

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07765

研究課題名(和文) GPCRとアミロイド 前駆タンパク質の巨大複合体形成による神経機能の制御

研究課題名(英文) GPCR-Amyloid precursor protein supercomplex regulate neural function

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞内で三量体Gタンパク質と共役する細胞膜受容体である。一般的にGPCRは細胞膜上で単量体で存在し、受容体として機能すると考えられている。これまでに我々はGPCRである1型代謝型グルタミン酸受容体とB型 アミノ酪酸受容体が複合体を形成し相互作用する可能性を明らかにした。本研究では、これらのGPCR複合体とアミロイド 前駆タンパク質(APP)との複合体形成について評価したが、細胞株を用いた再構成系では再現されなかった。一方、我々はげっ歯類脳の器官培養法を改良することで、アミロイド 産生の経時的な解析プラットフォームを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老年期認知症の主原因であるアルツハイマー病(AD)は、加齢とともに発症率が増加することから、超高齢化社会において社会的負担は増加していくことが予想される。ADの原因の1つであるアミロイド 産生を制御するメカニズムを明らかにすることは学術的、社会的に意義のあるものである。本研究で樹立した細胞株ではAPPとGPCR複合体の相互作用は確認されなかった。この結果は、神経細胞特異的な相互作用機構がある可能性を示している。一方、脳器官培養法を改良し、アミロイド 産生を長期間連続的に解析できる研究プラットフォームを確立することができた。この結果は、AD治療薬開発に資するものである。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors (GPCRs) are plasma membrane receptors whose intracellular domains are coupled to trimeric G proteins. Generally, GPCRs are thought to perform as receptors in monomeric form. We have previously shown that type 1 metabotropic glutamate receptors and type B gamma-aminobutyric acid receptors may form a complex and interact with each other. In this study, we evaluated the complex formation between these complexes and amyloid beta (A ) precursor protein (APP), which was not reproduced in a reconstituted system using cell lines. On the other hand, we have established an analysis platform for A production by improving the organ culture method of rodent brain.

研究分野：神経科学

キーワード：GPCR アルツハイマー病 アミロイド 代謝型グルタミン酸受容体 GABA受容体 シナプス可塑性 老人斑 器官培養

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上には多種多様な膜タンパク質が集積し、様々な機能を果たしている。膜タンパク質の多くは細胞内外の物質や情報のやり取りに関わっており、複数の膜タンパク質が複合体を形成して1つの機能分子を形成することも多い。一方、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は単量体で細胞膜受容体として働き、細胞内で共役する三量体Gタンパク質を介したシグナル伝達を行っているという考えに基づいて研究が進められてきた。近年の膜タンパク質の構造と機能に関する解析技術の進歩に伴い、GPCRは細胞内で三量体Gタンパク質と複合体を形成する一方で、他のGPCRなどの膜タンパク質と相互作用することが明らかになりつつある。

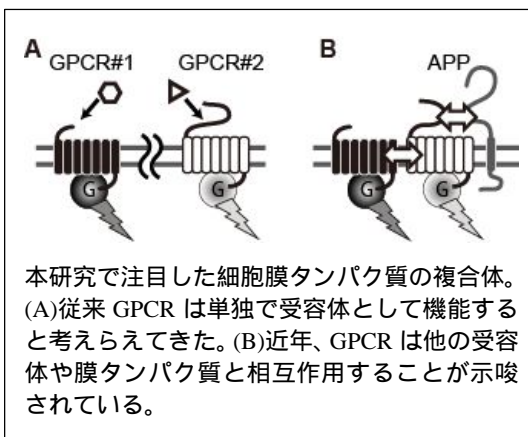
報告者らはこれまでに神経伝達を調節するGPCRである代謝型グルタミン酸受容体(metabotropic glutamate receptor; mGluR)とB型 $\gamma$ アミノ酪酸受容体(GABA<sub>B</sub>受容体)が注目し研究を進めてきた。mGluRは、同種のGPCR分子同士が二量体(ホモダイマー)を形成して受容体として機能し、GABA<sub>B</sub>受容体は2種GPCR分子がサブユニットとして二量体(ヘテロダイマー)を形成して機能することが知られており、報告者らはさらにこれらが四量体以上の複合体を形成している可能性を明らかにしてきた。さらにこれらGPCR複合体がアルツハイマー病(AD)の原因物質の一つであるアミロイドベータ(A $\beta$ )の前駆タンパク質(APP)と相互作用し、より大きな複合体を形成する可能性が示唆されている。しかしながら、これらの膜タンパク質の相互作用がA $\beta$ 産生やGPCRヘテロ複合体の機能に影響しADの発症や関連する病態に関わっているか否かについては明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

報告者らの研究結果や他の研究グループの結果から、GPCRヘテロ複合体のような膜タンパク質同士の複合体がさらに別の膜タンパク質とより高次の巨大複合体を形成し、シグナル伝達などの様々な細胞機能に関わっていることが示唆されている。このような膜タンパク質の巨大な複合体の分子メカニズムを解明することは生物学の発展と新奇創薬ターゲットの発見に寄与すると考えられる。しかしながら、膜タンパク質の巨大複合体の構成要素は複雑かつ流動的であるため、実態を把握することは非常に困難であり、ほとんど解明されていない。

本研究ではmGluRやGABA<sub>B</sub>受容体などのGPCRとAPPが形成する巨大複合体のダイナミクスと形成メカニズムの解明を目指す。GABA<sub>B</sub>受容体の活性化はシナプス伝達の抑制に関わっており、mGluRの活性化は記憶・学習の細胞レベルでの基礎過程であるシナプス可塑性に関わっていることから、これらの複合体形成と機能的な相互作用は、記憶・学習を制御している可能性がある。これらの相互作用による神経機能の制御機構の解明を目指して本研究を実施した。

一方、APPは細胞膜上で2種類の膜型プロテアーゼ( $\beta$ および $\gamma$ セクレターゼ)による2段階の切断によってA $\beta$ を産生する。A $\beta$ は $\gamma$ 切断部位の違いにより40アミノ酸残基からなるA $\beta$ 40と42アミノ酸残基からなるA $\beta$ 42などが知られている。A $\beta$ 42は強い凝集性があり、オリゴマーは細胞毒性やシナプス毒性を示すことが明らかにされている。そこで、APPやA $\beta$ などのAPP切断産



物と GPCR 複合体の相互作用が、このような細胞障害性に関わっている可能性を検証する。A $\beta$  はさらに凝集し脳内に沈着することで、アルツハイマー病の代表的な病理である老人斑となる。そのため、上記の相互作用が AD の発症や関連病態の解明につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

これまでに多くの先行研究において、GPCR 同士の複合体や GPCR と他の膜タンパク質の複合体形成や機能的な相互作用が報告されているが、不十分な解析で疑問視される結果も多い。その多くの研究が細胞株に一過的に過剰発現させた GPCR による評価であることから、非生理的な作用である可能性が示唆されている。そこで報告者は標的分子をテトラサイクリン誘導性に目的分子を発現する細胞株を作製し、複合体形成と機能的な相互作用について解析を行った。

GPCR の機能を評価するためには、細胞内のシグナル伝達をリアルタイムでモニターする必要がある。そこで、三量体 G タンパク質を介した GPCR のシグナル伝達の評価方法の確立を目指した。三量体 G タンパク質は GTP アーゼ活性を持つ  $\alpha$  サブユニットと、 $\beta\gamma$  複合体の 3 つのサブユニットからなり、 $\alpha$  サブユニットの種類によって  $G_s$ 、 $G_i$ 、 $G_q$  などに分類される。 $G_s$  タンパク質はアデニル酸シクラーゼを活性化し、 $G_i$  タンパク質はアデニル酸シクラーゼを抑制することで細胞内の環状 AMP(cAMP)シグナルの調節を行う。 $G_q$  タンパク質は、ホスホリパーゼ C を活性化することでジアシルグリセロールと細胞内カルシウムシグナルを惹起する。報告者らはウイルスベクターによる遺伝子発現方法を改良し、細胞内カルシウムシグナルと cAMP シグナルをライブセル・イメージングにて評価できる測定系を確立し、mGluR と GABA<sub>B</sub> 受容体のシグナル伝達について評価を実施した。

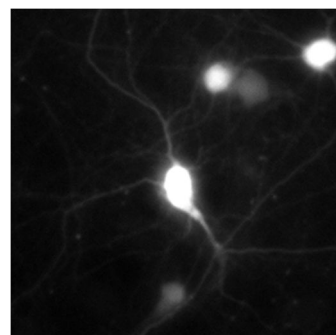
GPCR との複合体形成や機能的な相互作用によって APP の切断がどのような制御を受けるかについて評価するために、APP 切断産物である A $\beta$  の分泌を評価するための解析モデルの確立を試みた。生体内に近い環境で効率的に A $\beta$  の産生を評価するために、脳内の環境と神経回路をある程度保持し生体外で長期の維持が可能な脳器官培養の 1 種であるスライス培養法を改良した。

### 4. 研究成果

(1) GABA<sub>B</sub> 受容体は、GABA<sub>B</sub>R1 と GABA<sub>B</sub>R2 の 2 つの GPCR が 2 量体と形成することで機能する。GABA<sub>B</sub>R1 は GABA などのリガンドと結合し、GABA<sub>B</sub>R2 は細胞内で三量体 G タンパク質と共役する。報告者は、GABA<sub>B</sub> 受容体の両サブユニットを安定発現する細胞株を作製し、さらに樹立した細胞を用いて、 $G_q/G_{11}$  共役型の mGluR である 1 型 mGluR(mGluR1)と 5 型 mGluR(mGluR5)をそれぞれテトラサイクリン誘導性に発現する細胞を作製した。

(2) APP の切断産物である sAPP が GABA<sub>B</sub>R1 の細胞外ドメインの一部である Sushi ドメインと相互作用し、シナプス機能を制御している可能性が示唆されている。報告者らは、作製した GPCR 複合体安定発現細胞株を用いて相互作用の評価を行ったところ、上記の相互作用は確認されなかった。

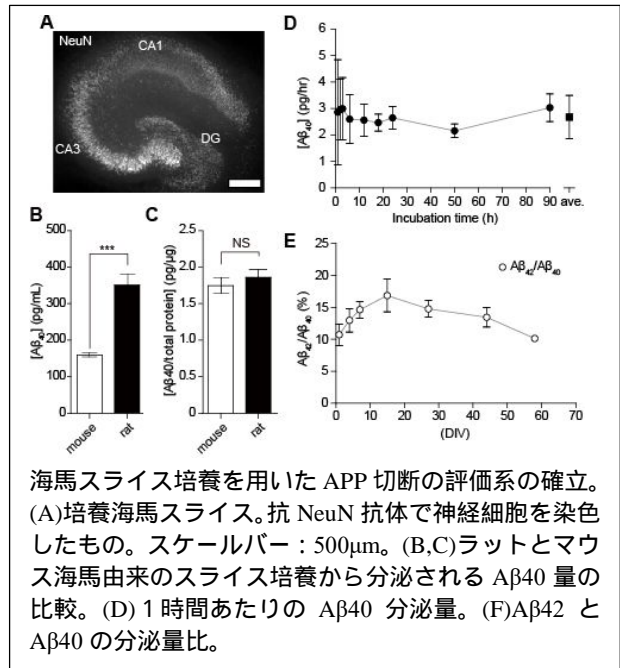
GABA<sub>B</sub> 受容体は細胞内で  $G_i/Go$  型の三量体 G タンパク質と共役しており、活性化によってアデニル酸シクラーゼを抑制し、cAMP シグナルを抑制する。そこで、細胞内の cAMP を測定する cADDIS システムを活用し、GABA<sub>B</sub> 受容体の細胞内シグナルの評価をライブセル・イメージングで行うことが可能とした。さらに mGluR1



初代培養神経細胞における cAMP センサーの発現。パキユロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。

の活性化によって GABA<sub>B</sub> 受容体のシグナル伝達が調節されることについて樹立した細胞株を用いて再現した。

(3) A $\beta$  は APP から  $\beta$  セクレターゼ(BACE)と  $\gamma$  セクレター-2 段階の切断によって産生されるペプチドである。産生される A $\beta$  の多くは A $\beta$ 40 であるが、全体の約 10% は疎水性がより強くアミロイド線維を形成しやすい A $\beta$ 42 である。報告者は培養期間中の APP と BACE1 の発現量の変化を明らかにし、セクレターゼ阻害剤による A $\beta$  産生の調節機構が保持されていることを明らかにした。さらに培養海馬スライス 1 枚あたりの A $\beta$ 40 の産生量は一時間あたり  $2.68 \pm 0.82 \text{ pg}$  であることが分かった。さらに、A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 産生量を経時的に定量し、A $\beta$ 42 産生量が生体内と同じく全体のおおよそ 10% 前後に保たれていることを明らかにした。さらに、マウスとラットの海馬培養スライスの A $\beta$  分泌量を比較したところ、スライスに含まれる総タンパク質量に対する分泌量は等しく、おおよそ  $1.7 \text{ pg} / \mu\text{g}$  であった。



mGluR と GABA<sub>B</sub> 受容体が形成する複合体と APP 切断の関係については不明であったが、上記の結果は、ラット海馬のスライス培養が APP 切断および A $\beta$  分泌の評価系として有用であることを示すものである。さらに報告者は、アデノ随伴ウイルスを用いた培養スライスへの遺伝子導入法について確立した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kamikubo Yuji, Jin Hao, Zhou Yiyao, Niisato Kazue, Hashimoto Yoshie, Takasugi Nobumasa, Sakurai Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Ex vivo analysis platforms for monitoring amyloid precursor protein cleavage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1068990 ~ 1068990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2022.1068990	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 Okamoto Kazuki, Kamikubo Yuji, Yamauchi Kenta, Okamoto Shinichiro, Takahashi Megumu, Ishida Yoko, Koike Masato, Ikegaya Yuji, Sakurai Takashi, Hioki Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Specific AAV2/PHP.eB-mediated gene transduction of CA2 pyramidal cells via injection into the lateral ventricle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 323 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-27372-8	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 Takasugi Nobumasa, Komai Masato, Kaneshiro Nanaka, Ikeda Atsuya, Kamikubo Yuji, Uehara Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 The Pursuit of the "Inside" of the Amyloid Hypothesis? Is C99 a Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 454 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12030454	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 Kamikubo Yuji, Yamana Tomohito, Inoue Yuriko, Sakurai Takashi	4. 巻 3
2. 論文標題 Multifaceted analysis of nanotoxicity using primary cultured neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nano Express	6. 最初と最後の頁 035003 ~ 035003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/2632-959x/ac7cfd	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 Kamikubo Yuji, Wakisaka Keiko, Imai Yuzuru, Sakurai Takashi	4. 巻 2322
2. 論文標題 Midbrain as an Ex Vivo Analysis Platform for Parkinson's Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 111 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_11	査読の有無 無
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 Kuroda Yui, Nonaka Miki, Kamikubo Yuji, Ogawa Haruo, Murayama Takashi, Kurebayashi Nagomi, Sakairi Hakushun, Miyano Kanako, Komatsu Akane, Dodo Tetsushi, Nakano-Ito Kyoko, Yamaguchi Keisuke, Sakurai Takashi, Iseki Masako, Hayashida Masakazu, Uezono Yasuhito	4. 巻 141
2. 論文標題 Inhibition of endothelin A receptor by a novel, selective receptor antagonist enhances morphine-induced analgesia: Possible functional interaction of dimerized endothelin A and $\mu$ -opioid receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111800 ~ 111800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.111800	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 Komiya Eriko, Tominaga Mitsutoshi, Hatano Ryo, Kamikubo Yuji, Toyama Sumika, Sakairi Hakushun, Honda Kotaro, Itoh Takumi, Kamata Yayoi, Tsurumachi Munehiro, Kishi Ryoma, Ohnuma Kei, Sakurai Takashi, Morimoto Chikao, Takamori Kenji	4. 巻 149
2. 論文標題 Peripheral endomorphins drive mechanical allodynia under the enzymatic control of CD26/DPPIV	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.08.003	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 Kaneshiro Nanaka, Komai Masato, Imaoka Ryosuke, Ikeda Atsuya, Kamikubo Yuji, Saito Takashi, Saido Takaomi C, Tomita Taisuke, Hashimoto Tadafumi, Iwatsubo Takeshi, Sakurai Takashi, Uehara Takashi, Takasugi Nobumasa	4. 巻 25
2. 論文標題 Lipid flippase dysfunction as a therapeutic target for endosomal anomalies in Alzheimer's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103869 ~ 103869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103869	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 上窪 裕二, 田端 俊英, 坂入 伯駿, 櫻井 隆	4. 巻 94
2. 論文標題 異種G蛋白質共役型受容体相互作用による代謝型グルタミン酸受容体の制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 468 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 周藝瑤, 上窪裕二, 石田葉子, 日置寛之, 櫻井隆
2. 発表標題 脳スライス培養を用いたアミロイドプラーク形成と神経突起変性の解析
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂入伯駿, 上窪裕二, 櫻井隆
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体における異種GPCR間相互作用
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 周藝瑤, 上窪裕二, 石田葉子, 日置寛之, 櫻井隆
2. 発表標題 アミロイドプラーク形成による神経突起変性の解析
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上窪裕二, 周藝瑤, 金浩, 橋本祥江, 櫻井隆
2. 発表標題 海馬スライス培養を用いたAPPプロセッシングの解析プラットフォーム
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上窪 裕二, 櫻井 隆
2. 発表標題 金属酸化物ナノ粒子の神経毒性
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 和樹, 上窪 裕二, 山内 健太, 岡本 慎一, 高橋 慧, 石田 葉子, 櫻井 隆, 小池 正人, 池谷 裕二, 日置 寛之
2. 発表標題 AAV2/PHP.eBベクターを用いた海馬CA2野選択的標識
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森 由紀, 上窪 裕二, 杉谷 善信, 松川 岳久, 小林 桃子, 武藤 剛, 横山 和仁, 角田 正史, 堀口 兵剛
2. 発表標題 低濃度鉛曝露による離乳後の仔ラットの注意力低下への 影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会
4. 発表年 2021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 1型代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体における異種GPCR間複合体形成と双方向シグナル調節
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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 1型代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体は異種GPCR間複合体を形成し、互いの細胞内シグナルを双方向に制御する
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020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43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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	高杉 展正  (Takasugi Nobumasa)  (60436590)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授     (15301)	

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