

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430012

研究課題名(和文)ヘテロGPCR変調によるシナプス可塑性調整機構：表面プラズモン共鳴による解析

研究課題名(英文)Regulation of synaptic plasticity via hetero-GPCR modulation: an analysis using surface plasmon resonance imaging

研究代表者

田端 俊英 (Tabata, Toshihide)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：80303270

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)：運動学習を支えるシナプス可塑性をトリガーする小脳プルキンエ細胞の代謝型グルタミン酸受容体mGluR1は、代謝型アデノシン受容体A1Rや代謝型GABA受容体GABAbRと複合体化していることが示唆されている。還元的な強制発現系(HEK-293細胞)に表面プラズモン共鳴および蛍光イメージングを適用し、これら受容体間の相互作用が1)ニューロン特異的細胞内環境に依存しないこと、2)Gi/oタンパク質による仲介を必要としないこと、3)脳髄液に蓄積するレベルのアデノシン、GABAの濃度変化によって動的に誘発され得ることを示した。これらの結果から、小脳運動学習の調整メカニズムの一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In cerebellar Purkinje cells, type-1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1), which serves as the trigger of synaptic plasticity underlying motor learning, is suggested to be complexed with adenosine A1 receptor (A1R) and B-type gamma-aminobutyric acid receptor (GABAbR). We applied surface plasmon resonance imaging and fluorometry to HEK-293 cells heterologously expressing these receptors and found that A1R and GABAbR can form complexes with mGluR1 and modulate mGluR1 signaling without the neuron-specific cellular environment. We also found that these modulations do not require Gi/o protein and may be induced dynamically with cerebrospinal fluid levels of adenosine and GABA. These findings provide an insight into the regulatory mechanism of cerebellar motor learning.

研究分野：神経生理学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 ニューロン シナプス可塑性 グルタミン酸 ガンマ・アミノ酪酸 Cキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含む動物は注意や興味に応じて学習効率を調整し、生存に重要な事物を選択的に学習すると考えられる。学習効率を調整するために、記憶の固定に関わるシナプス可塑的变化の誘導を促進あるいは阻害するしくみが存在すると考えられるが、その実体は分かっていなかった。研究代表者はこれまでに運動学習を支えるシナプス可塑的变化(小脳長期抑圧)をモデルとして、学習効率を調整するしくみを追究してきた。その中で、小脳長期抑圧の誘導をトリガーする小脳プルキンエ細胞の1型代謝型(Gタンパク質共役型)グルタミン酸受容体 mGluR1 が別種の代謝型受容体(B型-アミノ酪酸受容体 GABA_BR、1型アデノシン受容体 A1R)と複合体を形成し、これら受容体を介して mGluR1 シグナリングが増強あるいは抑制され、小脳長期抑圧の誘導が促進あるいは阻害される可能性を示した。

(2) 代謝型受容体の相互作用はシナプス可塑的变化および学習効率の調整機序として極めて魅力的であるが、小脳組織あるいは小脳プルキンエ細胞を標本とした従来の実験系では、このような機構を分子レベルで実証的かつ詳細に解析することが困難であった。なぜなら、ニューロンには当該受容体以外にも多くの受容体やそれらと相互作用するアダプター・タンパク質やシグナル分子が存在しており、当該受容体だけに焦点を当てて分子レベルの挙動を観察することが難しいからである。

2. 研究の目的

(1) ニューロン特異的細胞内環境を有さない還元的環境下において mGluR1 と GABA_BR もしくは A1R を共発現させたとき、GABA_BR-mGluR1 複合体および A1R-mGluR1 複合体が再構築されるかを調べた。

(2) また強制発現系においてこれらの受容体間に機能的な相互作用が生じるか否か、さらに還元的環境を利用して相互作用の分子機序を詳細に調べた。

3. 研究の方法

(1) tet-Op プロモーター支配下で mGluR1 サブユニットと A1R サブユニット、GABA_BR1 サブユニット、GABA_BR2 サブユニットをさまざまな組み合わせで発現する HEK-293 細胞を作出した。

(2) HEK-293 細胞から抽出したタンパク質に免疫共沈を適用し、受容体どうしが複合体化するか否かを検討した。励起・発光波長の異なる蛍光タンパク質を融合させた A1R および mGluR1 を共発現させた細胞に Förster resonance energy transfer (FRET) 測定を適用し、これら受容体の複合体形成を確認した。

(3) mGluR1 が活性化されると、共役する G_{q/11} タンパク質を介して protein kinase C (PKC) が活性化される。活性化した PKC は細胞質から細胞膜に移動する性質がある。さらに mGluR1 はイノシトール3リン酸受容体を介して細胞内ストアからの Ca²⁺の流出(細胞質 Ca²⁺濃度上昇)と関連する。PKCの移動を表面プラズモン共鳴(SPR)イメージングにより捉えるか、もしくは細胞質 Ca²⁺濃度上昇を fura-2 による蛍光イメージングによって捉えることにより、mGluR1 シグナリングの強度を評価した。

4. 研究成果

(1) 免疫共沈および FRET 測定により、GABA_BR-mGluR1 複合体および A1R-mGluR1 複合体が形成されることが明確に証明された。また複合体形成にニューロン特異的な細胞内環境が必須でないことが分かった。GABA_BR 受容体を形成する GABA_BR1 サブユニットと GABA_BR2 サブユニットのうち、前者

が mGluR1 との複合体形成でより重要であることが分かった。アラニン置換実験により、A1R の細胞膜に近接する部位が mGluR1 との結合に重要であることが分かった。

(2) 10^{-8} M の A1R アゴニストあるいは GABA_BR アゴニスト baclofen を事前投与すると、mGluR1 アゴニスト DHPG に誘発される mGluR1 シグナリングがそれぞれ消失あるいは 50-500 % 増大した。GABA_BR、A1R に共役する $G_{i/o}$ タンパク質を百日咳毒素によって阻害しても、baclofen の作用が見られた。 $G_{i/o}$ タンパク質活性剤 mastoparan の投与では mGluR1 シグナリングの減弱 / 増強を模倣できなかつた。GABA_BR1 サブユニットあるいは GABA_BR2 サブユニットのいずれかと mGluR1 を共発現した状態では、baclofen による mGluR1 シグナリングの増強が見られなかつた。Bioluminescence アッセイによって上記の実験で用いた濃度の百日咳毒素および mastoparan が実際に $G_{i/o}$ タンパク質をそれぞれ抑制、活性化していたことを確認した。

(3) GABA_BR の天然アゴニスト (GABA) により mGluR1 シグナリングを増強できることも確認され、この作用の解離定数は 63 nM であった。

(4) これらの結果は、i) A1R-mGluR1 および GABA_BR-mGluR1 はニューロン特異的細胞内環境に依存せず、内在的な性質により複合体を形成し、かつ相互作用すること、ii) 相互作用の仲介にはセカンド・メッセンジャー・カスケードが重要でないこと、iii) 神経活動依存的に脳部位の局所に蓄積する $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M の GABA やアデノシンの濃度変化によって相互作用が動的に誘発されること、を示唆している。以上のことから、A1R-mGluR1 および GABA_BR-mGluR1 の複合体形成・相互作用はシナプス可塑的变化および学習の促進・阻害の少なくとも一部を担っている可能性が高く、さらに小脳以

外の脳部位でも普遍的にシナプス可塑的变化やその他の mGluR1 介在性シナプス・シグナリングの調整に大きな影響を与えている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 14 件)

Yokoyama R, Kinoshita K, Hata Y, Abe M, Matsuoka K, Hirono K, Kano M, Nakazawa M, Ichida F, Nishida N, Tabata T, A mutant HCN4 channel in a family with bradycardia, left bundle branch block, and left ventricular noncompaction, Heart and Vessels, 査読有, in press.

DOI:10.1007/s00380-018-1116-6

上窪裕二、田端俊英、アデノシン受容体をターゲットとした臨床応用と最新研究、Clinical Neuroscience、査読無、35:128-129, 2017.

田端俊英、上窪裕二、アデノシン受容体の神経系における機能と役割、Clinical Neuroscience、査読無、35:10-11, 2017.

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, 査読有, 16:1-9, 2016.

DOI:10.1186/s12896-016-0266-9

Kinoshita K, Takahashi H, Hata Y, Nishide K, Kato M, Fujita H, Yoshida S, Murai K, Mizumaki K, Nishida K, Yamaguchi Y, Kano M, Tabata T, Nishida N, SCN5A(K817E), a novel Brugada syndrome-associated mutation that alters the activation gating of NaV1.5 channel, Heart Rhythm, 査読有, 13:1113-1120, 2016. DOI:10.1016/j.hrthm.2016.01.008

田端俊英、上窪裕二、アデノシン受容体の種類とあらまし、Clinical Neuroscience、査読無、34:1288-1289, 2016.

上窪裕二、田端俊英、グループII型およびIII型代謝型グルタミン酸受容体の生理的および薬理的作用、Clinical Neuroscience、査読無、34:256-257, 2016.

上窪裕二、田端俊英、グループI型代謝型グルタミン酸受容体の生理的および薬理的作用、Clinical Neuroscience、査読無、34:136-137, 2016.

上窪裕二、田端俊英、代謝型グルタミン酸受容体の構造と種類、Clinical Neuroscience、査読無、34:8-9, 2016.

Kamikubo Y, Tabata T, Sakairi H, Hashimoto Y, Sakurai T, Complex formation and functional interaction between adenosine A1 receptor and type-1 metabotropic glutamate receptor, Journal of Pharmacological Sciences, 査読有, 128:125-130, 2015. DOI:10.1016/j.jphs.2015.06.002

Hisajima N, Hata Y, Kinoshita K, Fukushima T, Nishida N, Kano M, Tabata T, The susceptibilities of human ether-a-go-go-related gene channel with the G487R mutation to arrhythmogenic factor, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 査読有, 38:781-784, 2015. DOI:10.1248/bpb.b14-00630

Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H, Altered actions of memantine and NMDA-induced currents in new Grid2-deleted mouse line, Genes, 査読有, 5:1095-1114, 2014. DOI:10.3390/genes5041095

Kinoshita K, Komatsu T, Nishide K, Hata Y, Hisajima N, Takahashi H, Kimoto K, Aonuma K, Tsushima E, Tabata T, Yoshida T, Mori H, Nishida K, Yamaguchi Y, Ichida F, Fukurotani K, Inoue H, Nishida N, A590T mutation in KCNQ1 C-terminal helix D decreases IKs channel trafficking and function but not Yotiao interaction, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 査読有, 72:273-280, 2014. DOI:10.1016/j.yjmcc.2014.03.019

Tabata T, Yamaguchi Y, Hata Y, Ichida F, Mori H, Modification of KCNH2-encoded cardiac potassium channels by KCNE1 polymorphisms,

Circulation Journal, 査読有,
78:2331-2331, 2014.
DOI:10.1253/circj.cj-14-0654

〔学会発表〕（計 11 件）

Abe M, Ikeda K, Ichiki A, Matsuoka K,
Sakairi H, Kamikubo Y, Sakurai T, Tabata T,
B-type GABA receptor serves as a
dynamic modulator increasing the
ligand-sensitivity of type-1
metabotropic glutamate receptor、日本神
経科学大会、2018、神戸

Kamikubo Y, Sakairi H, Tabata T,
Sakurai T, Signal crosstalk and
complex formation of mGluR1 and
GABABR、日本生理学会大会、2018、高
松

Matsuoka K, Abe M, Sakairi H,
Kamikubo Y, Sakurai T, Tabata T,
Complex formation and functional
interaction between mGluR1 and
GABABR in a heterologous expression
system、日本神経科学大会、2017、千
葉

Kamikubo Y, Sakairi H, Abe M,
Matsuoka K, Tabata T, Sakurai T,
Regulation of type-1 metabotropic
glutamate receptors function through
inter-GPCR interplay、日本薬理学会
年会、2017、長崎

Yoshida S, Kamikubo Y, Shinohara H,
Shiraishi Y, Sakurai T, Tabata T,
Modulation of type-1 metabotropic
glutamate receptor by adenosine A1
receptor: an analysis with surface

plasmon resonance imaging、日本神経
科学大会、2016、横浜

Kinoshita K, Yokoyama R, Takahashi Y,
Hata Y, Tabata T, Hirono K, Ichida F,
Nishida N, A novel HCN4 mutation in
a patient with left ventricular
noncompaction impairs the pacemaker
current、日本循環器学会学術集会、
2016、仙台

Ota M, Ishikawa M, Tanaka K, Kitagawa
H, Usui K, Kohno T, Okada T, Minehira
D, Toyooka N, Tabata T, Kawahara S,
T-588 analog TK-6 impairs the
hippocampus-dependent trace
eyeblick conditioning in mice、日本
神経科学大会、2015、神戸

Kamikubo Y, Tabata T, Sakairi H,
Hashimoto Y, Sakurai T,
Bidirectional interaction between
adenosine A1 receptor and type-1
metabotropic glutamate receptor,
Society for Neuroscience Annual
Meeting, 2015, Chicago, USA

熊谷彩子、伊東祐美、賀川舞、松田潤
一郎、佐々木勉、田端俊英、竹森洋、
GRID2 はメマンチンの作用機序におけ
る新しい調節因子である、日本臨床分
子医学会大会、2014、東京

上窪裕二、坂入伯駿、田端俊英、櫻井
隆、アデノシン A1 受容体と代謝型グル
タミン酸受容体の複合体形成と機能的
相互作用、日本薬理学会関東部会、2014、
横浜

Takahashi H, Kinoshita K, Yoshida S,
Fujita H, Murai K, Tabata T,
Electrophysiological
characterization of a novel SCN5A
mutant identified in a Brugada
syndrome patient、日本生理学会大会、
2015、神戸

横山 友貴 (YOKOYAMA, Tomoki)
福嶋 才貴 (FUKUSHIMA, Toshiki)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.u-toyama.ac.jp/biophys/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田端 俊英 (TABATA, Toshihide)

富山大学・大学院理工学研究部 (工学) ・教授

研究者番号 : 80303270

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

篠原 寛明 (SHINOHARA, Hiroaki)

富山大学・大学院理工学研究部 (工学) ・教授

研究者番号 : 60178887

上窪 裕二 (KAMIKUBO, Yuji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 : 80509670

(4)研究協力者