

ニューロンにおける膜7回貫通型受容体の
合成・移送と膜組み込み経路

(研究課題番号 06808079)

平成6・7年度科学研究費助成金
一般C 研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 山田久夫
(滋賀医科大学医学部・解剖学第二講座・助教授)

【はしがき】

モノアミンおよびペプチド性液性因子（ホルモン、神経伝達物質など）は標的細胞の細胞膜を7回貫通するタンパクからなる膜型受容体、すなわち膜7回貫通型受容体(7TMSR)に結合する。多くの7TMSRの化学構造は、ほんの数年前から判明し始めたばかりで、例えばGプロテインや2次メッセンジャーとの関連については多くの研究成果が挙げられているが、7TMSRの合成・移送・膜組み込み機構については、それに取り組む研究者が少ないこともあって、ほとんど解明されていない。

今回これを解明するべく、科学研究費を交付していただいた。長い突起を持つニューロンを解析のモデルに用いるというのは良いアイデアで、*in vivo*実験が行いにくいなどの欠点もあったものの、一定の成果を得ることができた。近年、受容体やトランスポーターの化学構造や機能の解明がすすんでいるが、今回の研究がそれらの一助となることを希望する。

【研究課題】

ニューロンにおける膜7回貫通型受容体の合成・移送と膜組み込み経路

【課題分類・番号】

一般 (C)・06808079

【研究年度】

平成6・7年度

【研究組織】

代表者： 山田久夫（滋賀医科大学医学部・解剖学第二講座・助教授）

分担者： なし

協力者： 越智淳三（滋賀医科大学医学部・解剖学第二講座・教授）

黒川 清（滋賀医科大学医学部・解剖学第二講座・助手）

西村 環（滋賀医科大学医学部・解剖学第二講座・助手）

【研究経費】

平成6年度 100万円

平成7年度 80万円

計 180万円

【論文】

1. K. Kurokawa, H. Yamada, J. Ochi :
Immunohistochemical localization of endothelin type A receptor in rat brain.
Neuroscience Research, suppl 18, s46
2. H. Yamada, J. Ochi :
Distribution of GnRH receptor in mouse brain.
Neuroscience Research, suppl 19, s60
3. T. Nishimura, H. Yamada, M. Kinoshita, J. Ochi :
Endothelin expression during rat heart development : An immunohistochemical and *in situ* hybridization study.
Biomedical Research, 15, 291-298, 1994
4. H. Yamada, K. Kurokawa :
Histocytochemical analysis of endothelin and its role in the central nervous system.
Central nervous system and blood pressure control 1993, Yubunsha Publishing, 105-117, 1994
5. 山田久夫、越智淳三 :
脳脈管ペプチド—その機能形態学的解析
解剖学雑誌, 70, 422-435, 1995

【学会発表】

1. 黒川清、山田久夫、越智淳三：
エンドセリン A 型受容体陽性ニューロンにおけるチロシン水酸化酵素の発現
第 9 9 回日本解剖学会総会，（山形）1994. 3.30
2. H. Yamada：
Distribution of GnRH-receptors in murine forebrain by immunohistochemical technique.
76th Annual Meeting, The Endocrine Society USA, （アナハイム）1994. 6.15
3. 山田久夫：
GnRH 受容体の組織細胞化学的解析
第 6 7 回日本内分泌学会秋季学術大会，（広島）1994.11.16
4. H. Yamada, J. Ochi：
Distribution of GnRH receptor in mouse brain.
第 1 8 回日本神経科学大会，（東京）1994.12. 7
5. 黒川 清、山田久夫、越智淳三：
エンドセリン A 型受容体のラット体内分布
第 1 0 0 回日本解剖学会総会，（東京）1995. 4. 2
6. 西村 環、山田久夫、越智淳三：
ラット心臓におけるエンドセリンの個体発生学的研究
第 1 0 0 回日本解剖学会総会，（東京）1995. 4. 2
7. J. Ochi, H. Yamada, K. Kurokawa, T. Nishimura：
Endothelin：A brain-vascular peptide.
Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, （Kyoto）1995. 7.10
8. H. Yamada, J. Ochi, P.M. Conn：
Immunohistochemical study on GnRH receptor.
Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, （Kyoto）1995. 7.10
9. K. Kurokawa, H. Yamada, J. Ochi：
Immunoreactivity of endothelin type a receptor in the brain.
Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, （Kyoto）1995. 7.10

10. 山田久夫、黒川 清、西村 環、寺村智子、越智淳三：
カテコールアミン産生細胞はエンドセリンA型受容体を持つ
第101回日本解剖学会総会，(福岡) 1996. 4. 4 (予定)

11. 黒川 清、山田久夫、越智淳三：
ラットVIP1型受容体に対する特異的抗体の作成と免疫組織化学への応用
第101回日本解剖学会総会，(福岡) 1996. 4. 4 (予定)

12. 寺村智子、西村 環、黒川 清、山田久夫、越智淳三：
ラット眼球におけるエンドセリンの局在について
第101回日本解剖学会総会，(福岡) 1996. 4. 4 (予定)

13. 劉 影、山田 久夫、越智 淳三：
消化管壁のエンドセリン含有細胞
第101回日本解剖学会総会，(福岡) 1996. 4. 4 (予定)

【研究成果の概要】

ホルモンや神経伝達物質などは標的細胞の細胞膜を7回貫通するタンパクからなる膜型受容体、すなわち膜7回貫通型受容体(7TMSR)に結合する。多くの7TMSRの化学構造は、ほんの数年前から判明し始めたばかりである。この7TMSRの合成・移送・膜組み込みとリサイクルの機構については、それに取り組む研究者が少ないこともあって、ほとんど解明されていない。

ニューロンは長い神経突起(樹状突起や軸索)をもっており、それらの突起先端部(または終末部)の細胞膜上にて、リガンドと結合するいくつかの7TMSRは、合成部位である核周部と膜上存在部である終末部が離れているため、この問題を解決するためのモデルとして用いることができる。

このような7TMS-Rの合成、神経突起先端までの移送、そして膜組み込みに関し、次の5つの仮説が考えられる。

- (1) mRNAが神経突起先端まで運ばれ、そこで遊離のリボゾームによって合成されたのち膜に組み込まれる。
- (2) 核周部のrER-ゴルジ系で合成されたのち分泌顆粒にパックされて突起先端まで運ばれ、そこで細胞膜に組み込まれる。
- (3) (2) とほぼ同じ過程をたどるが、運ばれる途中、分泌顆粒中ですでに膜に組み込まれ、膜融合によって細胞膜上にあらわれる。
- (4) 核周部のrERまたは遊離のリボゾームで合成されたのち、cytosol中を突起先端まで移動する。
- (5) 核周部のrERまたは遊離のリボゾームで合成されてすぐ細胞膜に組み込まれ、膜上を移動して突起先端部まで達する。

以上の仮説をもとに、対象として、エピトープ部位の異なる数種の抗体を保有しているGnRH受容体(GnRH-R)と、カテコールアミンと共存しているため変性実験を併用しやすいエンドセリンA受容体(ET-AR)をもちい、ラット視床下部および中脳にて検索した。

- (1) まず一般免疫組織化学法でニューロン内分布パターンを検討したところ、細胞膜よりも細胞質によく染まり、かつこの陽性所見は神経突起先端部に強い傾向が認められた。さらに、エピトープの異なる抗体を用いることによって、同じニューロン内の少し異なる領域が染色される。これらのことは得られた陽性反応産物は、internalizationを受けた後ライソソームで処理されている7TMSであると考えられる。また7TMSがリサイクルされる可能性も考えられた。
- (2) 軸索輸送を阻害するコルヒチンを脳室内に投与したところ陽性ニューロンの細胞体の染色性は少し増強しただけであった。しかしリガンド投与を併用すると、神経終末の染色性が低下するにもかかわらず、細胞体の染色性は少しでも増強していた。これは、軸索流の関与を疑わせる所見である。

- (3) ゴルジ装置からの発芽を阻害する Brefeldin A を投与しても、in vivo 実験の可能な処置時間と量では変化は認められなかった。しかしリガンド投与を併用すると、核周部ゴルジ野では染色性が少しでも増強するのに、それ以外の部位では染色性は減少した。このことから、ゴルジ発芽を介すると考えられる。
- (4) 6OHDA を注入してカテコールアミンニューロンを変性させる実験では、マーカーとしてカテコールアミン合成酵素のTHとDBHを指標に観察した。すなわちこれらの酵素の免疫染色陽性所見はカテコールアミンニューロン変性と同時に消失し、(一種)の再生過程にあわせて細胞体側から再出現してくる。この消失と復活の際の染色パターンとその経時変化をET-ARの場合と比較したところ、ほぼ同じであった。

以上のことを総合し、さらに電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による観察を加え、次のような結論を得た。すなわち、「7TMSRはrER-ゴルジ系でつくられ、細胞内膜系の膜に組み込まれた後、移送顆粒によって移動し、移送顆粒と細胞膜との融合によって細胞膜上にあらわれる。しかし、細胞膜上の部位選択性は少なくある程度は細胞膜上でも移動し得る。リサイクルされるものはきわめて少ないだろう。」という結論である。7

この得られた研究成果については、欧文国際誌に投稿するべく論文執筆中である。

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT - IN -AID
FOR SCIENTIFIC RESEARCH (C)

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER : 14202
2. RESEARCH INSTITUTION : Shiga University of Medical Science
3. CATEGORY : 831
4. TERM OF PROJECT (1994~1995)
5. PROJECT NUMBER : 06808079
6. TITLE OF PROJECT : Synthesis, transport and fate of G-protein coupled
7-transmembrane receptors
7. HEAD INVESTIGATOR : 00142373, Hisao Yamada, Associate Professor ,
Department of Anatomy,
Shiga University of Medical Science
8. INVESTIGATORS : none
9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS :

The synthesis, transport and fate of G-protein coupled 7-transmembrane receptors can be analyzed using neuron model. Because a neuron has perikaryon where receptor protein is synthesized, and long processes where receptors are functioning.

The hypothalamus and mesencephalon of adult male Wistar rats were immunostained with the antibodies to GnRH receptor and endothelin type A receptor, and observed under light-, electron- and confocal laser scan microscopes. The consumption or internalization of these receptors was analyzed by ligand administration. In these experiments, the Golgi-budding and axonal transport were inhibited by cerebroventricular injection of brefeldin A and colchicine, respectively. Moreover, we observed time-course change of immunostaining pattern of ET-A receptor in comparison with catecholamine synthesizing enzyme, TH and DBH, in the 6OHDA administered rat.

We conclude that this type receptor is synthesized in the rER-Golgi system, incorporated into the membrane, and then transported with vesicular membrane from Golgi-budding to fusion with the cell membrane.

10. KEY WORDS

- | | | |
|-----------------------------|---------------------|--------------|
| (1) G protein coupled | (2) 7 transmembrane | (3) receptor |
| (4) intracellular transport | (5) cell membrane | (6) GnRH |
| (7) endothelin | (8) neuron | |

(CONTINUE TO NEXT PAGE)