

機関番号：3 2 6 2 0

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700359

研究課題名（和文） GPCR シグナル・クロストークによるシナプス可塑性制御の分子機構

研究課題名（英文） Regulation of synaptic plasticity through inter-GPCR interplay

研究代表者

上窪 裕二 (KAMIKUBO YUJI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80509670

研究成果の概要（和文）：

本研究において、代表者は代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 とアデノシン受容体 A1R が機能的に相互作用することを見出した。mGluR1 は小脳長期抑圧の誘導に関与する分子であり、A1R はシナプス伝達や神経細胞の興奮性を抑制する分子である。本研究結果から、これらの分子が細胞膜上で近接して共局在している事が明らかとなった。また、A1R の活性化が mGluR1 のシグナル伝達を抑制することで、小脳長期抑圧を弱化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this project, I showed functional interaction of type-1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1) with adenosine A1 receptor (A1R). A1R signaling modulates synaptic release and neuronal excitability in many neurons. mGluR1 is a key molecule for inducing long-term depression. I found co-localization of A1R and mGluR1 in the plasma membrane. A1R agonists attenuated mGluR1-signaling and abolished LTD of glutamate-evoked current in cultured Purkinje cells

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

異種の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が複合体を形成し、直接あるいは下流のシグナル分子を介した相互作用によって単独の GPCR とは異なるシグナル伝達を行うことが示唆され注目を浴びている。

代表者らは、GPCR である代謝型ガンマアミノ酪酸受容体 ( $\text{GABA}_\beta\text{R}$ ) が中枢神経系におけるシナプス可塑性の誘導に関わる代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) と相互作用し、シナプス可塑性に影響することをこれまでに示している。そこで、本研究課題では、mGluR1 がアデノシン A1 受容体 (A1R) と相互作用しシナプス伝達を制御するのではないかと考え研究を開始した。

## 2. 研究の目的

代表者らは、同じ抑制型の GPCR である  $\text{GABA}_\beta\text{R}$  と A1R は活性化されると mGluR1 シグナルの増強と抑制という逆の働きをすることを明らかにしたが、分子メカニズムは未解明である。一方、様々な GPCR が細胞膜上で異種の受容体と直接結合して複合体を形成し、リガンドに対する親和性や脱感作に伴う細胞内移動に変化が起こることが報告されている。そこで、代表者らは、A1R の活性化が mGluR1 依存的なシナプス可塑性に与える影響と、A1R と mGluR1 の相互作用様式の解明を目指し研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気生理学的な解析

本研究では、薬理的な操作の行い易い単離培養したプルキンエ細胞を標本として用い、LTD への影響を評価した。LTD の誘導は、グルタミン酸の局所投与と細胞体の脱分極を繰り返し与えることで誘導し、ホールセル・パッチ・クランプ電位固定法によりグルタミン酸投与による内向き電流を測定した。A1R の活性化による mGluR1 シグナル伝達への影響は、mGluR1 に対する特異的なアゴニスト (DHPG) を投与した

際に発生する内向き電流を測定し、A1R アゴニストの有無による変化を評価した。

### (2) 生化学的な評価

mGluR1 と A1R に対する特異的な抗体を作成し、免疫共沈にて、mGluR1 と A1R の複合体形成について評価を行った。標本はマウスの小脳のシナプトソーム画分および mGluR1 と A1R を発現させた株化細胞の膜画分を用いた。各抗体で免疫沈降した膜画分は電気泳動し、ウェスタンブロット法にて評価を行った。相互作用部位の特定については、mGluR1 および A1R のアミノ酸配列を変えたものまたは部分ペプチドを株化細胞に発現させ、評価を行った。

### (3) 画像解析

mGluR1 の活性化および脱分極による細胞内シグナルについては、細胞内カルシウム濃度上昇を指標として評価をおこなった。カルシウム濃度の評価は、カルシウム指示薬である Fura-2 AM を用いたカルシウム・イメージングにより定量的な解析を行った。

mGluR1 と A1R の局在の評価は蛍光抗体法および、蛍光タグを mGluR1 または A1R に融合した融合タンパク質を発現させ評価を行った。観察は、共焦点蛍光顕微鏡および全反射蛍光顕微鏡を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 生理学的な解析から、A1R の活性化は mGluR1 シグナル伝達を抑制し、LTD を抑制することが明らかとなった。また、A1R による LTD の抑制は mGluR1 非依存的な LTD を抑制しなかった。このことから、A1R の活性化が mGluR1 シグナル伝達を抑制し、小脳 LTD を抑制することが示唆された。

(2) 生化学的な解析から、mGluR1 と A1R は小脳および株化細胞において複合体を形成することが明らかとなった。また、A1R と mGluR1 の相互

作用部位についても明らかになりつつある。

(3)カルシウム・イメージングの結果より、mGluR1の活性化による細胞内カルシウム濃度上昇がA1Rの活性化によって抑制されることが明らかとなった。一方、脱分極によるカルシウム流入はA1Rの活性化の影響を受けなかった。培養プルキンエ細胞におけるLTDの誘導には脱分極によるカルシウム流入とmGluR1の活性化が必要であるが、この結果はA1Rの活性化は脱分極シグナルではなくmGluR1シグナルを抑制して小脳LTDを抑制していることを示唆するものである。

共焦点蛍光顕微鏡を用いた観察から、mGluR1とA1Rは小脳プルキンエ細胞上で共局在することが示された。また、全反射蛍光顕微鏡を用いた観察から、mGluR1とA1Rは細胞膜近傍で共局在することが明らかになった。

シナプス可塑性の調節機構(メタ・シナプス可塑性)の分子メカニズムについて盛んに研究が行われているが、GPCRシグナル・クロストークによるメタ・シナプス可塑性についてはこれまで殆ど報告がない。本研究結果は、GPCRシグナル・クロストークによるシナプス可塑性の制御機構を示すものであり、学術的意味は大きい。覚醒レベルや気分の変化による髄液中のGABA、アデノシン濃度の変化が、GABA<sub>B</sub>R、A1Rの活性化を介してシナプス可塑性を制御している可能性を示唆するものであり、GPCRシグナル・クロストークのメカニズムの解明が、記憶・学習効率の調節機構の解明につながると期待される。GPCRは様々な生体機能に関わっており、本結果で示したGPCRヘテロ複合体形成によるシグナル・クロストークおよびシナプス可塑性の制御機構は創薬の新規標的の発見につながる可能性がある。

## 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)

[学会発表] (計 11 件)

- ①上窪裕二、アデノシン A1 受容体による代謝型グルタミン酸受容体と小脳長期抑圧の制御、第 84 回日本薬理学会年会、誌上発表
- ②上窪裕二、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)とアデノシン A1 受容体(A1R)相互作用による小脳 LTD の制御、Neuro2010 (神経科学学会・神経化学学会・神経回路学会 合同大会)、2010 年 9 月 4 日、神戸コンベンションセンター (兵庫)
- ③上窪裕二、A1 アデノシン受容体と mGluR1 のシグナル・クロストークによる小脳 LTD の制御、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 17 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ④Y. Kamikubo、Adenosine A1 receptor regulates mGluR1 signaling and LTD in cerebellar Purkinje cells、Neuroscience 2009 39th annual neuroscience meeting (Society for Neuroscience)、2009 年 10 月 19 日、Chicago's McCormick Place (Chicago、 Ill)
- ⑤Y. Kamikubo、Bi-directional regulation of cerebellar synaptic plasticity through inter-GPCR interplay、International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) 2009 年 7 月 28 日、Kyoto International Conference Center (Kyoto)

[その他]

ホームページ等

所属 Web サイト

<http://pharmacology.sakura.ne.jp/>

アウトリーチ活動情報

生理学若手研究者フォーラム・代表  
(2009年7月4日、順天堂大学)  
<http://youngphys.tobiiro.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上窪 裕二(KAMIKUBO YUJI)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号:80509670

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし