

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07063

研究課題名(和文)二種類の同一サブクラスGタンパク質共役型受容体によるシグナル伝達のクロストーク

研究課題名(英文) Signaling interaction between two G protein-coupled receptors of the same subclass

研究代表者

周防 諭 (Suo, Satoshi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20596845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体は神経伝達物質を含む様々な生体物質の受容体であるが、一つの伝達物質に対し類似構造を持つ受容体が複数存在する。線虫*C. elegans*では、神経伝達物質のオクトパミンはSIAと呼ばれる神経細胞に作用しCREBの活性化を起こす。本研究では、オクトパミン受容体SER-3あるいはSER-6単独の変異体でも反応が見られなくなるSIAでのCREBの活性化とは異なり、SER-3あるいはSER-6の一つの受容体が欠損してもオクトパミン依存的なカルシウム反応が引き起こされ、全ての受容体が欠損したときのみカルシウム反応が見られなくなり、必要となる受容体が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一つの伝達物質に対し似た構造を持つGタンパク質共役型受容体が複数存在するが、その意義は不明な点が多い。本研究では、シグナル伝達ごとに必要となる受容体の組合せが異なることを明らかにし、複数の受容体により複雑なシグナル伝達を生み出していることを示唆することで、Gタンパク質共役型受容体によるシグナル伝達の解明に貢献した。Gタンパク質共役型受容体は様々な薬の標的であることから、薬の作用メカニズムの解明や新薬の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors are receptors for various biomolecules including neurotransmitters. In many cases, there are multiple receptors with homologous structures that binds to the same neurotransmitter. In *C. elegans*, the neurotransmitter octopamine induces CREB activation in the SIA neurons. In this study, we found that, unlike the CREB activation which require both octopamine receptor SER-3 and SER-6, the octopamine-dependent calcium response was induced in SER-3 or SER-6 single mutants and the calcium response was diminished only in the mutants lacking all octopamine receptors, suggesting that the receptor requirements are different between the CREB activation and calcium response.

研究分野：神経科学

キーワード：神経伝達物質 Gタンパク質共役型受容体 *C. elegans* カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は神経伝達物質やホルモンなど様々な物質のシグナル伝達を行い、多くの医薬品の標的である。単一の伝達物質に対して複数の受容体が存在するが、受容体サブクラスごとに異なる Gタンパク質 (Gq, Gs, Gi など) と共役することによって、細胞内に異なったシグナル伝達を引き起こすことができる。また、同じ伝達物質に結合し、同じ Gタンパク質と共役する同一サブクラスに属す類似した受容体が複数存在するケースも多い。しかし、このような同一サブクラスの受容体を複数持つ意義は不明な点が多い。特に、同一サブクラス受容体が同じ細胞に発現することで、単独の時とどのように異なった細胞内情報伝達を生み出すのかは解明されていない。

最近我々は、二種の Gq 共役型オクトパミン受容体が特定の神経細胞内で共存して働くことを、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いた解析で見出した。これまで我々は、CREB (cAMP 応答因子結合タンパク質) の活性化を指標に、線虫でのドーパミンやオクトパミン (無脊椎動物がノルアドレナリンの代わりに持つ神経伝達物質) のシグナル伝達について解析を行ってきた (図 1)。餌がないときはオクトパミンにより、SIA と呼ばれるニューロンで CREB が活性化される¹。オクトパミンはドーパミンシグナル伝達の下流で働く²。オクトパミンによる CREB の活性化には同一サブクラスに属する SER-3 と SER-6 という二つの Gq 共役型オクトパミン受容体が働くことと、その下流で Gq と PLCB が働くことも明らかにした^{1,3}。これまでに SER-3 と SER-6 は両方とも SIA ニューロンで働いていることを明らかにしている。どちらか一方でも欠損するとオクトパミン依存的な CREB の活性化が起きないことから、SER-3 と SER-6 両方が機能するときのみ CREB の活性化が引き起こされると考えられる。しかし、オクトパミンにより引き起こされるセカンドメッセンジャーシグナル伝達の活性化や、それに対し SER-3 と SER-6 がどう関与しているかはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、変異体を用いて SER-3 と SER-6 の下流で起こるセカンドメッセンジャーの濃度変化を解析することで、同一サブクラス受容体が二種類存在することで起きるシグナル伝達の変化および、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。これにより、同一サブクラス受容体が複数存在することで、どのように細胞内情報伝達が変化するのか、そしてその分子機構はどのようなものであるのかを解明し、生物が限られた受容体を用いて、より複雑なシグナル伝達を行うメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、線虫 SIA ニューロン内の二種の Gq 共役型オクトパミン受容体 SER-3 と SER-6 の共存がシグナル伝達に与える影響とそのメカニズムを明らかにするために、Gq 共役オクトパミン受容体 SER-3 と SER-6 が共存する時と単独の時の、SIA ニューロンでのセカンドメッセンジャーの濃度変化の違いを調べる。カルシウムイオンの測定用の蛍光タンパク質プローブ GCaMP の遺伝子を、SIA ニューロンでの遺伝子発現を誘導する *ceh-17* プロモーターの下流につないだプラスミドを作製し、マイクロインジェクションにより形質転換線虫を作製した。GCaMP はカルシウム濃度依存的に蛍光強度が増加するので、蛍光強度を経時的に測定することで、カルシウム濃度の変化を観察できる。さらに、受容体の変異体との掛け合わせを行い、プローブを持つ受容体変異体を作製した。測定用の線虫株を用いて、オクトパミン刺激をした時の SIA ニューロンでのカルシウムの濃度変化を測定した。マイクロ流路デバイスによって線虫個体を物理的に固定し、溶液中にオクトパミンを加えた時の蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡とデジタルカメラで記録した。野生型、SER-3 の変異体、SER-6 の変異体、二重変異体について、この測定を行い、二種の受容体が存在する時、一方だけの時、どちらもないときの反応の違いを解析し、受

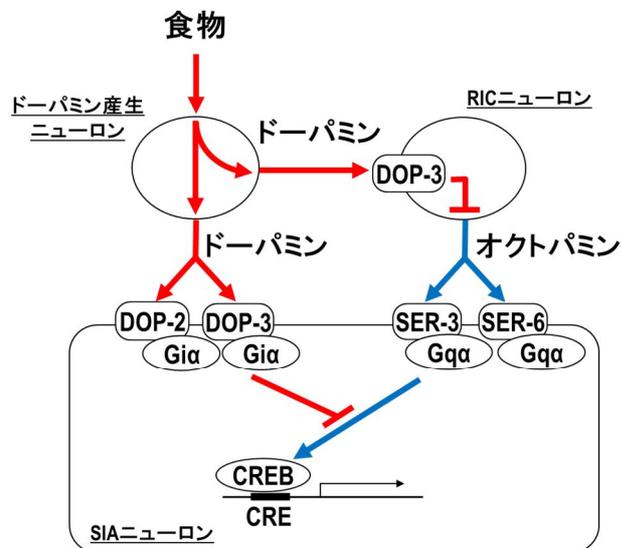


図 1. オクトパミンとドーパミンによる SIA ニューロンの制御
餌がない時に、オクトパミンは SIA ニューロンでの CREB 活性化を促す。ドーパミンは餌存在下でオクトパミンシグナル伝達を抑制する。

容体が二種類存在することで反応の強度や持続時間がどのように変化するか調べた。

また、SIA ニューロンが *C. elegans* の自発運動量を調節するのに働くことから、本研究では自発運動の測定も行った。線虫個体を寒天培地上で自由に運動させ、その様子をビデオ撮影し、ImageJ と R を用いて、運動速度と方向変化量を算出した。クラスター解析により、線虫の行動状態を分離した。

4. 研究成果

(1) SIA ニューロンにおけるカルシウム反応の解析

SIA でのカルシウムイオンの測定のために、*ceh-17* プロモーターとカルシウムレポーター GCaMP の融合遺伝子を作製した。この誘導遺伝子を、*C. elegans* 個体にマイクロインジェクションにより導入し、形質転換体を作成した。まず、初めにこれらの個体で測定を行ったが、測定結果に個体差が大きかった。*C. elegans* にマイクロインジェクションにより遺伝子を導入すると、導入遺伝子は染色体外に半安定的に維持される。UV 照射により、この染色体外の導入遺伝子を染色体内に導入し、安定的に保持させることができる。

ceh-17::GCaMP についても、この操作により、染色体内に導入した。

この安定的な形質転換体でオクトパミン暴露時の蛍光強度変化を測定した(図2)。*C. elegans* 個体が接触している溶液がオクトパミンを含む溶液に置き換わると、蛍光強度の上昇のスパイクが観察された。これは、オクトパミンを含まない溶液に置き換えた後もしばらく継続した。この結果から、SIA ニューロンではオクトパミン刺激によって、カルシウム濃度の上昇が起こることが示唆された。

(2) 受容体変異体における SIA ニューロンでのカルシウム反応

次に、融合遺伝子を持つ形質転換体と SER-3 受容体および SER-6 受容体の変異体 (*ser-3* と *ser-6*) を掛け合わせ、レポーター遺伝子を持つ受容体変異体を作製した。*C. elegans* には、SER-3 と SER-6 の他に、さらにもう一つのオクトパミン受容体で、Gi 共役型受容体である OCTR-1 が存在する。この受容体の変異体 (*octr-1*) についても同様に掛け合わせを行った。また、変異体同士を掛け合わせて 3 重変異体を作製した。

これらの単独変異体と 3 重変異体についてオクトパミン刺激によるカルシウム反応の解析を行った(図3)。*ser-3*、*ser-6*、*octr-1* いずれについても単独変異体では、オクトパミン依存的なカルシウム反応が見られ、野生型と有意な差がなかった。これに対し、3 重変異体では、野生型と比べてカルシウム反応が減少していた。以上の結果から、オク

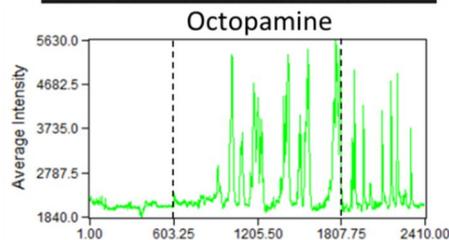
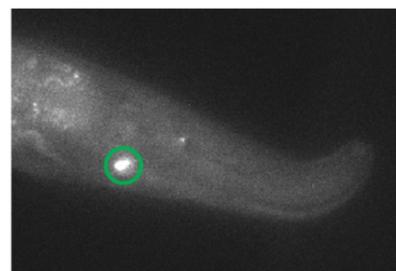


図2. SIAでのカルシウム反応
SIAニューロンでGCaMPを発現する線虫を固定し、丸で囲まれた領域の蛍光強度を測定した。オクトパミンに曝露すると(~600秒)、蛍光強度の上昇が見られ、オクトパミンを除去しても(~1800秒)継続した。

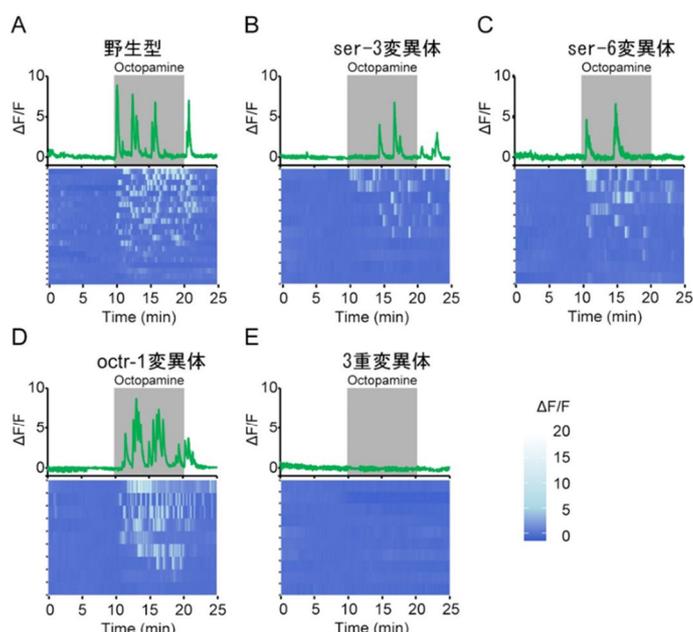


図3. オクトパミン受容体変異体でのカルシウム反応
ser-3、*ser-6*、*octr-1*の単独変異体ではカルシウム反応が見られたが3重変異体では反応が減少していた。上のパネルは代表的な蛍光強度変化を示し、下のパネルは全ての個体の結果をヒートマップで示した。

トパミンにより、SIA ニューロンでのカルシウム濃度の上昇が引き起こされること、一つのオクトパミン受容体がなくなっても反応は起こることが明らかとなった。しかし、全ての受容体が存在しないと反応が見られないことから、外来性オクトパミンは非特異的に SIA ニューロンを刺激しているのではなく、オクトパミン受容体依存的にカルシウム反応を起こしていることが分かる。このことから、SER-3 と SER-6 のどちらか一つの受容体がなくなってもみられなくなる CREB の活性化とは異なり、どちらかの受容体があればカルシウム反応が起こることが示唆された。従って、シグナル伝達ごとに必要となる受容体が異なると考えられる。

(3) オクトパミンによる自発運動量の制御

C. elegans は、運動量の多い状態と運動量の少ない状態を遷移して、雌雄同体は運動量の少ない状態で過ごす時間が長い。この行動状態の制御には様々な伝達物質が関与しており、ドーパミン欠損株では、運動量の多い状態で過ごす時間が長いことが報告されている⁴。これまで、我々は SIA ニューロンにおけるオクトパミンシグナル伝達はドーパミンにより制御されていることを明らかにしている²。さらに、SIA でのオクトパミンシグナル伝達が運動量を制御することが近年報告された⁵。このことから、SIA で働くオクトパミン受容体の運動量調節への影響を調べた。行動状態を測定するために、*C. elegans* の寒天培地上での行動を録画し、クラスター分析により、高運動量状態 (Roaming と Fast Turn) と低運動量状態 (Dwelling) に分離し、それぞれの状態で過ごす時間を決定した。その結果、ドーパミン欠損株 *cat-2* では、低運動量状態で過ごす時間が減少していた (図 4)。しかし、オクトパミン欠損株 *tbh-1* のバックグラウンドでは、*cat-2* で見られた低運動量状態の減少が抑制されていた。この結果から、ドーパミンの下流でオクトパミンが働き、運動量を制御していることが示唆された。次に、オクトパミン受容体変異体について同様の解析を行ったところ、*ser-3*、*ser-6*、*octr-1* 単独の変異体では、*cat-2* による低運動量状態の減少は抑制されていなかった。しかし、全ての受容体を欠損した 3 重変異体では、*cat-2* による運動量の増加が完全に抑制された。また、この働きについて、*ser-3* と *ser-6* は SIA ニューロンで機能することを確認した。これらの結果から、SIA ニューロンでの SER-3 と SER-6 によるシグナル伝達はドーパミンの下流で働き、運動量の調節に関わることが明らかになった。さらに、SIA ニューロンでのカルシウム反応と同様に、片方の受容体でも運動量の制御を行うことができることが明らかになった。

引用文献

- ¹Suo S, Kimura Y, Van Tol HH (2006) Starvation induces cAMP response element-binding protein-dependent gene expression through octopamine-gq signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26:10082–10090.
- ²Suo S, Culotti JG, Van Tol HH (2009) Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*. *EMBO J* 28:2437–2448.
- ³Yoshida M, Oami E, Wang M, Ishiura S, Suo S (2014) Nonredundant function of two highly homologous octopamine receptors in food-deprivation-mediated signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci Res* 92:671–678.
- ⁴Stern S, Kirst C, Bargmann CI (2017) Neuromodulatory control of long-term behavioral patterns and individuality across development. *Cell* 171:1649–1662.

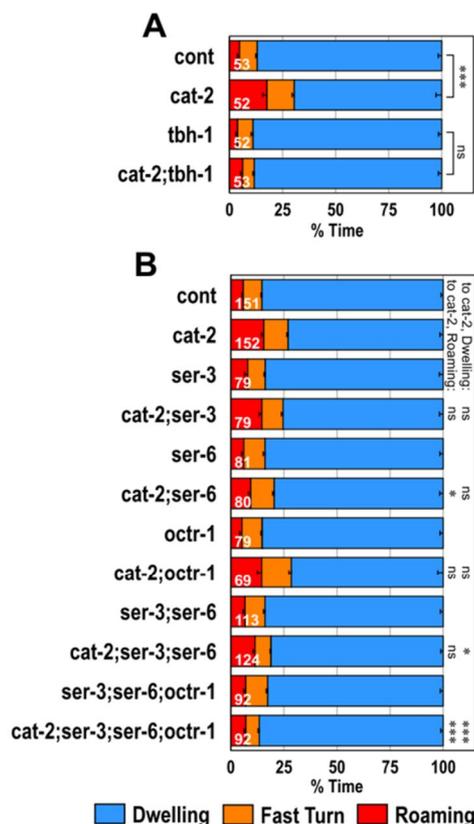


図 4. オクトパミンによる運動量の制御線虫の行動状態を解析した。Dwellingは低運動量状態、Fast TurnとRoamingは高運動量状態である。

ドーパミン欠損株 *cat-2* では運動量が上昇するが、*tbh-1* で抑制される。また、*cat-2* の運動量上昇は単独のオクトパミン受容体変異では抑制されないが、3 重変異体では抑制される。

⁵Churgin MA, McCloskey RJ, Peters E, Fang-Yen C (2017) Antagonistic serotonergic and octopaminergic neural circuits mediate food-dependent locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 37:7811–7823.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arai Satoshi, Kriszt Rokus, Harada Kazuki, Looi Liang-Sheng, Matsuda Shogo, Wongso Devina, Suo Satoshi, Ishiura Shoichi, Tseng Yu-Hua, Raghunath Michael, Ito Toshiro, Tsuboi Takashi, Kitaguchi Tetsuya	4. 巻 57
2. 論文標題 RGB-Color Intensiometric Indicators to Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP in Single Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 10873 ~ 10878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/anie.201804304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takashi Nagashima, Shoichi Ishiura and Satoshi Suo	4. 巻 61
2. 論文標題 Regulation of body size in Caenorhabditis elegans: effects of environmental factors and the nervous system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 367-374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1387/ijdb.160352ss	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takashi Nagashima, Shoichi Ishiura, Satoshi Suo	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Regulation of body size in Caenorhabditis elegans: effects of environmental factors and the nervous system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suo Satoshi, Harada Kazuki, Matsuda Shogo, Kyo Koki, Wang Min, Maruyama Kei, Awaji Takeo, Tsuboi Takashi	4. 巻 39
2. 論文標題 Sexually Dimorphic Regulation of Behavioral States by Dopamine in Caenorhabditis elegans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4668 ~ 4683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2985-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Satoshi Suo, Kazuki Harada, Shogo Matsuda, Takashi Tsuboi
2. 発表標題 Dopamine increases locomotor activity in <i>C. elegans</i> males
3. 学会等名 Asia-Pacific <i>C. elegans</i> Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 周防諭
2. 発表標題 ドーパミンは <i>C. elegans</i> の自発運動の性差を作り出す
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 周防諭、原田一貴、松田翔吾、王旻、丸山敬、淡路健雄、坪井貴司
2. 発表標題 ドーパミンは <i>C. elegans</i> オスの自発運動量を制御する
3. 学会等名 分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 周防諭、永嶋宇、大綱栄太郎、石浦章一
2. 発表標題 Dopamine and octopamine regulate body size of <i>C. elegans</i> .
3. 学会等名 CeNeuro 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 永嶋 宇、大網 栄太郎、石浦 章一、周防 諭
2. 発表標題 C. elegansにおいてドーパミンは体のサイズと産卵を制御する
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Suo, S., Harada, K., Matsuda, S., Kyo, K., Wang, M., Maruyama, K., Awaji, T., Tsuboi, T.
2. 発表標題 Sexually dimorphic dopaminergic signaling regulates behavioral states of C. elegans.
3. 学会等名 International C. elegans Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 周防 諭、原田 一貴、松田 翔吾、姜興起、王 旻、丸山 敬、淡路 健雄、坪井 貴司
2. 発表標題 ドーパミンは線虫C. elegansの運動量の性差を生み出す
3. 学会等名 Neuro2019 日本神経科学学会大会・日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

埼玉医科大学 薬理学教室
<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/yakuri/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	原田 一貴 (Harada Kazuki) (60830734)	東京大学・大学院総合文化研究科・助教 (12601)	
連携 研究者	坪井 貴司 (Tsuboi Takashi) (80415231)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授 (12601)	