

# 論文内容要旨

The subcellular dynamics of the Gs-linked receptor GPR3 contribute to the local activation of PKA in cerebellar granular neurons

( Gs 共役受容体 GPR3 の細胞内動態は小脳顆粒神経細胞内における PKA の局所活性に寄与する )

PLOS ONE, in press.

主指導教員：酒井 規雄教授

(医歯薬保健学研究院 神経薬理学)

副指導教員：安井 弥教授

(医歯薬保健学研究院 分子病理学)

副指導教員：橋本 浩一教授

(医歯薬保健学研究院 神経生理学)

氏 名 宮城 達博

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

G-protein-coupled receptor (GPR) 3 は、恒常的 Gs 活性化型 G タンパク質共役型受容体ファミリーに属し、細胞内 cAMP レベルを一定レベルに維持する受容体である。また、恒常的 Gs 活性化型受容体ファミリーは中枢神経系に豊富に発現していることが知られている。これまでに、GPR3 の中枢神経系における役割に関して、神経突起伸長、神経細胞分化・生存への関与について明らかになっている。さらに近年、アミロイドβ 産生や情動反応、神経因性疼痛、コカイン強化などとの関連が報告されている。しかしながら、中枢神経系における GPR3 の詳細な発現分布や GPR3 の機能について十分に明らかにされていない。そこで、本研究では GPR3 の生理学的役割をさらに明らかにするため、マウス脳における GPR3 の詳細な発現分布を検討すると共に、小脳顆粒神経細胞における細胞内局在や動態を観察し、神経細胞局所における PKA 活性化に果たす GPR3 の役割について検討した。

### マウス脳およびラット小脳顆粒神経細胞における GPR3 の局在

中枢神経系における GPR3 発現に関しては、これまでに *in situ* ハイブリダイゼーション法により内側手綱核、大脳皮質、海馬、線条体、小脳での発現が報告されている。中枢神経系における GPR3 のさらに詳細な発現分布を明らかにするため、GPR3 ノックアウト LacZ ノックインマウス脳組織を用いて、GPR3 プロモーター活性分布を評価した。GPR3 プロモーター活性は内側手綱核、海馬 CA2、視床、橋において高い活性分布を示し、線条体、皮質、小脳、延髄、脳幹、脊髄での活性分布も観察した。

小脳神経細胞における GPR3 の局在解析には、GPR3 特異的抗体が存在しないため、蛍光標識付加 GPR3 発現ベクターを神経細胞に遺伝子導入することにより検討した。GPR3 は細胞全体の形質膜や細胞体内ではゴルジ体、エンドソームで局在が観察された。さらに、神経突起内でも GPR3 陽性小胞が観察された。

### 神経細胞局所における GPR3 の機能解析

次に、恒常的 Gs 活性化機能を有する GPR3 が、神経細胞局所の PKA 活性化に与える影響について検討した。解析には、一細胞レベルでの PKA 活性化解析が可能な PKA FRET インジケーター AKAR3EV を使用した。小脳顆粒神経細胞では、神経細胞体形質膜で比較的高い PKA 活性化が観察されたが、細胞内小器官における PKA 活性化は観察できなかった。また、神経細胞体に比べ神経突起先端においてより高い PKA 活性が観察された。さらに、神経突起先端での PKA 活性は、内因性 GPR3 発現抑制により低下し、GPR3 過剰発現により上昇することから、GPR3 発現量依存的であることが明らかになった。

### 神経細胞における GPR3 の動態と機能

最後に、神経細胞における GPR3 の動態について、蛍光標識付加 GPR3 を小脳顆粒神経細胞に発現させ、蛍光タイムラプスイメージングにより検討した。興味深い事に、GPR3 小胞は神経突起内を双方向に約 5  $\mu\text{m}/\text{min}$  の速度で移動していた。また、神経突起内での

GPR3 小胞の移動は、約 50%が神経突起先端方向へ向かう順行性で、約 30%が逆行性であった。さらに、GPR3 小胞の順行移動はアクチン阻害剤、微小管阻害剤、ミオシン II 阻害剤により顕著に抑制され、神経突起先端部での GPR3 発現も抑制された。さらに、ミオシン II の阻害剤により神経突起先端部の PKA 活性も低下した。

以上の結果から、小脳顆粒神経細胞の神経成熟過程において GPR3 が神経突起先端部に運ばれ、神経突起先端部での PKA 活性化に寄与することが明らかとなった。神経突起先端部での PKA 活性化は神経細胞における軸索形成に重要であることが報告されており、さらに GPR3 は神経細胞分化に従って発現が上昇することから、GPR3 が神経細胞極性化に関与する可能性が示唆された。