

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07117

研究課題名（和文）細胞内局在性ムスカリン受容体の生体における機能解析

研究課題名（英文）Functional roles of intracellular muscarinic acetylcholine receptors in vivo

研究代表者

宇和田 淳介（UWADA, Junsuke）

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：70580314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、元来細胞表面に局在してアセチルコリンを受容することで機能するムスカリン受容体のM1サブタイプが、細胞の内部にも局在して機能するという知見に基づき、その機能解析を目的として進められた。研究の成果として、細胞内部でムスカリンM1受容体が活性化する様子を可視化する新しいツールを開発するとともに、細胞内へアセチルコリンを輸送しうるトランスポーター候補と複数同定した。このトランスポーター候補により細胞内でM1受容体が活性化することも示された。この成果により生体における細胞内ムスカリンM1受容体の活性化と、細胞内へアセチルコリンを取り込む新しいコリン伝達系を証明する新しい道筋が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アセチルコリンの受容体であるムスカリンM1受容体は、認知機能に深くかかわり、アルツハイマー病などの治療ターゲットの一つとしても知られる。しかし、このM1受容体が細胞の細部でも機能しうることはまだ一般的に知られておらず、その役割も明らかではない。本研究の成果として細胞内でムスカリンM1受容体が活性化されることを直接的に示す新しいツールを開発した。また、アセチルコリンを細胞内へ輸送するトランスポーター候補も同定した。トランスポーターは細胞内M1受容体の活性化を制御する新しい創薬ターゲットとなりうるものであり、認知症などの病態との関わりについても興味深い対象として今後更に研究の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：M1 muscarinic acetylcholine receptors localize not only cell surface but also intracellular compartments. In this research, we aimed to analyse functional roles of intracellular M1 receptors. As a result, we developed a new tool to visualize activation of intracellular localized M1 receptor. In addition, we found several candidate transporters which could transport acetylcholine into the cells. Co-expression of the candidate transporter led to activate intracellular M1 receptor by extracellular acetylcholine. Our results will contribute to demonstrate the intracellular cholinergic transmission in vivo.

研究分野：分子薬理学

キーワード：ムスカリン受容体 アセチルコリン トランスポーター 細胞内受容体

1. 研究開始当初の背景

アセチルコリン (ACh) の受容体である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のムスカリン受容体は、細胞の表面に局在して細胞外からのアセチルコリンを受け取ることで活性化し、細胞内で様々なシグナルを惹起する。しかし近年は、カンナビノイド受容体やオピオイド受容体などいくつかの GPCR において細胞表面だけでなく、細胞の内部にも局在して機能しうることが示されてきている (Hebert-Chatelain et al, *Nature*, 2016; Stoeber et al., *Neuron*, 2018)。我々もこれまでに ACh をリガンドとするムスカリン M1 受容体が細胞の内部、特にゴルジ体に局在し、リガンド刺激に応じた活性化を受けることを示してきた (Uwada et al., *J Neurochem*, 2011; Anissuzaman et al., *J Neurochem*, 2013)。また、コリンエステラーゼ阻害剤による ACh 量の増加で、ACh 取り込み量の増加に伴った細胞内ムスカリン M1 受容体を介する応答が亢進することを報告している (Masuoka et al., *Neuroscience*, 2019)。しかし、実際の生体においてこの細胞内 M1 受容体がどのような役割を果たすのかについてはまだ明らかではない。

これまでの細胞内 GPCR の研究では、リガンドの膜透過性の違いを利用した細胞表面や細胞内 GPCR への特異的な刺激や、単離した細胞小器官に対するリガンド刺激による解析が行われてきた。我々も、細胞膜非透過のペプチド性ブロッカーを利用して細胞内 M1 受容体の機能解析を進め、細胞表面と細胞内の M1 受容体が異なる機能を有することを明らかにしている。しかし、これらの方法は直接細胞内で GPCR が活性化されたことを示すものではなく、より直接的かつリアルタイムに細胞内で GPCR が活性化されることを証明するツールが求められていた。また、水溶性で細胞透過性のない ACh が細胞内の M1 受容体に作用するためには、何らかのトランスポーターによって細胞内へ輸送される必要がある。しかし、その実態は明らかではなく、生体レベルで細胞内 M1 受容体活性化を実証するうえでの障壁となっていた。

2. 研究の目的

本研究の主な目的の一つは、細胞内局在性の低下したムスカリン M1 受容体の変異マウスを作成することによって生体レベルでの細胞内 M1 受容体の役割を解析することであったが、所属機関などの環境の変化のため方向性を変更し、*in vitro* で細胞内 M1 受容体の活性化を証明する研究を主軸として進めた。実際には、細胞内で M1 受容体が活性化する様子を可視化することで直接的に検出する新しいツールを作成し、その検証を行った。また、細胞内 M1 受容体が生体におけるリガンドとしての ACh によって活性化されるために必須となる、トランスポーターを同定するためのスクリーニングを行った。これにより、本来細胞透過性がなく、コリンエステラーゼによって分解されるのみと考えられてきた ACh が、細胞膜を通過して細胞内でムスカリン M1 受容体を活性化するという、従来の定説とは全く異なるコリン伝達経路を証明するための道筋を得ることを目指した。

3. 研究の方法

細胞内 M1 受容体が活性化される様子を可視化するため、M1 受容体の 3 番目細胞内ループを循環置換 GFP (circular permutation GFP: cpGFP) に置き換えた。この M1-cpGFP を発現するプラスミドを培養細胞に導入し、共焦点顕微鏡下で観察しながら ACh を添加し、蛍光強度の変化をモニタリングすることにより、細胞の表面と細胞の内部の M1 受容体それぞれの活性化を個別に検出した。

ACh を細胞内へ取り込むためのトランスポーターを同定するため、放射性ラベルした ACh の取り込み実験によるトランスポーターの探索を行った。対象となるトランスポーターは、脳での発現の有無と既知の輸送基質の性質を勘案しピックアップしており、その遺伝子を ACh の取り込み活性のない培養細胞へ導入しトランスポーター活性の有無を検討した。

4. 研究成果

作成した M1-cpGFP 遺伝子を培養細胞で発現させて局在を確認したところ、細胞の表面だけでなく、細胞の内部にも局在することが確認された (図 1-A)。細胞内の局在を、細胞内小器官のマーカーと比較したところ、ゴルジ体に局在していることが分かった。我々の以前の研究で神経系の培養細胞において M1 受容体はゴルジ体に局在することが分かっており、今回作成した M1-cpGFP の局在は、本来の M1 受容体の局在と一致するものであることが示された。リアルタイムで M1-cpGFP の蛍光を観察しながら、ACh を添加したところ、細胞表面の M1-cpGFP において有意な蛍光強度の増強が見られたものの、細胞内に局在する M1-cpGFP では変化が見られなかった (図 1-B)。このことから、M1-cpGFP が実際に ACh に応答して蛍光強度の変化を示すことが確認されたものの、細胞内の M1-cpGFP が ACh によって活性化されるためには、何らかの補助的な因子が必要となることが分かった。

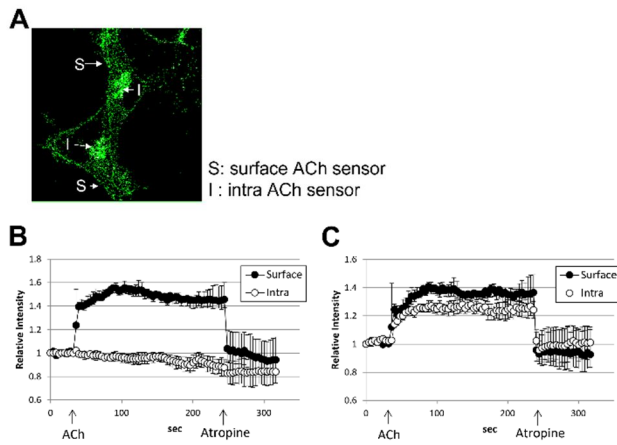


図 1: (A) M1-cpGFP の細胞局在性 (B)(C) M1-cpGFP のみ(B)、M1-cpGFP とトランスporter-X (C) を発現させた培養細胞における ACh 応答。

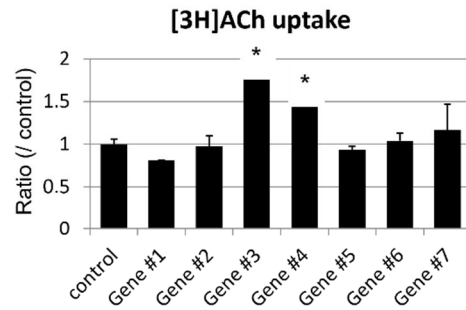


図 2: 培養細胞に各種トランスporter 遺伝子を導入し、コリンエステラーゼ阻害剤存在下で [3H]ACh の取り込み量を測定した。

放射性ラベルされた ACh を用いて、ACh 取り込み活性のあるトランスporter のスクリーニングを進めた結果、いくつかの ACh トランスporter 候補が見つかった (図 2)。特に取り込み活性の高かったトランスporter-X (仮称) について、細胞内局在性を免疫染色により調べたところ、このトランスporter は細胞表面だけでなく、細胞内にも局在し、特にゴルジ体において細胞内 M1 受容体と共局在することが分かった。ゴルジ体に局在する M1 受容体は、ゴルジ体の内腔側に ACh 受容の面を向けている。そのため、細胞内 M1 受容体が活性化されるためには、細胞表面だけでなく、ゴルジ体膜についても ACh は通過しなければならない。トランスporter のゴルジ体への局在は、このゴルジ体膜の ACh 通過をも可能としうることを示す知見として重要である。

前述の M1-cpGFP と、同定された ACh トランスporter 候補 X を共発現させたところ、細胞表面だけでなく、細胞内の M1-cpGFP についても、ACh に応答した蛍光強度の増強が観察された (図 1-C)。このことは、トランスporter-X を介して ACh が細胞膜、およびゴルジ体膜を通過することで、M1-cpGFP を活性化していることを示していると予想される。更に、細胞表面の M1-cpGFP を細胞膜透過性のないペプチド性のブロッカーで阻害したところ、ACh 刺激によって細胞内部の M1-cpGFP のみが活性化される様子も確認された。

以上のように、細胞の内部でムスカリン M1 受容体が活性化される様子をリアルタイムに検出する新しいツールが開発された。更に ACh を細胞内へ輸送する ACh トランスporter 候補を複数同定した。これらの成果を生体レベルの系へ適用することにより、ACh が細胞膜表面だけでなく細胞内へ輸送され、細胞内ムスカリン M1 受容体を活性化するという、従来の定説とは異なる「細胞内コリン伝達系」の実証が可能になると思われる。また、得られた ACh トランスporter 候補が実際に生体内で ACh の細胞膜輸送に機能しているかを明らかにすることで、細胞内ムスカリン M1 受容体の活性を生体レベルで制御する薬理学的な標的として、M1 受容体が特に働いている認知機能の改善など、新しい創薬に繋がる成果が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uwada Junsuke, Nakazawa Hitomi, Mikami Daisuke, Islam Mohammad Sayful, Muramatsu Ikunobu, Taniguchi Takanobu, Yazawa Takashi	4. 巻 182
2. 論文標題 PNU-120596, a positive allosteric modulator of 7 nicotinic acetylcholine receptor, directly inhibits p38 MAPK	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114297 ~ 114297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2020.114297	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 Uwada Junsuke, Yazawa Takashi, Nakazawa Hitomi, Mikami Daisuke, Krug Susanne M., Fromm Michael, Sada Kiyonao, Muramatsu Ikunobu, Taniguchi Takanobu	4. 巻 63
2. 論文標題 Store-operated calcium entry (SOCE) contributes to phosphorylation of p38 MAPK and suppression of TNF- signalling in the intestinal epithelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109358 ~ 109358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2019.109358	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
1. 著者名 Muramatsu Ikunobu, Uwada Junsuke, Chihara Kazuyasu, Sada Kiyonao, Wang Mao Hsien, Yazawa Takashi, Taniguchi Takanobu, Ishibashi Takaharu, Masuoka Takayoshi	4. 巻 160
2. 論文標題 Evaluation of radiolabeled acetylcholine synthesis and release in rat striatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 342 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15556	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 Uwada Junsuke, Mukai Shoichiro, Terada Naoki, Nakazawa Hitomi, Islam Mohammad Sayful, Nagai Takahiro, Fujii Masato, Yamasaki Koji, Taniguchi Takanobu, Kamoto Toshiyuki, Yazawa Takashi	4. 巻 278
2. 論文標題 Pleiotropic effects of probenecid on three-dimensional cultures of prostate cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 119554 ~ 119554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2021.119554	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇和田淳介
2. 発表標題 p38 MAPK is directly inhibited by PNU-120596, a positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	矢澤 隆志 (YAZAWA Takashi) (00334813)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	
研究分担者	加藤 剛志 (KATOH Tuyoshi) (60194833)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	
研究分担者	谷口 隆信 (TANIGUCHI Takanobu) (60217130)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	
研究分担者	益岡 尚由 (MASUOKA Takayoshi) (80509307)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

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
---------	---------