

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790860  
 研究課題名（和文） 抑制性三量体 G タンパク質に結合する GRIN1 遺伝子の  
 脳神経系における機能解析  
 研究課題名（英文） Functional analysis of GRIN family in the central nervous system  
 研究代表者  
 本谷 安正 (MOTOTANI YASUMASA)  
 鶴見大学・歯学部・助教  
 研究者番号：60421830

研究成果の概要（和文）：本研究では脳神経系の三量体Gタンパク質の機能を解明するために抑制系  $G\alpha i/o$  サブユニットに特異的結合する GRIN ファミリー遺伝子に焦点を当て研究を遂行した。GRIN1 についてはコンディショナルノックアウト(KO)マウス、過剰発現系マウスの作製および哺乳動物由来細胞における遺伝子ノックダウン細胞株の樹立を終了し、GRIN3 については simple KO マウスの作製に成功した。GRIN1 の発現抑制実験により、GABAB2 受容体の著しい発現低下とカンナビノイド CB1 受容体アゴニスト刺激による細胞内シグナルの活性化が起こらないことを見出した。また、GRIN3 KO マウスの解析から線条体におけるドーパミン D1 および D2 受容体の発現低下を明らかとした。これらの知見から、GRIN ファミリーは特に神経系 GPCR の機能発現に重要な役割を担うことを示唆しており、今後の GRIN ファミリー研究の方向性が確立できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：We have studied about the roles of GRIN family , which binds to  $G\alpha i/o$  subunits, in the brain. In this study, we were able to generate both conditional GRIN1 KO mice and simple GRIN3 KO mice. Also, GRIN1 knockdown by lentivirus based RNAi system was successful. GRIN1 knockdown in retinoic acids induced neuronal P19 cells caused the reduction of GABAB2 receptor without the affect of  $G\alpha o$  expression. Furthermore, stimulation of cannabinoid receptor 1 (CB1) agonist could not activate the ERK pathway in these cells. On the other hand, ablation of GRIN3 in mice led to the decrease of both dopamine D1 and D2 receptors. These observations indicate that GRIN family plays the roles for GPCR function, such as stability and turn over in the cell membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学

### 1. 研究開始当初の背景

三量体 G タンパク質は創薬のターゲットである 7 回膜貫通受容体 (GPCR) により活性化され、生体恒常性維持に関わる主要な生体システムの一つである。しかしながら、三量体 G タンパク質の活性制御メカニズムに関わる分子は多数同定されているものの生体における役割は不明な点が多い。我々は三量体 G タンパク質のサブファミリーである抑制性 Gi/o サブユニットに結合する GRIN ファミリーを独自に単離同定しており、脊椎動物特異的であること、および脳神経系に多く発現していることを明らかにしている。すなわち、GRIN ファミリーの機能解析を遂行することで、高次動物の中枢神経系における GPCR-三量体 G タンパク質システムの新たな役割の解明が期待される。

### 2. 研究の目的

GRIN 遺伝子は 3 つのファミリー分子から構成されるが、脊椎動物特異的であるため、線虫やショウジョバエを研究対象とすることは不可能である。本研究では GRIN1 および GRIN3 の遺伝子操作マウスの作製を行う。特に GRIN1 については脳神経系において広範な異常が予想されることから、時期・空間特異的に遺伝子制御が可能なコンディショナル KO マウスを作製する。また、RNAi 法を用いた遺伝子ノックダウンを行い GRIN の機能解析を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) GRIN1 の機能解析

GRIN1 の内在性プロモーターを用いて GFP および GRIN1 を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスの作製を行う。また GRIN1 のコンディショナル KO マウスを作製し、CAG-Cre マウスと交配することで Simple KO マウスの作製も併せて行う。

P19 マウス細胞株をレンチノイン酸処理し、神経細胞に誘導し、GRIN1 の発現誘導が起こるか確認する。また P19 細胞株にレンチウイルス RNAi を感染させ、GRIN1 発現を抑制した細胞株を樹立する。

#### (2) GRIN3 の機能解析

GRIN3 の翻訳領域を LacZ 遺伝子に置換した KO マウスの作製を行う。GRIN3 は主に線条体に発現しているため、ドーパミン受容体の発現量の変化を解析する。また GRIN3 を特異的に認識する抗体を作製する。

### 4. 研究成果

#### (1) GRIN 遺伝子操作動物の作製



図1 マウスGRIN1のゲノム構造および導入遺伝子のコンストラクション

図1に示したとおり、内在性 GRIN1 プロモーター (15kb-18kb) 下に EGFP あるいは flag タグを付加した GRIN1 遺伝子を導入し、これらをマウス受精卵に microinjection し Tg マウスを作製した。最終的に EGFP を発現する Tg マウスは 3 系統、flag-GRIN1 を発現する Tg マウスは 2 系統樹立できた。これらのマウスは図2に示したように脳特異的発現し、特に大脳皮質・海馬で強い発現様式を示し、これらは野生型 GRIN1 のそれと一致していた。

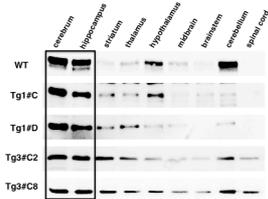


図2 最上段panelは内在性GRIN1の脳内部位のウェスタンブロット解析。2及び3段目panelはflag-GRIN1を発現する2系統のマウスラインをflag抗体で染色。下段2段目はGRIN1 promoter制御下にGFPを発現するマウスラインをGFP抗体で染色。

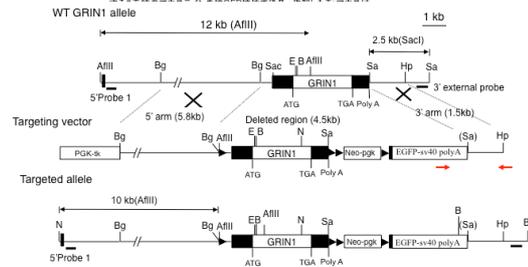


図3 コンディショナルGRIN1マウス作製のためのターゲティングベクターの構造

コンディショナル GRIN1 KO マウス作製に用いたターゲティングベクターの構造は図3に示したとおりでイントロン1および3' UTRのすぐ後ろに loxP 配列を、その直下に組換え ES 細胞の選別に用いた neo 耐性遺伝子 (frt 配列で挟まれている) およびスプライシングアクセプター配列をもつ EGFP 配列を導入している。これらの組換え ES 細胞をマウス胚盤胞にプラストインジェクションしキメラマウスを作製した。キメラマウスから F1 マウスを作製しジャームライ

ン伝達されたコンディショナル GRIN1 KO マウスの作製に成功した。現在、CAG-Cre マウスおよび CAG-Flpe Tg マウスと交配し、GRIN1 翻訳領域を破壊したヘテロ個体および Frt 配列を除去したマウスを得ることができた。少なくとも Frt 配列を除去することによる EGFP のリーク発現は認められていない。

## (2) GRIN1 の機能解析

P19 細胞に GRIN1 に対する RNAi を発現するレンチウイルスを感染させ、blasticidin による薬剤選択を行った。これらの細胞株をレンチノイン酸で処理し、神経細胞に誘導後 GRIN1 遺伝子発現の抑制が起こるか解析した (誘導前の P19 細胞には GRIN1 や  $G\alpha o$  は発現していなかった。)。その結果、図 4 に示したとおり、GRIN1 の大幅な発現抑制が認められたが、 $G\alpha o$  サブユニットの発現に差はなかった。このことは GRIN1 は  $G\alpha o$  の発現量調節には必須ではないことを意味している。また、Neuro2a 細胞株に対する RNAi 実験も併せて行ったが、RNAi 発現前に既に GRIN1 が発現しているためか、タンパクレベルでの抑制効果を得ることはできなかった。これらの事実から GRIN1 は胎生期マウス脳においては分化神経細胞に発現していることから、未分化神経細胞層に先に RNAi を導入することで効率的なノックダウン効果が期待され、脳形成における GRIN1 の迅速な機能解析が可能となるかもしれない。

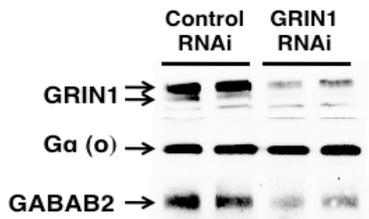


図4 GRIN1 RNAi感染細胞において GRIN1 の顕著な発現抑制が認められるが  $G\alpha o$  の発現には差は認められない。また、GABAB2 の発現量が GRIN1 RNAi 感染細胞で大きく減少している。

次に、 $G_i/o$  共役型 GPCR の一つであるカンナビノイド受容体 (CB1) のアゴニストを添加し、下流シグナルの一つである ERK の活性化状態をリン酸化抗体 (pERK) を用いて解析したところ、コントロールでは pERK の活性化が経時的に観察されたが、GRIN1 ノックダウン細胞では活性化が認められなかった。抗体の関係で CB1 受容体の発現量を解析できなかったが、最近 GABAB2 受容体 ( $G_i/o$  共役型) の発現量が GRIN1 ノックダウン細胞で著しく減少していることを見出した (図 4)。

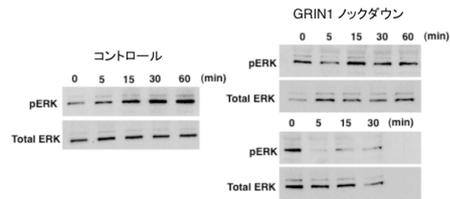


図5 神経分化誘導P19細胞におけるカンナビノイド受容体(CB1)アゴニスト刺激によるリン酸化ERK(pERK)発現量の経時変化

特にアゴニスト刺激のない basal condition 下での GABAB2 受容体の減少およびカンナビノイドアゴニスト刺激による下流シグナルの活性化が起こらない事実は GRIN1 は  $G\alpha i/o$  のエフェクターや調節因子ではなく、上流の GPCR と  $G\alpha i/o$  間の結合アフィニティや安定性に関与している可能性が考えられる。

## (3) GRIN3 の遺伝子操作動物の作製

GRIN3 KO マウスの作製に用いたターゲティングベクターの構造は図 6 のとおりである。

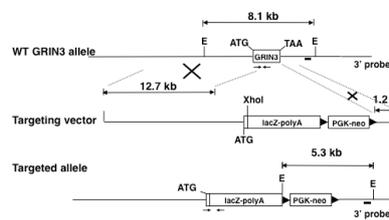


図6 GRIN3 KOマウス作製のためのターゲティングベクター構造

GRIN3 翻訳領域は GRIN1 と同様に single エキソンに含まれるため、その大部分を LacZ 遺伝子に置換した。またターゲティングベクターの 5' 側長腕は当初 7 kb としていたが組換え ES 細胞の得られる率が極端に低かったため、12.7 kb まで伸ばし、代わりに 5' 側の外側プローブを用いたサザンブロット解析を行わないこととした。このベクターを用いて GRIN1 コンディショナル KO マウスと同様の手法により GRIN3 KO マウスを作製した。また、GRIN3 の遺伝子破壊の有無を確認するため、GRIN3 のペプチド抗体を 5 種類 (ウサギ 10 匹分) 作製し、内在性 GRIN3 を認識する抗体が 1 種類得られ、ペプチドカラムによるアフィニティ精製を行った。

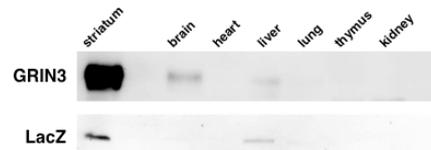


図7 GRIN3 の発現様式およびKOマウスにおけるlacZの発現

図 7 に示したとおり、成体マウス組織において GRIN3 は脳および肝臓で発現が認められる。特に脳の線条体において (図 7 の一番左のレーン)、特異的に強い発現が認められる。LacZ 抗体を用いた解析においても同様の発現様式が確認できた (図 7)。次に、GRIN3 のヘテロおよびホモ個体の線条体における GRIN3 発

現を解析したところ、ヘテロ個体において GRIN3 の減少が、ホモ個体では完全に欠損していることが確認できた (図 8)

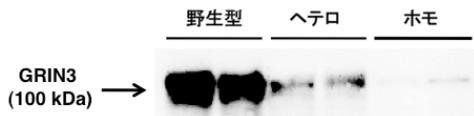


図8 GRIN3 KOマウスの線条体におけるウェスタンブロット解析

さらに、ヘテロ個体の脳における発現を LacZ 染色で解析したところ、線条体で顕著に強く大脳皮質の第 5 層および海馬でも発現していた (図 9)。投射先 (淡蒼球) の LacZ 染色像より GRIN3 は線条体の直接路 (ドーパミン受容体 D1 陽性細胞) および間接路 (D2 受容体陽性細胞) の両方で発現していることが明らかとなった。

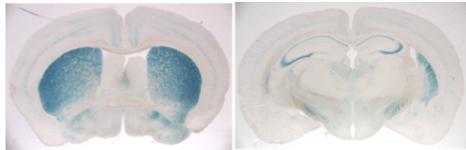


図9 成体期GRIN3ヘテロ個体の脳におけるLacZ染色

次に、線条体はドーパミンの主要なターゲット部位の一つであるため、ドーパミン受容体の発現量を調べたところ、D2 受容体 (Gi/o 共役型) の発現量が半分強、D1 受容体 (Gs 共役型) の発現量は予想外に 70% 程度減少していた (図 10)。一方、腹側線条体に発現している D3 受容体 (Gi/o 共役型) の発現量に変化は認められなかった (図 10)。予備的試験ながら、線条体で強く発現しているアデノシン A2a 受容体 (Gs 共役型) およびムスカリン M4 受容体 (Gi/o 共役型) の発現量に変化は認められなかった。

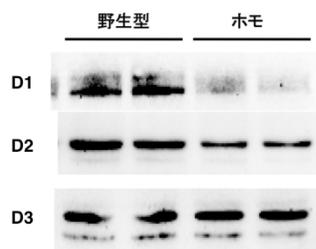


図10 GRIN3 KOマウス線条体におけるドーパミン受容体のウェスタンブロット解析

このように、GRIN3 のターゲットは明らかにドーパミン D1 および D2 受容体であり、GRIN1 ノックダウン P19 細胞株における GABAB2 受容体の減少と併せて考えると、GRIN ファミリーは GPCR の細胞膜での安定性あるいは turn over 等に関与しているのかもしれない。これまで、GRIN ファミリーは Gi/o サブユニットの GDP-GTP サイクルを調節しているのではないかと考え、海馬初代培養細胞を用いた電気

生理学的解析を行ってきたが、ポジティブな結果が得られなかった。本研究の成果により今後は GPCR に焦点を当てて GRIN の機能解析を行うことができる。当面は GRIN3 KO マウスの線条体神経細胞の初代培養においてドーパミン D1・D2 受容体の発現量が減少しているか確認し、GRIN3 の様々な deletion mutant を強制発現させることで機能ドメインの同定に努めていきたい。また脳における発現様式から明らかに脳において中心的働きを担うのは GRIN1 である。コンディショナルおよび Simple KO マウスの作製に成功したことから GRIN1 についても今後の機能解析の進展が期待される。

## 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 1 件)

① Ikuo Masuho\*, Yasumasa Mototani\*, Yoshinori Sahara, Junko Asami, Shun Nakamura, Tohru Kozasa, and Takayoshi Inoue (\* : equal to contribution)

Dynamic expression patterns of G protein regulated neuroite outgrowth1 (GRIN1) and its colocalization with Gao implicate roles of Gao-GRIN1 signaling pathway in neuronal cell migration, differentiation and wiring. *Developmental Dynamics*, 2008, Sep; 237(9):2415-29, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 本谷安正

Identification of cell-types expressing G protein-regulated induced neurite outgrowth 1 (GRIN1) in the developing and adult mice.

第 31 回 日本神経科学大会、2008 年 7 月 9-11 日、東京国際フォーラム

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

本谷 安正 (MOTOTANI YASUMASA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号 : 60421830

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

岡村 匡史 (OKAMURA TADASHI)

国立国際医療研究センター研究所・

ヒト型動物開発研究質・室長

研究者番号 : 00333790