

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293044

研究課題名(和文) 記憶の長期保持に関わる新規代謝型受容体とスプライシング異型による分泌蛋白の解析

研究課題名(英文) Analyses of an orphan metabotropic receptor which plays a role in the long term retention of memory, and a secretory protein encoded by its splice variant

研究代表者

久保 義弘 (KUBO, Yoshihiro)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授

研究者番号：80211887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：Prprt3は、遺伝子情報からGタンパク質結合型受容体と考えられるタンパク質だが、その機能は未知である。本研究課題では、Prprt3の分子機能の解明を目指して研究を実施し、Prprt3がFurinによってN末端細胞外領域の根元で切断されること、グルタミン酸トランスポーターおよびGi/o G蛋白質と結合すること、主として興奮性神経細胞のシナプス前終末に発現していること、脳の興奮性神経細胞特異的に遺伝子を破壊すると恐怖条件付け記憶の長期保持に異常が見られること、ムスカリン性ACh受容体のアゴニストであるOxo-Mによって活性化されるがAChでは活性化されないこと等を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Prprt3 is a putative G protein coupled receptor of family C, but its function is totally unknown. We aimed at the elucidation of the molecular function and physiological role of Prprt3, and observed the followings. (1) Prprt3 is partly cleaved at the end of N-terminal extracellular domain by Furin. (2) It binds to glutamate transporters EAAT1, 2 and Gi/o G protein. (3) It is expressed chiefly at the presynaptic terminal of excitatory neurons. (4) Conditional Prprt3 gene knock out homozygous mice in forebrain excitatory neurons showed impairment of long term retention of fear conditioning memory. (5) Prprt3 is activated by Oxo-M, a muscarinic ACh receptor agonist, but not by ACh.

研究分野：分子生理学

キーワード：Prprt3 オーフアン受容体 スプライス異型 恐怖条件付け記憶 長期保持

1. 研究開始当初の背景

我々は、先に、7回膜貫通型タンパク質をコードする遺伝子 Prrt3 (Proline Rich Transmembrane Protein 3) をデータベースに見いだした。Prrt3は、大きな細胞外領域を持つことを特徴とし、family C に属するG蛋白質結合型受容体であると考えられた。しかし、先行研究は皆無で、リガンドや機能は全く未知であった。Prrt3の際だった特徴は、上述の受容体 Prrt3- Longに加えて、同一遺伝子からスプライシングの違いによりつくられる、細胞外領域のみからなる分泌蛋白 Prrt3- Short が存在することであった。我々は、本申請研究の開始時点において、以下の知見を得ていた。

(1) Prrt3全遺伝子 KO マウスを作成したところ、KO ホモマウスは、高い生後1週間以内の致死率を示し、十分数が得られなかった。そこで KO ヘテロマウスを用いて網羅的行動解析を行ったところ、恐怖条件付け記憶および空間記憶の長期保持の低下していた。

(2) 北大・医・解剖の渡辺教授、今野助教との共同研究により、急速凍結脳切片を用いた解析で、C末端抗体、N末端抗体いずれによっても、KO ホモマウスで消失する特異的染色が、視床、海馬、黒質、小脳皮質等に検出された。Allen brain atlas では、海馬の錐体細胞や顆粒細胞に強い mRNA の発現が見られるが、Prrt3 タンパク質は、細胞体の層をよけて発現していたため、細胞体以外に存在することがわかった。

(3) Western blot 解析により、HEK293 細胞に発現させた - Long は、計算値に近い約 110 kDa であるのに対し、脳では 110 kDa のバンドに加え、約 130 kDa の major バンドが検出され、何らかの修飾の存在が示唆された。

(4) C末端抗体を用いた場合にのみ、脳タンパク質の Western blot 解析で 80kDa、70 kDa のバンドが検出された。これは、N末端細胞外領域が根元近くで切断された長さに対応した。

(5) 致死率が高く実施できなかった KO ホモマウスを用いた網羅的行動解析を行うために、新潟大学・脳研・崎村教授研究室にて、条件的 KO を可能にする Flox マウスを作成していただいた。

(6) -Long、もしくは -Short を含む分子複合体の解析を行うため、各々に、FLAG- 6x His tag を付加したタンパク質を発現する TG マウスを作成した。

2. 研究の目的

上記状況に立ち Prrt3 の分子機能と生体での役割の解明を目指して以下の実験を行う。

(1) KO ホモマウスを陰性コントロールとすることにより、Prrt3 タンパク質の脳内発現パターンの詳細を解析する。また、in situ hybridization (ISH) により、mRNA を発現す

る細胞体の位置を併せて解析し、神経細胞内における分布極性も解析する。

(2) KO ヘテロマウスで空間記憶の異常が観察されたので、KO ホモマウスの海馬のシナプス伝達の電気生理学的解析を行う。

(3) -Long の生理的リガンドの同定は極めて重要である。Family C に属するため、ペプチドよりは、イオン、アミン、アミノ酸等の小分子である可能性が高い。そこで、候補物質の網羅的スクリーニングを行う。また、下流シグナル系の解明に向け DNA microarray による野生型と KO ホモの発現遺伝子の比較解析を行う。

(4) HEK293 細胞に発現する -Long に比し、脳内に発現するものは 20 kDa 程度大きい。この差違は、何らかの分子修飾によるものと考えられるが、糖鎖修飾によるもの、リン酸化によるものではないことが既に確定している。そこで、何らかの複合体形成の可能性を想定して、FLAG- 6x His tag 付加 Prrt3-Long, -Short を神経細胞全般で発現する TG マウス (作成済み) を用い、Prrt3 を含む複合体を高度に精製し、精製物の質量分析により、複合体を構成しているタンパク質を同定する。

(5) N末端細胞外領域の根本で切断された -Long の分子実態を解明するために、種々の細胞外プロテアーゼによる精製全長タンパク質の切断実験を行う。また、切断候補モチーフを変異させて切断されなくなることを確認し、どの細胞外プロテアーゼにより、どこで、切断されるのかを確認する。

(6) 単純 KO ホモマウスは致死率が高く、十分な個体数が得られないので、新たに作成済みの Flox マウスを用いて、脳内部域特異的もしくは薬剤投与特異的に Prrt3 遺伝子を破壊した KO ホモマウスを十分数得て、網羅的行動解析を行う。

3. 研究の方法

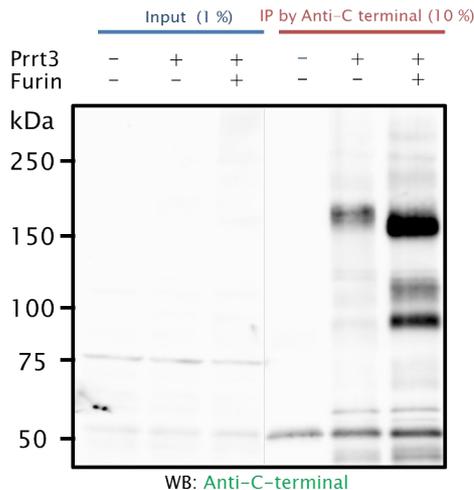
分子生物学実験、質量分析実験を含む生化学実験、免疫組織化学的実験、行動解析実験、電気生理学実験とも、常法により行った。方法論の詳細は誌面の関係で割愛する。

4. 研究成果

(1) Prrt3 の N 末端細胞外領域を切断する酵素と切断部位の同定

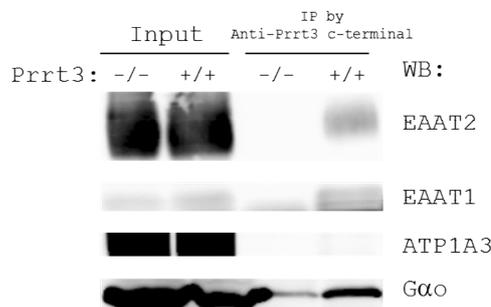
我々は、脳に発現する Prrt3 タンパク質の特異抗体を用いた western blot 解析により、N末端細胞外領域が根元付近で切断された受容体が存在することを見出した。切断は、当初、細胞外に放出される protease、tPA、Neuropsin、Neurotrypsin 等によると推測したが、これらの遺伝子破壊マウスでも Prrt3 の切断は同様に観察された。そこで、次に、細胞内でのタンパク質のプロセッシングに関わる pro-protein convertase (PCs) によるものと推測し、遺伝子発現系を用いた実験を

行ったところ、PC のひとつである Furin によって、Prprt3 が、少なくとも部分的に切断されることが確認された(下図)。なお、Furin の遺伝子破壊マウスは致死であるため、Furin 非存在マウスで、Prprt3 の切断が起きなくなるかどうかについては解析できていない。さらに、アミノ酸配列から Furin の切断部位と予想されるモチーフに R343S & R345S 変異を導入することにより切断が減弱することを観察した。



(2) Prprt3 に結合するタンパク質の同定

我々は、Prprt3 の機能を知る手がかりを得るために、免疫共沈タンパク質の質量分析による解析を行った結果、たくさんの候補分子のリストが得られた。その中で、非特異的ではないと判断できるものとして、グルタミン酸トランスポーター EAAT1, EAAT2, G 蛋白質 alpha i/o サブユニット等が同定された。その会合は、in vitro 発現系を用いた免疫共沈実験でも確認された(下図)。これらの知見から、Prprt3 が、興奮性シナプス前終末に局在する Gi/o 共役型受容体であることが示唆された。シナプス前終末に存在するという知見は、免疫組織化学的解析の結果にも、よく合致していた。



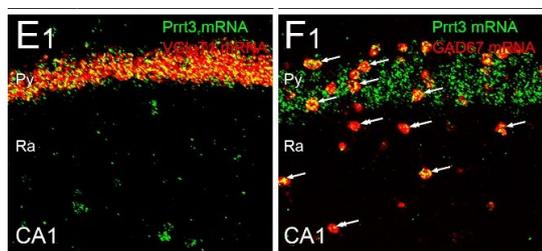
(3) in situ hybridization による発現細胞の解析

Prprt3-Short を特異的に検出するプローブを用いた解析によっては、明確な発現が検出されなかった。そのため、RT-PCR クローニング出来るものの、分泌タンパク質型の Prprt3-Short をコードする mRNA の脳内発現は、

非常に低いことが明らかになった。

強い発現を示す受容体型の Prprt3-Long を発現する細胞種を、二重 FISH 法により海馬 CA1 領域において解析した結果、錐体細胞層において、VGlut1 との強い重なりを示した(下図・左)ことから、グルタミン酸作動性の、興奮性神経細胞に強く発現することが明らかになった。また、数は少ないものの、分子層において、GAD67 との明確な重なりを認めため、一部の抑制性神経細胞にも発現していることが認められた(下図・右)。GLAST との重なりは認められず、グリア細胞には発現していないことも明らかになった。

発現部位が、シナプス前終末かシナプス後部位かを確定するために、免疫電顕による解析を行ったところ、シナプス前終末における発現は明確に認められたが、シナプス後部位における発現も若干認められた。



(4) 大脳興奮性神経細胞特異的ノックアウトホモマウスを用いた網羅的行動解析

本研究では、Prprt3 の主たる発現部位である大脳興奮性神経細胞特異的に Prprt3 遺伝子を破壊(KO)したマウスの網羅的行動解析を目的の一つとした。生存率が低かったため時間を要したが充分数の KO ホモマウスを確保することに成功した。まず、免疫組織学的解析により、大脳興奮性神経細胞における Prprt3 タンパク質の発現が失われていることを確認した。

網羅的行動解析の結果、恐怖条件付け記憶の長期保持に異常が見られることが明らかになった。なお、先に(完全 KO ホモマウスは致死率が極めて高かったため)完全 KO ヘテロマウスで行った行動解析では、空間学習記憶の長期保持にも異常が見られた。今回の大脳興奮性神経細胞特異的 KO ホモマウスでは KO ホモであるため、より重篤な症状を予想していたが、予想に反して有意な低下が見られなかった。

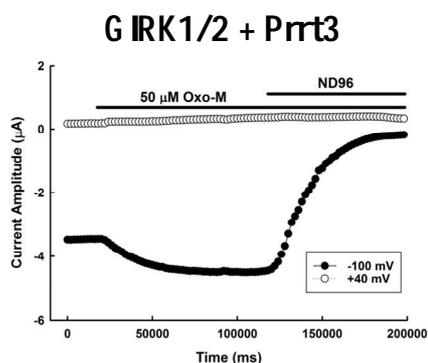
この結果は、黒質等大脳以外の発現、もしくは抑制性神経細胞における発現が機能的意義を有する可能性を示唆する。

(5) リガンド候補分子のスクリーニング系の確立

リガンドの同定は最重要事項だが、代謝型受容体の場合、カップルするG蛋白質の種類により出力が異なるため、検出方法を変えなければならない。そのため、カップルするG蛋白質の種類と同定も鍵となる。先に、免疫共沈タンパク質の質量分析の結果、Gi/oタンパク

質が同定されたので、エフェクターとして Gi/oタンパク質で活性化されるGIRKチャンネルを用いて、その電流増加を指標に、リガンド候補物質の効果を解析した。

その結果、ムスカリニックアセチルコリン受容体のアゴニストである Oxo-M によって、小さいながらも確実な応答が観察された(下図)。生理的神経伝達物質であるアセチルコリンやムスカリンでは活性化はみられなかったため、生理的リガンドが同定できたわけではない。それでもなお、この知見は、Prnt3 が機能的にGi/oタンパク質にカップルするという重要な情報を与えるもので、スクリーニング系の確立に寄与した点で、大きな意義を有する。

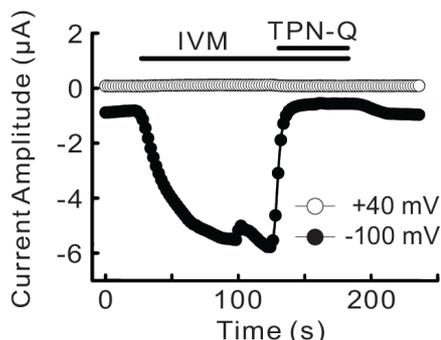


(6) リガンド候補分子の大規模スクリーニング

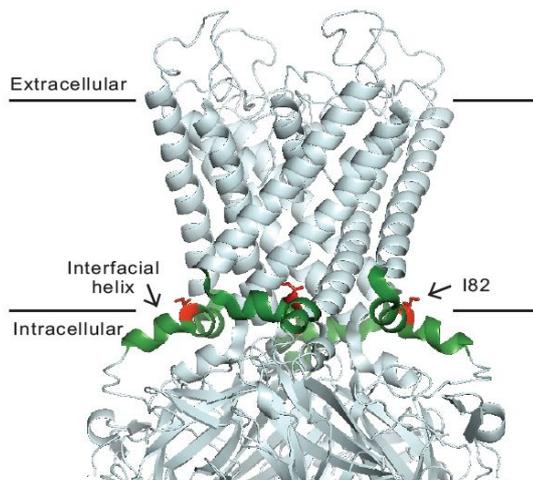
京都大学・上杉志成教授より1000 種以上の生体内分子のライブラリーを分与いただいた。そして、リガンド同定に向けて、ツメガエル卵母細胞の系で、Gi/oによって活性化されるGIRKチャンネルをエフェクターとして用いてスクリーニングを実施した。現時点で、半数程度のスクリーニングが終了したが、これまでのところ Oxo-M よりも強くPrnt3を活性化する分子は見出されていない。よって、生体内における生理的リガンドは依然不明である。

(7) GIRK1チャンネルを直接活性化する小分子の新規同定

上述の Prnt3 リガンド同定に向けての、GIRK チャンネルをエフェクターとして用いた小分子ライブラリーのスクリーニング実験の副産物として、回虫駆除薬としてよく知られている Ivermectin が、Prnt3 の共発現の有無に関わらず GIRK チャンネルを、直接活性化することを新たに見出した(下図)。



さらに、GIRK2 チャンネルが GIRK4 より高い感受性を示すことに着目し、両分子のキメラ、および変異体の機能解析を行うことにより、Ivermectin のGIRK2 への結合の構造基盤部位を同定した。P2X4 受容体等では、Ivermectin は、膜貫通部位の細胞外側よりに結合することが知られているが、GIRK2 チャンネルの場合は、細胞内領域の I1e82 が重要であることが明らかになった(下図)。



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)

Tateyama M, Kubo Y
Stabilizing effects of G protein on the active conformation of adenosine A1 receptor differ depending on G protein type
European Journal of Pharmacology (2016) 788:122-13.
doi:10.1016/j.ejphar.2016.06.025. 査読有

[学会発表](計 5 件)

Chen IS, Yamamoto T, Zhou Li, Natsume R, Konno K, Uesugi M, Watanabe M, Takao K, Miyakawa T, Sakimura K, Kubo Y
Behavioral analyses of forebrain specific knock-out mice of an orphan metabotropic receptor Prnt3 and screening of small molecule library toward identification of its ligand
第 40 回日本神経科学大会
2017年07月20日 ~ 2017年07月23日(発表決定)
幕張メッセ(千葉県・幕張市)

Chen IS, Kubo Y
Effects and activation mechanisms of antiparasitic agents on GIRK channels
第 94 回日本生理学会大会
2017年03月29日
アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

Chen IS, Yamamoto T, Kubo Y

Activation mechanisms of an orphan metabotropic receptor Prrt3
第 93 回 日本生理学会
2016 年 03 月 22 日
札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

山本泉、横井紀彦、深田優子、今野幸太郎、山本友美、渡辺雅彦、深田正紀、久保義弘
LC-MS/MS analysis of an orphan metabotropic receptor Prrt3 complex
第 92 回 日本生理学会大会
2015 年 3 月 21 日
神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

山本泉、山本友美、今野幸太郎、渡辺雅彦、久保義弘
An investigation of post-translational cleavage of an orphan metabotropic receptor, Prrt3.
第 37 回 日本神経科学大会
2014 年 9 月 11 日
パシィフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 義弘 (KUBO, Yoshihiro)
生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授
研究者番号：80211887

(2) 研究分担者

今野 幸太郎 (KONNO, Kotaro)
北海道大学・医学（系）研究科（研究院）
・助教
研究者番号：2059641

(3) 連携研究者

山本 泉 (YAMAMOTO, Izumi)
生理学研究所・分子生理研究系・特別研究員
研究者番号：20645254

渡辺 雅彦 (WATANABE, Masahiro)
北海道大学・医学（系）研究科（研究院）
・教授
研究者番号：70210945

(4) 研究協力者

陳 以珊 (Chen, I-Shan)
生理学研究所・特任助教
山本 友美 (Yamamoto, Tomomi)
生理学研究所・技術職員
立山 充博 (TATEYAMA, Michihiro)
生理学研究所・准教授
高雄 啓三 (TAKAO, Keizo)
生理学研究所・特任准教授
宮川 剛 (MIYAKAWA, Tsuyoshi)
藤田保健衛生大学・教授

服部 聡子 (HATTORI, Satoko)
藤田保健衛生大学・助教
深田 正紀 (FUKATA, Masaki)
生理学研究所・教授
深田 優子 (FUKATA, Yuko)
生理学研究所・准教授
横井 紀彦 (YOKOI, Norihiko)
生理学研究所・助教
崎村 建司 (SAKIMURA, Kenji)
新潟大学脳研究所・教授
周 麗 (SYUU, Rei)
新潟大学脳研究所・ポスドク研究員
夏目 理恵 (NATSUME, Rie)
新潟大学脳研究所・技術職員