

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 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791149
 研究課題名（和文）精神疾患関連分子である代謝型グルタミン酸受容体 5 の活性調節機構の解明
 研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of metabotropic glutamate receptor 5 activity which protein related to psychiatric disorder.
 研究代表者
 上松 謙 (UEMATSU KEN)
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：60441672

研究成果の概要（和文）：代謝型グルタミン酸受容体 5 (mGluR5) の新規リン酸化サイトの検索を行い、セリン 870 残基がプロテインキナーゼ A(PKA) によってリン酸化修飾を受けることを発見した。新規リン酸化サイトの検索は、mGluR5 の C 末端ペプチドを作成し、*in vitro* で PKA によるリン酸化反応を行い、アイソトープラベル【 γ -³²P】ATP の取り込みをリン酸化ペプチドマップに展開した。この時、野生型 mGluR5 C 末端ペプチドと、セリン 870 残基をアラニン残基に置換したミュータントとの比較で、ミュータントではアイソトープの取り込みが阻害されることから証明された。現在、このリン酸化サイトによる mGluR5 機能や活性の変化を解析中である。

研究成果の概要（英文）：In this research, we discovered new phosphorylation site of mGluR5, which phosphorylated by PKA and the site is serine 870 of mGluR5. Methods of this study, we generate mGluR5 C-terminal peptide for *in vitro* phosphorylation assay by protein kinase A and 【 γ -³²P】ATP. Compared with wild and mutant mGluR5 C-terminal peptide, mutant inhibited to gain 【 γ -³²P】labeled isotope. Now we set up the experiment of the function by this mGluR5 phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学、分子生物学、細胞内情報伝達、蛋白リン酸化修飾、細胞内カルシウム動態、

1. 研究開始当初の背景

統合失調症、陰性症状である、感情鈍麻、自発性、意欲の低下、無関心は現在の治療薬での改善が難しいとされ、その病態に認知障害があると考えられている。フェンサイクリジンの乱用で、統合失調症様の陰性症状が出現することから、グルタミン酸神経伝達系と陰性症状の関連が考えられてきた。グルタミン酸受容体のひとつである、代謝型グルタミン酸受容体5型 (mGluR5) は、統合失調症、アルツハイマー病、不安障害や薬物依存などの病態において、認知、記憶、学習の面で関与していると考えられている。mGluR5 欠損マウスの解析では、統合失調症患者で認められる prepulse inhibition の障害や、海馬 CA1 部位における LTP の障害が報告されている。また、脆弱 X 症候群のモデルである fragile X mental retardation protein (FMRP) 欠損マウスはアルツハイマー病の動物モデルとも考えられているが、FMRP 欠損マウスでのシナプス可塑性の異常は、mGluR5 機能亢進が原因と考えられている。このように、mGluR5 はグルタミン酸情報伝達系において極めて重要であるが、mGluR5 活性調節のメカニズムは明らかでない。

2. 研究の目的

mGluR5 の活性調節による細胞内シグナル伝達の調整、神経可塑性への関与、他のグルタミン酸受容体との相互作用など未解明な部分は多い。応募者は、リン酸化により mGluR5 の生理的機能が修飾され、活性が調節されることに着目し研究を推進している。本申請研究課題では、mGluR5 の新規リン酸化部位の発見と、その機能解析により、mGluR5 の活性調節機構の解明を進める。

3. 研究の方法

(1)本研究では、分子生物学、神経化学の手法を用いて、代謝型グルタミン酸受容体5型(mGluR5)の新規リン酸化部位と、そのリン酸化を行うプロテインキナーゼの特定を

行う。具体的には、mGluR5 の C 末端ペプチドを大腸菌に遺伝子導入し培養することでペプチドを作成し、ペプチドに付けた GST タグにより単離精製を行う。そのペプチドを用いて、*in vitro* で様々なプロテインキナーゼによるリン酸化反応を行い、アイソトープラベル【 γ - ^{32}P 】ATP の取り込みをリン酸化ペプチドマップに展開する。この時、野生型 mGluR5 C 末端ペプチドと、リン酸化が予測されるセリンもしくはスレオニン残基をアラニン残基に置換した変異型との比較で、ミュータントではアイソトープの取り込みが阻害されることからアミノ酸リン酸化修飾が証明される。

(2)グルタミン酸による刺激によって、mGluR5 を介する細胞内シグナル伝達が、新たに同定したリン酸化修飾によって変化、影響を受けるのかを検証する。野生型 mGluR5 と、目的のリン酸化修飾を受けるセリンもしくはスレオニン残基（新規リン酸化部位を含む）をアラニン残基に置換し、リン酸化修飾されない mGluR5 変異型との比較により、その機能を解析する。過去に報告のある、mGluR5 を介した ERK の変化や、細胞内カルシウム動態の変化を検証する。

4. 研究成果

(1)新規リン酸化部位の検索のため、予測されるリン酸化部位で、過去に論文報告のない部位のセリンもしくはスレオニン残基をアラニン残基に置換した変異型 mGluR5 C 末端ペプチドを作成した。作成した変異体は、セリン 834 残基、スレオニン 837 残基、スレオニン 840 残基、・・・他、計 42 種類である。使用したプロテインキナーゼは、プロテインキナーゼ A、マップキナーゼ、プロテインキナーゼ C、CDK5 である

(図 1)



ペプチドは、トリプシン消化後、二次元に薄層クロマトグラフィーを用いて展開される。その展開したクロマトグラフィーは、フィルムに長時間感光させることで、アイソトープ集積部位が検出されるが、そのパターンを、野生型と変異型で比較する。図1の様に、野生型と変異型で集積部位が変化ない場合、変異させたリン酸化アミノ酸残基はプロテインキナーゼCでリン酸化修飾を受けない。

42種類の変異型 mGluR5 を作成した後、ようやく PKA にてリン酸化修飾を受ける部位を認め、それは過去に報告のない新規のリン酸化サイトであった。

(図 2)

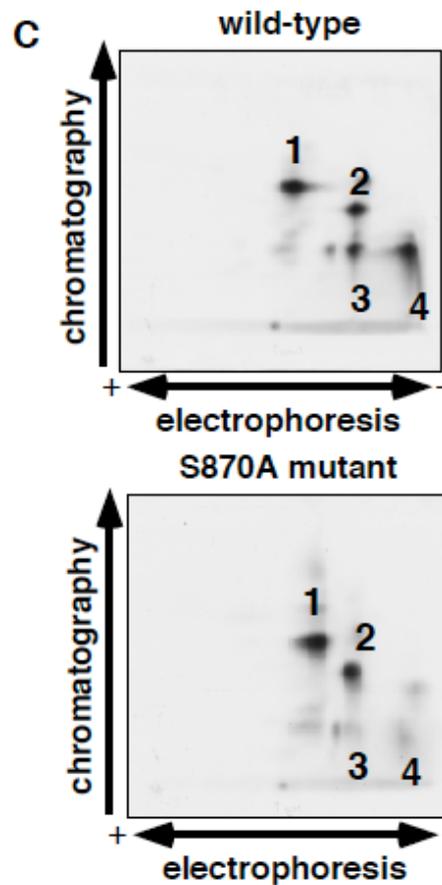


図2では3、4で示した点が、変異体で消失することが明らかである。

(2) 現在、この新たに発見したリン酸化サイトの機能解析を行っている

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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

上松謙, 内村直尚, 松石豊次郎, 西昭徳
スフィンゴシン-1-リン酸による線条体中型有棘細胞での GPR6 ひ依存性の PKA/DARPP-32 シグナル伝達の解析
日本神経科学会 2011. 9. 24 (横浜)

[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

上松 謙 (Uematsu Ken)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：60441672

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：