

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：32620
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700390
 研究課題名(和文) アデノシン受容体による代謝型グルタミン酸受容体の機能調節と運動学習の制御
 研究課題名(英文) Adenosine A1 receptor interacts with mGluR1 and regulates motor learning.
 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)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞膜表面ないしは細胞内で異種のGPCRと複合体を形成し、機能的な相互作用を行っている。神経細胞においてもGPCRの異種複合体の形成は確認されているが、生理的な役割は殆どわかっていない。本研究においては小脳プルキンエ細胞におけるアデノシンA1受容体と代謝型グルタミン酸受容体に注目し、これらの相互作用が運動学習に重要な小脳LTDの誘導を制御している事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In various cell types, G protein-coupled receptors (GPCRs) form heteromeric complexes and cooperatively mediate the intricate cellular responses. Although heteromeric GPCR complexes are suggested to occur in many neurons, their contribution to neuronal function remains unclear. We address this question using two GPCRs expressed in cerebellar Purkinje cells: adenosine A1 receptor, which regulates neurotransmitter release and neuronal excitability in central neurons and type-1 metabotropic glutamate receptor, which mediates cerebellar long-term depression, a form of synaptic plasticity crucial for cerebellar motor learning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

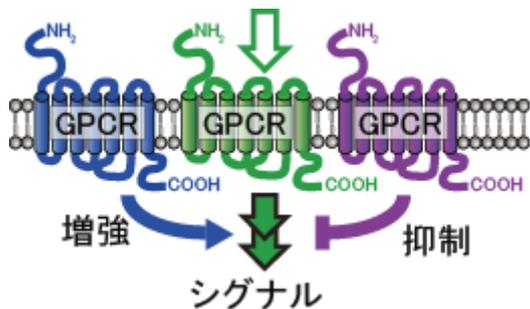
キーワード：Gタンパク質共役型受容体、シナプス可塑性、小脳長期抑圧、代謝型グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor; GPCR)は、細胞内で共役する三量体Gタンパク質を介してシグナル伝達を行う。GPCRは細胞膜を7回貫通する共通構造をもち、N末端が細胞外に、C末端が細胞内にあり、細胞内で三量体Gタンパク質と共役しており、三量体Gタンパク質を介した様々なシグナル伝達を行う。GPCRの機構を解明する上で重要な発見をした Brian Kent Kobilka 博士と Robert Joseph Lefkowitz 博士の2名が2012年のノーベル化

学賞を共同で受賞している。GPCRをはじめとする膜タンパク質は大量生産、精製、結晶化が困難であり、GPCRの立体構造の解析は進んでいなかった。しかしながら、近年のタンパク質の結晶化と構造解析技術の進歩により次々とGPCRの立体構造が明らかにされている。機能的な面では、GPCRを介したシグナル伝達については、GPCR一分子がリガンドの結合などによる活性化によって1組の三量体Gタンパク質を活性化しシグナル伝達を行うというモデルで表現されることが多い。しかしながら、近年のGPCRの立体構造解析やキ

メラ GPCR などを用いた生理学的、生化学的解析の結果などから、同種の GPCR 同士の複合体(ホモダイマー、ホモオリゴマー)形成や異種の GPCR 同士の複合体(ヘテロダイマー、ヘテロオリゴマー)形成の可能性が示唆され、非常に注目されている。しかしながら、相互作用が検討されている GPCR ペアはごく一部であり、その詳細なメカニズムや生理的な意義については殆どが未解明のままである。

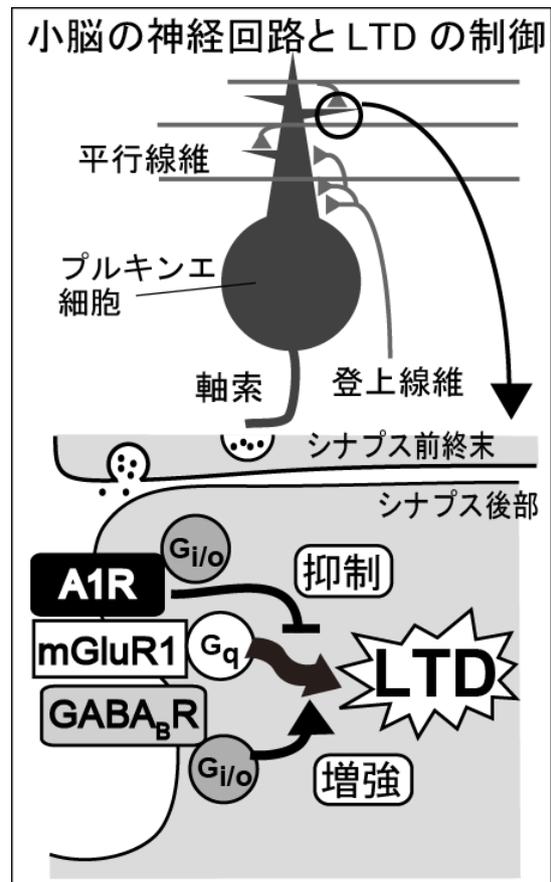


申請者は、シナプス伝達効率が減少する長期抑圧 (LTD) の制御・維持機構について研究を行ってきた (Kamikubo et al., 2005, 2006)。小脳 LTD は、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス伝達効率が持続的に低下するという現象であり、小脳依存的な運動学習の基礎過程であると考えられている (Ito et al., 2002)。小脳 LTD の誘導には GPCR である 1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) が関与しているが、mGluR1 シグナルが代謝型ガンマ・アミノ酪酸受容体 (GABA_BR) の活性化などによって調節を受けるという報告 (Hirono et al., 2002) から、申請者は小脳における mGluR1 と GABA_BR のシグナル・クロストークに注目し、以下の事を明らかにした。(1) GABA_BR と mGluR1 がプルキンエ細胞の棘突起上で共局在し、(2) GABA_BR の活性化が mGluR1 シグナルを強化して、(3) 小脳 LTD を強める (業績 1)。この申請者らの報告は別の研究グループも強く支持している (Rives ML et al., 2009)。

2. 研究の目的

記憶・学習は気分、覚醒、興味など様々な心理的要因によって変化する。記憶・学習の細胞レベルの基礎過程としてシナプス伝達効率の変化(シナプス可塑性)が盛んに研究され、分子メカニズムや誘導機序の解明が進んでいる。しかしながら、シナプス可塑性がどのような心理的機序で制御されているかについては未解明の点が多い。近年、シナプス可塑性の可塑性であるメタ可塑性 (Abraham WC, Bear MF, 1996) が学習・記憶効率の制御機構として注目を浴びている。シナプス可塑性の誘導にはシナプスに発現する GPCR の活性化が大きく関わることから、GPCR の相互作用に

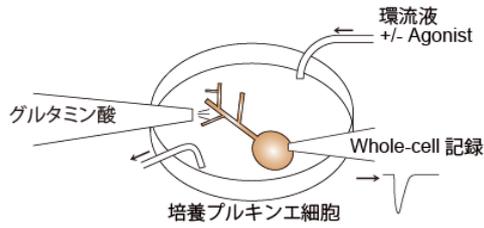
よる機能的な調節は記憶・学習に大きな影響を与えている可能性がある。そこで著者らは、GPCR のヘテロ複合体形成による相互作用がシナプス可塑性に影響を与え、記憶・学習効率に作用している可能性に注目し研究を行ってきた。本研究では、小脳 LTD の誘導に関わる mGluR1 とアデノシン A1 受容体 (A1R) の相互作用に注目し研究を実施した。これまでの研究結果から、GABA_BR と同タイプの GPCR である A1R は mGluR1 のシグナルを抑制し (Tabata et al., 2007)、小脳 LTD を阻害する可能性が示唆されていた。そこで本研究課題では mGluR1 と A1R の相互作用の分子メカニズムの解明とその操作による小脳 LTD の制御を目指し研究を実施した。



3. 研究の方法

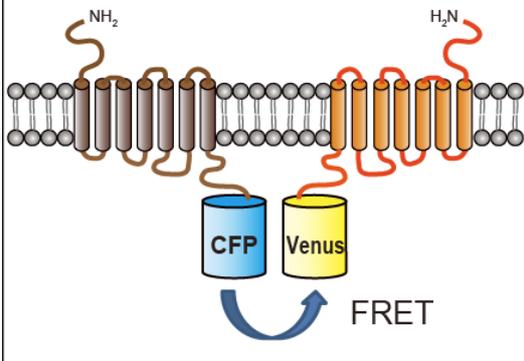
著者らは小脳 LTD の誘導に関わる 1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) がアデノシン A1 受容体 (A1R) の相互作用するメカニズムとその生理的な意義に注目し検討を行った。小脳 LTD の制御についてはマウス小脳由来の培養プルキンエ細胞を標本とし、グルタミン酸の樹状突起への局所投与と細胞体の脱分極によって誘導されるグルタミン酸の感受性の低下を小脳 LTD のモデルとして解析を行った。

培養プルキンエ細胞を用いた LTD の誘導



mGluR1 と A1R の相互作用部位の特定には GPCR の部分的なペプチドと蛍光タンパク質の融合タンパク質を HEK293 細胞に発現させ、蛍光タンパク質に対する抗体で免疫沈降し複合体を形成する側の GPCR が共沈されてくるか否かで評価を行った。さらにライブセルにおける GPCR 複合体形成の評価には、Forster resonance energy transfer (FRET) イメージングを用いて解析を行った。FRET イメージングは GPCR に青色蛍光タンパク質 (CFP) ないしは黄色蛍光タンパク質 (Venus) を融合した GPCR を HEK293 細胞に発現させ、アクセプター・ブリーチング、スペクトル・イメージングなどの手法を用いて評価を行った。

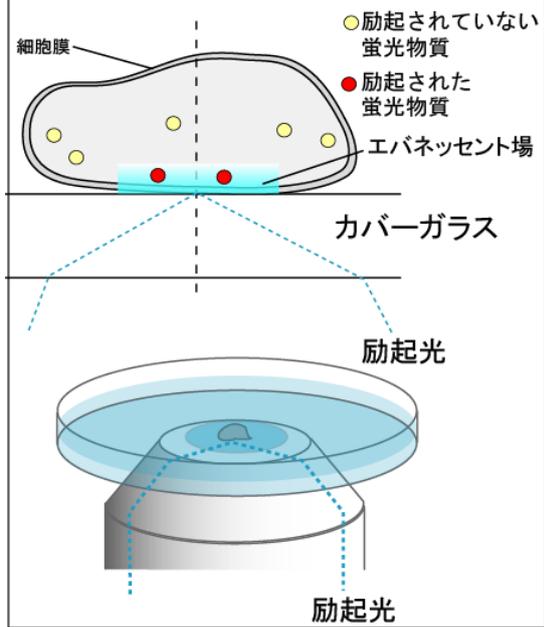
ライブセル FRET イメージング



小脳組織および培養プルキンエ細胞における mGluR1 と A1R の局在についてはウサギを用いて作成した特異的ポリクローナル抗体を用いて染色した。さらに、染色に用いた抗体を使用して固定小脳切片標本を用いた FRET による相互作用の解析を行った。FRET 効率については前述同様アクセプター・ブリーチング法を用いた。

細胞表面における相互作用と局在については全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いた。mGluR1 と A1R に蛍光タンパク質を融合させたものを HEK293 細胞に発現させライブセルで 2 つの GPCR の局在と輸送について観察を行った。

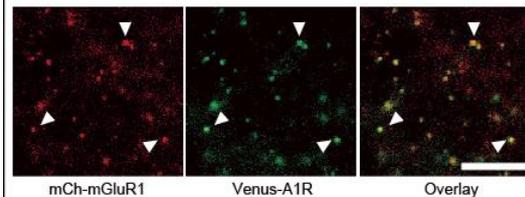
全反射蛍光顕微鏡イメージング



4. 研究成果

アデノシン A1 受容体の活性化によって mGluR1 の細胞内シグナル伝達が抑制され、結果として小脳 LTD の誘導が抑制されることが明らかになった。また、免疫共沈と FRET イメージングによって A1R と mGluR1 の相互作用部位を特定することができた。さらに相互作用部位のペプチドを細胞内に過剰発現させると mGluR1 と A1R の相互作用が抑制される可能性が示唆された。

mGluR1 と A1R の膜近傍での共局在



覚醒、集中、気分などの変化による髄液中のアデノシン濃度の変化が (Bohlen et al., 1979) 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があり、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。生体内では非常に多くの GPCR が発現しており、mGluR1-A1R の相互作用以外にも GPCR 複合体形成および相互作用によって受容体機能の多様性を生み出している可能性があり、今後の発展が期待できる結果が得られた。また本研究手法は、中枢神経系における他の GPCR 相互作用の生理的役割とメ

カニズムの解析に応用できるものであり、他の GPCR 研究、記憶・学習研究の嚆矢となり得ると考えられる。さらに、現在使用されている医薬品の多くは GPCR を標的としており、今回の結果から得られた知見は、GPCR ヘテロ複合体形成によるシグナル・クロストークの分子メカニズムの解明につながり GPCR のヘテロ複合体をターゲットとした創薬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)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) 上窪 裕二, GPCR と Gq α 、G β γ シグナリング, *Clinical Neuroscience*, 依頼原稿, 2013; 31: 502 -503,

https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=3_75&products_id=1344

(2) 上窪 裕二, GPCR と cAMP シグナリング, *Clinical Neuroscience*, 依頼原稿, 2013; 31: 382 -383,

https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=3_75&products_id=1330

(3) 上窪 裕二, 清水 英明, GPCR と三量体 G タンパク質, *Clinical Neuroscience*, 依頼原稿, 2013; 31: 262-263,

https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=3_75&products_id=1319

(4) 上窪 裕二, 清水 英明, G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 総論, *Clinical Neuroscience*, 依頼原稿, 2013; 31: 134-135,

https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=3_75&products_id=1316

(5) Ichikawa-Tomikawa N, Ogawa J, Douet V, Xul Z, Kamikubo Y, Sakurai T, Kohsaka S, Chiba H, Hattori N, Yamada Y, and Arikawa-Hirasawa E., Laminin a1 is essential for mouse cerebellar development, *Matrix Biology*, 査読有, 2012; 31: 17-28,

DOI:10.1016/j.matbio.2011.09.002

(6) Suzuki N, Hasegawa-Moriyama M, Takahashi Y, Kamikubo Y, Sakurai T, Inada E., Lidocaine attenuates the development

of diabetic-induced tactile allodynia by inhibiting microglial activation, *Anesthesia & Analgesia*, 査読有, 2011; 113: 941-6,
doi: 10.1213/ANE.0b013e31822827a2.

[学会発表] (計 6 件)

(1) 坂入 伯駿, 上窪 裕二, 櫻井 隆, 第 90 回日本生理学会大会, 異種 GPCR 間の相互作用による神経伝達の制御, 2013 年 3 月 29 日, タワーホール船堀 (東京)

(2) 上窪 裕二, 櫻井 隆, 第 86 回日本薬理学会年会, 海馬切片培養標本を用いたアミロイド β 産生の評価, 2013 年 3 月 21 日, 福岡国際会議場 (福岡)

(3) 榎山 拓, 上窪 裕二, 櫻井 隆, 第 86 回日本薬理学会年会, 切断端認識抗体を用いたニューレグリン 1 の BACE1 切断依存的細胞間シグナル伝達の解析, 2013 年 3 月 21 日, 福岡国際会議場 (福岡)

(4) 上窪 裕二, 櫻井隆, 第 35 回日本神経科学大会 (Neuroscience2012), mGluR1-アデノシン A1 受容体相互作用とシグナル・クロストーク, 2012 年 9 月 21, 名古屋国際会議場 (愛知)

(5) 上窪 裕二, 櫻井 隆, 第 85 回日本薬理学会年会, アデノシン A1 受容体と 1 型代謝型グルタミン酸受容体の複合体形成によるシグナル・クロストーク, 2012 年 3 月 16 日, 国立京都国際会館 (京都)

(6) 上窪 裕二, 藤田 洋介, 下村 岳司, 宮島 隆彰, 田端 俊英, 袋谷 賢吉, 狩野 方伸, 櫻井 隆, 第 34 回日本神経科学大会 (Neuroscience2011), アデノシン A1 受容体と代謝型グルタミン酸受容体の相互作用による小脳 LTD の調節, 2011 年 9 月 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川)

[その他]

(1) ホームページ等

所属講座 Web サイト

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

Researchmap

<http://researchmap.jp/Kamikubo/>

(2) アウトリーチ活動等

平成 24 年度 生理学若手研究者フォーラム

「生体機能への挑戦」の代表者・座長,

2012 年 6 月 30 日, 順天堂大学 (東京)

<http://youngphys.tobiiro.jp/forum/f2012>

/home.html

平成 23 年度 生理学若手研究者フォーラム
「脳機能の解明を目指して」の代表者・座長,
2011 年 6 月 18, 順天堂大学(東京)
[http://youngphys.tobiiro.jp/forum/2011/
home.html](http://youngphys.tobiiro.jp/forum/2011/home.html)

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