

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K22745

研究課題名（和文）異種GPCR間の結合を介した新たな小脳運動学習制御機構の解明

研究課題名（英文）Novel regulatory mechanism of cerebellar motor learning via heterologous GPCR coupling

研究代表者

坂入 伯駿（Sakairi, Hakushun）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20876693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、小脳運動学習が生じる仕組みのひとつである1型代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)の活性化、及びそれを起点として生じるプルキンエ細胞の長期抑圧(LTD)という現象について、mGluR1が発現するシナプスにGABA-B受容体(GBR)が共発現してLTDを増強する現象を踏まえて、mGluR1とGBRの結合状態変化の視点からLTD増強機序の解明を目指したものである。mGluRとGBRを共発現するHEK293細胞、及び初代培養神経細胞を用いた解析の結果、mGluR1の発現量とGBRシグナルの関連を見出し、またGBRとの結合能がmGluR1と大きく異なるmGluRサブタイプを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動学習とは運動の反復によって動きの滑らかさや正確性が獲得される学習過程のことであり、小脳疾患における運動や発話の障害にも関与する重要な機能である。mGluR1はその学習の成立に重要な役割を持つ受容体である。本研究は、そのような重要な役割を持つmGluR1が他のGタンパク質共役型受容体(GPCR)と結合することで相互に機能調節を行う可能性を示すものであり、運動学習やその異常に関して新たな視点を与える学術的意義を持つ。GPCRの相互作用は新たな創薬ターゲットとしても注目されており、本研究もまたmGluR1とGBRの結合と相互作用に基づく運動学習の病態理解や治療戦略を考える上で社会的な意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the activation of type 1 metabotropic glutamate receptors (mGluR1) and the phenomenon of long-term depression (LTD) of Purkinje cells that is triggered by mGluR1, which is one of the crucial mechanisms of cerebellar motor learning. Based on the phenomenon that GABA-B receptors (GBRs) are co-expressed at mGluR1-expressed synapses and enhance LTD, we aimed to elucidate the mechanism of LTD enhancement from the viewpoint of changes in the binding state of mGluR1 and GBRs. Using HEK293 cells that co-express mGluR and GBR and primary cultured neurons, we found an association between mGluR1 expression and GBR signaling, and also discovered that one of the subtypes of mGluR is significantly different from mGluR1 in their binding potential to GBR.

研究分野：薬理学

キーワード：異種GPCR間相互作用 運動学習 LTD(長期抑圧) 1型代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1) GABA-B受容体(GBR)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動学習とは、運動の反復により動きの滑らかさや正確さを獲得する学習過程である。主に小脳がその機能を担い、小脳疾患等でこの機能が障害されると会話や歩行が困難になるなど重篤な運動失調が生じる。小脳の運動学習が起こる仕組みは、小脳プルキンエ細胞の刺激応答性が長期に減弱する LTD という現象によって説明される。LTD が生じるきっかけのひとつとなるのが、平行線維-プルキンエ細胞間の後シナプス上に発現する mGluR1 の活性化である(伊藤ら:2002)。近年、この mGluR1 が発現するシナプス上に GBR が共発現することが発見され、また GBR の活性化が mGluR1 依存性 LTD を増強することが電気生理学的に示された(上窪ら:2007)。このことは、mGluR1 と GBR の間にある何らかの相互作用が LTD を増強する可能性を示唆していたが、具体的な機序は未解明であった。その中において申請者は、小脳や株化細胞において mGluR1 が GBR と結合すること、また両受容体は互いの細胞内シグナルを双方向的に調節することを明らかにした(坂入ら:2020)。更に申請者が行った予備実験において、mGluR1 と GBR の結合が受容体の活性化に伴って動的に変化する様子が観察され、受容体間の結合状態と受容体活性の変化とが連動する可能性が示唆された。

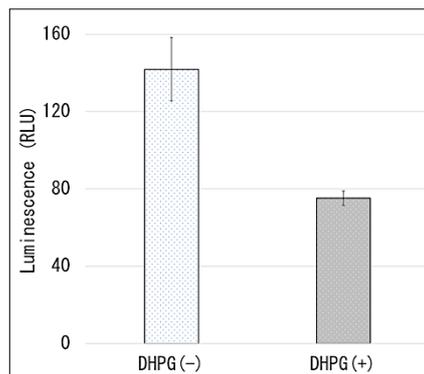


図 1: 発光酵素再構成を用いた、mGluR1 活性化による受容体間結合の変化。発光酵素断片を付加した mGluR1 と GBR が近接すると、再構成された発光酵素が添加した基質と反応し、発光が生じる。mGluR1 アゴニストである DHPG の有無により発光強度に違いが見られ、受容体間の結合状態が変化していることがわかる。

2. 研究の目的

上記の事実から、GBR による mGluR1 依存性 LTD 増強の作用機序に両受容体間の結合状態の変化が関係すると推測されたため、申請者は「mGluR1 と GBR の結合状態の変化が mGluR1 の細胞内シグナルを制御して LTD を増強する」と仮説を立て、本研究において mGluR1 と GBR の結合と乖離によって生じる細胞内シグナル伝達の変化、及びそれによる新たな LTD 調節機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

GPCR 間の結合の評価法としては、上述の NanoBiT と呼ばれる発光酵素断片再構成法を利用したアッセイのほか、共免疫沈降法によっても GPCR 間の複合体形成を調べた。

GPCR の細胞内シグナル解析については、シグナル mGluR1 は G_q 共役型の GPCR であり、検出に用いられる代表的な細胞内シグナル産物として IP₃、DAG、カルシウムなどがある。そのため IP₃

を検出するために IP-One アッセイ、DAG を検出するために DAG BacMam アッセイ、カルシウムを検出するためにカルシウムインジケータを導入し、多角的な解析を行った。一方、GBR は G_i 共役型の GPCR であり、検出に用いられる代表的な細胞内シグナル産物としては cAMP がある。そのため cAMP を検出するために cADDis cAMP BacMam アッセイを用いて評価を行った。

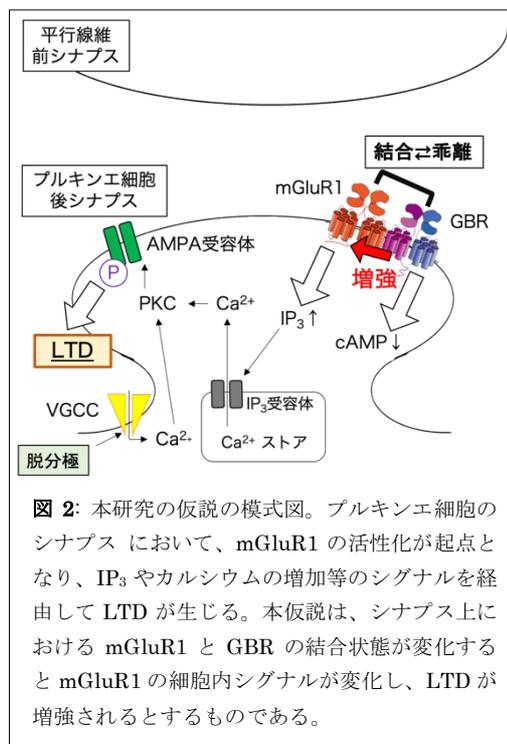


図 2: 本研究の仮説の模式図。プルキンエ細胞のシナプスにおいて、mGluR1 の活性化が起点となり、IP₃ やカルシウムの増加等のシグナルを経由して LTD が生じる。本仮説は、シナプス上における mGluR1 と GBR の結合状態が変化すると mGluR1 の細胞内シグナルが変化し、LTD が増強されるとするものである。

また研究の過程において、安定した実験結果を得るためには mGluR1 と GBR を共発現する安定発現細胞株が必要と判断したため作出を行った。GBR は GBR1 と GBR2 の両サブユニットをなるべく均等に発現する必要があること、また mGluR1 の恒常的な発現は細胞死の原因となることが安定発現細胞株作出の上で困難となる。そのため、まず pBI バイディレクショナル発現ベクターを用いて GBR1、GBR2 を均等に発現する GBR 恒常発現 HEK293 細胞株を作出し、続いてその細胞株へ Tet-One 誘導発現システムを用いてテトラサイクリン誘導性に mGluR1 を発現する機能を付与することで、GBR と mGluR1 の共安定発現細胞株を樹立した。また同システムを用いて、mGluR1 と構造が類似する mGluR サブタイプを誘導発現する共発現 HEK293 細胞株も作成し、対照として比較を可能とした。各 GPCR には SNAP、CLIP、Halo といった標識リガンドを認識するタグを付与し、1 分子レベルでのライブセルイメージングを行えるようにした。

4. 研究成果

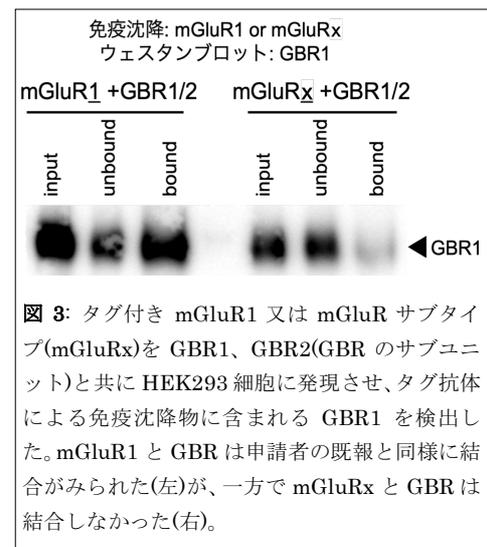
mGluR1 と GBR の共安定発現細胞株の作出により、両受容体の細胞内シグナルの変化や受容体の挙動についてより精細に調べることが可能になった。その結果、GBR を恒常発現する HEK 細胞において、mGluR1 の発現量が細胞内の cAMP 量を変化させることが分かり、mGluR1 の活性化のみならず発現自体が GBR の活性に影響する可能性が示唆された。

また、mGluR のとあるサブタイプが GBR との結合能の点で mGluR1 と大きく異なることを発見した。この発見によって、GBR は広く mGluR 全般に結合するのではなく mGluR1 に特異的に結合する性質を持つ可能性が示唆され、またこの mGluR サブタイプは mGluR1 と GBR の複合体形成における有用な対照となった。

初代培養神経細胞を用いた神経細胞内のシグナル解析では、cADDIS BacMam cAMP アッセイを応用し、神経細胞における cAMP の増減のライブイメージングに成功した。

その他、本研究で確立した実験手法を用いて、mGluR1 や GBR と同様に G_q、G_i 共役型 GPCR が結合する組み合わせであるエンドセリン A 受容体と μ オピオイド受容体の解析を行い、共著論文として発表した。加えて、μ オピオイド受容体の解析を通じて、掻痒におけるエンドモルフィンの新たな作用を解明し、こちらも共著論文として発表した。

今後の方針としては、作成した共安定発現細胞株を用いて全反射顕微鏡(TIRFM)等を用いて各受容体の細胞膜上での挙動を観察し、GPCR 間の結合状態の動的変化を解析する。また、mGluR サブタイプと GBR の共発現 HEK 細胞株についても同様の解析を行い、GBR との相互作用において mGluR1 と他のサブタイプがどのように異なるかを比較する。得られた結果をもとに、mGluR1 と GBR の複合体を阻害する方法を考案し、神経細胞に適用して LTD に関連するシグナルの変調を観察する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuroda Yui, Nonaka Miki, Kamikubo Yuji, Ogawa Haruo, Murayama Takashi, Kurebayashi Nagomi, Sakairi Hakushun, Miyano Kanako, Komatsu Akane, Dodo Tetsushi, Nakano-Ito Kyoko, Yamaguchi Keisuke, Sakurai Takashi, Iseki Masako, Hayashida Masakazu, Uezono Yasuhito	4. 巻 141
2. 論文標題 Inhibition of endothelin A receptor by a novel, selective receptor antagonist enhances morphine-induced analgesia: Possible functional interaction of dimerized endothelin A and μ -opioid receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111800 ~ 111800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.111800	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 Komiya Eriko, Tominaga Mitsutoshi, Hatano Ryo, Kamikubo Yuji, Toyama Sumika, Sakairi Hakushun, Honda Kotaro, Itoh Takumi, Kamata Yayoi, Tsurumachi Munehiro, Kishi Ryoma, Ohnuma Kei, Sakurai Takashi, Morimoto Chikao, Takamori Kenji	4. 巻 149
2. 論文標題 Peripheral endomorphins drive mechanical allodynia under the enzymatic control of CD26/DPPIV	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2021.08.003	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 0件）

1. 発表者名 坂入 伯駿、上窪 裕二、田端 俊英、櫻井 隆
2. 発表標題 1型代謝型グルタミン酸受容体とGABA _B 受容体は異種GPCR間複合体を形成し、互いの細胞内シグナルを双方向に制御する
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上窪 裕二、坂入 伯駿、田端 俊英、櫻井 隆
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体の複合体形成とシグナルクロストーク
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂入 伯駿、上窪 裕二、河野輝、山元京、田端 俊英、櫻井 隆
2. 発表標題 中枢神経に発現するGタンパク質共役型受容体(GPCR)のヘテロオリゴマー形成とシグナル伝達制御の解析
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂入 伯駿、上窪 裕二、田端 俊英、櫻井 隆
2. 発表標題 1型代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体における異種GPCR間複合体形成と双方向シグナル調節
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂入 伯駿、上窪 裕二、櫻井 隆
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体における異種GPCR間相互作用
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂入 伯駿、上窪 裕二、山崎 響、橋本 祥江、櫻井 隆
2. 発表標題 神経細胞に対してナノ粒子が引き起こす細胞応答と細胞死の評価
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 響、坂入 伯駿、上窪 裕二、櫻井 隆
2. 発表標題 シリカナノ粒子により生じる細胞内シグナルと細胞死の評価
3. 学会等名 第149回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

順天堂大学大学院 細胞・分子薬理学 https://pharmacology.sakura.ne.jp/ researchmap https://researchmap.jp/hakushun-sakai ri
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------