

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640024

研究課題名(和文) Tangoを利用した5-HT2C受容体活性のin vivoライブイメージング

研究課題名(英文) For the in vivo imaging of 5-HT2C receptor activity using Tango system

研究代表者

田中 雅樹 (Tanaka, Masaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80264753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では5-HT2C受容体(5-HT2CR)活性を簡便に測定できるシステムを開発するために、Tangoと呼ばれるArrestinのGタンパク質共役型受容体への結合を利用した系を構築した。まずTangoベクターに5-HT2CRを挿入したpEF1-5-HT2CR-Tangoプラスミドを構築し、受容体は2種類のRNA未編集型(INI)と完全編集型(VGV)アイソフォームを使用した。次に5-HT2CRから遊離したLexAの量に依存するEGFPによるレポータープラスミドを構築した。そして安定発現細胞株を作製し、INI、VGV型の活性を比較し、このアッセイ系が有効に作動していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a serotonin (5-HT) 2C receptor (5-HT2CR)-Tango assay system, a novel analysis tool of 5-HT2CR activity based on the G protein coupled receptor-arrestin interaction. In the first year, we constructed pEF1-5-HT2CR-Tango plasmids by modifying plasmids for Tango-system in drosophila with insertion of 5-HT2CR gene. We used two isoforms of mRNA editing, that is, INI and VGV isoforms of 5-HT2CR. Then we constructed plasmids for EGFP-reporter whose expression reflects the amount of released LexA by arrestin. In the second year, we developed a cell line stably expressing 5-HT2CR-Tango system using HEK293 cells and measured activity of INI and VGV isoforms and confirmed this system worked well. We think this system will be applied for high throughput drug-screening of 5-HT2CR activating ligands and in vivo brain imaging of 5-HT2CR activity after developing 5-HT2CR-Tango-transgenic mice in the future.

研究分野：神経解剖学

キーワード：5-HT2C受容体 Tango GPCR arrestin RNA編集

1. 研究開始当初の背景

セロトニン_{2C}受容体 (5-HT_{2C}R) は Gq/G11 と共役する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の1つで、脳高次機能や摂食等で重要な役割を担っており、精神疾患やメタボリック症候群などの疾患に対する治療薬のターゲットになっている^{1),2)}。

我々はこれまで 5-HT システムによるストレス応答ペプチドの制御³⁾やアルコール依存形成における 5-HT_{2C}R の関与⁴⁾などの解析を行ってきた。5-HT_{2C}R の mRNA は RNA 編集と呼ばれる転写後修飾を受ける。この編集の結果、活性の異なる複数のアイソフォームを発現する。慢性的アルコール暴露により編集酵素 ADAR の発現上昇が起き、側坐核における 5-HT_{2C}R の RNA 編集が亢進することによって特定のアイソフォームが増加することを見出した⁵⁾。しかし、この編集亢進による側坐核 5-HT_{2C} 活性の変化については分かっておらず、これをリアルタイムで測定する方法の開発が必要となった。

Tango を利用した GPCR 活性測定は様々な受容体に応用できる⁶⁾が、このテクニックは培養細胞でのみ利用されてきた。最近このテクニックをショウジョウバエに導入し、ドーパミン受容体活性のライブイメージングに成功した⁷⁾。

2. 研究の目的

我々は、最近ショウジョウバエで開発されたドーパミン受容体を解析する Tango システムを 5-HT_{2C}R に応用して 5-HT_{2C}R 活性をリアルタイムで測定できるシステムの確立を最初 *in vitro* の細胞培養系で行い、将来 *in vivo* で 5-HT_{2C}R の脳高次機能への関与を解析できる系の開発を最終目標としている。補助金を受けている2年の研究期間内にまず Tango を利用した 5-HT_{2C}R 活性の測定系の開発を、HEK293 細胞を使って行う。その時に RNA 編集によりアミノ酸配列が異なる2種類の 5-HT_{2C}R アイソフォーム、未編集型 (INI、第

2 細胞内ループの 156, 158, 160 番目のアミノ酸がイソロイシン、アスパラギン、イソロイシン)、と編集型 (VGV、バリン、グリシン、バリン) を使ってベクターを構築し、基礎活性や 5-HT 刺激による活性を、EGFP をリポーターとしてアッセイする系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

Tango と呼ばれる Arrestin の GPCR への結合を利用したシステムを 5-HT_{2C}R で構築した。

(1) プラズミド構築

まず、ショウジョウバエ用に開発された Valium-TEVcs-LexA-HA-2A-Arrestin-TEVp プラズミド⁷⁾を動物細胞で発現させるために、NotI-XbaI 断片

(TEVcs-LexA-HA-2A-Arrestin-TEVp) を pEF1 の NotI-XbaI 部位に挿入した。そして、TEVcs の上流 (KpnI-NotI) に終止コドンを除いた 5-HT_{2C}R を挿入し、pEF1-5-HT_{2C}R-Tango プラズミドを構築した。なお、5-HT_{2C}R は2種類の RNA 編集アイソフォーム (INI と VGV) を使用した。INI, VGV のサブクローニングは既に報告している通り⁵⁾、INI:

5'-GGTACCCGCCACCATGGTGAACCTGGG CAC-3', VGV:

5'-GCGGCCGCCACACTACTAATCCTCTCG -3'を用いて pGEM-T easy (Promega 社)ベクターを用いて行い、KpnI-NotI フラグメントを pEF1 に挿入して、pTango-5HT_{2C}R を作製した。

次に、レポーターとして pLexOP-mini-EGFP プラズミドを構築した。このプラズミドは、CMV プロモーターの上流に LexA オペレーター配列を持ち、EGFP 発現は 5-HT_{2C}R から遊離した LexA の量に依存する。なお、EGFP は通常の半減期のもの (EGFP) と短いもの (dEGFP) を使用した。

(2) 安定細胞株作製

5-HT_{2C}R-Tango の活性を、EGFP レポーター遺伝子発現を指標に測定するために、pLexOP-mini-EGFP または dEGFP の安定発現

株を HEK293 細胞で作製した。細胞選別には hygromycin B (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を使用した。

(3) ウェスタンブロット

次に、5-HT_{2C}R-Tango の発現をウェスタンブロットを用いて調べた。COS7 細胞に 5-HT_{2C}R-Tango プラズミドを遺伝子導入にして 24 時間後 PBS 洗浄し、Triton X-100 で細胞を溶解して回収した。20000Xg で遠心後、上清を SDS-PAGE 泳動を行って PVDF メンブレンに転写後抗 HA 抗体(1:1000、GeneTex 社)で免疫反応(12 h, 25°C)させた。発色はアルカリフォスファターゼ発色法 (nitroblue tetrazolium chloride、5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase p-toluidine salt) を用いて行った。

(4) 免疫細胞染色

細胞内局在が観察しやすい HeLa 細胞を用いた。カバーガラス上に培養した HeLa 細胞にリポフェクタミン 2000 で 5-HT_{2C}R-Tango を導入 24 時間後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 HA (1:1000)抗体、または抗 5-HT_{2C}R 抗体(1:100, D-12, Santa Cruz 社)で免疫反応(12 h, 25 °C)させた。2次抗体は Alexa Fluor 488 で標識した goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (Life Technologies 社)を用いた。DAPI (Dojinndo 社)で核染色後、共焦点レーザー顕微鏡(LSM 510 META, Carl Zeiss 社)を用いて細胞内局在を観察した。

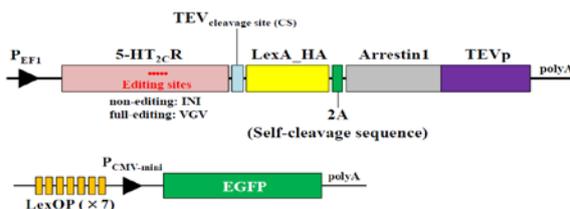
(5) Fluorometric 解析

あらかじめ pLexOP-mini-EGFP リポーター細胞(2 × 10⁴)を 96 穴プレートに培養し、pTango-5HT_{2C}R プラズミドを リポフェクタミン 2000 で遺伝子導入した。24 時間後 5-HT または 5HT_{2C}R の選択的阻害剤 SB242084 を投与してさらに 24 時間おいてリポーター(EGFP)の活性を測定した。蛍光強度の測定は fluorometer (Tecan GENios 社)を用いて行った。フィルターは 485-nm (excitation) と 535-nm (emission) を使用した。

4. 研究成果

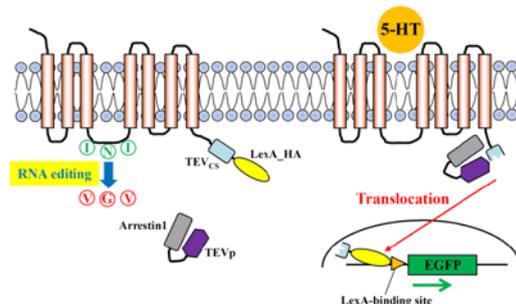
図 1 のように Tango システムで 5-HT_{2C}R 機能を解析するために、LexA-tagged 受容体 (pTango-5HT_{2C}R) と EGFP-reporter (pLexAOPmini-EGFP/Hygro) プラズミドを構築した。

図 1



この pTango-5HT_{2C}R の受容体 C 末端にはタバコ etch virus のプロテアーゼ (TEVp)切断部位と転写因子 LexA および HA タグが連結されている。さらに self-cleavage sequence 2A と Arrestin1-TEVp が続いており、このベクターを強制発現させると、2A で切断され、Arrestin1-TEVp が細胞質に存在する。5HT_{2C}R の活動に依存して arrestin1 がリクルートされると、TEVp の作用で LexA-HA が切り離されて、核内に移行し LexA オペレーター(LexOP)に結合することで EGFP がリポーターとして発現が増強する仕組みである。この原理をスキームで表すと図 2 のようになる。

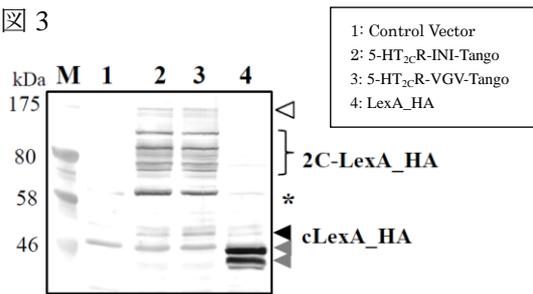
図 2



この pTango-5HT_{2C}R システムを COS-7 で構築して抗 HA 抗体でウェスタンブロットを行うと、多数のバンドが現れた (図 3)。175 kDa は全長、70-100 の多数のバンドは 2A で自己切断を受けた、5-HT_{2C}R-LexA_HA のサイズで、これは糖鎖の修飾も受けた大きさで

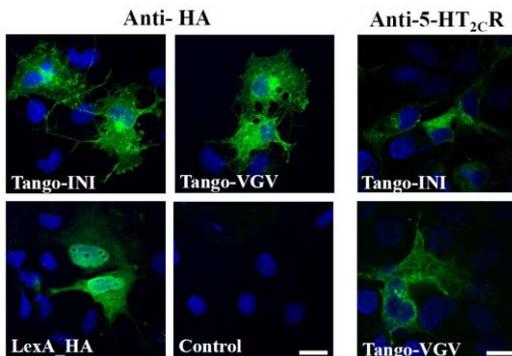
あると推測された。LexA_HA はおよそ 50 kDa に位置していると考えられた。

図 3



また、pTango-5HT_{2c}R を HeLa 細胞に遺伝子導入して抗 HA 抗体と抗 5-HT_{2c}R 抗体で免疫細胞化学を行って細胞内局在を検索すると、図 4 のように受容体は主に細胞膜に存在し、LexA は TEVp により TEVcs で切断され主に核に存在していることが確認できた。

図 4



次に HEK293 細胞に The LexA-driven EGFP reporter 遺伝子を発現させた安定株を作製し、pTango-5HT_{2c}R INI または VGV isoforms を導入した。EGFP 発現は両方のアイソフォームで観察でき受容体の constitutive activity を反映していると思われた。さらに 5-HT で受容体を刺激すると EGFP リポーターの発現が増強し(図 5A)、また濃度依存的に LexA_HA の release が亢進した(図 5B)。

図 5A

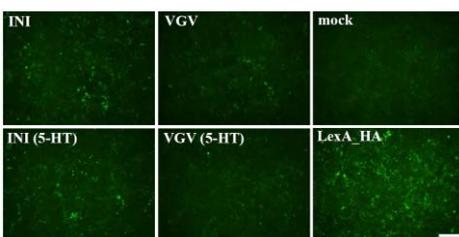
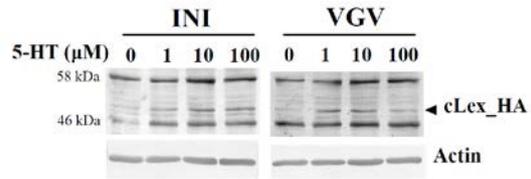
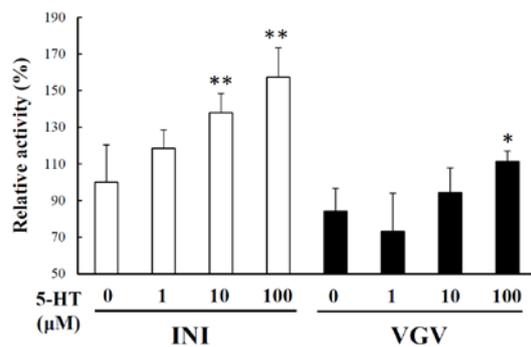


図 5B



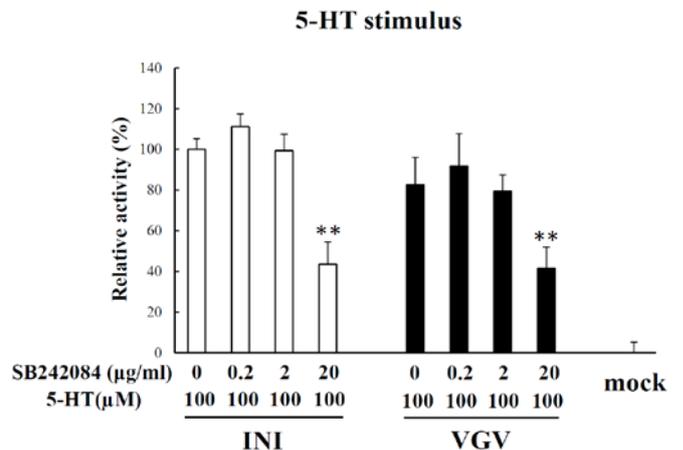
また、EGFP-リポーター遺伝子の発現を指標に fluorometric 解析を行うと、図 6 のように 5-HT 刺激により濃度依存的に蛍光強度が増強し、5HT_{2c}R の活性化の程度を検出できていると考えられた。INI 型と VGV 型では蛍光強度に差があり、INI の方が全体に強かったが、これは 2つのアイソフォームでは受容体の細胞内伝達系(イノシトールリン酸、細胞内カルシウム濃度)に差があり、編集型 VGV の方が低い反応を示す先行研究の結果⁵⁾を支持した。

図 6



さらに 5HT_{2c}R の選択的なインヒビター (SB242084) で前処理すると、図 7 のようにこの 5-HT による EGFP-リポーターの反応性増加が抑制されることを分かった。

図 7



以上まとめると、5HT_{2C}R-Tango システムの構築に培養細胞系では成功したと思われる。これらの成果をまとめて、現在論文投稿中である。今後この細胞系で fluorometer を用いて様々な化合物の 5HT_{2C}R 活性化の程度をスクリーニングすることが期待できる。さらには将来この系をマウスニューロンに導入したトランスジェニックマウスを作製して、脳部位特異的な 5HT_{2C}R 活性を *in vivo* EGFP reporter を検出することで解析できれば、情動、摂食を含めた、5HT_{2C}R 研究の発展に貢献できると思われる。

<引用文献>

- 1) Quesseveur G, Nguyen HT, Gardier AM, Guiard BP. 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression. *Expert Opin Investig Drugs* 21(11):1701-25, 2012.
 - 2) Halford JC, Boyland EJ, Blundell JE, Kirkham TC, Harrold JA. Pharmacological management of appetite expression in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 6(5):255-69, 2010.
 - 3) Miyamoto Y, Watanabe Y, Tanaka M. Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain. *Regul Pept* 145: 54-59, 2008.
 - 4) Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Kimura M. Serotonin_{2C} receptors in the nucleus accumbens are involved in enhanced alcohol-drinking behavior. *Eur J Neurosci* 35(8): 1368-1380, 2012.
 - 5) Watanabe Y, Yoshimoto K, Tatebe H, Kita M, Nishikura K, Kimura M, Tanaka M. Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 17(5): 739-751, 2014.
 - 6) Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(1): 64-69, 2008.
 - 7) Inagaki HK, Ben-Tabou de-Leon S, Wong AM, Jagadish S, Ishimoto H, Barnea G, Kitamoto T, Axel R, Anderson DJ. Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell* 148(3): 583-595, 2012.
- ## 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 4 件)
- 1) Watanabe Y, Yoshimoto K, Tatebe H, Kita M, Nishikura K, Kimura M, Tanaka M. Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 査読有 17:739-751, 2014.
DOI: 10.1017/S1461145713001545
 - 2) Tanaka M, Furube E, Aoki M, Watanabe Y. Behavioral analysis of relaxin-3 deficient mice. *Ital J Anat Embryol* 査読無 118: 56-59.
<http://dx.doi.org/10.13128/IJAE-13893>
 - 3) Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tatebe H, Miyata S, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. Differential expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons. *PLoS ONE* 査読有 9: e89327.
DOI: 10.1371/journal.pone.0089327
 - 4) Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y, Tatebe H, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the aggregate forming activity of exogenous α -synuclein fibrils. *Neurobiol Dis* 査読有 73: 244-253.
DOI: 10.1016/j.nbd.2014.10.011
- [学会発表] (計 9 件)
- 1) Tanaka M. Alteration in RNA editing of serotonin_{2C} receptors is involved in alcohol drinking in mice. 第 120 回日本解剖学会総会・第 92 回生理学会合同大会シンポジウム、神戸、2015.3.21-3.23.
 - 2) Tanaka M, Watanabe Y, Yoshimoto K, Nishikura K, Kimura M. RNA editing of serotonin 2C receptor is involved in alcohol intake. 20th International Symposium on Regulatory Peptides. Kyoto, Japan, 2014. 9. 7-10
 - 3) Watanabe Y, Tsujimura A, Aoki M, Taguchi K, Tanaka M. Development of Tango system for the monitoring of 5-HT_{2C}R activity. Neuroscience 2014. Washington D. C., USA, 2014. 11. 15-19
 - 4) 渡邊義久, 辻村敦, 青木美空, 田口勝敏, 田中雅樹. Tango を利用した 5-HT_{2C}R 活性のモニタリングシステムの開発. 第 37 回日本神経科学大会. 横浜, 2014. 9. 11-13.
 - 5) 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹. Tango を利用した 5-HT_{2C}R 活性のモニタリングシステムの開発. 第 11 回 GPCR 研究会. 東京, 2014. 5. 9-10.

- 6) Watanabe Y, Yoshimoto K, Tanaka M. Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. FEBS-EMBO 2014. Paris, France, 2014. 8. 30-9.4.
- 7) 青木美空, 渡邊義久, 吉本寛司, 田中雅樹. 5-HT_{2C}受容体RNA編集の脳高次機能への役割～RNA未編集マウスの行動解析～. 第37回日本神経科学大会. 横浜, 2014. 9. 11-13.
- 8) 吉本寛司, 渡邊義久, 田中雅樹, 長尾正崇, 上田秀一. 習慣飲酒形の視床下部グレリンとセロトニンの神経協調. 第37回日本神経科学大会. 神奈川, 2014. 9. 12.
- 9) Watanabe Y, Yoshimoto K, Tatebe H, Nishikura K, Kimura M, Tanaka M. Involvement of 5-HT_{2C}R-editing in alcohol preference. Society for Neuroscience. San Diego, USA, Nov 11, 2013 Nov 9-13, 2013

[図書] (計 1 件)

- 1) Watanabe Y, Tsujimura A, Taguchi K, Tanaka M. α -Synuclein metabolism and aggregation in the pathogenesis of Parkinson's disease. In: Polizzi M and Kanowitz H editors. Alpha-Synuclein: Functional Mechanisms, Structure and Role in Parkinson's Disease. (Nova Science Publishers Inc, New York) 29-50, 2014.

[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：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/cellbio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 雅樹 (Tanaka Masaki)
 京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：80264753

(2)研究分担者

渡邊 義久 (Watanabe Yoshihisa)
 京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：50363990

(3)連携研究者

()

研究者番号：