

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22500332

研究課題名（和文）代謝型グルタミン酸受容体を介した新規細胞内シグナル伝達系の解析

研究課題名（英文）Analysis of novel intracellular signal transduction mechanism of metabotropic glutamate receptor.

研究代表者 森吉 弘毅 (Moriyoshi Koki)

京都大学医学部附属病院・医員

研究者番号：50263091

研究成果の概要（和文）：高次脳機能に深く関わる代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) のシグナル伝達機構の全体像を解明するため、特徴的な長い C 末細胞内領域の解析を行い、受容体細胞内局在に影響を及ぼす複数の蛋白領域を同定した。さらに、新規に開発した効率の良いスリーハイブリッドシステムを用いて相互作用蛋白のスクリーニングを行い、これまで知られていなかった結合蛋白を複数同定した。これらの蛋白を介したシグナルを解析する事により、中枢神経シナプスにおけるシグナル調節機構の理解が進むと共に、精神神経疾患や自閉症等の新たな創薬のターゲットとなる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) play crucial roles in higher brain functions such as learning and memory formation. The purpose of this research project is to identify novel signal transduction mechanisms of mGluRs and to elucidate the whole picture of mGluR-mediated regulation of synaptic function. Analysis of characteristic long C-terminal intracellular domain of mGluR1a revealed novel protein regions that controls intracellular localization of receptor molecules. Furthermore, screening of cDNA library using newly-developed yeast three-hybrid system successfully identify novel mGluR-interacting molecules. These results may improve the molecular understanding of synaptic regulation of central nervous system, and newly-identified molecules may become the candidate of drug development for neuropsychiatric diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：mGluR, スリーハイブリッド、細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

mGluR は中枢神経系のシナプスにおいてシグナル伝達の調節に関わっており、シナプスの形成・発達・可塑的变化といった現象を通じて記憶・学習といった高次脳機能の発現や成熟神経回路の形成に深く関わっている。

mGluR は 7 回膜貫通部位を持つ G 蛋白共役型受容体で、特に大きな細胞外領域を持つ class C 受容体群に属している。mGluR は構造的・機能的特徴に基づいて 3 つのグループに分けられており、特に Group 1 に属する mGluR1, mGluR5 は他の class C 受容体に

はみられないような長いC末細胞内領域という特徴を備えている。これまで mGluR の C 末部分に結合する分子が幾つか同定されてきたが、いずれも結合にはごく限られた領域のみで十分な事が示されており、他の大部分の細胞内領域については生理的意義が不明であった。しかし、このような部分も種間を越えて保存されており、また細胞外および膜貫通部位は共通でC末部分のみが異なるスプライズバリエーション間で特性の違いが知られていることから、この部分に未知の機能的意義があるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Group 1 mGluR の C 末細胞内領域が mGluR シグナル伝達に重要な役割を果たしていると考え、そのメカニズムを分子生物学的手法を用いて解析し、全体像を解明する事を目的としている。mGluR は中枢神経系シナプスの機能調節に重要な役割を果たしており、シグナル伝達メカニズムの解明および新規シグナル伝達システムの同定はシナプス機能調節機構を理解する上で欠かせないものと考えられる。さらに、これらのシグナル伝達系は、自閉症・発達障害等のシナプス機能不全が本態と考えられている疾患に対し、新たな創薬のターゲットとなる可能性が期待される。

3. 研究の方法

主として2つの方向から研究を行った。第一に、Group 1 mGluR の C 末細胞内領域に、特徴的なアミノ酸配列が複数ある点に着目し、様々な欠変異体を作成した。自然に存在する mGluR1 スプライズバリエーション(mGluR1a と mGluR1b) の間で受容体分子の細胞内局在が異なる事が知られており、この現象を手がかりに Group 1 mGluR の C 末細胞内領域の機能的意義を探索した。第二に、mGluR の C 末細胞内領域をプローブとして結合蛋白のスクリーニングを行った。この際に、我々が新規に開発した効率の良い yeast three hybrid (Y3H) ベクターシステムを用いる事で、単なる1対1の結合だけでなく、特定の蛋白が結合する事で構造変化が起こり、別の蛋白の結合が誘導される複合体形成をシミュレートする事が可能となり、より幅広い結合蛋白のスクリーニングを行うことができた。

4. 研究成果

(1) Group 1 mGluR C 末細胞内領域内に存在する機能的蛋白領域の同定

まず最初に、mGluR1a および mGluR1b 全長 (N 末端に FLAG タグを付加したもの) を HEK293 細胞に発現し、細胞膜表面への輸送を計測した。抗 FLAG 抗体を細胞の外側から加えて、膜表面に存在する mGluR 蛋白 N 末端に

結合させ、余分な抗体を洗い流した後に、細胞を溶解してウェスタンブロッティングを行った。抗 FLAG 抗体を用いて mGluR 蛋白を検出すると、mGluR1a, mGluR1b ともに高い発現が認められた。一方、抗マウス IgG 抗体を用いて、細胞膜表面の mGluR に結合していた FLAG 抗体を検出すると、mGluR1a と比べて mGluR1b は明らかにバンドが薄く、膜表面に存在する mGluR1b の量が少ないことが示された。さらに、より定量的に蛋白量を計測するために、以下の手順を用いた ELISA 解析を行った。複数のウェルの細胞に対して同等の条件で mGluR1a もしくは mGluR1b を発現させ、培養後に細胞を固定する。細胞を「全受容体」群と「膜表面受容体」群に分け、「全受容体」群は界面活性剤を用いて細胞膜透過処理を行っておく。それぞれの細胞に対して HRP ラベルされた抗 FLAG 抗体を結合させると、透過処理を行った「全受容体」群では抗体が細胞内に入り込むことが可能なため、細胞膜表面および細胞内に存在する両方の mGluR に抗体が結合するのに対し、「膜表面受容体」群では細胞膜表面の mGluR にのみ抗体が結合できる。その後、余分な抗体を洗浄して除き、TMB 基質を用いて HRP 活性を測定することで蛋白量を数値化できる。この ELISA を用いて mGluR1a, mGluR1b のトータル蛋白量および膜表面蛋白量を測定し、表面に輸送された蛋白の割合 (%膜表面輸送 = 「膜表面受容体」 / 「全受容体」 × 100) を計算した。mGluR1a と比較して、mGluR1b は若干トータルの蛋白発現量が多い傾向が認められたが、細胞膜表面に輸送された蛋白量は明らかに少なく、%膜表面輸送は mGluR1a が 60%前後なのに対して mGluR1b は 20%程度に過ぎなかった。このように、ELISA を用いれば mGluR の膜表面輸送の程度を数値化して定量的な解析を行うことが可能になり、またコンストラクト毎の発現量の違いも吸収できるため、以降は ELISA を用いた解析を中心に行った。

過去の報告では mGluR1b の細胞膜表面への輸送を妨げているのは、膜貫通領域直後に存在する塩基性アミノ酸のクラスター (RRKK クラスター) であると言われている。これを確認するために、RRKK クラスターを欠失した mGluR1b (Δ RRKK) を作成し、膜表面への輸送を解析した。mGluR1b (Δ RRKK) の %膜表面輸送は 60%以上であり、mGluR1a と同程度であることが示され、RRKK クラスターが mGluR1b の膜表面への輸送を妨げる決定的な要素であることが、この実験系でも確認できた。

この RRKK クラスターを含む領域は mGluR1a においても共通に存在する。にもかかわらず、mGluR1a においては RRKK クラスターの効果が顕在化することなく、蛋白は効率よく膜表面に輸送される。おそらく mGluR1a の長い C 末細胞内領域のどこかが RRKK クラスターをマ

スクする機能を持っていると推定されているが、具体的なアミノ酸配列などは不明であった。これを明らかにするために、まず mGluR1a を C 末から様々な長さで削った変異体を作成し、それぞれの%膜表面輸送を測定した。その結果、1047 番目のアミノ酸以降を削っても%膜表面輸送は 70%前後で mGluR1a 全長と大差ないのに対し、885~1008 番目のアミノ酸以降を削った変異体においては 20%以下と著明に膜表面への輸送が減少し、mGluR1b と同程度となった。ここから更に RRKK クラスターを削ると膜表面への輸送が復活するため、これらの変異体では mGluR1aC 末端のマスク効果が失われ、RRKK クラスターの効果が顕在化して細胞膜表面への輸送を妨げていると思われる。以上の結果から、1008 番目~1046 番目のアミノ酸領域にマスク効果を持つ配列があると推定できた。

マスク効果を持つと思われる 1008 番目~1046 番目のアミノ酸配列を眺めると、プロリンおよびグルタミンが集積した特徴的な配列 (PQ 領域 1) が見つかった。この部分がマスク効果に関与している可能性を考え、PQ 領域 1 を欠失した変異体を用いて解析を行った。効率よく膜表面に輸送される最短の変異体である mGluR1a($\Delta 17$)から PQ 領域 1 を欠失させると、%膜表面輸送は 20%以下となり、マスク効果が失われる事が示された。一方、PQ 領域 1 を含む 35 アミノ酸の短い配列のみを RRKK クラスターの直後に繋いだ変異体 mGluR1a($\Delta 29$)では、%膜表面輸送が 60%以上となり、この短い領域のみで RRKK クラスターをマスクするのに充分である事が示された。以上の結果から、PQ 領域 1 が RRKK クラスターをマスクするための配列として機能していることがわかった。

RRKK クラスターをマスクする配列として PQ 領域 1 が同定できたと考え、確認のために mGluR1a 全長から PQ 領域 1 を欠失した変異体 mGluR1a($\Delta PQ1$)を作成した。予想では mGluR1a($\Delta PQ1$)ではマスク効果が失われるために膜表面への輸送が阻害されると考えていたが、予想に反して mGluR1a($\Delta PQ1$)の%膜表面輸送は 60%以上と mGluR1a と変わらず、PQ 領域 1 を欠失しただけでは RRKK クラスターのマスク効果を解除できない事が判明した。この結果から、PQ 領域 1 以外にもマスク効果に関わるアミノ酸配列があると推定されたため、mGluR1a($\Delta PQ1$)を元に、更なる欠失変異体を作成した。その結果、PQ 領域 1 を欠き、かつ 1111 番目のアミノ酸以降を欠いた変異体 mGluR1a($\Delta 22$)は効率よく膜表面に輸送されるのに対し、PQ 領域 1 と 1102 番目のアミノ酸以降を欠いた変異体 mGluR1a($\Delta 34$)は著明に膜表面への輸送が抑制される事が明らかとなった。新たにマスク効果を持つ領域として同定された 1102 番目

~1110 番目の 9 個のアミノ酸のうち、6 個がグルタミン酸もしくはアスパラギン酸の酸性アミノ酸であり、この酸性アミノ酸の集積した領域 (酸性領域 1) が RRKK クラスターのマスク効果に重要であると考えられた。これを確認するために、酸性領域 1 を含む 30 アミノ酸の短い配列のみを RRKK クラスターの直後に繋いだ変異体 mGluR1a($\Delta 21$)を作成したところ、効率よく膜表面に輸送され、この短い領域のみで RRKK クラスターをマスクするのに充分である事が示された。さらに、そこから酸性領域 1 を除いた 21 アミノ酸を結合した mGluR1a($\Delta 24$)では膜表面への輸送向上は認められず、酸性領域 1 が PQ 領域 1 とは別に単独で RRKK クラスターのマスク効果を持つ事が示された。

このように、RRKK クラスターをマスクする配列として PQ 領域 1 および酸性領域 1 の 2 つが同定されたので、mGluR1a 全長から PQ 領域 1 および酸性領域 1 の両方を欠失した変異体 mGluR1a($\Delta 25$)を作成した。しかし、mGluR1a($\Delta 25$)は効率よく膜表面に輸送され、さらに別のマスク効果に関わるアミノ酸配列があると推定された。

以上のように、mGluR1 の膜貫通領域直後に存在する RRKK クラスターが受容体の膜表面輸送を妨げる役割を持ち、mGluR1b においてはこの RRKK クラスターの効果が現れて、全体の 20%程度しか細胞膜表面に輸送されないこと、一方 mGluR1a においては長い C 末端細胞内領域に存在する複数の特徴的な配列 (PQ 領域 1、酸性領域 1 他) がそれぞれ別個に RRKK クラスターをマスクする機能を持ち、その結果 mGluR1a 蛋白は効率よく細胞膜表面に輸送されること、が明らかとなった。このような調節機構は、N 末細胞外領域や 7 回の膜貫通領域も含めた受容体蛋白全体として機能しているのだろうか。あるいは C 末細胞内領域のみでこのような調節が成り立っているのだろうか。これを確認するために、mGluR の C 末細胞内領域のみを取り出し、これを全く別個の膜貫通領域に繋いで、その局在を観察した。この実験のためのベクターとして、独自に作成した pDPGM を用いた。このベクターは N 末細胞外領域に Myc タグおよび EGFP を持ち、PDGF 受容体の 1 回膜貫通領域がそれに続いている。このベクターの C 末細胞内領域に mGluR1a あるいは mGluR1b の細胞内領域を繋ぎ、HEK293 細胞に発現してその局在を観察した。ベクター単独、あるいは mGluR1a の C 末(m1aC)を繋いだものでは EGFP の蛍光は細胞全体で一樣に観察され、一部核周囲や細胞の辺縁で強い傾向が認められた。一方、mGluR1b の C 末 (m1bC) を繋いだものはこれと全く異なる像を示し、細胞全体にわたって斑状に集積した蛍光が認められた。これらの蛋白が細胞膜表面に発現しているか

どうかを確認するために、細胞を固定し、膜透過処理を行わずに抗 Myc 抗体による蛍光細胞染色を行った。その結果、ベクター単独、あるいは m1aC を繋いだものでは明らかな細胞膜表面の染色が観察されたのに対し、m1bC を繋いだものでは同じ条件で細胞膜表面の染色は認められなかった。さらに、mGluR1b の C 末から RRKK クラスターを除いた m1bC (Δ RRK1) を繋いだものを発現したところ、斑状の集積は消えて一様な蛍光が観察されるようになり、細胞膜表面の染色も認められるようになった。これらの結果から、mGluR の細胞膜表面への輸送、RRKK クラスターによる阻害、mGluR1a 細胞内領域による RRKK クラスターのマスクといった調節機構は、C 末細胞内領域のみで再現しうる事が明らかとなった。

ここまでの結果は HEK293 細胞を用いて得られたものであるが、実際の神経細胞で発現した場合に同様の事が起こるのであるか。これを確認するために大脳皮質より調製した初代培養神経細胞に発現ベクターを導入し、局在の観察を行った。まず、N 末に FLAG タグを付加した mGluR1a あるいは mGluR1b 全長を発現し、抗 FLAG 抗体で染色して局在を観察した。膜透過処理を行わずに、膜表面にある受容体のみを染色したところ、やや mGluR1b の方が蛍光が弱いもののどちらも細胞全体が一様に染まった。同時に発現した EGFP で観察できる細胞の形態と比較してみても、全ての突起が同程度に染まっており、特定の突起に局在する傾向は認められなかった。一方、膜透過処理を行って、細胞内の蛋白も含めて染色したところ、細胞体に強い染色が認められた。特に mGluR1b において細胞体への蛋白集積の程度が強く、相対的に突起に分布する蛋白の割合が少なくなっている様子が観察された。また、一部 HEK293 細胞で観察されたような斑状の集積も認められた。これらの結果から、神経細胞においても mGluR1a が効率的に膜表面に輸送されるのに対し、mGluR1b は細胞内に留まる傾向がある事が明らかとなった。

さらに、mGluR の C 末細胞内領域の効果を確認するために、pDPGM を用いた C 末発現ベクターを初代培養神経細胞に導入した。mGluR1a の C 末 (m1aC) を繋いだベクターは神経突起全体に一様に分布するのに対し、mGluR1b の C 末 (m1bC) を繋いだものは、細胞体および神経突起の中において斑状に強く集積する傾向が認められた。mGluR1b の C 末から RRKK クラスターを除いたもの (m1bC (Δ RRK1)) ではこのような集積は観察されなかった。これらの結果も HEK293 細胞での結果と一致するものであり、神経細胞においても RRKK クラスターが mGluR1b の局在に大きな影響を及ぼすこと、mGluR1a においては RRKK クラスターの効果がマスクされて

いることを示している。

今回の研究で、mGluR1a の C 末細胞内領域に RRKK クラスターの機能をマスクできる複数の領域が存在することが明らかとなった。それぞれの領域は、その前後を含む短い領域だけでマスク効果を持ち、他の領域の存在を必要としないように見える。また、HEK293 細胞での膜表面への蛋白輸送を指標とする限りでは、それぞれの領域は同程度の RRKK クラスターマスク効果を持ち、一見したところでは違いは認められない。しかし、実際の脳内においては、単純に細胞膜表面に出現するか否かだけではなく、神経細胞の種類や発達時期、周囲の環境や神経活動などによって複雑な制御を受けていると考えられ、例えば樹状突起スパインへの局在、シナプス周辺部への分布、シナプス活動に応じた局在の変化等が起きていると思われる。このような過程において、今回同定した複数の領域がそれぞれ別の役割を担うような可能性も十分考えられ、今後は様々な実験系を用いて、より生体内に近い状態での解析を行っていく必要がある。今回、mGluR1 の局在調節に何らかの機能を担っていると思われる領域を幾つかの狭い範囲に限定できたことは、今後の解析を進める上で大きな利点となると思われる。

(2) 新規 mGluR 結合蛋白の同定

我々が新規に開発した Yeast three hybrid (Y3H) ベクター pBT を用いて、mGluR1a あるいは mGluR5 の C 末細胞内領域を bait とし、大脳 cDNA ライブラリのスクリーニングを行った。この際に、既知の結合蛋白である Homer や Tamalin、あるいは mGluR の C 末をリン酸化する事が知られている src, fyn 等の src ファミリーチロシンキナーゼを同時に発現する事で、蛋白結合やリン酸化によって構造の変化した mGluR C 末に結合する蛋白の同定を目指した。一連のスクリーニングにより、細胞内骨格関連蛋白、MAP キナーゼ関連蛋白、低分子量 G 蛋白結合蛋白、細胞内輸送関連蛋白、蛋白修飾酵素等のこれまで mGluR との相互作用が知られていなかった蛋白が同定され、一部は試験管内で蛋白同士の結合が確認された。今後は神経細胞内などの生理的条件下での蛋白相互作用を検証し、下流のシグナル伝達機構に及ぼす影響を解析する事で、mGluR を中心とした蛋白複合体の機能解明に新たな進展がみられるものと期待される。

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) Kataoka TR, Fujimoto M, Moriyoshi K, Koyanagi I, Ueshima C, Kono F, Tsuruyama

T, Okayama Y, Ra C, Haga H., PD-1 regulates the growth of human mastocytosis cells., Allergology international、査読有、v62, 2013, pp99-104.
DOI: 10.2332/allergolint.12-0A-0450.

〔学会発表〕（計1件）

(1) Moriyoshi K, Multiple protein regions control cell surface expression of mGluR1a, Annual Meeting of Society for Neuroscience, アメリカ合衆国、サンディエゴ・コンベンションセンター、2010年10月16日

〔図書〕（計1件）

(1) 森吉弘毅, 他11名、クバプロ、ブレインサイエンス・レビュー2010, 2010, 264

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 森吉 弘毅 (Moriyoshi Koki)

京都大学医学部附属病院・医員

研究者番号：50263091

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし