

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500333

研究課題名（和文） シナプス伝達制御機構の解析

研究課題名（英文） analysis of synaptic transmission

研究代表者 中嶋 善明（NAKAJIMA YOSHIAKI）

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10300724

研究成果の概要（和文）：新規受容体結合タンパクを同定して、シナプス伝達を制御する新たな仕組みを解明した。次に受容体と結合タンパクの相互作用をハイスループットに解析できる系を開発して、現在臨床で使用されている薬1000個程度をスクリーニングした。相互作用を増強するもの現弱させるものをそれぞれ数個ずつ見付け、新たな治療法の開発あるいは副作用の検索に対して意義深い結果を得た。

研究成果の概要（英文）：I identified novel mGluR-binding proteins which regulate synaptic transmission in a unique fashion. Then, I developed a high-through put analysis system for the receptor-protein interactions. Using this assay methods, I screened about 1000 drugs commonly used clinically to examine if they modulate the protein-interaction properties. I found several drugs which either enhance or diminish the interaction. The finding would be a basis of development of new therapeutics or a clue to possible sides effects of the drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1900000	570000	2470000
2011年度	500000	150000	650000
2012年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計			

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：受容体

1. 研究開始当初の背景
神経伝達ではシナプス前膜から放出された伝達物質がシナプス後膜の受容体で受容される

ことで情報が伝達される。これら両方の過程を制御するのが受容体である。本研究では、シナプス前及び後の代表的なG蛋白共役

型受容体の機能解析を軸に、シナプス伝達機構を解明する。

ヒューマンゲノムの解読は要素還元型の研究に一つの区切りを与え、網羅的解析法の進歩はシステムバイオロジーの考え方の必要性を訴えている。しかしながら精密なシステムの構築には個々の分子の機能解析が必須である。最近、私はmGluR6プロモーターを用いて双極細胞特異的にGFPを発現するマウスを作成し、トランスクリプトームの手法により網膜双極細胞での情報処理の分子機構を明らかにした(JB)。一方で、プロテオームの手法を用いたシナプス前mGluR結合蛋白の同定を進め、全く新しいシナプス小胞放出制御機構を見つけ、シナプス可塑性の生起機構を明らかにした(PNAS)。しかし、これら網羅的解析から得られた結果を見渡し、改めて個々の分子の機能解析の必要性を痛感した。具体的には、トランスクリプトーム解析で得られた双極細胞特異的発現分子の多数が機能未知の分子であることや、シナプス前mGluRに結合する蛋白の意義づけである。例えば以下の点がそれぞれにおいてあげられる。網膜双極細胞現状、網膜における分泌性因子の研究は色素上皮由来の因子あるいは一般的な因子の効果に関するものである。本研究の双極細胞由来因子は全く機能未知の蛋白の解析であり、得られる結果は全てにおいて新しいものとなる。疾患の治療を目的とした実験に関しては成功の確証はないが、これまでの様々な研究にも関わらず、網膜色素変性症や緑内障の治療法は見つかっておらず、新たな視点から治療法を検討する本研究の意義は少なからず存在する。

シナプス前のmGluR結合蛋白私を含め多くの研究の結果、G蛋白共役型受容体は単にG蛋白の活性化因子ではなく、それぞれが独自の機能を持つことが明らかになった。私は最近の研究で受容体とシナプス小胞放出機構の関連を解明したが、本研究はこれを発展させ、受容体と新たな情報系との関連を明らかにするものである。1つの受容体に対する複数の因子の相互作用の量・質的関係こそがシナプスの多様性に関わると信じており、得られた結果は神経系の疾患あるいは部位特異的な治療法開発に貢献できると考える。

2. 研究の目的

シナプス前のmGluR及びシナプス後のmGluR6の機能解析を基に、シナプス伝達機構の解明を目指す。前者ではmGluR結合蛋白の機能解析を、後者ではmGluR6を発現する網膜双極細胞に特異的な遺伝子の機能解析を行う。前者は受容体分子レベル、後者は受容体発現細胞レベルでの解析を起点とし、受容体によるシナプス特異性発現という自らの考えを検証する。予想される結果は神経系の疾

患あるいは部位特異的な治療法の開発に深く関わり、臨床的な意義も大きい。

3. 研究の方法

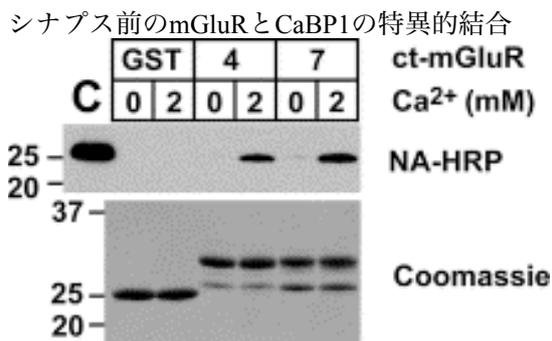
(1)アフィニティー精製後のプロテオーム解析でmGluRと結合するタンパクを既に同定している。今後は以下の解析を進める。1 各mGluRと当該分子の結合の特異性を調べる。2 mGluR及び当該分子の相互作用に関わる領域を調べる。3 当該分子のmGluRとの結合に対する既知のmGluR結合蛋白の影響を検討する。4 mGluR及び当該分子の相互作用が酵素活性に及ぼす効果を調べる。

問題点とその対策 A シナプス前のmGluRにはシナプス小胞放出部位の近傍に存在するものと、少し離れた場所に存在するものがあるが、両者ともシナプス小胞放出に関わる。膜輸送サイクルのどの過程に当該酵素が関わるのかは、相互作用するシナプス前のmGluRの発現部位と相関すると考える。このことを念頭に、まずは解析法が進歩しているPC12等の培養細胞を用いた系でmGluRと当該酵素の相互作用が膜輸送に及ぼす効果を調べる。方法は各mGluRと当該酵素を細胞に発現させる系を用いるが、特異的効果が得られなかった場合は、*in vitro*の輸送系あるいは神経細胞初代培養系や遺伝子改変動物を用いた実験等アッセイ系を適宜変更する。前者は分子の発現量の問題に対応し、後者は生理的に必要な因子が培養細胞に発現していない場合に対する対応である。B mGluRと結合する蛋白は複数知られているため、単にmGluRの発現量を変化させるだけではこれら相互作用の生体での意義を単離するのが困難である。そこでmGluRの蛋白結合部位にポイントミューテーションを入れ、それぞれの蛋白との相互作用が特異的に無くなるミュータントを得る。得られた変異を持つmGluRを細胞あるいは生体に発現させることで、当該酵素とmGluRの相互作用の意味を理解する。方法としては結合部位のアミノ酸を順次アラニンに変化させることを第一とするが、予想される結果が得られない場合はアラニンではなく可動性が高いグリシンあるいは電離した側鎖のチャージの変更等の手段を用いる。

(2)受容体と結合タンパクの相互作用をハイスループットに解析できる系を開発し、新たな治療法の開発を目指す。このために、定量性と価格を考慮し、マイクロプレートを用いたELISAの様なものを開発する。この際、問題となるのは受容体分子を固相化する方法である。この点に関しては価格の点からポリスチレン結合ペプチドを用いることとする。多数報告されているペプチドのうち効率がよく特異性が高いものを予備実験の段階で選択する予定である。

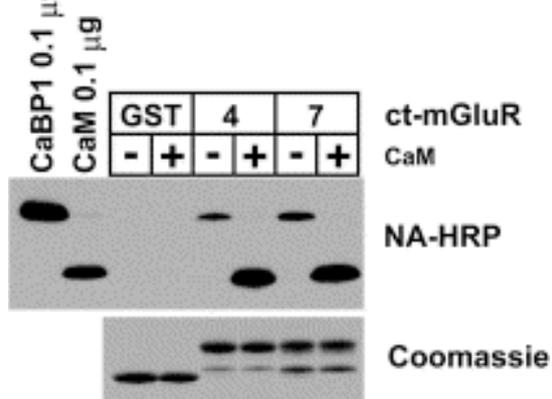
4. 研究成果

(1)シナプス前のmGluRにカルシウム結合タンパクであるCaBP1が結合することを発見し、mGluR、カルモデュリン、CaBP1の3者が巧妙に神経伝達を制御することを示した。興味深いことに、シナプス前のカルシウムチャンネルもカルモデュリンとCaBP1を結合し、それぞれによって独特な制御を受ける。さらに、シナプス前終末でmGluRとカルシウムチャンネルは近接して存在する。従って、mGluRとカルシウムチャンネルがカルモデュリンやCaBP1を介して間接的な相互作用をすることが明らかとなった。つまり、mGluRあるいはカルシウムチャンネルとこれら分子の相互作用を制御する薬剤を見つけることで、癲癇などの神経の疾患に対し、新たな概念をもとにした治療薬開発の礎を築いた。



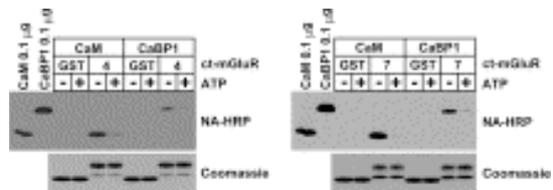
NA-HRPとラベルしたパネルがシナプス前のmGluRに特異的に結合したCaBP1を示す。

CaBP1とmGluRの結合はカルモデュリンによって阻害される。



NA-HRPとラベルしたパネルがmGluRに特異的に結合したCaBP1とカルモデュリンを示す。

mGluRがPKCによってリン酸化されるとCaBP1を結合できなくなる。



NA-HRPとラベルしたパネルがmGluRに特異的に結合したCaBP1とカルモデュリンを示す。

(2)具体的な治療法開発を目指し、mGluRとmGluR結合タンパクの相互作用に影響を及ぼす薬物の検索を進めた。まず、mGluRと結合タンパクの相互作用を多数、定量的かつ簡便に検出できるマイクロプレートを用いた系を開発した。実際にこの系を用いてmGluRと結合タンパクの相互作用を定量的に解析したところ、過去の発表で得られたと同様の値を得ることができた。またバックグラウンドが非常に低い解析系であることも確認した。次に、この系を用いて現在臨床で用いられている約1000個の薬剤のmGluRと結合タンパクの相互作用に及ぼす効果を調べた。相互作用を顕著に増強するものあるいは現弱させるものそれぞれ数個ずつが確認できた。本研究は、既存薬剤の神経系疾患への応用を提起するとともに、既存薬剤の神経系への副作用の存在に関して警鐘を鳴らすものとなった。

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)

〔雑誌論文〕 (計1件)

Nakajima Y. Ca²⁺-dependent binding of calcium-binding protein 1 to presynaptic group III metabotropic glutamate receptors and blockage by phosphorylation of the receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 412: 602-605 2011

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 (1)

中嶋 善明 (NAKAJIMA YOSHIAKI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10300724

(2)研究分担者 (0)

研究者番号：

(3)連携研究者 (0)

研究者番号：

