 法及び免疫組織化学的解析により確認された (北海道大学・渡辺研究

室より協力)。

(2) Prrt3 の生理的役割の理解を深めるための行動解析

野生型マウス (Flox ホモマウス) および Prrt3 KO ホモマウス (Prrt3-flox × Actb-Cre) の十分な個体を確保し、筋力測定、協調運動、運動学習、条件付け、不安様行動、参照記憶、社会的行動や感覚的テストなどの測定を網羅した行動解析を、藤田医科大学・宮川研究室の協力のもとに所属研究室の技術職員・山本様が行った。

(3) Prrt3 の生理的リガンドの同定のための小分子ライブラリースクリーニング

アフリカツメガエル卵母細胞に Prrt3 と GIRK チャネルを共発現させ、二電極膜電位固定法により GIRK チャネル電流を指標とした小分子ライブラリー (京都大学・上杉先生より提供) のスクリーニングを行った。

(4) Prrt3 におけるリガンド結合部位の同定のための解析

我々は、Prrt3 におけるリガンド結合部位は、ほかの Family C GPCR と同じ N 末端細胞外領域に位置することを想定している。しかし、リガンドが膜貫通部位と結合する可能性も否定できない。そこで、Furin 共発現法および Mutagenesis 法による Prrt3 の N 末端細胞外領域欠失の切断体を作成し、全長の Prrt3 又はその切断体を GIRK チャネルと共発現させ、Oxo-M の投与による電流増加作用の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 網羅的行動解析

野生型マウス (Flox ホモマウス) および Prrt3 KO ホモマウス (Prrt3-flox × Actb-Cre) 各 20 匹を用い、以下のテスト項目を行った: General health/neurological screen; Light/dark transition; Open field; Elevated plus maze; Hot plate; Social interaction; Rotarod; Prepulse inhibition/startle response; Porsolt forced swim; Barnes maze; T-maze; Tail suspension; Cued and contextual fear conditioning; 24hr home cage monitoring。その結果、ほぼすべてのテスト項目においては、Prrt3 KO ホモマウスは野生型マウスとの有意な差が無いことが明らかとなった。しかし、Barnes maze test (バーンズ円盤迷路テスト) においては興味深い結果を得た (図 2)。

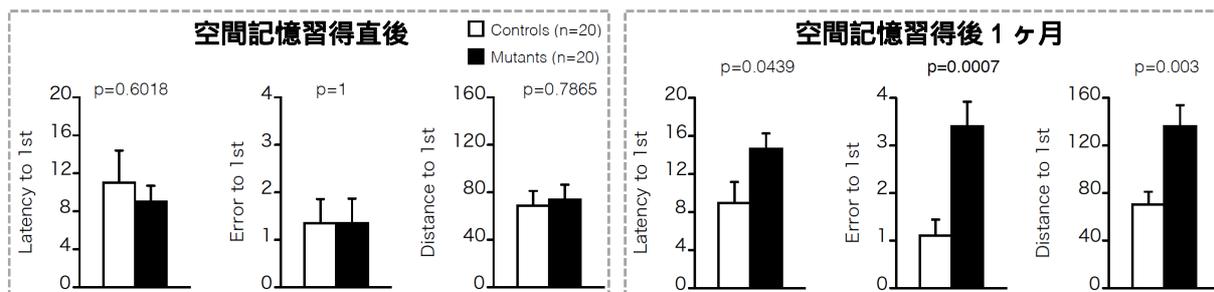


図 2. バーンズ円盤迷路テスト (Control: 野生型マウス; Mutants: Prrt3 遺伝子破壊マウス)

バーンズ円盤迷路テストはマウスの空間学習の記憶を探るためのテストである。我々は、両グループのマウスを円盤上の目的地の位置に正確にたどり着くことを学習させ、この空間記憶習得直後と学習後 1 カ月の時点で目的地の位置を覚えるかどうかを測定した。その結果、学習後 1 カ月の時点で Prrt3 KO ホモマウスは野生型マウスと同じ目的地の位置は記憶していて、しかし、目的地に到達するまでの (1) 時間、(2) 目的地以外の場所を覗くエラー、(3) 移動距離が、いずれも Prrt3 KO ホモマウスのほうが有意に大きくなることが明らかとなった (図 2 右側)。以上のことから、Prrt3 KO ホモマウスは目的場所に行く道順をはっきり覚えていない可能性があることを示唆された。

(2) 小分子化合物ライブラリースクリーニング

我々はこれまで 代謝型グルタミン酸受容体リガンドライブラリー、 アセチルコリン受容体リガンドライブラリー、 脂肪酸ライブラリー、 メラトニン受容体リガンドライブラリー等の投与による Prrt3 の活性変化を GIRK チャネル電流増加或は減少を指標としたスクリーニングを行ってきた。その結果、Oxo-M と同じムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストに属する数個の化合物が、Prrt3 の活性化を介して GIRK チャネル電流増加作用を示すことが明らかとなった (図 3 左側)。ただし、アセチルコリン

は作用を示さなかったため、生理的リガンドは未同定である。本研究では、さらに ヒスタミン受容体リガンドライブラリーと カンナビノイド受容体リガンドライブラリーの投与による解析を行った。その結果、複数の抗ヒスタミン薬の投与が GIRK 電流を減少させることを見出した(図3右側)。しかし、その効果は Prrt3 との共発現無しでも見られた。よって、これらの薬剤は Prrt3 のリガンドとして機能しているわけではなく、GIRK チャンネルに直接作用することが明らかとなった。

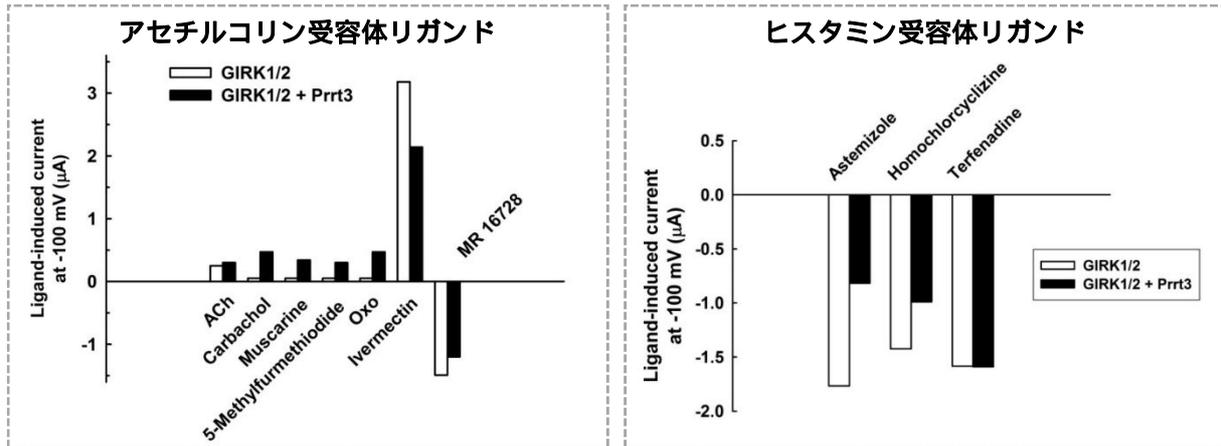


図3. 小分子化合物ライブラリースクリーニング

(3)リガンド結合部位の解析

Prrt3 のリガンド結合部位を探すため、Prrt3 の全長体と N 末端細胞外領域の 39 番から 339 番のアミノ酸残基を削除した切断体 (Prrt3 de39-339) を GIRK チャンネルと共発現させ、Oxo-M 投与による GIRK チャンネル電流増加の解析を行った。また、Furin との共発現による N 末端細胞外領域の切断体の比較も行った。その結果、Prrt3 の全長体と切断体の電流増加に有意差は見られなかった(図4) よって、Prrt3 の Oxo-M に対する感受性は、N 末端細胞外領域の切断により明らかな変化がないことが明らかとなった。このことから、Oxo-M の結合部位は Prrt3 の N 末端細胞外領域ではないことを示唆された。

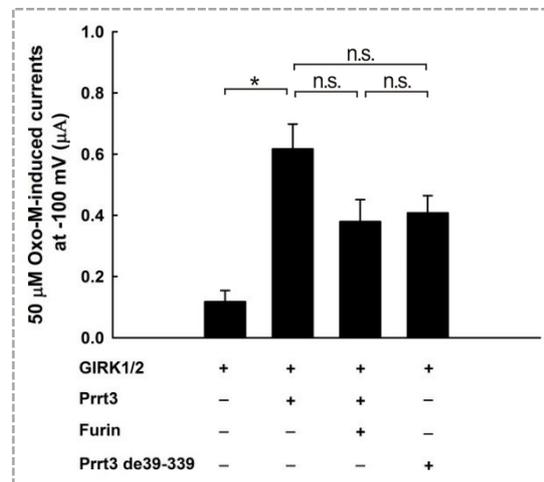


図4. Oxo-M の投与による Prrt3 の全長体と N 末端切断体の活性化効果の比較

(4) その他の研究成果

Prrt3 のリガンドの同定を目的としたスクリーニングの過程で、複数の GIRK チャンネルの新規抑制剤を見出した(図3右側)。GIRKチャンネルは神経興奮性・心拍・甲状腺ホルモン分泌の調節において重要な分子である。本研究で見出したGIRK チャンネルの新規抑制剤、非鎮静性抗ヒスタミン薬である Terfenadine や Astemizole は、HERG チャンネルの活性を阻害し不整脈を誘発する可能性があることが報告されているが、これらの薬剤による GIRK チャンネルの影響に関する報告は未だない。そこで、我々は電気生理学実験及び分子ドッキング法を用いて、Terfenadine による GIRK チャンネル活性の変化とその制御作用の鍵を握る領域の解析を行った。その結果、Terfenadine を含む複数の非鎮静性抗ヒスタミン薬の投与は GIRK チャンネル(特に GIRK1)の電流を阻害することが明らかとなった。ドッキングシミュレーション(Dr. Karbat and Prof. Reuveny, Weizmann Institute of Science, Israel より協力)及び変異体を用いた電気生理学的解析により Terfenadine 作用部位の同定を試みた結果、GIRK1 のポア領域の Pore helix の中央部、イオン選択性フィルターの背後に位置する Phe137 がこの薬による活性阻害作用に重要であることが明らかとなった(図5A & B)。さらに、GIRK1 の Phe137 に対応する GIRK2 の Ser148 の変異体を用いた解析を行った結果、この位置のアミノ酸残基の側鎖の大きさが阻害作用の効果を定めることを突き止めた(図5C)。また、GIRK1 の Phe137 は、イオン選択性や膜電位依存的活性化にも寄与すること、Terfenadine の結合と PIP₂ の結合には競合が見られることが明らかになった。これらの情報は、GIRK チャンネルを標的とした

新規薬物を創出につながることを期待される。この研究成果をまとめた原著論文は British Journal of Pharmacology 誌に発表した(文献1)。

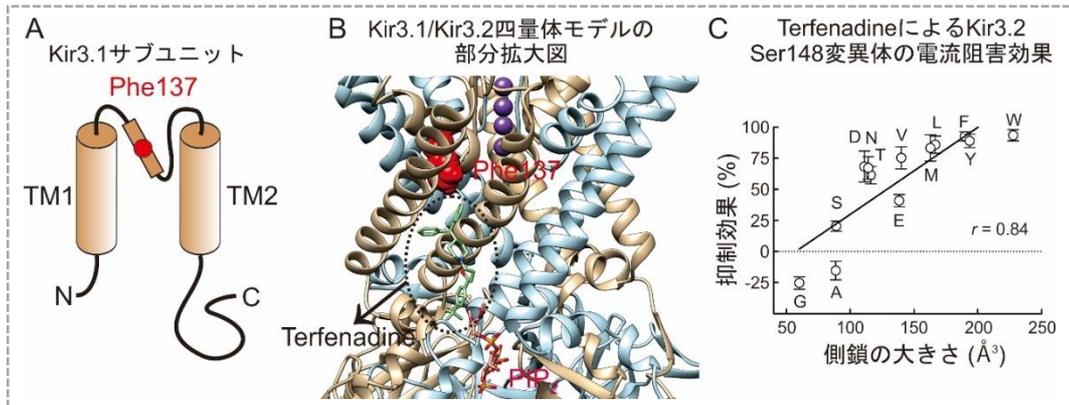


図5. Terfenadineによる活性阻害に重要であるGIRKチャネルのアミノ酸残基(A)と推測の結合部位(B)およびアミノ酸残基の側鎖の大きさによる阻害作用の変化(C)

<引用文献>

Chen IS, Liu C, Tateyama M, Karbat I, Uesugi M, Reuveny E, Kubo Y. Non-sedating antihistamines block G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. Br. J. Pharmacol., 176, 3161-3179, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 I-Shan Chen, Chang Liu, Michihiro Tateyama, Izhar Barbat, Motonari Uesugi, Eitan Reuveny, Yoshihiro Kubo	4. 巻 176
2. 論文標題 Non-sedating antihistamines block G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3161-3179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.14717	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 I-Shan Chen, Chang Liu and Yoshihiro Kubo
2. 発表標題 Regulation mechanisms of G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channel by small molecules
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress: FAOPS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 I-Shan Chen, Chang Liu, Michihiro Tateyama, Izhar Barbat, Motonari Uesugi, Eitan Reuveny, Yoshihiro Kubo
2. 発表標題 Inhibitory mechanisms of G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channel by antihistamines
3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of the Biophysical Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomomi Yamamoto, Satoko Hattori, Li Zhou, Rie Natsume, Kohtarou Konno, I-Shan Chen, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Tsuyoshi Miyakawa, Yoshihiro Kubo
2. 発表標題 Physiological roles of Prrt3, an orphan metabotropic receptor: Comprehensive behavioral test battery analysis using homozygous full gene knock-out mice derived from flox mice
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果 NIPS Research ホームページ:
非鎮静性抗ヒスタミン薬によるGIRKチャネルの活性阻害機構の解明
http://www.nips.ac.jp/nips_research/2019/07/girk_1.html

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
研究協力者	久保 義弘 (Kubo Yoshihiro) (80211887)	生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授 (63905)	
研究協力者	山本 友美 (Yamamoto Tomomi)	生理学研究所	
研究協力者	服部 聡子 (Hattori Satoko)	藤田医科大学	
研究協力者	周 麗 (Zhou Li)	新潟大学	
研究協力者	夏目 理恵 (Natsume Rie)	新潟大学	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今野 幸太郎 (Konno Kohtarou)	北海道大学	
研究協力者	渡辺 雅彦 (Watanabe Masahiko)	北海道大学	
研究協力者	崎村 建司 (Sakimura Kenji)	新潟大学	
研究協力者	宮川 剛 (Miyakawa Tsuyoshi)	藤田医科大学	
研究協力者	上杉 志成 (Uesugi Motonari)	京都大学	
研究協力者	劉 暢 (Liu Chang)	生理学研究所	
研究協力者	立山 充博 (Tateyama Michihiro)	生理学研究所	
研究協力者	Karbat Izhar (Karbat Izhar)	Weizmann Institute of Science, Israel	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	Reuveny Eitan (Reuveny Eitan)	Weizmann Institute of Science, Israel	