

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007-2008
課題番号：19590242
研究課題名（和文） スナピン分子を介する細胞内情報伝達および神経伝達物質遊離の調節機構の解明
研究課題名（英文） The mechanism of Snapin-mediated intracellular signal transduction and neurotransmitter release
研究代表者 鈴木 史子 (SUZUKI FUMIKO) 福井大学・医学部・助教 研究者番号：80291376

研究成果の概要： 私たちは $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体(以下 $\alpha_{1A}$  受容体)の相互作用分子として細胞内小分子であるスナピンを同定し、その生体内における機能的意義を解明する目的で研究しています。私たちはこれまでに、スナピンが $\alpha_{1A}$  受容体のみならず TRPC6  $Ca^{2+}$ チャネルとも相互作用し、この受容体とチャネル間に生理的リンクを形成する重要な介在分子であること、その結果として $\alpha_{1A}$  受容体作動性の TRPC6  $Ca^{2+}$ チャネルを介する  $Ca^{2+}$ 流入機構において中心的な役割を担っていることを明らかにしそのメカニズムを報告してきました。

今回私たちはこの受容体作動性  $Ca^{2+}$ 流入機構が生体内で担う機能的役割の一つとして神経伝達物質の遊離に着目し、PC12 細胞を用いてドパミン分泌への関与を調べました。その結果、スナピンを強発現した PC12 細胞では $\alpha_{1A}$  受容体の活性化により  $Ca^{2+}$ 流入が著しく増大すると共に、細胞外へのドパミン分泌が増大することが観察されました。さらにこのようなドパミン分泌量の増大は 1)  $\alpha_{1A}$  受容体刺激後の後期相で観察される受容体作動性  $Ca^{2+}$ 流入の増大に依存する成分と、2) 受容体刺激直後に観察されるスナピンと SNARE 複合体間の相互作用によると考えられる成分の2種類から成っていることが示唆されました。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アドレナリン受容体 スナピン, TRPC6  $Ca^{2+}$ チャネル, 受容体作動性 $Ca^{2+}$ 流入

## 1. 研究開始当初の背景

近年、Gタンパク共役型受容体には多様な相互作用分子が存在することが明らかになってきています。そして、このような相互作用分子による受容体機能の修飾は、生体内における受容体のシグナルを解析する上で必要不可欠であると認識されるようになって

きました。

私たちは、Gタンパク共役型受容体の一つである $\alpha_{1A}$  受容体が生体内で多様な機能的・薬理学的特性を示すことから、「生体内に $\alpha_{1A}$  受容体の相互作用分子が存在し、この受容体の機能を修飾しているのではないかと考えました。この仮説をもとに、イースト2

ハイブリッド法を用いてヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、その結果、 $\alpha_{1A}$  受容体の相互作用分子としてスナピンを同定しました。

スナピン -  $\alpha_{1A}$  受容体間の相互作用が受容体の機能的特性にどのような影響を及ぼすのかを調べるため、この受容体とスナピンを培養細胞に発現し、受容体の活性化により引き起こされるシグナルについて検討しました。その結果、スナピンは  $\alpha_{1A}$  受容体作動性の  $Ca^{2+}$  流入において重要な役割を担う分子であることを突き止めました。その機序は、1) スナピンは  $\alpha_{1A}$  受容体のみならず、受容体作動性  $Ca^{2+}$  チャネルの分子の実体であると現在考えられている TRPC6  $Ca^{2+}$  チャネルとも相互作用し、2)  $\alpha_{1A}$  受容体の活性化を受けて “ $\alpha_{1A}$  受容体-スナピン-TRPC6  $Ca^{2+}$  チャネル複合体” を形成し、3) 刺激前には細胞内小胞体上に主に存在している TRPC6  $Ca^{2+}$  チャネルの細胞膜上への移行を促進し、4) その結果このチャネルを介する  $Ca^{2+}$  流入が著しく増大かつ持続されるというものでした (論文⑨参照)。このように私たちはこれまで、 $\alpha_{1A}$  受容体作動性の  $Ca^{2+}$  流入増大機構において、スナピンが中心的役割を担う重要な介在分子であることを明らかにし報告してきました。

## 2. 研究の目的

細胞内の  $Ca^{2+}$  が、生体内・細胞内の多様な生理反応を担う重要なセカンドメッセンジャーであることはよく知られています。そこで私たちは、スナピンを介在分子とするこの  $\alpha_{1A}$  受容体作動性の  $Ca^{2+}$  流入増大機構が生体内で担う役割を明らかにしようと考えました。

論文⑨の中で私たちは、ラットの脳において “ $\alpha_{1A}$  受容体-スナピン-TRPC6  $Ca^{2+}$  チャネル複合体” が形成されていることを示しましたが、この結果は、 $\alpha_{1A}$  受容体作動性の  $Ca^{2+}$  流入増大機構が脳内で機能していることを示唆しています。また近年、 $\alpha_{1A}$  受容体の活性化が脳内で前シナプ斯的に神経伝達物質の遊離を制御しているという研究結果が複数報告されています。また一方で、スナピンは脂質二重膜の融合に重要な役割を担う SNARE 複合体の相互作用分子でもあり、神経伝達物質の遊離に関与することが報告されています。これらのことから、私たちは  $\alpha_{1A}$  受容体の活性化により引き起こされる神経伝達物質の遊離における、この  $Ca^{2+}$  流入増大機構の関与について検討しました。

## 3. 研究の方法

先述した目的のために、受容体の活性化による神経伝達物質の遊離を観察できるモデル細胞として PC12 細胞を採用し、 $\alpha_{1A}$  受容体、

スナピンおよび TRPC6  $Ca^{2+}$  チャネルの発現量の異なる cell line を構築し、この受容体の活性化による内在性ドパミンの分泌量の変化について検討しました。

(1)  $\alpha_{1A}$  受容体とスナピンを安定的に共発現した PC12 細胞を用いて、この受容体を刺激した時のドパミン分泌量を調べる。

(2)  $\alpha_{1A}$  受容体のシグナルに関与する様々な阻害薬をもちいて、ドパミン分泌の機序を検討する。

(3) スナピンをノックダウンした細胞を用いて、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化とドパミン分泌量における影響を調べる。

(4) TRPC6  $Ca^{2+}$  チャネルをノックダウンした細胞を用いて、(3) と同様の実験を行い、このチャネルを介する  $Ca^{2+}$  流入の影響を調べる。

## 4. 研究成果

(1) まず、 $\alpha_{1A}$  受容体とスナピンを安定的に共発現した PC12 細胞を用いて、 $\alpha_{1A}$  受容体を刺激した時のドパミン分泌量を調べました。その結果、スナピンの強発現細胞ではドパミンの分泌量が増大しているという結果を得ました。(図 1)。

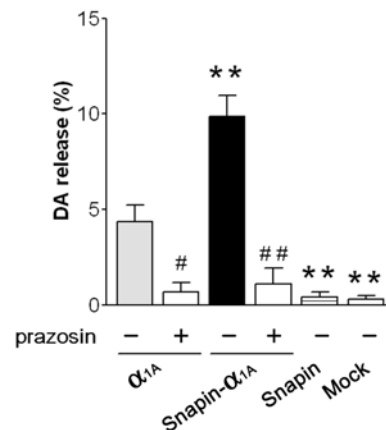


図 1  $\alpha_{1A}$  受容体刺激によるドパミンの分泌 (3 分間) とスナピン強発現の影響

[ prazosin は  $\alpha_1$  受容体特異的阻害薬  
 $\alpha_{1A}$ 、Snapin、Mock は細胞に導入した遺伝子 ]

(2) 次に、この  $\alpha_{1A}$  受容体刺激により引き起こされるドパミン分泌に関与しているシグナルを調べるため、様々な阻害薬を用いてその影響を検討しました。その結果、 $\alpha_{1A}$  受容体の活性化によるドパミン分泌は Gq タンパク、ホスホリパーゼ C (PLC)、細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルにより引き起こされていることが明らかになりました。また電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルやテトロドトキシンには非感受性でした (図 2)。この結果により、 $\alpha_{1A}$  受容体刺激によるドパミン分泌は、細胞膜の脱分極にはよらない別の経路により引き起こされていることが示唆されました。

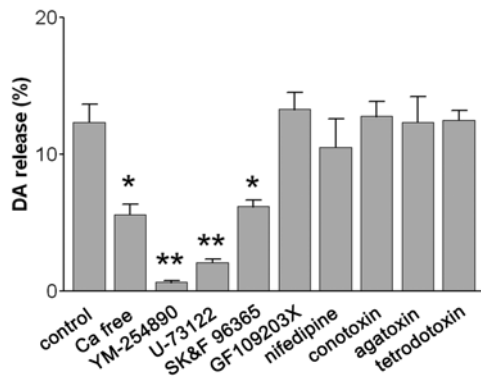


図2  $\alpha_{1A}$  受容体刺激によるドパミン分泌における様々な阻害薬の効果

YM-254890	Gq タンパク阻害薬
U-73122	PLC 阻害薬
SK&F 96365	ROC/SO 阻害薬
GF109203X	PKC 阻害薬
nifedipine	L-Ca <sup>2+</sup> チャネル阻害薬
ω-conotoxin GVIA	N-Ca <sup>2+</sup> チャネル阻害薬
ω-agatoxin TK	P/Q-Ca <sup>2+</sup> チャネル阻害薬
tetrodotoxin	Na <sup>2+</sup> チャネル阻害薬

(3) このようなドパミン分泌における $\alpha_{1A}$  受容体作動性のCa<sup>2+</sup>流入増大機構の重要性を調べるため、 $\alpha_{1A}$  受容体とスナピンを強発現しているPC12細胞に、内在性に発現しているTRPC6 Ca<sup>2+</sup>チャネルをsiRNA法により抑制し、 $\alpha_{1A}$  受容体刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化とドパミン分泌量を経時的に調べました。その結果、TRPC6 Ca<sup>2+</sup>チャネルノックダウン細胞では、 $\alpha_{1A}$  受容体刺激後の後期相(刺激後3-5分)において、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が抑制されると同時にドパミンの分泌も抑制されました。この結果は、受容体作動性Ca<sup>2+</sup>流入の増大がドパミン分泌を引き起こす(または持続する)ことに関与していることを示唆しています。

(4) さらに(3)と同様の手法を用いて、 $\alpha_{1A}$  受容体とスナピンを強発現しているPC12細胞において、スナピンの発現をsiRNA法により抑制し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度とドパミン分泌への影響を調べました。その結果、 $\alpha_{1A}$  受容体刺激後の後期相においては、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度とドパミン分泌のいずれも抑制されることが観察されました。この結果は(3)のTRPC6 Ca<sup>2+</sup>チャネルのノックダウン細胞で得られた結果とよく類似していました。

一方、TRPC6 Ca<sup>2+</sup>チャネルノックダウン細胞において観察された結果と異なっていたのは、スナピンをノックダウンした細胞においては受容体刺激直後(刺激後0-0.5分)に分泌されるドパミンの量が有意に低下していた点でした。この結果から、スナピンは脂質二重膜の融合に重要な役割を担うSNARE

複合体と相互作用することにより、ドパミン含有小胞体を細胞膜近傍に係留する足場タンパクとしての役割も担っているのではないかと考えています。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Muramatsu I., Suzuki F., Nishimune A., Anisuzzaman ASM., Yoshiki H., Su T.H., Chang C.K., Morishima S. Expression of distinct alpha-1 adrenoceptor phenotypes in pigmented and albino rabbit iris. Br. J. Pharmacol., in press. (査読有り)
- ② Anisuzzaman A.S.M., Morishima S., Suzuki F., Tanaka T., Yoshiki H., Muramatsu I. Identification of M1 muscarinic receptor subtype in rat stomach using a tissue segment binding method, and the effects of immobilization stress on the muscarinic receptors. Eur. J. Pharmacol. 599:146-151, 2008. (査読有り)
- ③ Muramatsu I., Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman A.S.M., Tanaka T., Rodrigo M.C., Myagmar B.E., Simpson P.C. Identification of alpha 1L-adrenoceptor in mice and its abolition by alpha 1A-adrenoceptor gene knockout. Br. J. Pharmacol. 155:1224-34, 2008. (査読有り)
- ④ Su T.H., Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman A.S.M., Tanaka T., Cheng J.T., Muramatsu I. Native profiles of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor phenotypes in rabbit prostate. Br. J. Pharmacol. 155:906-12, 2008. (査読有り)
- ⑤ Sathi Z.S., Anisuzzaman A.S.M., Morishima S., Suzuki F., Tanaka T., Yoshiki H., Muramatsu I. Different affinities of native  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors for ketanserin between intact tissue segments and membrane preparations. Eur. J. Pharmacol. 584:222-28, 2008. (査読有り)
- ⑥ Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman A.S.M., Sathi Z. S., Tanaka T., Muramatsu I. Identification of alpha-1L adrenoceptor in rat cerebral cortex and possible

relationship between alpha-1L and alpha-1A adrenoceptors. Br. J. Pharmacol. 153:1485-94, 2008. (査読有り)

- ⑦ Anisuzzaman A.S.M., Morishima S., Suzuki F., Tanaka T., Yoshiki H., Sathi Z.S., Akino H., Yokoyama O., Muramatsu I. Assessment of muscarinic receptor subtypes in human and rat lower urinary tract by tissue segment binding assay. J. Pharmacol. Sci. 106:271-279, 2008. (査読有り)
- ⑧ Horinouchi T., Morishima S., Tanaka T., Suzuki F., Tanaka Y., Koike K., Miwa S., Muramatsu I. Different changes of plasma membrane  $\beta$ -adrenoceptors in rat heart after chronic administration of propranolol, atenolol and bevantolol. Life Sci. 81:399-404, 2007. (査読有り)
- ⑨ Suzuki F., Morishima S., Tanaka T., Muramatsu I. Snapin, a new regulator of receptor signaling, augments  $\alpha$ 1A-adrenoceptor-operated calcium influx through TRPC6. J. Biol. Chem. 282:29563-29573, 2007. (査読有り)

[学会発表] (計5件)

- ① 鈴木史子,  $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体作動性  $Ca^{2+}$ 流入機構の分子メカニズム, 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月17日, 横浜市
- ② 鈴木史子, Snapin をアダプターとする受容体作動性  $Ca^{2+}$ 流入機構, H20年度生理研究研究会「TRP チャネルの機能的多様性とその統一的理解」, 2008年6月6日, 岡崎市
- ③ Fumiko Suzuki, Roles of Snapin in  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor-induced calcium influx through TRPC6 channels. 第81回日本薬理学会年会, 2008年3月18日, 横浜市
- ④ 森島 繁, Snapin を介する  $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体の受容体作動性  $Ca^{2+}$ 流入(ROC) 増強メカニズム, 第3回 TRP チャネル研究会(TRP channel conference), 2007年7月20日, 岡崎市
- ⑤ 鈴木史子,  $\alpha_{1A}$ -アドレナリン受容体-Snapin-TRPC6 間の相互作用による受容体作動性カルシウム流入の増大, 日本分子イメージング学会(第2回総会・学術集会), 2007年6月28日, 福井市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 史子 (SUZUKI FUMIKO)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 80291376

### (2) 研究分担者

村松 郁延 (MURAMATSU IKUNOBU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 10111965

森島 繁 (MORISHIMA SHIGERU)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50290911

田中 高志 (TANAKA TAKASHI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40313746

### (3) 連携研究者

なし