

# 広島大学 大学院医系科学研究科

## 神経薬理学研究室

私達、神経薬理学研究室では神経変性疾患、虚血性脳疾患、うつ病を初めとする精神疾患、神経免疫疾患など、様々な難治性神経疾患の治療方法の糸口を得ることを目的に、次のような研究を行っています。

### 1) タンパク質リン酸化酵素 PKC に関する研究

#### PKC について

プロテインキナーゼ C (PKC) は、様々な細胞機能に關与するタンパク質リン酸化酵素で、10種類以上の分子種の存在が知られています。神経系で PKC は、神経可塑性の発現と維持、神経系の発達、神経細胞の突起伸長と極性の形成に關与していると考えられています。

#### イメージングを駆使した PKC トランスロケーションの研究

PKC の際立った特徴として、細胞が何らかの刺激を受けた際に、PKC が特定の細胞内器官・部位に居場所を変えることが知られており、この現象は、「PKC トランスロケーション」と呼ばれています。我々は PKC とクラゲ由来の蛍光タンパク質である GFP (Green fluorescent protein) を融合させたタンパク質 PKC-GFP を培養細胞に遺伝子導入し、蛍光で光る可視化 PKC を発現させました(図1参照)。共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、おもに PKC-GFP は、細胞質に存在し核は黒く抜けて見えるのがわかります。そこで、細胞に存在する受容体を刺激すると PKC は素早く細胞膜の方に移動し、また細胞質に戻ってきます。このように、PKC はトランスロケーションした部位でリン酸化酵素としての働きを発揮すると考えられます。

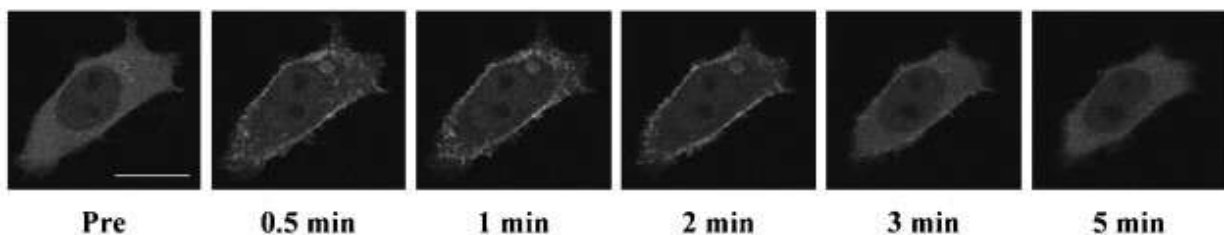


図1 PKC-GFP のトランスロケーションの様子。PKC-GFP を培養細胞(CHO 細胞)に発現させ、CHO 細胞が持つ P2Y 受容体を ATP で刺激した。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行った。

#### 薬物により誘発されるによる PKC トランスロケーション

PKC トランスロケーションは薬物でも誘発されます。下の図は静脈麻酔薬のプロポフォールが  $\epsilon$  PKC-GFP のトランスロケーション起こすことを示しています。プロポフォールの効果、特に副作用の発現には PKC トランスロケーションが關与していることが予想されます(図2)。

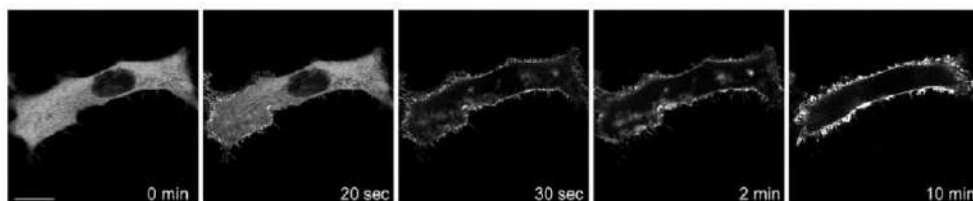


図2 PKC-GFP を HeLa 細胞に発現させて、静脈麻酔薬プロポフォールを投与したところ、PKC-GFP は細胞膜に持続的にトランスロケーションした。プロポフォールが直接 PKC に働いて起こす現象であると予想された。

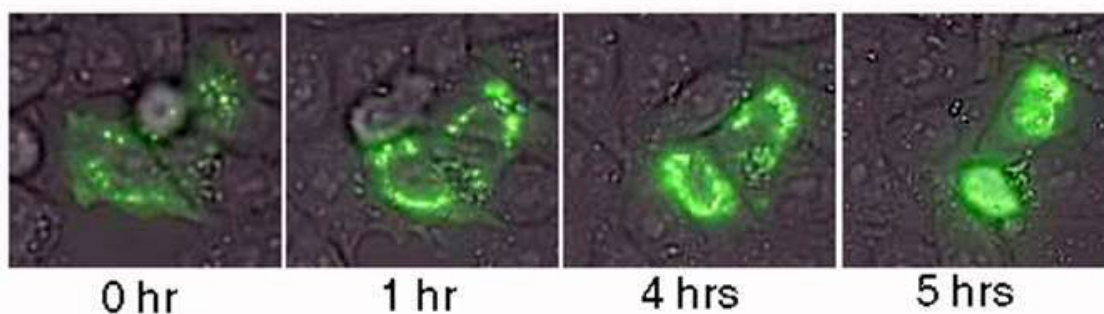
## PKC の関与する神経変性疾患の病態解明と治療薬の開発に関する研究

### PKC と脊髄小脳変性症

遺伝性脊髄小脳失調症 14 型(SCA14)は PKC の  $\gamma$  分子種( $\gamma$ PKC)の遺伝子変異で起こる遺伝性疾患です。そこで、この病気を引き起こす変異  $\gamma$ PKC の細胞内での特性を明らかにすることで、脊髄小脳失調症をはじめとする神経変性疾患の病態解明を試みています。 $\gamma$ PKC-GFP を細胞に発現すると、次第に細胞内で凝集体(ぶつぶつ)を形成し、それらが核のほうに集積して、やがて細胞が死ぬことがわかりました(図3))。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、同様に異常なタンパク質が凝集体を作ることがわかっており、SCA14 の病態を解明していくことが、神経変性疾患全般の病態解明につながると考えています。

また、この凝集体形成を抑制する薬物は、神経変性疾患の治療薬となる可能性があると考え、そのような薬物を探すことに着手しています。糖類でダイエット甘味料のトレハロースが、変異  $\gamma$ PKC の凝集体形成と細胞毒性を抑制することを見つけました。

図3 変異  $\gamma$ PKC-GFP が凝集体を形成する様子



## 2) セロトントランスポーターの機能解析

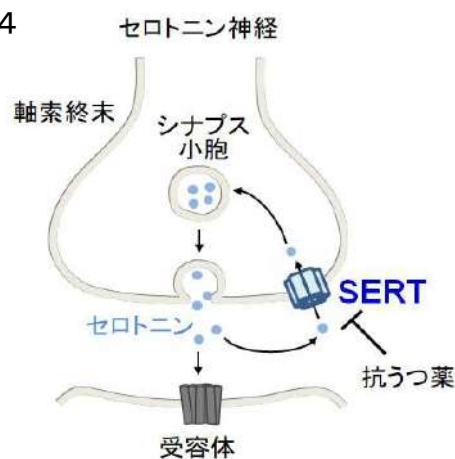
### セロトントランスポーターとは？(図4 参照)

セロトニンは、人間の情動(不安・抑うつ)をコントロールする神経伝達物質のひとつです。セロトニンは神経細胞で合成され、神経終末(前シナプス)に運ばれてシナプス間隙に放出され、情報を伝達します。放出されたセロトニンの一部は分解されますが、一部は神経終末に回収され、再利用されます。この神経終末にセロトニンを再回収する役割を担うのがセロトントランスポーター(SERT)です。SERT は、抗うつ薬の作用点として知られています。

### 膜輸送を介したセロトントランスポーター機能調節と膜輸送促進効果の持つ薬物の検索

SERT は、遺伝子が転写されたのち、小胞体でタンパク質に翻訳され膜に組み込まれます。その後、ゴルジ体を経て形質膜に発現し、初めて細胞外のセロトニンを取り込む機能を発揮できるようになります。その後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ分解されます(図5)。

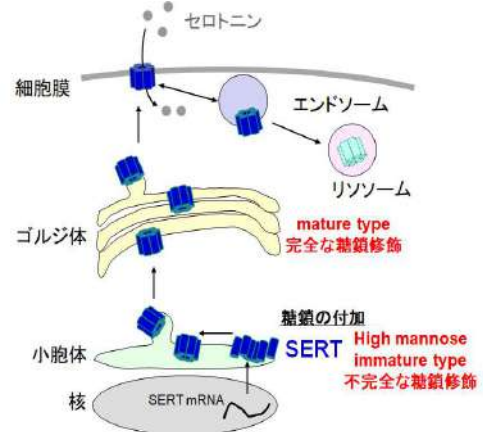
図4



この過程が SERT の一生です。この一生の間、SERT は膜に組み込まれたまま輸送されるので、この過程を SERT の膜輸送と呼んでいます。我々は、この SERT の膜輸送の調節機構に焦点を当てて研究を行っています。SERT 膜輸送を促進、あるいは抑制する薬物は、SERT 発現細胞のセロトニン取り込み能力を変化させることができます。従って、SERT が関与する精神神経疾患の治療薬の候補になる可能性があります。

また、SERT の膜輸送促進効果を持つ薬物は、折りたたみ不全タンパク質の小胞体への蓄積を抑制するので小胞体ストレスの改善薬として、様々な神経疾患の治療薬として期待できるのではないかと考え、そのような薬物を検索しています。また、パルミトイル化による SERT 膜輸送の調節機構の解析にも着手し、世界で初めて、SERT のパルミトイル化部位を同定しました。

図5 SERT の膜輸送と糖鎖修飾



### 3) 恒常的活性化型受容体機能探索による神経免疫疾患病態理解と治療応用

細胞膜上には様々な受容体が発現していますが、中でも G 蛋白質共役型受容体 (GPR) は受容体の中でも最大のファミリーを構成し、ヒトで約 800 種類の GPR の存在が明らかにされており、創薬の重要なターゲットとなっています。

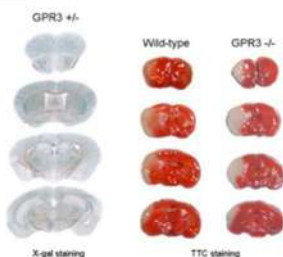
GPR3 は恒常的 Gs 活性化能があるユニークな受容体ですが、研究代表者の田中は、卵母細胞に発現する GPR3 が減数分裂停止維持に関与することを Mehlmann, Jaffe, 佐伯らと共同で解明して以来<sup>1, 2)</sup>、主に GPR3 の分子基盤や、病態への影響や役割について検討してきました。

その結果、GPR3 が神経細胞に豊富に発現し<sup>3, 7)</sup>、神経突起伸張<sup>3, 6, 8, 10)</sup>・分化<sup>4, 8)</sup>・生存<sup>5, 10)</sup>など神経細胞恒常性維持に深く関与し、その破綻は脳梗塞を増悪させる<sup>5)</sup>ことを解明しました(図 6)。最近では、GPR3 は軸索再生にも寄与し、緑内障病態に関与する<sup>10)</sup>ことがわかりました(図 7, 8)。その他、GPR3 は多発性硬化症増悪バイオマーカーの可能性が指摘されていますが、T 細胞に発現する GPR3 が、核内受容体 NR4A2 発現制御や、エフェクター T 細胞抑制に寄与することを新たに解明<sup>9)</sup>しており、神経免疫疾患の多発性硬化症病態に与える GPR3 の役割について現在検討を進めています。

他の研究者らの GPR3 に関連した報告でも、アルツハイマー病との関連性(Thathiah A et al., Science 2009; Huang Y et al., Sci Transl Med 2015)や、褐色脂肪細胞でエネルギーメタボリズムなど恒常性へ関与が報告されており (Johansen OS et al., Cell 2021)、近年非常に注目を集めている受容体です。

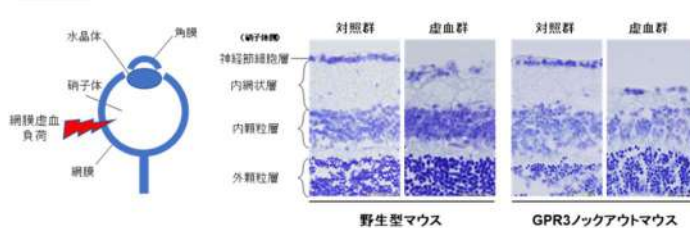
ハイコンテント・超解像共焦点顕微鏡、RNA シークエンスなど最新の研究ツールを活用し、恒常的活性化型受容体を通じた神経・免疫の共通した機能や分子基盤を探り、脳梗塞や多発性硬化症などの神経免疫疾患の病態理解と治療への応用を目指しています。

図6



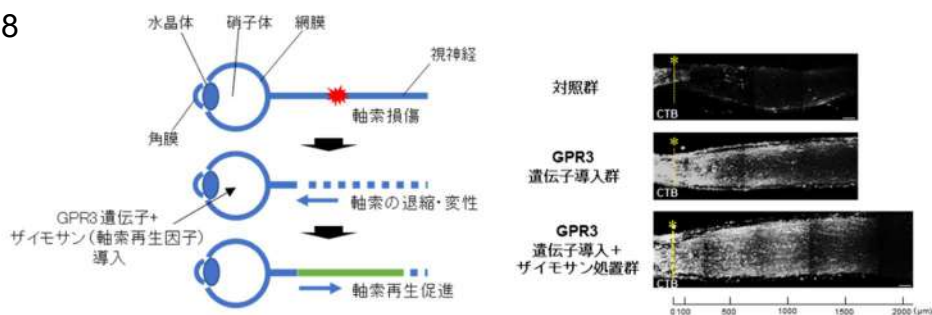
GPR3ノックアウトマウスでは  
脳梗塞巣が拡大する

図7



GPR3ノックアウトマウスでは網膜虚血負荷により  
神経節細胞死が増大する

図8



マウス網膜へのGPR3遺伝子導入や他の軸索再生因子との併用が軸索再生を促進する

## 主要関連論文 (\*責任著者)

1. Mehlmann LM, Tanaka S et al., Science, 2004.
2. Freudzon L, Tanaka S et al., J Cell Biol, 2005.
3. Tanaka S et al., J Biol Chem. 2007.
4. Tanaka S et al., PLoS One, 2009.
5. Tanaka S\* et al., Neurobiol Dis, 2014.
6. Miyagi T, Tanaka S\* et al., PLoS One, 2016.
7. Ikawa F, Tanaka S\* et al., Brain Res, 2020.
8. Tanaka S\* et al., Mol Cell Neurosci, 2022.
9. Shiraki H, Tanaka S\* et al., J Pharmacol Sci, 2022.
10. Masuda S, Tanaka S\* et al., Neurobiol Dis, 2022.

## 連絡先

広島大学大学院 医系科学研究科 神経薬理学研究室

酒井規雄

広島市南区霞1-2-3 基礎社会医学研究棟 8階

電話082-257-5140

E-mail: nsakai@hiroshima-u.ac.jp