様　式　Ｃ－４１

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：奨励研究
研究期間：2020～2020
課題番号：２０Ｈ０１００５

研究課題名　　単一細胞レベルでのカルシウム反応計測に基づくスクリーニングシステムの確立

研究代表者
石川　有紀子（Ishikawa, Yukiko）

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　480,000円

研究成果の概要：当研究室では覚醒維持に不可欠な神経ペプチドであるオレキシンの受容体を標的とした低分子化合物の探索を行っている。オレキシンには1型と2型の2種の受容体が存在し、それぞれが単独で発現した場合と共発現した場合でその細胞内のカルシウム上昇反応にどのような影響が見られるかはこれまで明らかにされていない。
本研究では培養細胞にこれらの受容体を一過性に発現させ、単一細胞ごとのカルシウム上昇を測定する方法を確立した。その結果、1型または2型単独の場合に比べて1，2型受容体共発現細胞ではオレキシンに対するカルシウム上昇反応が有意に減少することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
生体内では神経細胞の種類によってオレキシン受容体の発現パターンが異なることが判っている。またオレキシンは睡眠覚醒のみならず情動などにも関わっており、受容体の型によりその作用機序も異なる。
本研究の結果はオレキシン受容体の発現パターンによって細胞内シグナル伝達が異なることを示唆している。

研究分野：生化学

キーワード：受容体　共発現　オレキシン

※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。

１．研究の目的

申請者の所属する研究室では、新規睡眠障害治療薬の開発を目指して、覚醒維持に不可欠な神経ペプチドであるオレキシンの受容体を標的とした低分子化合物の探索を行っている。その評価にはオレキシン受容体の安定発現株（CHO 細胞等）の細胞内カルシウム上昇反応を指標としてきたが、より生体内に近い条件での低分子化合物への応答を検討するために、新たに一過性発現系でのカルシウム反応解析の最適化を目指している。

先行研究ではオレキシン 1 型受容体の C 末端に緑色蛍光蛋白 GFP を連結させた発現ベクターと、オレキシン２型受容体に赤色蛍光蛋白 mCherry を連結させた発現ベクターを一過性に共発現させた細胞を作成し、オレキシンに対する単一細胞レベルでのカルシウム反応を計測することに成功した。しかしながらこの方法では、それぞれの受容体および蛍光蛋白が必ずしも同量で発現するとは限らないという問題があった。

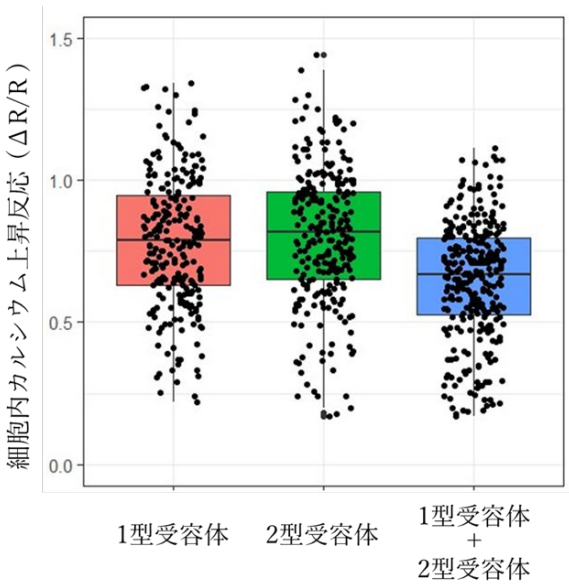
そこで本研究では、共発現系における受容体発現量を等しくするために 2A ペプチドを用いたターゲッティングベクターを新たに構築し、細胞内のカルシウム反応の比較を行った。

２．研究成果

本研究では新たに以下の 3 種のターゲッティングベクターを作成し、それぞれを CHO 細胞に発現させることに成功した。なお、受容体の発現は緑色蛍光蛋白 GFP の蛍光で確認した。

① オレキシン１型受容体-GFP
② オレキシン２型受容体-GFP
③ オレキシン１型受容体-オレキシン２型受容体-GFP

先行研究で確立した一過性発現系での単一細胞ごとのカルシウム上昇計測を行ったところ、①あるいは②のオレキシン受容体単一発現系ではオレキシンに対する細胞内カルシウム上昇に有意な差は見られなかった。しかしながら①あるいは②の単一発現系と比べ、③の共発現系ではオレキシンに対するカルシウム上昇が有意に減少することが明らかになった。（右図）



このことは受容するのが同じオレキシンでも受容体発現パターンによって細胞内シグナル伝達が異なることを示唆している。脳内では神経細胞のタイプによってオレキシン受容体の発現パターンも異なる。さらにオレキシン受容体活性化の機能的意義は覚醒のみならず情動など多岐にわたり、受容体の型によっても異なることが判っている。本研究の成果はオレキシン機能の多様性に受容体の発現パターンとシグナル伝達の差異が寄与することを示唆する。

今後はこの発現パターンによる応答性の違いのメカニズムについてさらに追及していく。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名