

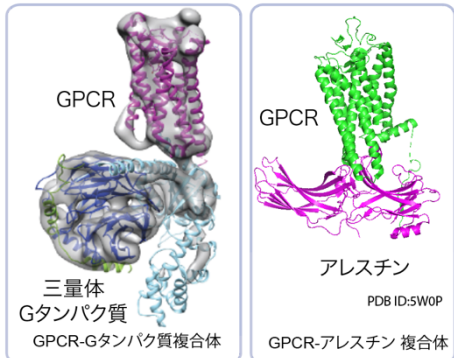
研究成果報告書の概要

講座等名	医化学講座	事業推進者名	清水（小林）拓也
所属部門	神経部門		
分担研究課題	異常感覚を伴う神経可塑的变化とその病態に関する研究		
キーワード	慢性疼痛、膜タンパク質、構造生物学		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	11名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 教授 小林拓也（研究総括）、准教授 片野泰代（疼痛関連分子のプロテオミクス解析）、松村伸治（疼痛に関わる脊髄イメージング）、講師 中川 学（生化学分析）、寿野良二（膜タンパク質の構造解析）、助教 西田和彦（脊髄投射神経の発生学的解析）、井上明俊（痒み分子の構造解析）、前野寛大（高圧 NMR 解析）、船津宣雄（生殖細胞特異的転写因子の解析）、大学院生 寿野千代（膜タンパク質の発現および精製）、高井朋代（膜タンパク質の発現および精製）</p>			
<p>研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について）</p> <p>（1）内臓痛の伝達に關与する脊髄後角神経回路の同定</p> <p>体性感覚の伝達に關与する脊髄後角神経回路は近年徐々に明らかになってきたが、一方で内臓感覚の伝達経路については不明な点が多い。そこで本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲水投与による潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いて内臓痛を誘導し、このモデルマウスの脊髄後角での神経活動パターンを解析した。DSS モデルマウスの脊髄での神経活動を抗 c-fos 抗体を用いた免疫染色により解析した結果、c-fos 陽性細胞は第 6 腰髄から第 1 仙髄にかけてをピークとして存在し、脊髄後角の I 層を中心とした浅層に分布していた。この分布パターンはホルマリンの皮内注入による皮膚疼痛刺激に応答する神経活動パターンと異なる点が認められ、体性感覚と内臓感覚で脊髄での伝達経路が異なることが示唆された。</p> <p>（2）シグナル伝達機構およびリガンド結合様式の解明</p> <p>様々な G タンパク質共役受容体 (GPCR) のクライオ電子顕微鏡単粒子解析 (Cryo-EM SPA) による構造解析を行っている (図 1)。2 種のプロスタグランジン受容体 EP3, EP4 と G タンパク質との複合体を調製し、Cryo-EM SPA によって構造決定した (図 2)。EP3, EP4 はそれぞれ共役する G タンパク質の種類が異なり、それぞれが共役する Gi/o, Gs との複合体を調製し、構造決定した (Nojima S., et al., <i>Structure</i> (2020)、論文投稿準備中)。申請者らはすでに EP4 では不活性構造を、EP3 では内在性リガンド結合型の構造を決定しており、新たに決定した G タンパク質結合型 (活性化状態) 構造と比較することによって、EP4 の活性化機構及び EP3, EP4 と G タンパク質の結合様式を明らかにした。また EP3-Gi, EP4-Gs 複合体構造を比較し、シグナルアッセイを指標とした変異体解析により、プロスタグランジン受容体の G タンパク質選択性に ICL2 を含む受容体と G タンパク質の界面の特定のアミノ酸が重要であることを明らかにした (論文投稿準備中)。プロスタグランジン受容体以外についても数種の GPCR のプロジェクトを推進している。単体および①と同様の G タンパク質との複合体を調製して、Cryo-EM SPA もしくは X 線結晶構造解析による構造決定を目指し、現在それぞれサンプルの精製には成功している。今後は構造決定を目指して構造解析に適したサンプルの条件検討を行う予定である。</p> <p>（3）スチリペントールの L5 脊髄神経切断モデルマウスの神経障害性疼痛緩和の作用機序</p> <p>抗癲癇薬は癲癇だけでなく神経障害性疼痛の除痛薬として処方されるが、その作用機構は不明な点が多い。ドラベ症候群で有効な抗癲癇薬であるスチリペントールは、近年、アストロサイトの乳酸デヒドロゲナーゼの阻害剤として作用することが明らかとなっている。本研究では、L5-脊髄神経切断 (L5-SNT) マウスモデルの神経障害性疼痛に対するスチリペントールの効果を調べた。ガバペンチンやカルバマゼピンなどの他の抗痙攣薬と同様に、スチリペントールは、L5-SNT の 7 日後にマウスに髄腔内投与した場合、用量依存的に L5-SNT 誘発性の機械的痛覚過敏を軽減した。同様に、幅広いモノカルボン酸トランスポーター阻害剤である α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸は、</p>			

L5-SNTによって誘発される機械的痛覚過敏を軽減した。乳酸の同時投与は、スチリペントール、カルバマゼピン、または α -シアノノ-4-ヒドロキシ桂皮酸による鎮痛効果を無効化したが、ガバペンチンによる鎮痛効果は無効化しなかった。抗痙攣薬はいずれも、脊髄後角のアストロサイトの活性化状態に影響を与えませんでした。以上のことから、スチリペントールが神経障害性疼痛に有効であることを、アストロサイト-ニューロン間の乳酸シャトルが神経障害性疼痛に関与していることを示唆した。

迅速なGPCR複合体構造解析プラットフォームの構築と構造情報に基づいた合理的なリガンドの開発

① Cryo-EM単粒子解析



Gタンパク質を介したシグナル伝達の分子機構の解明 アレスチンを介したシグナル伝達の分子機構の解明

② in silico&シグナルアッセイスクリーニング

バイアス作動薬、選択的リガンドなどの新規薬剤開発 (Cryo-EM構造情報をもとにした化合物設計)

③Cryo-EM SPA/X線結晶構造解析

- 新規化合物との複合体高分解能構造の決定
- Cryo-EM構造をもとにして結晶構造解析のためのコンストラクトを探索、高分解能構造決定
- 精密なリガンド結合様式の解明

図1

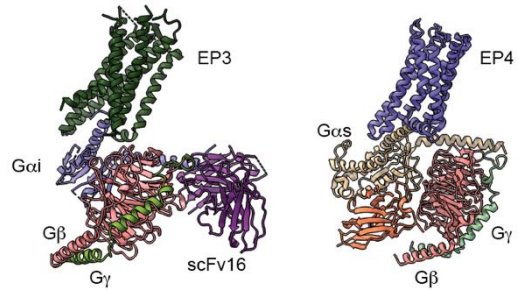


図2 プロスタグランジン受容体-Gタンパク質複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析