

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 15 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791147

研究課題名（和文）遺伝子操作動物を用いた GRIN の脳機能解明および脳形成に関与する GPCR の同定

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms and *in vivo* functions of GRIN3 for dopamine D2 receptor

研究代表者

本谷 安正 (MOTOTANI YASUMASA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：60421830

研究成果の概要（和文）：本研究では GRIN ファミリーの遺伝子機能を明らかにするために、GRIN3 遺伝子の機能解析を行った。GRIN3 がドーパミン D2 受容体を介したシグナル伝達を増強すること、D2 受容体量を増加させることを明らかにした。また、GRIN3 が GRK2 および GRK6 と結合することを明らかにし、そのメカニズムは GRIN3 が Go と結合することにより、GRK2 および GRK6 と GRIN3 間の結合も強くなるという全く新規のものであった。GRIN3 は GRK より D2 受容体の脱感作機能を阻害すると考えられた。また、GRIN3 KO マウスにおいて活動量の低下と著しい不安様行動を示すこと、ドーパミントランスポーター阻害剤に対する反応性が異なる点を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We examined molecular mechanisms and *in vivo* functions of GRIN3. In this study, we revealed that GRIN3 modulated both signal transduction and amounts of dopamine D2 receptor. GRIN3 was able to bind to not only Galpha(o) but also GRK family. Especially, GRIN3 binding with GRK6 was greatly enhanced in a manner of Galpha(o) binding to GRIN3. Probably, by this mechanism, GRIN3 trapped the crucial region of GRK2 and GRK6 for desensitization of D2 receptor, and potentiated G protein signaling. Thus, GRIN3 seems to be inhibitor of GRK family, at least GRK2 and GRK6. Finally, we observed that GRIN3 KO mice showed less locomotor activity, increased anxiety, and less sensitivity for dopamine transporter inhibitor, GBR12909.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,200,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,410,000

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、GRIN3、Go、ドーパミン、D2 受容体

1. 研究開始当初の背景

三量体 G タンパク質は創薬のターゲットである 7 回膜貫通受容体 (GPCR) により活性化され、生体恒常性維持に関わる主要な生体シ

テムの一つである。しかしながら、三量体 G タンパク質の活性制御メカニズムに関わる分子は多数同定されているものの機能は不明な点が多い。我々は三量体 G タンパク質の

サブファミリーである抑制性Gi/o サブユニットに結合する GRIN ファミリーを独自に単離同定した。図1に示すように、GRIN ファミリーは脊椎動物に特異的であり、3つの遺伝子から構成される。GRIN ファミリー間のアミノ酸配列における相同性がC末の約100アミノ酸において観察される。

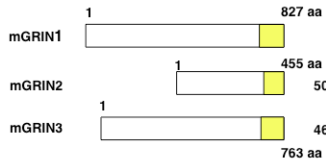


図1 マウスGRINファミリー間のアミノ酸相同性比較。GRINファミリー間にはC末端約100アミノ酸(黄色ボックス)に相同性が認められ、Gi/oサブユニットはその領域に結合する。

また、GRIN3 はドーパミン受容体が多く存在する線条体に発現が強く(図2)、GRIN3 KO マウスでは線条体における D2 受容体の発現量が大きく減少していた(図3)。

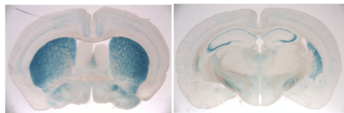


図2 成体期のGRIN3ヘテロ個体脳におけるLacZ染色。線条体、大脳皮質第5層および海馬(CA1, CA3)において発現が認められる。

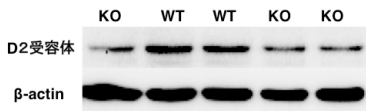


図3 D2受容体のウェスタンブロット解析。WTに比べてKOでは発現量が減少している。

2. 研究の目的

GRIN3 とドーパミン受容体の機能解析を行うことで GRIN ファミリー全体の機能が明らかにできると考えた。GRIN3 の分子レベルでのドーパミン受容体の制御機構を解析するとともに、KO マウスを用いた GRIN3 の行動学的解析が本研究の目的である。

3. 研究の方法

GRIN3 遺伝子の様々な変異ミュータントを作製し、ドーパミン D2 受容体の発現量およびシグナル伝達に影響を及ぼす部位を同定した。また、GRIN3 上の GRK2 および GRK6 との結合部位を同定した。GRIN3 KO マウスの行動解析を行い、生体における GRIN3 の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)

はじめに、GRIN3 が GRIN1 および GRIN2 と同様に Go に結合可能か、免疫沈降実験を行った。図4に示すように全長 GRIN3(763アミノ酸(aa))のうち、668-686aaの部位に強く

Go は結合した(図4A)。しかしながら、GRIN3 の735-47aaの部位においてもGoとの弱い結合が観察された(図4B)。

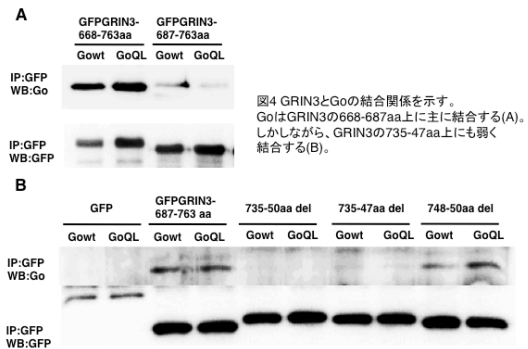


図4 GRIN3とGoの結合関係を示す。GoはGRIN3の668-687aa上に主に結合する(A)。しかしながら、GRIN3の735-47aa上にも弱く結合する(B)。

(2)

次に、ドーパミン D2 受容体シグナルにおける GRIN3 の効果を解析した。ドーパミン D2 受容体および GRIN3 を HEK293FT 細胞に過剰発現させ、ドーパミン刺激を行い、D2 シグナル活性化状態をリン酸化 ERK (pERK) 発現量を指標に解析した。

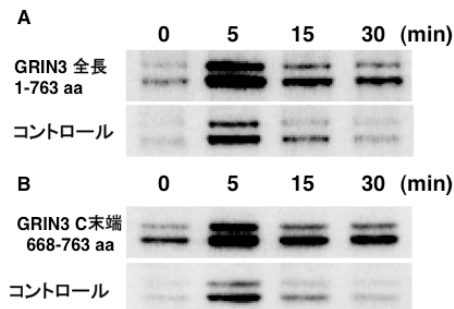


図5 ドーパミン受容体活性化におけるGRIN3の効果。D2受容体を過剰発現させたHEK293FT細胞に0.1 μMのドーパミン刺激を行い、0-30分にわたり、pERK量の変化を指標に受容体活性化状態を解析した。全長GRIN3(A)およびC末端GRIN3(B)ともにpERKの量が増加している。

図5Aに示すように、コントロール群およびGRIN3群ともにpERKの活性化ピークはドーパミン刺激後5分と変わらない一方、そのシグナル強度(pERK量)は測定時間全てにおいて大きくなっている。Basal条件下(0分値)におけるGRIN3群のpERK量の増大は内在性GRK抑制によるものと考えられる。

次に、D2シグナル伝達を活性化させる部位を探索したところ、図5Bに示すようにGRIN3のC末端が重要であることが分かった。このC末端の欠損ミュータントを複数作製し、C末端のどの部位が重要であるか調べたところ、意外なことにGo結合部位である668-687aaを含んだ部位が重要であることが判明した(図6)。

一方、弱い Go 結合部位である GRIN3 の 735-47aa を欠損させた GRIN3 は pERK 量に影響を及ぼさなかった (図 6)。687-763aa においてもコントロールに比べて有意に pERK 量の増加が観察されるが、これはあとに述べる D2 受容体量の発現増加によると考えられた。

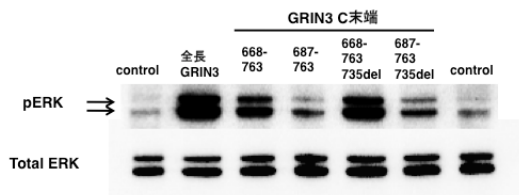


図6 668aaを含むGRIN3のC末端はD2受容体シグナルを著しく亢進する。

(3)

GRIN3 が D2 受容体シグナルを増強すること、および GRIN3 KO マウスにおける D2 受容体の発現量の減少により、GRIN ファミリーが G タンパク質のエフェクターではなく、調節因子であると考えられたので、GRIN が既知の調節因子と結合するか解析した。まず、G タンパク質の負の調節因子である RGS と結合するか、免疫沈降実験を行ったところ少なくとも RGS4、RGS7 および Gβ5 とは結合しなかった (データ示さず)。一方、受容体の負の調節因子である GRK ファミリーとの結合を同様に解析したところ、図 7 に示すように GRIN ファミリーは全て C 末端を介して GRK2 および GRK6 に結合した。さらに、図 7 B に示すように、GRIN2 および GRIN3 は Go 依存性に GRK6 との結合を強めていた。

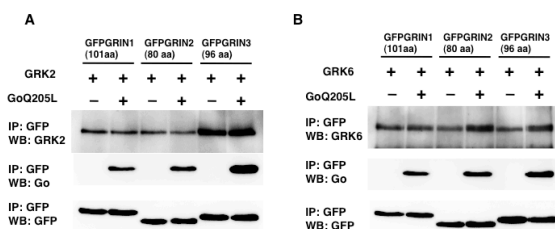


図7 GRINファミリーとGRK2およびGRK6の結合関係。GRINファミリーのC末端は全てGRK2およびGRK6と結合する(AおよびB)。特にGRIN2およびGRIN3はGo依存性にGRK6との結合が増強されている(B)。

(4)

次に、(3) のメカニズムを解析するために、GRIN3 の C 末端と GRK6 の関係を調べた。GRIN3 の 668-687aa 部位を含んだ C 末端は Go 結合依存性に GRK6 との結合が強く誘導されることが明らかとなった (図 8)。Go と GRK6 は直接結合しないことが報告されており、この GRIN3 の分子機構は全く新規なものである。特に、図 5 および図 6 の結果を照らし合わせると、GRIN3 は Go と結合すると同時に GRK6 と結合し、GRK6 によるドーパミン D2 受容体

の脱感作機構を抑制すると考えられた。

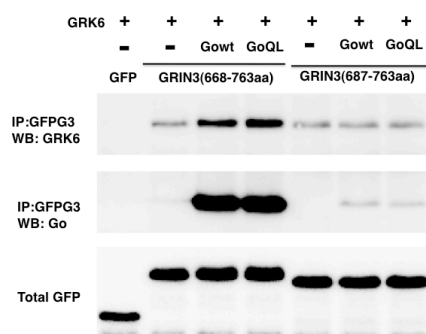


図8 GRIN3のGo結合部位はGタンパク質結合依存性にGRK6との結合を強める。

(5)

(4) の GRIN3 上の GRK6 との結合部位をさらに解析した。

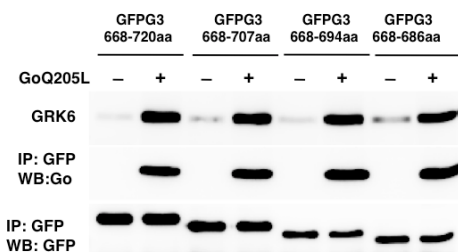


図9 GRIN3のGo誘導性GRK6結合部位はGRIN3のGo結合部位668-686aaに一致する。

図 9 に示すように GRIN3 の Go 誘導性 GRK6 結合部位は GRIN3 の 668-686aa が重要であり、これは GRIN3 の Go 結合部位と完全に一致した。今後は、668-686aa の 19 アミノ酸にアミノ酸置換したミュータントを用いて、Go との結合に必須であるが GRK6 には結合できないアミノ酸配列の同定を行う予定である。

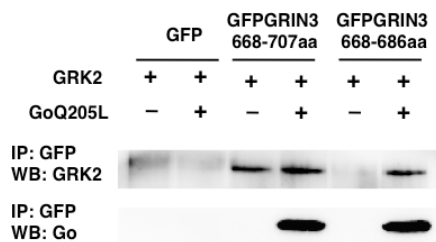


図10 GRK2はGo依存性にGRIN3に結合する。

さらに、GRK2 も同様な結合をするか解析したところ、GRK2 においても Go 依存性に GRIN3 と結合することが明らかとなった (図 10)。同時に GRK2 は 687-707aa に結合することも判明したが、この領域は D2 受容体の発現量に関わる部位のため、GRIN3 が GRK を抑制性

制御し、受容体量を増加させると考えられた。

(6)

次に GRIN3 がドーパミン D2 受容体量におよぼす効果について解析した。GRIN3 の HEK293FT 細胞への過剰発現は著しく D2 受容体量を増加させた(図 11)。以前明らかにした GRIN3 KO マウスにおける D2 受容体量の減少は GRIN3 遺伝子破壊による直接の効果と考えられた。興味深いことに、GRIN3 の N 末端と C 末端の両方に D2 受容体量を増加させる部位が存在することが明らかとなった。

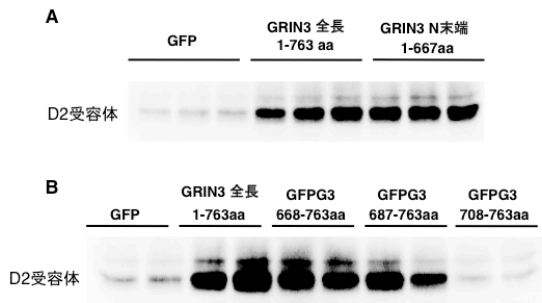


図11 GRIN3はD2受容体量を増加させる。GRIN3のN末端(A)およびC末端(B)の両方にD2受容体量の調節部位が存在する。しかしながら、C末端の708-763aaにはそのような効果はない。

少なくとも GRIN3 の C 末端 708-763aa にそのような機能はないため、687-708aa の 22 アミノ酸が D2 受容体の発現量調節に重要であり、これは GRIN3 が GRK2 をトラップすることで D2 受容体と GRK2 間の結合を阻害しているためと考えられる。

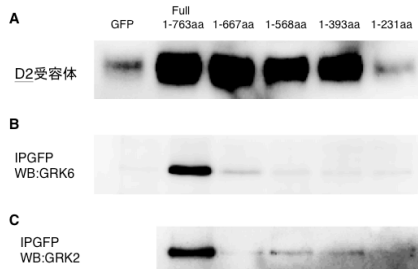


図12 GRIN3のN末とD2受容体量の関係。GRIN3のN末端とGRK2 およびGRK6との結合関係。

また、図 12 に示すように、GRIN3 の様々な N 末端が D2 受容体量を増加させた。少なくとも、GRIN3 の 1~231aa までは D2 受容体量の調節に関わっていない(図 12A)。また、これらの N 末端は GRK2 および GRK6 と非常に弱いながらも結合していた(図 12B および C)。この結果は、GRIN3 は広範な領域にわたり、複数の箇所において GRK ファミリーと結合することを示しており、GRIN ファミリーのターゲットが GRK ファミリーであることを強く示唆している。

以上のことから、GRIN3(おそらく他の GRIN1 および GRIN2 も)は GRK に対する阻害分子として機能すると考えられた。本研究より、GRK はそれ自身の異なる部位を用いて D2 受容体シグナルの脱感作および D2 受容体の内部移行を伴う脱感作を制御しており、GRIN3 はその両方を抑制していると考えられた。

(7)

次に GRIN3 KO マウスにおける行動解析を行った。オープンフィールド試験を 2 時間行ったところ、図 13A および図 14 に示すように、GRIN3 KO マウスは有意な活動量の低下が観察された。また、チャンパー内での中央(センター位置)への滞在時間が有意に減少しており、GRIN3 KO マウスは不安様行動を示すことが明らかとなった(図 13B)。

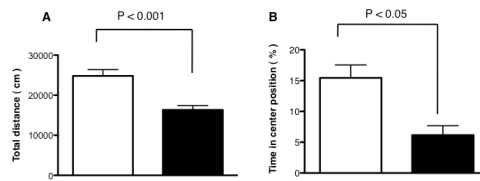


図13 GRIN3 KOマウスにおけるオープンフィールド試験。GRIN3 KOマウスにおいて活動量の低下が観察される(A)。また、センターポジションへの滞在時間の比率が有意に減少している(B)。

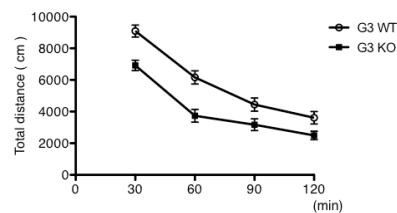


図14 30分毎のGRIN3 KOマウスにおけるオープンフィールド試験。GRIN3 KOマウスにおいて、全ての測定時間で有意な活動量の低下が観察される。

さらに不安様行動を elevated plus maze 試験により解析したところ、図 15 に示すようにホモ個体だけでなくヘテロ個体においても、gene-dose 依存性に不安様行動が著しく亢進していた。

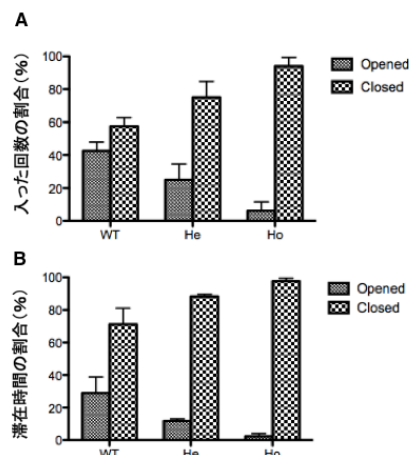


図15 Elevated plus maze試験による不安様行動解析。ヘテロおよびホモ個体ともに有意にopen barlに入る回数(A)および滞在時間(B)ともにその比率は減少している。

最後にドーパミントランスポーターの阻害剤である GBR12909 を 20mg/kg 濃度で腹腔内投与し、移動量を解析したところ、GRIN3 KO マウスでは全体的に移動距離が少なく特に、投与後 15 および 20 分における移動距離は有意に減少していた(図 16)。

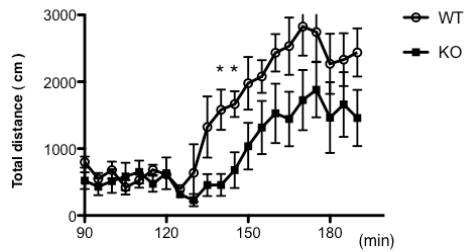


図16 GBR12909投与後の移動距離。
KOマウスでは投与後15および20分後の移動距離が有意に減少していた(*)。

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)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本谷 安正 (MOTOTANI YASUMASA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：60421830

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡村 匡史 (OKAMURA TADASHI)

国立国際医療研究センター研究所・

ヒト型動物開発研究質・室長

研究者番号：00333790