

平成 21 年 3 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007~2008
 課題番号：19790079
 研究課題名 (和文) 5' -AMP キナーゼによる GABA_B 受容体のリン酸化と脳保護作用の可能性
 研究課題名 (英文) Phosphorylation of GABA_B receptor by 5' -AMP-dependent kinase and possible effect of protection on central nervous system
 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：5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化 (リン酸化) により、抑制性神経伝達を担う GABA 受容体の一つである GABA_B 受容体の R2 サブユニットの細胞内領域に位置する 783 番目のセリン残基 (S783) がリン酸化を受けることが判明した。マウス大脳皮質由来培養神経細胞に 100 μM NMDA を暴露すると、カルシウムの流入と共に、24 時間以内に神経細胞死が誘導されるが、この NMDA 暴露直後に AMPK のリン酸化が上昇することが判明した。したがって、NMDA 受容体の新規シグナルとして AMPK 活性化を介した GABA_BR2 サブユニットのリン酸化 (p783) が明らかとなった。一方、AMPK を活性化させる薬物としてしられる、ビッグアニド系薬物をマウスに腹腔内投与したが、しかしながら、海馬、大脳皮質など脳内部位のいずれにおいても AMPK の活性化および p783 の変動は認められなかった。また、マウスを 2 日間の絶食にさらしても、変動しなかった。したがって、中枢神経系においては、AMPK は、グルコース代謝によってではなく、NMDA 暴露のようなカルシウムシグナルの活性化が GABA_B 受容体機能を調節する可能性が示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：(1) ガンマ-アミノ酪酸 (GABA) (2) GABA_B 受容体 (3) リン酸化 (4) 蛋白質分解 (5) AMPK (6) カルシウムシグナリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 受容体感受性と蛋白質リン酸化 神経伝達物質のように、細胞膜を自ら透過できな

い親水性物質に対する受容体は、細胞膜上に提示されて、その機能を果たす。受容体を持続的または反復して刺激したり、あるいはしばらく刺激を加えない状態に曝したりすると、受容体の刺激感受性が低下、あるいは上昇す

る事がある。これらの現象は一般的に脱感作、あるいは過感受性と呼ばれる。これらの現象の主要な原因は、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る。

(2) GABA_B 受容体のリン酸化と機能制御 抑制性の神経伝達を担う GABA_B 受容体は G 蛋白質共役型受容体で、R1 および R2 の二つのサブユニットによるヘテロダイマーである。アゴニスト GABA は R1 に限り結合し、R2 には結合できない。一方で、Gi 蛋白質の結合と同蛋白質を介したシグナル伝達は R2 の役割である。従って GABA_B 受容体のシグナル伝達は R1 と R2 の共存下のみ認められる。加えて、サブユニット蛋白質のリン酸化も GABA_B 受容体の機能に重要である。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) は、PKA によりリン酸化される。GABA_B 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、S892 のリン酸化はこの脱感作の程度を軽減する。すなわち、S892 のリン酸化は GABA_B 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、意義は不明であった。

(3) AMPK による GABA_B 受容体のリン酸化の発見 我々の研究グループは、上述のような研究をふまえて、GABA_B 受容体に結合し、同受容体の機能を制御するような蛋白質を解析したところ、①GABA_B 受容体の両サブユニット蛋白質に対する AMP キナーゼ (AMPK) の結合を発見した。さらに②このキナーゼによる GABA_B 受容体のリン酸化とその部位の同定に成功した。AMPK は R1、R2 の両サブユニットに結合可能で且つリン酸化部位も特定できたが、③電気生理学的には R2 サブユニットのリン酸化に意義があるというデータが出ている。すなわち、この新規リン酸化部位は、先に報告された R2 サブユニットの S892 とは別の部位であるが、S892 と同様に、リン酸化により GABA_B 受容体の脱感作を抑制した。以上のことから、このリン酸化とその制御はいったい我々の中枢神経系の活動に、どういう意味があるのだろうかという疑問が浮上した。

(4) AMPK による細胞内 ATP 量の制御 AMP キナーゼ (AMPK) は ATP の消費と、その結果生じる 5' -AMP の蓄積を鋭敏に感知して活性化するセリン・スレオニンキナーゼである。AMPK 活性化によってリン酸化を受ける多く

の酵素は、ATP 産生を促進し、あるいは ATP 消費を抑制する。このように AMPK は細胞内のエネルギー物質 ATP の確保に努めている。これまで AMPK の研究の対象は、主にグルコースの貯蔵、代謝および血中濃度に関連する肝臓や筋肉等であった。

(5) AMPK 研究の新展開 近年、視床下部における中枢ホルモン・レプチンおよびグレリンによる摂食行動制御に対する AMPK 関与に注目が集まり、AMPK が個体全体のエネルギーの確保に努めている可能性が提唱されている。しかしながら、グルコース要求性の高い中枢神経系そのものの AMPK によるエネルギー保持の働きの報告は少ない。さらに、AMPK を活性化させる新たな物質として、CaMKK が報告された。すなわち、AMPK シグナルの上流に Ca²⁺が存在することを意味する。また、AMPK の触媒サブユニットに相同性の高い触媒サブユニット類似蛋白質が相次いで発見されている。この新規触媒媒体の中枢神経系での分布は不明である。

以上のことから、AMPK は末梢の細胞だけでなく、中枢神経系のエネルギー保持に働いている可能性が充分考えられる。また、この AMPK によるリン酸化を介した GABA_B 受容体の機能制御機構は、中枢神経系の抑制性伝達の賦活を通じた精神活動の制御に関与すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は AMPK の活性化に伴う抑制性神経伝達賦活の可能性と探求することにあつた。

(1) AMPK と GABA_B 受容体の相互作用 本研究では、AMPK 触媒サブユニットがリン酸化される事に続いて、GABA_B 受容体サブユニットがリン酸化される事が、第一に重要な鍵となる。すなわち、AMPK の下流に GABA_B 受容体があるかどうかである。我々の研究では、すでに両者の結合とリン酸化を確認し、さらにリン酸化部位を特定したが、結合部位の特定には到っていない。したがって、分子的な解析により、GABA_B 受容体上の AMPK 触媒サブユニットの結合部位を特定する。

(2) GABA_B 受容体のリン酸化と安定性 本研究の根幹はいわば「受容体のリン酸化」であるが、蛋白質の機能は、修飾のみならず、その局在や、発現から分解へのターンオーバーにも注意が必要である。特に、GABA_B 受容体の様な細胞膜蛋白質の場合、蛋白質そのものの安定性に加えて、細胞膜上に提示される状態

を保つという安定性も機能発現に重要なファクターである。したがって本研究ではこの「蛋白質安定性」についても解析を進めることでリン酸化の生理学的意義を推察する。

(3) 中枢神経系における AMPK の活性変動と GABA_B 受容体のリン酸化 中枢神経系における AMPK の活性変動を追跡した研究は、視床下部における摂食中枢に対する働きを除いてまだまだ不十分というのが現状である。本研究では、中枢神経系における、AMPK の活性を増減させる薬物もしくは条件を探索する。その手法は、既に末梢組織等で、AMPK 活性変動を調節する事が知られている薬物や条件を試すことから開始する。次に、神経細胞の活動に重要な Ca²⁺ チャンネル開口する薬物や同開口に関与する条件を試す。さらに、細胞の呼吸を阻害する神経毒となる薬物を試用する。本研究遂行上、第二に重要な鍵は、これらの条件暴露により AMPK 活性が変動した場合、GABA_B 受容体のリン酸化がそれに応じて変動することである。本件に注意しながら解析を進めた。

(4) AMPK による GABA_B 受容体リン酸化と神経保護効果 本研究の最終段階は、上述の(3)で発見した AMPK 活性が変動する条件の下、GABA_B 受容体のリン酸化が変動する意義を解明することである。例えば、試行予定の神経細胞死が誘発される条件下で同受容体リン酸化が上昇した場合、その上昇が、細胞死に関与しているのか、細胞死の抑制に関与しているのかが次の興味の対象となる。本研究では AMPK や、GABA_B 受容体の各サブユニットのノックダウンや、変異体導入により、AMPK による GABA_B 受容体リン酸化の、このような生理学的意義を追求する。例えば、同じ神経細胞死条件下においても、GABA_B 受容体のリン酸化部位が欠損しているような遺伝子を有する細胞が、脆弱性を示すならば、同リン酸化部位のリン酸化には神経細胞死の脆弱性に関連することが導かれる。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 実験 GST 融合蛋白質を用いた蛋白質相互作用の解析 GABA_B 受容体細胞内領域の GST 融合蛋白質と、AMPK の二つの触媒サブユニット、 $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ それぞれに対する、融合蛋白質の親和力の相違や、結合部位の探索を試みた。

(2) 培養細胞による実験 中枢神経系細胞における AMPK 活性変動と GABA_B 受容体リン酸化

初代神経培養細胞に対し、様々な条件の処置を試み、既に報告されている AMPK 活性変動の再現と、新しい報告に基づく条件下での、未知の AMPK 活性変動の測定を測定した。対象薬物としては、メトホルミンなどの抗糖尿病薬、及び、興奮性毒性を誘発するグルタミン酸受容体アゴニストなどである。

(3) *in vivo* 実験 実験動物脳内の AMPK および GABA_B 受容体の発現及びリン酸化の分布と総量の変動 摂食による GABA_B 受容体リン酸化の関係では、通常 AMPK の活性は個体のエネルギー残存状態に左右されるはずであるが、実際脳内ではどうか検討した。さらに、メトホルミンなどの抗糖尿病薬与にとともなう変動も解析した。

4. 研究成果

(1) マウス全脳から調製したホモジネートに含まれる GABA_B 受容体細胞内領域の GST 融合蛋白質（以下融合蛋白質）に対する結合タンパク質を、プルダウン法により共沈させ、イムノブロットングにて検出すると、AMPK およびリン酸化 AMPK が検出された。一方、内因性の GABA_B 受容体の R1 および R2 サブユニットも共沈してきたが、このうち、R2 の 892 番目のセリン残基のリン酸化は共沈したタンパク質に含まれていたが、783 番目のセリン残基のリン酸化は検出されてこなかった。したがって、783 番目のセリン残基のリン酸化はすみやかに脱リン酸化されること、もしくは、可能性の一つとして、同リン酸化されている GABA_B 受容体の R2 サブユニットは二量体を形成しない可能性が示唆された。

(2) マウス大脳皮質由来培養神経細胞に 100 μ M NMDA を暴露すると、カルシウムの流入と共に、24 時間以内に神経細胞死が誘導されたが、この NMDA 暴露直後に AMPK のリン酸化が上昇することが判明した。また、このとき GABA_B R2 サブユニットのリン酸化 (p783) も上昇した。したがって、NMDA 受容体の新規シグナルとして AMPK 活性化を介した同サブユニットのリン酸化調節機構の存在の可能性が示唆された。

(3) AMPK 及び GABA_B R2 サブユニットのマウス脳内分布を調べたところ、海馬および大脳皮質に比較的多いことが判明した。このタンパク質の発現と pAMPK および p783 の分布は大きく異なり、部位特異的なリン酸化・脱リン酸化制御の可能性が示唆された。AMPK が、生体のエネルギー調節を感知するという観点から、マウスを 2 日間の絶食にさらしてみたが、しかしながら、AMPK や R2 のリン酸化に

著名な変動は認められなかった。次に、マウスに、AMPKを活性化させる薬物としてしられる、ピグアナイド系薬物をマウスに腹腔内投与したが、しかしながら、海馬、大脳皮質など脳内部位のいずれにおいてもAMPKの活性化およびp783の変動は認められなかった。

したがって、中枢神経系においては、AMPKは、グルコース代謝によってではなく、NMDA暴露のようなカルシウムシグナルの活性化がGABA_B受容体機能を調節する可能性が示唆される。

以上のことから、in vitroではAMPKのGABA_B受容体への結合および、培養細胞内でのカルシウムシグナルに伴うAMPKおよびGABA_B受容体のリン酸化上昇などが観察されたが、これらin vitroや培養細胞内で認められたリン酸化の変動は目下in vivoにおいて期待した変動を見せていない。その可能性の一つとして急速なp783の脱リン酸化が危惧される。今後は、p783の脱リン酸化制御機構にも着目しながらp783の意義を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

1. Makoto Shuto, Keiichi Seko, Nobuyuki Kuramoto, Chie Sugiyama, Koichi Kawada, Masanori Yoneyama, Reiko Nagashima, Kiyokazu Ogita. Activation of c-Jun N-terminal kinase cascades is involved in part of the neuronal degeneration induced by trimethyltin in cortical neurons of mice. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 60-70. (2008) 査読有り
2. Masanori Yoneyama, Naoko Iwamoto, Reiko Nagashima, Chie Sugiyama, Koichi Kawada, Nobuyuki Kuramoto, Makoto Shuto, Kiyokazu Ogita. Altered expression of heat shock protein 110 family members in mouse hippocampal neurons following trimethyltin treatment in vivo and in vitro. *Neuropharmacology.* 55, 693-703. (2008) 査読有り
3. Chie Sugiyama, Nobuyuki Kuramoto, Reiko Nagashima, Masanori Yoneyama, Kiyokazu Ogita. Enhanced expression of RNase L as a novel intracellular signal generated by NMDA receptors in mouse cortical neurons. *Neurochem Int.* 53, 71-78. (2008) 査読有り
4. Reiko Nagashima, Chie Sugiyama, Yuka Gotoh, Masanori Yoneyama, Nobuyuki Kuramoto, Takahiro Taira, Hiroyoshi Ariga, Kiyokazu Ogita. Altered expression of DJ-1 in the hippocampal cells following in vivo and in vitro neuronal damage induced by trimethyltin. *Neurosci Lett.* 440, 232-236. (2008) 査読有り
5. Reiko Nagashima, Chie Sugiyama, Masanori Yoneyama, Nobuyuki Kuramoto, Koichi Kawada, Kiyokazu Ogita. Acoustic overstimulation facilitates the expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit probably through enhanced DNA binding of activator protein-1 and/or NF-kappaB in the murine cochlea. *Neurochem Int.* 51, 209-15. (2007) 査読有り
6. Chie Sugiyama, Nobuyuki Kuramoto, Keiichi Seko, Yukio Yoneda, and Kiyokazu Ogita. Decreased level of mitochondrial RNA by glutamate in cultured cortical neurons. *Neuroreport* 18, 827-830. (2007) 査読有り
7. Nobuyuki Kuramoto, Megan E. Wilkins, Benjamin P. Fairfax, Raquel Revilla-Sanchez, Miho Terunuma, Keisuke Tamaki, Mika Iemata, Noel Warren, Andrés Couve, Andrew Calver, Zsolt Horvath, Katie Freeman, David Carling, Lan Huang, Cathleen Gonzales, Edward Cooper, Trevor G. Smart, Menelas N. Pangalos, and Stephen J. Moss. Phospho-Dependent Functional Modulation of GABA_B Receptors by the Metabolic Sensor AMP-Dependent Protein Kinase. *Neuron.* 53, 233-247. (2007) 査読有り

[学会発表] (計27件)

1. 佐野尚平、長嶋玲子、米山雅紀、倉本展行、荻田喜代一 (2009) マウス胎児大脳皮質由来神経系前駆細胞の増殖における5'-AMP-activated protein kinaseの役割 第129回日本薬学会年会 京都、3月26-28日。
2. 長嶋玲子、鈴木有香、倉本展行、荻田喜代一 (2009) 強大音響曝露による蝸牛外側壁線維細胞のAMP-activated protein kinaseシグナルの活性化 第129回日本薬学会年会、京都、3月26-28日。
3. 首藤誠、杉山千絵、米山雅紀、倉本展行、荻田喜代一 (2008) 副腎摘出によるトリメチルスズ誘発性神経細胞傷害の増強メカニズム 第58回日本薬学会近畿支部大会、総会 神戸、10月25日。

4. 倉本展行 (2008) AMP 活性化型キナーゼによる抑制性神経伝達の新規制御機構の可能性 第 58 回日本薬学会近畿支部大会、総会神戸、10 月 25 日。
5. 首藤誠、樋口桂、杉山千絵、米山雅紀、倉本展行、米田幸雄、荻田喜代一 (2008) 副腎摘出マウスにおけるトリメチルスズ誘発性神経細胞傷害の増強メカニズム 第 38 回日本神経精神薬理学会、品川、10 月 1 日。
6. Reiko Nagashima, Nobuyuki Kuramoto, Kiyokazu Ogita (2008) In vivo intense noise exposure activates AMP-activated protein kinase in the cochlear spiral ligament fibrocytes of mice. 第 31 回神経科学会、東京、7 月 9 日。
7. 長嶋玲子、竹村真理子、倉本展行、荻田喜代一 (2008) 強大音響暴露による蝸牛外側壁線維細胞における AMPK の活性化 日本薬学会第 128 年会、横浜、3 月 27 日。
8. 倉本展行、玉置啓介、照沼美穂、折田将成、荻田喜代一、米田幸雄、ステファン J モス (2008) PP1・及び PP2A は GABA_BR2 サブユニットの PKA 依存性リン酸化部位を脱リン酸化する 第 81 回日本薬理学会、横浜、3 月 17 日。
9. 杉山千絵、倉本展行、米田幸雄、荻田喜代一 (2007) 神経細胞障害における RNase 活性化の関与 ファーマ・バイオフォーラム 2007、大阪、12 月 2 日。
10. 折田将成、杉山千絵、倉本展行、荻田喜代一 (2007) NMDA 受容体を介する 5' -AMP-activated protein kinase 活性化と GABA_B 受容体のリン酸化変動 ファーマ・バイオフォーラム 2007、大阪、12 月 2 日。
11. 折田将成、山下智美、杉山千絵、倉本展行、荻田喜代一 (2007) 興奮性神経伝達の新規シグナルとしての 5' -AMP-activated protein kinase の活性化と GABA_B 受容体のリン酸化. 第 35 回薬物活性シンポジウム、広島、11 月 30 日。
12. 杉山千絵、倉本展行、米田幸雄、荻田喜代一 (2007) グルタミン酸神経細胞死における新規細胞内シグナルとしての RNase 活性化. 第 35 回薬物活性シンポジウム、広島、11 月 29 日。
13. 折田将成、山下智美、杉山千絵、倉本展行、荻田喜代一 (2007) NMDA 受容体の新規シグナルとしての 5' -AMP-activated protein kinase の活性化と GABA_B 受容体のリン酸化 第 112 回日本薬理学会近畿部会、大阪、11 月 16 日。
14. Nobuyuki Kuramoto, Tomomi Yamashita, Masanari Orita, Chie Sugiyama, Stephen J. Moss and Kiyokazu Ogita (2007). NMDA 受容体チャネルの開口を介した 5' -AMP キナーゼによる GABA_B 受容体のリン酸化. Phosphorylation of GABA_B receptor R2 subunit by 5' -AMP-activated protein kinase through opening NMDA receptor channel. 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回神経化学学会大会、横浜、2007 年 9 月 11 日。
15. Masanari Orita, Makoto Shuto, Chie Sugiyama, Nobuyuki Kuramoto, Yukio Yoneda and Kiyokazu Ogita (2007) 若齢マウスの隔離飼育による異常行動の可逆. Reversibility of behavior abnormalities induced by isolation housing in young mice. 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回神経化学学会大会、横浜、2007 年 9 月 11 日。
16. Chie Sugiyama, Nobuyuki Kuramoto, Yukio Yoneda, and Kiyokazu Ogita (2007) グルタミン酸誘発性神経細胞死における RNA 分解の関与の可能性. Possible involvement of RNA degradation in glutamate-induced neuronal death. 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回神経化学学会大会、横浜、2007 年 9 月 12 日。
17. 折田将成、首藤誠、杉山千絵、倉本展行、荻田喜代一 (2007) 隔離飼育ストレスによる可逆的認知機能障害. Reversible impairment of cognition by isolation stress. 第 37 回日本神経精神薬理学会札幌、7 月 13 日。
18. 杉山千絵、世古敬一、倉本展行、米田幸雄、荻田喜代一 (2007) 神経細胞死における RNA 分解の関与の可能性. 第 37 回日本神経精神薬理学会、札幌、7 月 11 日。
19. 杉山千絵、倉本展行、米田幸雄、荻田喜代一 (2007) グルタミン酸誘発性神経細胞死の新規細胞内シグナルとしての RNase 活性化. 第 111 回日本薬理学会近畿部会、名古屋、6 月 15 日。
20. 倉本展行、荻田喜代一、Stephen J. Moss (2007) 5' -AMP キナーゼによる GABA_B 受容体の新規リン酸化部位. Novel phosphorylation sites on GABA_B receptor by 5' -AMP activated protein kinase. 日本薬学会 第 127 年会、富山、3 月 28 日。
21. 首藤誠、西田実加、杉山千絵、倉本展行、米田幸雄、荻田喜代一 (2007) 隔離飼育ストレスによる認知機能障害の可逆性. 日本薬学会 第 127 年会、富山、3 月 28 日。
22. 折田将成、倉本展行、荻田喜代一 (2007) 絶食に伴う中枢神経系の神経伝達変動の可能性. Possible fasting-induced

alterations of neurotransmission in central nervous system. 第80回日本薬理学会年会、名古屋、3月16日.

23. 首藤誠、西田実加、杉山千絵、倉本展行、米田幸雄、荻田喜代一 (2007) 若年マウスの隔離飼育による社会性欠如の可逆性. 第80回日本薬理学会年会、名古屋、3月16日.
24. Chie Sugiyama, Nobuyuki Kuramoto, Yukio Yoneda and Kiyokazu Ogita (2007) Possible involvement of RNase in glutamate-induced neuronal death. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. San Diego, U.S.A., Nov. 6.
25. Nobuyuki Kuramoto, Tomomi Yamashita, Masanari Orita, Chie Sugiyama, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda. (2007) Phosphorylation of GABAB receptor R2 subunit by 5' -AMP activated protein kinase through exposure of Glutamate receptor agonists. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. San Diego, U.S.A., Nov. 6.
26. Makoto Shuto, Mika Nishida, Chie Sugiyama, Nobuyuki Kuramoto, Yukio Yoneda and Kiyokazu Ogita (2007) Reversibility of sociality deficiencies induced by isolation housing in young mice. 7th International Brain Research Organization world congress of neuroscience, Melbourne, Australia, July 14.
27. Nobuyuki Kuramoto, Keisuke Tamaki Miho Terunuma, Masanari Orita, Kiyokazu Ogita, Yukio Yoneda and Stephen J. Moss (2007) Dephosphorylation of GABA_BR2 at S892 is regulated by PP1 and PP2A. 7th International Brain Research Organization world congress of neuroscience, Melbourne, Australia, July 14.

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