

機関番号：34428

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790099

研究課題名（和文） 興奮性シグナルによる AMPK 活性化と GABA<sub>B</sub> 受容体の脱感作抑制機構の解明研究課題名（英文） Possible regulation by excitatory signals on GABA<sub>B</sub> receptor desensitization via AMPK activation.

研究代表者

倉本 展行 (KURAMOTO NOBUYUKI)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：60324092

研究成果の概要（和文）：

GABA<sub>B</sub> 受容体 R2 サブユニットの AMPK によるリン酸化部位 p783 レベルの上昇は、同受容体の脱感作を抑制する。p783 レベルは DMEM 培地で培養した神経細胞に対して NMDA を曝露することで増加した。一方このリン酸化部位は少なくとも *in vitro* 実験系で AMPK の活性低下とともに、容易に脱リン酸化されることが判明した。したがって GABA<sub>B</sub> 受容体の作用は AMPK の活性化に対して鋭敏に影響されることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：

The increase in the p783 level, which is AMPK-dependent phosphorylation site on GABA<sub>B</sub> receptors R2 subunit, suppresses desensitization of the receptors. The p783 level was increased by NMDA exposure in the primary neurons, which were cultured in DMEM-based medium. On the other hand, the phosphorylation site immediately dephosphorylated *in vitro* system, according to the decrease in AMPK activity. It is thus suggested that GABA<sub>B</sub> receptors functions were promptly regulated by the alteration of AMPK activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学

## 1. 研究開始当初の背景

受容体の脱感作・過感受性化は、受容体蛋白質そのもののリン酸化・脱リン酸化による機能変動、もしくは細胞膜上に提示されている総受容体数の変動などが主要な原因だと考えられている。GABA<sub>B</sub> 受容体の R2 サブユニットの C 末端を含む細胞内領域に位置する 892 番目のセリン残基 (S892) が PKA により、さらに 783 番目のセリン残基 (S783) が AMP キナーゼ (AMPK) によ

りそれぞれリン酸化されることを明らかにされている。GABA<sub>B</sub> 受容体はアゴニストによる反復刺激によって受容体の脱感作を起こすが、これら R2 のリン酸化は、それぞれこの脱感作の程度を軽減する。すなわち、R2 のリン酸化は GABA<sub>B</sub> 受容体の機能を長期保持するのである。このようなリン酸化による脱感作軽減のメカニズムの詳細や、生理学的なあるいは病態生理学的な意義は不明である。

## 2. 研究の目的

- (1) GABA<sub>B</sub> 受容体のターンオーバー : GABA<sub>B</sub> 受容体の細胞内局在、二量体形成、細胞膜提示などの情報を細胞生物学的、生化学的手法により検討する。発現蛋白質量に対するリン酸化の割合や、リン酸化の部位を脱リン酸化する酵素の同定、およびその程度について、情報を収集する。
- (2) プレコンディショニング : マウスに興奮性毒性を示す薬物 NMDA を適用しておく、海馬の特定の領域が、次の興奮性毒性に対して耐性を獲得することがある。このプレコンディショニングに着目し、GABA<sub>B</sub> 受容体のリン酸化有無による機能変動を解析するための手段として、マウス初代培養神経細胞や海馬急性スライスを調製し、グルタミン酸などによる興奮性刺激、および、GABA などによる抑制性刺激に対して応答する実験系を確立する。
- (3) 興奮性毒性に対する GABA<sub>B</sub> 受容体アゴニストの保護作用の可能性 : (2) で調製した条件に対して、興奮性刺激に伴う抑制性伝達能の変動とその後の興奮性刺激に対する応答および、抑制性刺激に伴うその後の興奮性刺激に対する応答の測定を試みる。

## 3. 研究の方法

- (1) 細胞内局在の検討
  - ① 0.32 M スクロースによるマウス脳ホモジネートを、1,000 *xg*、20,000 *xg* 次いで 100,000 *xg* で遠心分離により分画し、受容体蛋白質の局在を探索した。
  - ② 培養神経細胞を細胞免疫染色して、R2 やそのリン酸化の局在を検討した。
- (2) 受容体サブユニットの単離とリン酸化
  - ① 免疫沈降法 : R1、R2 の各サブユニット、またはリン酸化受容体特異的抗体による免疫沈降を脳ホモジネートで試みた。
  - ② プルダウン法 : R1 および R2 の各サブユニットからなる GST 融合蛋白質を大腸菌で合成、これを精製し、R1 および R2 の各サブユニットと結合する蛋白質を脳ホモジネートからの単離を試みた。
  - ③ 脱リン酸化酵素の探索 : 精製酵素を用いて、*in vitro* による p892 及び p783 の脱リン酸化反応を試みた。
- (3) 海馬急性スライスの調製  
成体マウス海馬を 500  $\mu\text{m}$  の厚さにスライスし、人工脳脊髄液で 120 分間賦活化した。賦活中の R2 とそのリン酸化をウェスタンブロッティング法により定量した。
- (4) 初代神経細胞の培養と興奮性毒性
  - ① マウス E14 の大脳皮質から調製した初代培養神経細胞を、Neurobasal あるいは、DMEM を用いた方法により調製し、培養

日数と 2 つの培地の相違に伴う受容体発現とリン酸化の相違を解析した。

② 培養 8-9 日目に、NMDA 曝露もしくは、メトホルミン曝露による AMPK の活性化と p783 レベルの増加をウェスタンブロッティング法により測定した。

### (5) 蛍光指示薬を用いた解析

- ① Fluo-4 を用いて培養神経細胞内の細胞 Ca<sup>2+</sup>イオン濃度及び NMDA などの薬物曝露によるその濃度の変動を測定した。
- ② 膜電位指示薬 DiBAC<sub>4</sub>(3) 及び DiSC<sub>3</sub>(5) を適用し、KCl あるいは NMDA 曝露に伴う脱分極、GABA あるいは Baclofen 曝露に伴う過分極の測定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内局在の検討

① R2 サブユニットは、1,000 *xg* および 20,000 *xg* により沈殿として得られた。これを NP-40 あるいは RIPA 緩衝液により可溶化を試みたが、R2 サブユニットは約 50% 可溶化できたものの、残りを完全に溶解することは出来ず、界面活性剤濃度上昇に伴い、R2 蛋白質の分解が促進された。R2 サブユニットのリン酸化部位のうち、p892 は R2 の挙動と同じであったが、p783 は可溶性画分に検出された。AMPK も同様に、可溶性画分に局在していた。

② 細胞免疫染色法により、R2 サブユニットおよび 2 つのリン酸化部位のシグナルは、神経細胞のスパイン様の構造、樹状突起、軸索、核以外の細胞体など至る所に存在していることがわかり、常に十分量発現していることが示唆された。

(2) 受容体サブユニットの単離とリン酸化  
免疫沈降法及びプルダウン法により、R1 は R2 を、R2 は R1 を共沈降させることがわかった。沈降した蛋白質には p892 は検出されたが、p783 は検出されなかった。これは、p783 が二量体状態以外の R2 にのみ存在する可能性を想起させた。しかしながら、p783 抗体で免疫沈降したところ、沈降物には R2 が検出されたものの、p783 は検出されず、沈降作業中に p783 抗体陽性シグナルが消失してしまい、このリン酸化部位が脱リン酸化されやすいことが判明した。したがって、これら沈降法により精製した R2 から p783 を脱リン酸化する方法は適用できなかった。一方 p892 は、免疫沈降で集めた R2 に精製酵素を作用させたところ、PP1 および PP2A により脱リン酸化することが判明した。

### (3) 海馬急性スライスの調製

急性スライスの賦活化処理は、その後の電気生理学的な解析に用いられるもので、一般的に神経細胞の機能を失ってはいないはずである。その裏付けとして、神経細胞

のマーカー蛋白質 $\beta$ -チューブリンや、R2、AMPK は消失しなかった。p892 は 120 分の賦活化処理により約 80%まで減少した。一方、p783 や AMPK の活性を表す 172 番目のスレオニンのリン酸化は 120 分間の賦活化処理によりほぼ完全に消失した。賦活化処理液が高濃度グルコースであったことから、AMPK の活性が低下し、p783 が何らかの脱リン酸化酵素で速やかに脱リン酸かされたのかもしれない。

#### (4) 初代神経細胞の培養と興奮性毒性

① Neurobasal あるいは DMEM を基本とした培地とともに初代培養神経細胞では、培養初期に R2 の発現はほとんど認められず、培養日数に伴い発現は増加した。p892 レベルは R2 の発現と同様に培養日数に応じて増加したが、p783 レベルはむしろ培養初期に高く、培養日数に応じて減弱することが判明した。p783 レベルは幼弱な神経細胞での役割があるのかも知れない。

② 興奮性毒性を示す薬物として、本研究では NMDA を用いた。100  $\mu$ M NMDA を 15 分間曝露すると、24 時間以内に、MTT 還元能の低下、ヘキスト染色による核の凝集などが増加し、遅発性神経細胞死が起こることが判明した。この時 Neurobasal を基本とした培地では p783 レベルに変化は見られなかったが、DMEM を基本とした培地では、AMPK の活性化(リン酸化レベルの増加)とともに、p783 レベルが増加した。メトホルミン曝露でも同様に、AMPK の活性化が認められた。

#### (5) 蛍光指示薬を用いた解析

① 初代培養 5 日目の培養細胞に Fluo-4 を適用した後、KCl あるいは NMDA を曝露したところ、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴う蛍光強度の増加を測定出来た。

② 膜電位指示薬による検討でも同様に、KCl あるいは NMDA 曝露による脱分極を測定出来た。一方、GABA による過分極を測定できたが、Baclofen による過分極は観察されなかった。これは共役する K<sup>+</sup>チャネル (GIRK) が発現していないことに起因することが示唆された。

#### (6) 考察

以上のことから、少なくとも DMEM 培地で培養した神経細胞では、NMDA などの興奮性毒性にตอบสนองして p783 レベルが増加し、GABA<sub>B</sub> 受容体の機能を制御する可能性が示唆される。一方このリン酸化部位は少なくとも *in vitro* 実験系で AMPK の活性低下とともに、容易に脱リン酸化されることが判明し、したがって GABA<sub>B</sub> 受容体の作用は AMPK の活性化に対して鋭敏影響されることが示唆される。本研究では神経細胞に対する Baclofen 曝露による過分極を測定出来なかったが、今後は、細胞内

シグナル cAMP 量測定を予定し、NMDA などの興奮性刺激後の GABA<sub>B</sub> 受容体を介した cAMP 合成抑制作用への影響もしくは、GABA<sub>B</sub> 受容体適用後の NMDA 受容体を介した興奮性毒性抑制への作用を検討する予定である。このリン酸化部位では、神経細胞の培養初期にそのリン酸化レベルが高く維持されていることから、培養初期の未成熟な細胞での役割などが想起され、表題のような GABA<sub>B</sub> 受容体の興奮刺激に対する保護作用だけでなく、例えば GABA<sub>B</sub> 受容体の神経細胞の成熟に対する役割というような新たな機能発見に繋がる可能性もあり、今後も慎重な検討を図るべきだと考えられる。

#### 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 2 件)

1. Nobuyuki Kuramoto, Keiichi Seko, Chie Sugiyama, Makoto Shuto, Kiyokazu Ogita (2011) Trimethyltin initially activates the caspase 8/caspase 3 pathway for damaging the primary-cultured cortical neurons derived from embryonic mice. *J. Neurosci. Res.* in press
2. Makoto Shuto, Kei Higuchi, Chie Sugiyama, Masanori Yoneyama, Nobuyuki Kuramoto, Reiko Nagashima, Koichi Kawada, Kiyokazu Ogita K. (2009) Endogenous and exogenous glucocorticoids prevent trimethyltin from causing neuronal degeneration of the mouse brain *in vivo*: involvement of oxidative stress pathways. *J Pharmacol Sci.* 110 424-436.

[学会発表] (計 25 件)

1. 田中菜月、倉本展行、米山雅紀、荻田喜代一 (2010) 胎児大脳皮質由来神経系幹細胞の 5'-AMP-activated protein kinase シグナルはリアノジン受容体チャネルにより活性化される。第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)、神戸、12 月 10 日。
2. 新原博輝、甲谷 章、倉本展行、荻田喜代一 (2010) 神経細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体 R2 サブユニット S783 のリン酸化調節。第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)、神戸、12 月 10 日。
3. 甲谷 章、鷺田水保、伊藤慎智子、倉本展行、荻田喜代一 (2010) 神経興奮抑制による GABA<sub>B</sub> 受容体の脱リン酸化と機能変動の可能性 Possible of dephosphorylation and functional move of GABA<sub>B</sub> receptor by inhibition

- neuronal excitation. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)、神戸、12月8日.
4. 甲谷 章、鷲田水保、伊藤慎智子、倉本展行、荻田喜代一 (2010) GABA<sub>B</sub> 受容体のリン酸化と脱リン酸化の調節 第60回日本薬学会近畿支部大会・総会、大阪 (摂南)、10月30日.
  5. 新原博輝、甲谷 章、倉本展行、荻田喜代一 (2010) 大脳皮質由来初代培養神経細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体 R2 サブユニットの発現と S783 のリン酸化 第60回日本薬学会近畿支部大会・総会、大阪 (摂南)、10月30日.
  6. 新原博輝、甲谷 章、倉本展行、荻田喜代一 (2010) 初代培養大脳皮質神経細胞における GABA<sub>B</sub>R2 サブユニット S783 のリン酸化の変動次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2010、京都、9月11日.
  7. 田中菜月、佐野尚平、倉本展行、米山雅紀、荻田喜代一 (2010) メトホルミンによる 5'-AMP-activated protein kinase の活性化はリアノジン受容体介在性 Ca<sup>2+</sup>シグナリングを介して神経系幹/前駆細胞の増殖を促進する Activation of 5'-AMP-activated protein kinase by metformin promotes proliferation of the neural stem/progenitor cells via ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling. 第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学会大会、第20回日本神経回路学会大会 合同大会 (Neuro2010)、神戸、9月2日.
  8. Akira Koutani, Hiroki Niihara, Nobuyuki Kuramoto and Kiyokazu Ogita (2010) Possible regulation of GABA<sub>B</sub> receptors expression by phosphatases. 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Copenhagen, Denmark, July 20.
  9. Nobuyuki Kuramoto, Shohei Sano, Natsuki Tanaka, Masanori Yoneyama and Kiyokazu Ogita (2010) Involvement of 5'-AMP-activated protein kinase in proliferation and survival of neural stem/progenitor cells. 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Copenhagen, Denmark, July 20.
  10. 田中菜月、佐野尚平、倉本展行、米山雅紀、荻田喜代一 (2010) リアノジン受容体を介する 5'-AMP-activated protein kinaseシグナルによる神経系幹・前駆細胞の増殖制御。神経組織の成長・再生・移植研究会第25回学術集会 (第25回GRT研究会)、大阪、5月21日.
  11. 倉本展行、佐野尚平、米山雅紀、川田浩一、荻田喜代一 (2010) 神経系幹/前駆細胞の増殖におけるリアノジン受容体感受性 5'-AMP activated protein kinase シグナルの関与 日本薬学会第130年会、岡山、3月30日.
  12. 甲谷章、田中菜月、新原博輝、倉本展行、荻田喜代一 (2010) 海馬急性スライスにおける GABA<sub>B</sub> 受容体 R2 サブユニットの脱リン酸化 日本薬学会第130年会、岡山、3月28日.
  13. 佐野尚平、倉本展行、米山雅紀、荻田喜代一 (2010) リアノジン受容体は神経系幹・前駆細胞の増殖における 5'-AMP activated protein kinaseシグナルに關与する 第83回日本薬理学会年会、大阪、3月16日.
  14. Akira Koutani, Nobuyuki Kuramoto, Natsuki Tanaka, Hiroki Niihara and Kiyokazu Ogita (2009) Possible regulation of synaptic activity-dependent phosphorylation of GABA<sub>B</sub>R2 subunit. The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Japan, Nov. 14.
  15. Makoto Shuto, Chie Sugiyama, Gabriela Acosta, Nobuyuki Kuramoto, and Kiyokazu Ogita (2009) Involvement of mineralocorticoid receptor in trimethyltin-induced neuronal cell damage in the dentate gyrus of mouse brain. he 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Japan, Nov. 14.
  16. Nobuyuki Kuramoto and Kiyokazu Ogita (2009) Excitatory signals induce phosphorylation of inhibitory GABA<sub>B</sub> receptor subunit. he 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Japan, Nov. 14.
  17. Reiko Nagashima, Nobuyuki Kuramoto and Kiyokazu Ogita (2009) Activation of 5'-AMP-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase signals in cochlear spiral ligament fibrocytes by intense noise exposure. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSJ Joint Meeting, Busan, Korea, August 28.
  18. 甲谷章、倉本展行、荻田喜代一 (2009) GABA<sub>B</sub> 受容体サブユニットの脳内発現分布とリン酸化次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2009、東京、8月24日.
  19. Shohei Sano, Nobuyuki Kuramoto, Masanori Yoneyama, Reiko Nagashima, Koichi Kawada and Kiyokazu Ogita (2009) Possible involvement of 5'-AMP-activated protein kinase in proliferation and survival of neural stem/progenitor cells derived from the neocortex of embryonic mice. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSJ Joint Meeting, Busan, Korea, August 23.
  20. 甲谷章、倉本展行、田中菜月、新原博輝、荻田喜代一 (2009) GABA<sub>B</sub>受容体 R2 サブユニットの恒常的リン酸化 第115回日本薬理学会近畿部会、金沢、6月26日.
  21. 首藤誠、倉本展行、杉山 千絵、荻田 喜代一 (2009) トリメチルスズ誘発性神経細胞傷害における JNK 経路の関与 第115回日本薬理学会近畿部会、金沢、6月26日.
  22. 佐野尚平、倉本展行、米山雅紀、長嶋玲子、川田浩一、荻田喜代一 (2009) 大脳皮質由来神経系前駆細胞の生存及び増殖における 5'-AMP activated protein kinase の関与の可能性 Possible involvement of 5'-AMP-activated protein kinase in proliferation and survival of neuroal stem/progenitor cells derived from the neocortex. 第52回日本神経化学会、群馬・伊香保、6月22-23日.

23. 長嶋玲子、田中始、倉本展行、荻田喜代一  
(2009) 強音曝露は蝸牛靱帯線維細胞の  
5'-AMP-activated protein kinase/c-Jun  
N-terminal kinase 経路を活性化する In vivo  
intense noise exposure activates  
5'-AMP-activated protein kinase/c-Jun  
N-terminal kinase pathway in the cochlear  
spiral ligament fibrocytes of mice. 第 52 回日  
本神経化学会、群馬・伊香保、6 月 22-23 日.
24. 佐野尚平、長嶋玲子、米山雅紀、川田浩一、  
倉本展行、荻田喜代一 (2009) 大脳皮質由来神経  
系前駆細胞の増殖/生存における  
5'AMP-activated protein kinase の役割。神経組  
織の成長・再生・移植研究会第 24 回学術集会、  
伊香保、6 月 21 日.
25. 甲谷章、倉本展行、荻田喜代一 (2009)  
GABA<sub>B</sub>R2 サブユニット上の serine 892 のリン  
酸化および脱リン酸化 Phosphorylation and  
dephosphorylation at serine 892 on GABA<sub>B</sub>R2  
subunit. 第 52 回日本神経化学会、群馬・伊香  
保、6 月 22-23 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakuri/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉本 展行 (KURAMOTO NOBUYUKI)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：60324092

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし