

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 24 年 3 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790448

研究課題名（和文）：プリオン関連蛋白質による神経細胞変性死へのグルタミン酸受容体の関与とその分子機構

研究課題名（英文）：The involvement and mechanism of mGluR1 for neurodegeneration induced by prion protein

研究代表者

松原 岳大（MATSUBARA TAKEHIRO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10513294

研究成果の概要（和文）：

我々はprion protein (PrP)がmetabotropic glutamate receptor type I (mGluR1)と結合していることを見出した。さらに、この結合を通してPrPがmGluR1の活性化を調節し、細胞内Ca²⁺の濃度調節に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We found out that PrP bound to mGluR1 and through this binding, PrP modulated the activation of mGluR1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：プリオン

1. 研究開始当初の背景

（1）正常型プリオン蛋白質(PrP)の生理的機能は未だ明確ではない。その機能を調べるために我々はPrPノックアウト(KO)マウスを作製したが、このマウスは小脳プルキンエ細胞変性死を起こした。これは後に、PrP欠損に加え Doppel(Dpl)という蛋白質が異所性に発現するために起こることがわかった。DplはPrPと立体構造が類似しており、違いはDplにはPrPのN末に存在する Octapeptide repeats(OR) や Central hydrophobic region(CR)がないことである。また、PrPのN末欠損(PrP Δ 32-121)や、CR領域欠損(PrP Δ CR)Tgマウスもプルキンエ細胞の変性

作用を持つことが知られている。さらにこれらのKOマウスに野生型PrPを導入すると、プルキンエ細胞の変性死が抑えられたことから、PrPが神経保護作用を有していることが示唆された。

（2）これまでにPrPは、様々なシタンパク質と結合し、シグナル伝達や免疫、apoptosisなどに関与していることが報告されている。このことから（1）で示唆された神経保護作用はプルキンエ細胞に存在する蛋白質と結合することで発揮されていることが考えられた。

（3）また、異常型プリオン蛋白質によって

引き起こされるプリオン病や、アルツハイマー病などではCa²⁺ signalingの異常が報告されている。Ca²⁺は重要なセカンドメッセンジャーであり、様々な生命活動に関与していることが知られている。さらにはPrP自身が細胞内におけるCa²⁺の動態の調節に関与していることが報告されている。

(4)そこで我々は、プルキンエ細胞に豊富に発現しているmGluR1に着目した。この蛋白質は7回膜貫通型の受容体でligand刺激によって、PLCβを介して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させることが報告されている。これらのことから、PrPがmGluR1と結合し、この結合を通してmGluR1の活性化を調節し、細胞内のCa²⁺の動態に影響を与えていると我々は推測した。

2. 研究の目的

(1) PrPとmGluR1と結合していることを明らかにする。

(2) この結合を介してPrPがmGluR1の活性化を制御し、細胞内Ca²⁺濃度の調節に関与していることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法によるPrPとmGluR1の結合の証明

①マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a (N2a) 細胞にPrP及びmGluR1を共発現させた。共発現させた細胞を回収し、蛋白質を溶出した。抗PrP抗体及び抗mGluR1抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルをSDS-PAGE及びWBに供与し、PrP、mGluR1の共沈を検証した。

②同様の実験を3週齢マウスから採取した小脳を用いて行った。採取した小脳から、蛋白質を溶出した。抗PrP抗体及び抗mGluR1抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルをSDS-PAGE及びWBに供与し、PrP、mGluR1の共沈を検証した。

(2) FRET assayによるPrPとmGluR1の結合の証明

蛍光タンパク質(Cerulean, Venus)を融合させたPrP及びmGluR1を作製した(mGluR1-Cerulean, PrP-Venus)。これらの融合蛋白質をN2a細胞に共発現させた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、acceptor bleaching法によるFRET効率の計測を行った。

(3) Ca²⁺ imagingによるPrPによるmGluR1活性

化調節

N2a細胞を用いて、PrP及びmGluR1両方を恒常的に発現しているstable cell lineを作製した。これらの細胞にCa²⁺指示薬であるFluo-8を取り込ませ、mGluR1アゴニストである(S)-3, 5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG)刺激下での指示薬の蛍光変化を観察した。また今回、Ca²⁺の濃度変化をより詳細に観察するため、DHPG複数回刺激下における蛍光変化を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) PrPとmGluR1の結合

mGluR1及びPrPを共発現させたN2a細胞から、蛋白質を溶出し、抗mGluR1抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、PrPの共沈を確認した。(Fig. 1赤枠)

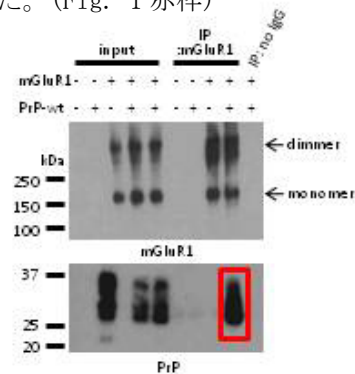


Fig. 1

また抗PrP抗体を用いて同様に免疫沈降を行ったところ、mGluR1の共沈を確認した。(Fig. 2青枠)

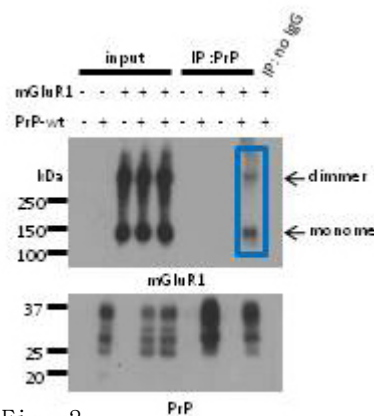


Fig. 2

さらに、マウス小脳を用いて、免疫沈降を行った。その結果、抗mGluR1抗体を用いた場合はPrP (Fig. 3赤枠)の、抗PrP抗体を用いた場合はmGluR1 (Fig. 3青枠)の共沈をも確認した。このことからPrPとmGluR1が結合していることが分かった。

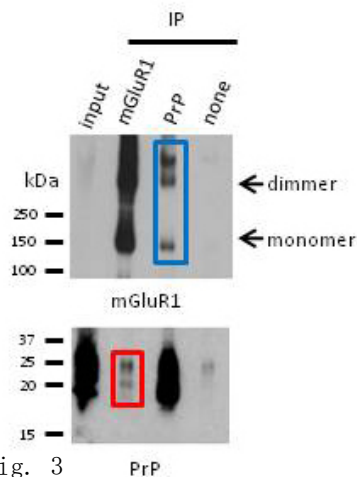


Fig. 3

続いてPrPとmGluR1の結合をFRET assayを用いて検証した。

mGluR1-CeruleanとPrP-Venusを共発現させ、acceptor bleaching法によりFRET assayを行った。PrP-Venusに対してbleachingを行ったところ(bleaching領域はFig. 4 all area内にて白枠で示した)、Venusの蛍光はほとんど消失した(Fig. 4 PrP-Venus bleach area)。しかし一方でbleaching後、Ceruleanの蛍光は増強していることが認められた(Fig. 4 mGluR1-Cerulean bleach area)。この結果はPrP-VenusとmGluR1-Cerulean間でenergy transferが起きていることを示しており、PrPとmGluR1が結合していることが明らかになった。

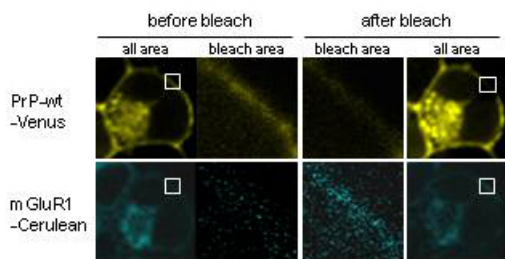


Fig. 4

最後にPrPとmGluR1の機能的な相関関係を検討した。作製したPrPとmGluR1を恒常的に発現しているN2a細胞にCa²⁺指示薬Fluo-8を取り込ませた。mGluR1アゴニストであるDHPGの複数回刺激下におけるFluo-8の蛍光強度の変化を観察した。それぞれ典型的な蛍光強度の変化をFig. 5のグラフに示した。なお、グラフ両端の灰色の棒グラフ及びそれを結ぶ黒線は、DHPGの添加を表している。

mGluR1単独の発現細胞では、一度の刺激で複数回の濃度上昇や、一回目や二回目の刺激では反応せず、3回目の刺激でのみ反応を示すものや、上昇した濃度が維持されるなど、著しく不規則な反応を示した(Fig. 5 N2a

+mGluR1)。一方で、PrPとmGluR1を両方とも恒常的に発現している細胞では、刺激後すぐに濃度上昇が認められ、数秒後には刺激前の濃度と同水準までに戻った。多くの細胞で、このように統率のとれた濃度変化が認められた(Fig. 5 N2a +mGluR1 +PrP)。このことからPrPによってmGluR1の活性化が制御されていることが示唆された。

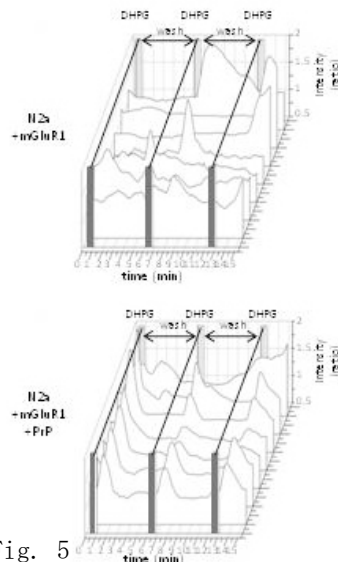


Fig. 5

これらのことから、PrPはmGluR1と結合し、この結合を介してmGluR1の活性化を調節することで、PrPが細胞内Ca²⁺濃度の制御に関与していることが明らかになった

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0件)

[学会発表] (計4件)

1: ポスター Takehiro Matsubara, Katsuya Satoh, Yasuhito Uezono, Noriyuki Nishida. Cellular prion protein regulates the function of metabotropic glutamate receptor type I, through the binding. プリオン研究会、長野県軽井沢、2011年7月10日

2: ポスター Takehiro Matsubara, Yasuhito Uezono, Noriyuki Nishida. Cellular prion protein regulates the intracellular Ca²⁺ signaling through it

binding to metabotropic glutamate receptor type I, mGluR1. 日本分子生物学会・生化学会合同大会、兵庫県神戸、2010年12月7日

3: ポスター Takehiro Matsubara, Naohiro Yamaguchi, Yuka Sudo, Yasuhito Uezono, Noriyuki Nishida. Cellular prion protein binds to metabotropic glutamate receptor type I and regulates its function 日本分子生物学会、神奈川県横浜、2009年12月9日

4: ポスター Takehiro Matsubara, Naohiro Yamaguchi, Yuka Sudo, Suehiro Sakaguchi, Yuko Ando, Noriyuki Nishida, Yasuhito Uezono. 異常型プリオン蛋白質による神経細胞変性死におけるmGluR1の役割とプリオン蛋白質との相互作用 日本薬理学会、神奈川県横浜、2009年3月16日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 岳大 (Matsubara Takehiro)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：10513294

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし