

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460707

研究課題名(和文) 異種GPCR間の相互作用による痛み伝達の制御

研究課題名(英文) Regulation of pain through inter-GPCR interplay

研究代表者

上窪 裕二 (Kamikubo, Yuji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80509670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経系には様々なGタンパク質共役型受容体(GPCR)が発現し、神経伝達などに関与している。これまでに、多くのGPCRが複合体を形成し相互作用することが報告され、痛みの伝達に関わる代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)と痛みの抑制に関わるアデノシンA1受容体(A1R)が複合体を形成する可能性が示唆されている。そこで、我々はmGluR1とA1Rの相互作用し痛みの伝達に関わるシナプス伝達の調節している可能性に注目し研究を行った。その結果、mGluR1はアデノシンA1受容体(A1R)と複合体を形成し、mGluR1とA1Rは互いのシグナル伝達を抑制しあうことが明らかとなった。

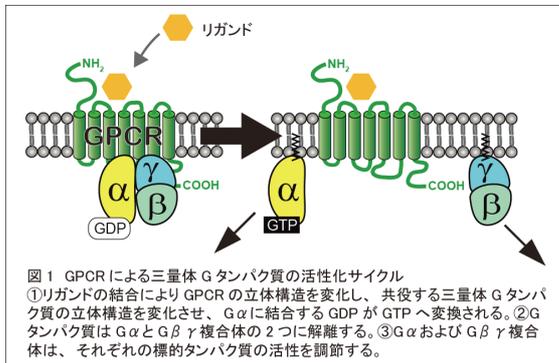
研究成果の概要(英文)：Many reports suggest that multiple G protein-coupled receptor (GPCR)s form heteromeric complexes and cooperatively trigger atypical signaling that cannot be initiated by individual GPCRs on their own. Indeed, previous studies suggest that Adenosine A1 receptor (A1R) activation also modulates cellular responses that depend on type-1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1). mGluR1 are involved in pain transmission and synaptic plasticity including cerebellar long-term depression (LTD). In this project, we indicated that mGluR1-A1R form heteromeric complex and these receptors mutually modulate each other by direct interaction. These findings indicate a new mechanism of cooperation between neuronal GPCRs to elicit atypical and intriguing cellular responses.

研究分野：神経薬理学

キーワード：疼痛 シナプス GPCR 代謝型グルタミン酸受容体 アデノシン受容体

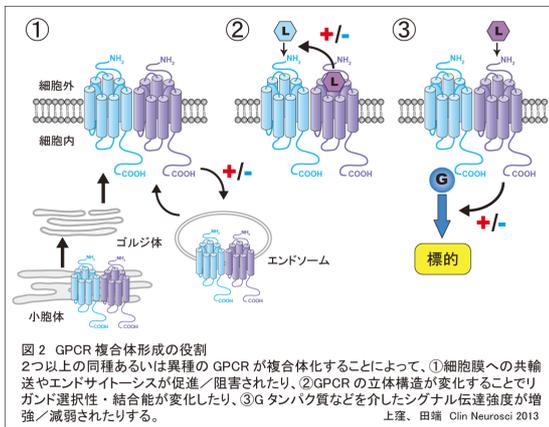
1. 研究開始当初の背景

神経間の情報伝達は、主として神経伝達物質とその受容体によって実現される。受容体は構造と性質から、Gタンパク質共役型 (GPCR)、イオンチャネル共役型、チロシンキナーゼ型、核内受容体などに分類される。GPCRは、細胞膜を7回貫通する共通構造をもち、細胞内で三量体Gタンパク質と共役しそれらを通じて細胞内にシグナルを伝える。ヒトゲノムにはおよそ800種類のGPCRがコードされており、全タンパク質中最大のスーパーファミリーを形成している。GPCRは多くの疾患に関与していることが知られ、市販薬の数割がGPCRをターゲットとしており、現在も盛んに研究が進められている。

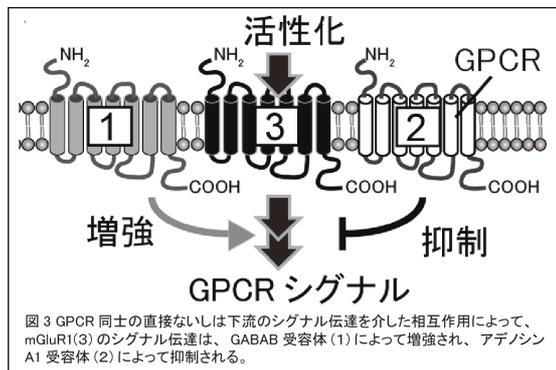


神経系には、アドレナリン受容体やドパミン受容体など様々なGPCRが発現し、神経細胞の分化、遊走、回路形成、およびシナプス伝達などに関与している。近年のGPCR研究の成果により、同種および異種GPCRが二量体ないしは多量体形成し、相互作用しあうことで単量体では実現できないような高度な機能制御を行っているという報告がなされてきた。

GPCRの相互作用の機能的な意義は未解明なものがほとんどであるが、GPCRの輸送制御、リガンド結合能の変化、シグナル伝達のクロストークなどが報告されている。我々はこれまでにGPCRのヘテロ複合体形成によるシナプス伝達の制御について研究を行い以下のことを明らかにした。代謝型ガンマアミノ酪酸受容体(GABA_BR)とアデノシンA1受



容体(A1受容体)は小脳プルキンエ細胞の樹状突起上で代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)と共局在し、mGluR1シグナルを増強/抑制し、その結果、小脳LTDを増強/阻害する。さらに、mGluR5もまたmGluR1と同様にA1受容体と複合体を形成する。中枢神経系におけるGPCRの働きを解明し治療薬の開発などの応用を行うためには、どのGPCRがどこでどう機能しているかを解明する必要がある。しかしながら、これらGPCRの相互作用と生理的作用が神経系において普遍的なものか否かは未解明のままであった。近年、GPCRヘテロ複合体形成とシグナル・クロストークによる痛みと痒みの伝達制御について報告がなされ、疼痛の制御とGPCR相互作用が注目されている。しかしながら、GPCRシグナル・クロストークによる痛み伝達の制御については殆ど解明されていない状況であった。



2. 研究の目的

我々は特に疼痛に関する上記のmGluR1、mGluR5、A1受容体、およびGABA_BRを中心

とした GPCR の複合体形成とシグナル・クロストークが痛み伝達の制御に関与しているという仮説を立て、GPCR 相互作用による疼痛伝達制御とそのメカニズムの解明を目指し研究を行った。GPCR 間の相互作用部位を決定し、相互作用を操作することは新しい創薬のターゲットになり得る。

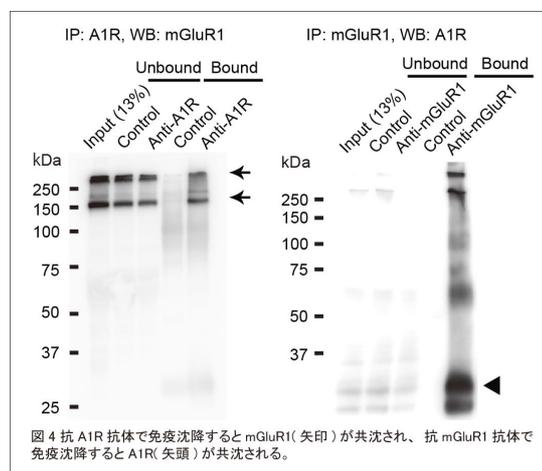
3. 研究の方法

上記 GPCR 間の複合体形成の解析を行うため誘導発現細胞株を作製した。誘導発現細胞株の作成は、テトラサイクリン誘導型の HEK293 細胞を用い、Flp-In システムおよび Jump-In システムを用いてテトラサイクリン誘導型 GPCR の安定発現細胞株を作成した。これらの誘導発現細胞株、神経組織、および初代培養神経細胞を用いて、異種 GPCR 間の複合体形成と機能的な相互作用の解析を行った。複合体形成の評価を行うために、免疫共沈法 (Co-IP)、フェルスター共鳴エネルギー転移 (FRET) 法、免疫染色法、全反射照明蛍光 (Total Internal Reflection Fluorescence : TIRF) 顕微鏡イメージングなどを行った。免疫共沈法では、GPCR が形成する複合体の探索および解析が可能であり、FRET イメージングでは GPCR 同士分子間距離が明らかにできる。TIRF イメージングでは生細胞の細胞膜における GPCR の局在の観察が可能である。機能的な相互作用については、カルシウム・イメージング、表面プラズモン共鳴イメージング、cAMP アッセイ、ライブセル FRET イメージングおよび蛍光抗体 FRET 解析などを行った。

4. 研究成果

作製した細胞株を用いて免疫共沈法や FRET 法による解析を行ったところ、mGluR1 と A1 受容体が神経細胞以外でも細胞膜近傍で複合体を形成することが明らかとなった。さらに、特定のアミノ酸配列をアラニンに置換した A1 受容体を作製し、相互作用部位の特定

を行ったところ、A1 受容体の C 末端にある 4 つの芳香族アミノ酸が mGluR1 および 5 との相互作用に重要であることを明らかにした。A1 受容体の相互作用部位は Helix8 と呼ばれる構造であり、他 GPCR や細胞膜の構造タンパク質などとも相互作用する可能性がある。さらに我々は、時間分解 FRET を用いた細胞内 cAMP アッセイや表面プラズモン共鳴イメージング法を用いて機能的な相互作用について解析を行った。その結果、mGluR1 の活性化は A1 受容体のシグナル伝達を抑制し、A1 受容体の活性化は mGluR1 のシグナル伝達を抑制することが明らかになった。mGluR1 は小脳プルキンエ細胞などの細胞に限局して発現しており、小脳運動学習に関与している。一方 A1 受容体は中枢神経系に広く発現し、神経伝達の制御に関わっている。A1 受容体は高親和性のアデノシン受容体であり脳内に定常的に存在するアデノシンで活性化される可能性がある。A1 受容体は睡眠 / 覚醒などと深くかかわっており、これらの GPCR の相互作用は学習・記憶や睡眠・覚醒サイクルなどの制御に関与している可能性がある。mGluR1 および A1 受容体は脊髄の後角にも多く発現しており、mGluR1 は痛みの伝達、A1 受容体は痛み伝達の抑制に関わっている可能性が示唆されていることから、これらの複合体形成による機能的な相互作用は痛みの伝達制御に関わっている可能性が考えられる。



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 4件)

Kamikubo Y, Takasugi N, Niisato K, Hashimoto Y, Sakurai T. Consecutive analysis of BACE1 function on developing and developed neuronal cells. Journal of Alzheimer's Disease. 2017; 56(2):641-653.
doi: 10.3233/JAD-160806.

Nonobe Y, Yokoyama T, Kamikubo Y, Yoshida S, Hisajima N, Shinohara H, Shiraishi Y, Sakurai T, Tabata T. Application of surface plasmon resonance imaging to monitoring G protein-coupled receptor signaling and its modulation in a heterologous expression system. BMC Biotechnology. 2016;16:36.
doi: 10.1186/s12896-016-0266-9.

Inoue Y, Kamikubo Y, Ezure H, Ito J, Kato Y, Moriyama H, Otsuka N. Presynaptic protein Synaptotagmin1 regulates the neuronal polarity and axon differentiation in cultured hippocampal neurons. BMC Neuroscience. 2015;16:92.
doi: 10.1186/s12868-015-0231-x.

Kamikubo Y, Tabata T, Sakairi H, Hashimoto Y, Sakurai T. Complex formation and functional interaction between adenosine A1 受容体 receptor and type-1 metabotropic glutamate receptor. Journal of Pharmacological Science. 2015;128(3):125-30.
doi: 10.1016/j.jphs.2015.06.002.

〔学会発表〕(計 5件)

上窪裕二, 坂入伯駿、阿部匡良、松岡希斗、田端俊英、櫻井隆、GPCR 相互作用による 1 型代謝型グルタミン酸受容体機能の制御、第 90 回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール(長崎)、2017 年 3 月 16 日

田端俊英、吉田翔、上窪裕二、篠原寛明、白石有希、櫻井隆、題名: アデノシン A1 受容体による 1 型代謝型グルタミン酸受容体シグナリングの変調: 表面プラズモン共鳴イメージングによる解析、第 39 回日本神経科学大会、場所: パシフィコ横浜(横浜)、2016 年 7 月 21 日

上窪裕二、培養神経細胞および組織を用いた膜タンパク質の機能解析、第 3 回包括的神経グリア研究会、ホテルニュータカハシ(熱海)、2016 年 1 月 10 日

Kamikubo Y, Tabata T, Sakurai T. Bidirectional interaction between adenosine A1 受容体 receptor and type-1 metabotropic glutamate receptor, Neuroscience 2015, Chicago's McCormick Place (Chicago, Ill), 2015 年 10 月 18 日

上窪裕二、山名智人、櫻井隆、GPCR 複合体形成による神経機能の制御、第 38 回日本神経科学大会、神戸国際会議場(神戸)、2015 年 7 月 28 日

〔その他〕
ホームページ等
<http://pharmacology.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
上窪 裕二 (KAMIKUBO, Yuji)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 80509670

(2) 研究分担者
長谷川 麻衣子 (HASEGAWA, Maiko)
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号: 20516637

(3) 連携研究者
稲田 英一 (INADA Eiichi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 40193552