

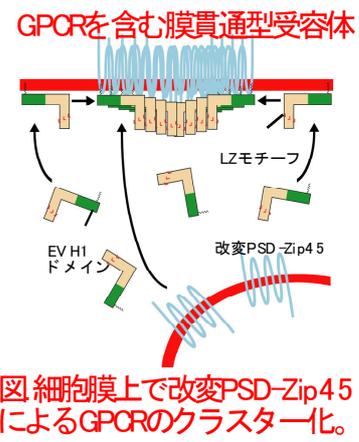
## 平成17年度科学研究費補助金（学術創成研究費）研究進捗状況報告書

ふりがな		そぶえ けんじ				
①研究代表者氏名		祖父江 憲治		②所属研究機関 ・部局・職 大阪大学・医学系研究科・教授		
③研究課題名	和文	神経および血管細胞可塑性研究を基盤とした膜貫通型受容体立体構造解析システムの創成				
	英文	Establishment of a novel analytical system for three-dimensional structure of transmembrane receptors based on neuronal and vascular cell plasticity				
④研究経費 (直接経費) 18年度以降は内約額 単位:千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
	86,900	87,900	93,100	92,500	97,700	458,100
⑤研究組織 (研究代表者及び研究分担者)						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)			
祖父江 憲治	大阪大学・医学系研究科・教授	神経科学 細胞生物学	GPCRを含む膜貫通型受容体および膜貫通型蛋白質とPSD-Zip45 膜ターゲティングシステムの開発・膜貫通型クラスター高純度調整法の開発・極低温電子顕微鏡による膜貫通型受容体クラスターの立体構造解析および総括研究。 神経および血管細胞可塑性の研究。			
乾 誠	山口大学・医学部・教授	神経科学 細胞生物学	PSD-Zip45 膜ターゲティングシステムの開発・極低温電子顕微鏡による膜貫通型受容体クラスターの立体構造解析。			
林 謙一郎	大阪大学・医学系研究科・助教授	分子生物学 細胞生物学	GPCRを含む膜貫通型受容体および膜貫通型蛋白質とPSD-Zip45 膜ターゲティングシステムの開発・膜貫通型受容体クラスターの高純度調整法の開発・GPCR立体構造に基づく創薬開発。神経および血管細胞可塑性の研究。			
森田 強	大阪大学・医学系研究科・助手	分子生物学 細胞生物学	GPCRを含む膜貫通型受容体および膜貫通型蛋白質とPSD-Zip45 膜ターゲティングシステムの開発・膜貫通型受容体クラスター高純度調整法の開発。神経および血管細胞可塑性の研究。			
⑥当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)						
<p>構造生物学の隆興により、X線構造解析や核磁気共鳴法(NMR)を用いて膨大な数のシグナル伝達分子・細胞骨格蛋白質・転写因子・足場蛋白質(scaffold protein)など水溶性蛋白質の立体構造が解明されてきた。この結果、リガンド結合部(活性部位)や蛋白質間結合ドメイン構造の詳細が明らかになり、この構造情報を基に新規標的蛋白質の検索・拮抗ペプチドや創薬の開発など研究の広がりを見せている。細胞膜蛋白質であるG蛋白質共役受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)は、外来刺激(光・匂い・味・フェロモン)・脂質・オータコイド・神経伝達物質・ヌクレオチドなど多種類のリガンドを受容体としている。現在リガンド不明なオーファン受容体や未同定のものを含めると、GPCRは1000種類近くの巨大なファミリーを形成すると推測されている。しかしながら、GPCRを初めとした膜貫通型受容体の構造解析による研究の発展性と応用が期待されているが、研究の進展は遅れている。最大の理由は膜貫通型受容体が非水溶性蛋白質であり、可溶化→結晶化→立体構造解析という従来の構造生物学的手段が通用しない等、多くの問題点があることなどによる。本申請は、研究代表者らが行ってきた神経と血管細胞可塑性研究を基盤に、生細胞の細胞膜上でGPCRを含む膜貫通型受容体から一般の膜貫通蛋白質に至る非水溶性膜貫通型蛋白質を、改変PSD-Zip45を用いて細胞質側から2次元準結晶レベルのクラスター化を行い、このクラスターの高純度精製標品を極低温電子顕微鏡により立体構造解析を行うことにより、普遍的な膜貫通型蛋白質立体構造解析システムを確立することを目的とする。本研究は構造生物学に革新的インパクトを与えるとともに、細胞膜構造生物学という新たな研究分野の創成と関連研究領域の発展に大きく寄与するものと期待している。</p>						

⑦これまでの研究経過

I 本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。  
 本研究は、神経と血管可塑性研究を基盤としてシナプス可塑性の分子機構および血管平滑筋細胞の分化・脱分化機構の研究をさらに発展させると共に、新たに生細胞の細胞膜上で膜貫通型受容体を2次元準結晶レベルまでクラスター化し、このクラスターを高純度精製して極低温電子顕微鏡により立体構造解析を行い、膜貫通型受容体構造解析システムを確立することを目指したものである。本研究は学際的学問領域より出発し、従来の膜貫通型受容体構造解析で成し得なかった普遍的な膜貫通型蛋白質の構造解析システムを確立しようとするものであり、構造生物学に革新的インパクトを与えるとともに、細胞膜構造生物学という新たな研究分野の創成に寄与するものと考えている。従って、本研究は創造的・革新的・学際的学問領域創成を主眼に置いたものである。

II 研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。  
 本研究は、申請者の神経および血管細胞可塑性研究を基盤に、膜貫通型受容体立体構造解析システムの創成を目的としており、以下の項目を中心に研究を計画した。1) GPCRを含む膜貫通型受容体の膜ターゲティング亢進システムの開発---極低温電子顕微鏡を用いた膜貫通型受容体構造決定には、数百mg以上のクラスター化(2次元準結晶レベル)標品を必要とする。そこで、膜貫通型受容体の遺伝子改変発現系(EVH1結合配列の挿入)による膜ターゲティング亢進システムの開発。2) PSD-Zip45の遺伝子改変と改変PSD-Zip45安定発現システムの開発---膜貫通型受容体の膜ターゲティングとクラスター化を目的として、PSD-Zip45の膜ターゲティングシグナル挿入と、大量安定発現細胞系の開発。3) 膜貫通型受容体/改変PSD-Zip45クラスターの高純度調整法の開発---膜貫通型受容体/改変PSD-Zip45クラスターの可溶化・高純度精製法の開発。4) 極低温電子顕微鏡を用い膜貫通型受容体の立体構造解析。5) 立体構造情報が得られたものについては、ドラッグデザインに基づく創薬開発。6) 神経シナプス可塑性の分子機構解析。7) 血管細胞可塑性に基づく動脈硬化発症の分子機構と血管平滑筋細胞分化機構の解析。



以上の研究計画に基づき、現在までの研究進捗状況を述べる。1) GPCRであるLPA受容体(LPA1, LPA2, LPA3)・エンドセリン受容体・代謝性グルタミン酸受容体・ドーパミン受容体の細胞質ドメインに、改変PSD-Zip45のEVH1ドメインに結合する-PPXXF-配列を挿入し、各種GPCRの細胞膜表面への発現を検討した。この結果、ドーパミンD1受容体が最も効率的に細胞ターゲティングを示すことを見出した。(林・乾)2) PSD-Zip45以外にこれまでに報告されている各種足場(scaffold)蛋白質のクラスター化能を検討し、PSD-Zip45以外に強力なクラスター化能を示す蛋白質はラプシン(rapsin)のみであった。次に、各種膜ターゲティングシグナルを検討し、新規PSD蛋白質であるPSD-Zip70のミスチン酸化配列が最も効率的にPSD-Zip45(以下、改変PSD-Zip45)を膜ターゲティングを示すことを見出した。そこで、この改変PSD-Zip45を限定条件下で大量発現する細胞をクローン化した。(林・森田)3) 改変PSD-Zip45細胞株にドーパミンD1受容体を強制発現することにより、細胞膜上でドーパミンD1受容体のクラスター化に成功した。現在、このクラスターの可溶化と高純度調整法を開発中である。(祖父江・林)4) 粗精製クラスター標品を用いて、電子顕微鏡による構造観察の準備に入った。(林・乾)5) PSD-Zip70がシナプス成熟化の必須因子であることを見出した。(祖父江)6) 不飽和LPAによる血管内膜肥厚をin vivoで証明し、動脈硬化発症初期病変である血管内膜肥厚に最も近い動物モデルを提示した。また、エピレギュリンが不飽和LPAにより誘導される動脈硬化初期憎悪因子であることを見出した。(林・祖父江)

III その他  
 シナプス可塑性の研究に関して、シナプス特異蛋白質として新規PSD-Zip300, PSD-Zip180, PSD-Zip30を見出した。現在、これらPSD蛋白質のシナプス可塑性への役割の解析と、膜貫通型受容体クラスター化への応用を追究中である。また、血管細胞可塑性の研究に関して、新規不飽和LPA特異的受容体(GPCR)を検索中で、本研究の膜貫通型受容体立体構造解析システムへの導入を目指している。

## ⑧特記事項

〔これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。〕

研究代表者らのこれまでの研究において得られた成果の特記事項を研究経過に沿って述べ、推薦者の期待の達成度についても記す。

[細胞骨格Ca<sup>2+</sup>制御機構の研究]細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルのメディエーターであるカルモデュリンの標的として細胞骨格に注目し、一群の細胞骨格構成員の発見と細胞骨格Ca<sup>2+</sup>制御機構を解明した。中でもカルデスモンは平滑筋から非筋細胞に及ぶアクチン-ミオシン系の制御因子であることを明らかにし、新たな細胞骨格制御系を提示した。また、カルスペクチン/カルモデュリン/4.1蛋白質/アクチンによる細胞膜骨格Ca<sup>2+</sup>制御系を解明した。これらの研究は、細胞骨格初期研究の発展に大きく寄与した。

[神経細胞可塑性の研究]カルスペクチンがシナプス後肥厚部(postsynaptic density; 以下PSD)の主要蛋白質であることから、PSD分子構築と機能解析によるシナプス可塑性の研究を開始した。化学処理したPSDを抗原に多数のPSDモノクローナル抗体を作製し、これら抗体を用いて遺伝子及び蛋白質工学的手法により一連のPSD蛋白質の発見と、その機能解析によりシナプス可塑性の研究を行ってきた。代表的PSD蛋白質であるPSD-Zip45は特有のロイシンジッパーモチーフで強力な自己集積能を有し、mGluRをシナプス後部に局在する足場蛋白質であることを明らかにした。その後PSD-Zip45は、IP3受容体・リアノジン受容体・Shankなどシナプス後部蛋白質と相互作用し、シナプス可塑性関与することが明らかになった。PSD-Zip70はシナプス成熟に必須蛋白質であることを明かにし注目を集めている。本戦略によるシナプス可塑性研究は他に類を見ない独創性を示し、その成果はシナプス可塑性研究に大きく寄与した。

[血管細胞可塑性の研究]平滑筋細胞分子マーカー最初の例として、平滑筋細胞形質転換(分化⇔脱分化)に伴うカルデスモンのアイソフォーム変換と発現変化を見出した。血管細胞可塑性最大の関心事は、動脈硬化発症の基盤となる血管平滑筋細胞脱分化と発生過程における未分化細胞からの血管平滑筋細胞分化である。血管平滑筋細胞の形態・機能とカルデスモンをはじめとした平滑筋細胞分子マーカーを指標として、分化型血管平滑筋細胞培養系を世界に先駆け確立した。同培養系を用いて血管平滑筋細胞の分化・脱分化型形質は細胞内シグナル伝達系であるPI3キナーゼ/PKB系とERK・p38MAPK系の力のバランスにより決定されること、このシグナル伝達系下流の血管平滑筋細胞特異的転写装置(Nkx3.2/SRF/GATA6)を解明した。また、同上培養系を用いて動脈硬化発症因子として不飽和LPAを同定、in vivo においても不飽和LPAは血管内膜肥厚層を形成を証明した。不飽和LPAが発現誘導するパラクライン因子としてエピレギュリンを同定し、動脈硬化発症初期の増悪因子であることを示した。これら独創的研究方法を用いた研究は血管生物学領域における独走であり、この研究領域に多大なるインパクトを与えた。

[膜貫通型受容体立体構造解析システム創成の研究]上記神経および血管細胞可塑性研究を基盤に、Tリンパ球細胞表面受容体CD45がレクチンによりパッチ・キャップ形成する際に、細胞質側でカルスペクチン/4.1蛋白質/アクチンがCD45のクラスター化に関与することを明らかにした。その後、PSD-45がmGluRをシナプス後部で集積するモデルとして、非神経細胞の細胞膜上でPSD-Zip45の自己集積能のみでmGluRのクラスター化を証明した。これを発端に、藤吉教授(京大)と共同研究でPSD-Zip45結合配列を付加したエンドセリン受容体とPSD-Zip45共発現により、細胞膜上でエンドセリン受容体クラスター化を証明し、膜貫通型受容体構造解析への可能性を示唆した。しかし、mGluRやエンドセリン受容体クラスターのサイズは小さく、直ちに立体構造解析の対象となり得なかった。そこで、本申請の効率的膜貫通型受容体クラスター化システム確立と立体構造解析、さらに構造情報を基にしたドッキングデザイン開発という膜貫通型受容体構造解析システムの創成を目指すもので、構造生物学に革新的インパクトを与えるのみならず、細胞膜構造生物学という新たな研究分野の創成と関連研究領域の発展に寄与するものと期待している。

以上の如く、研究代表者らの研究は独創的発想とその遂行により研究推進を行っているもので、推薦者の期待は充分達成されつつあると同時に、この研究を基盤にさらに膜構造生物学創成という新たな領域へと発展しつつあると考えられる。

⑨研究成果の発表状況

〔 この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。 〕

- Kuriu T. Inoue A. Bito H. Sobue K. and Okabe S. Dynamic subpopulation of post-synaptic density molecules is critically dependent on actin cytoskeleton. *Neuron* (2005) (in press)
- Sugiyama Y. Kawabata I. Sobue K. and Okabe S. Determination of absolute numbers of post-synaptic molecules in single hippocampal excitatory synapses. *Neuron*. (2005)(in press)
- Hori K. Yasuda H. Konno D. Maruoka H. Tsumoto T. and Sobue K. NMDA receptor-dependent synaptic translocation of IRSp53 via PKC signaling. *J. Neurosci.* 25, 2670-2681.(2005)
- Maruoka H Konno D. Hori K. and Sobue K. Dendritic spine maturity involves PSD-Zip70 in collaboration with its binding partner; SPAR. *J. Neurosci.*25. 1421-1430. (2005)
- Konno D. Yoshimura S. Hori K. Maruoka H. and Sobue K. Involved of the PI3-kinase/Rac1 and Cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 5082-5088. (2005)
- Ko JA, Gondo T, Inagaki S, Inui M. Requirement of the transmembrane semaphorin Sema4C for myogenic differentiation. *FEBS Lett.* 579, 2236-2242. (2005)
- Hayashi K. Shibata K. Morita T. Iwasaki K. Watanabe M. and Sobue K. Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells. *J. Biol Chem.* 279, 40807-40818. (2004)
- Iwamoto T. Yamada Y. Hori K. Watanabe Y. Sobue K. and Inui M. Differentiation modulation of NR1-NR2A and NR1-NR2B subtypes of NMDA receptor by PDZ domain-containing proteins. *J. Neurochem.* 89, 100-108. (2004)
- Hori K. Konno D. Maruoka H. and Sobue K. MALS is a binding partner of IRSp53 at cell-cell contacts. *FEBS Lett.* 554, 30-34. (2003)
- Yoshida K. Nishida W. Hayashi K. Ohkawa Y. Ogawa A. Aoki J. Arai H. and Sobue K. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation* 108, 1746-1752. (2003)
- Takahashi M., Hayashi K., Yoshida K., Ohkawa Y., Komurasaki T., Kitabatake A. Ogawa A. Nishida W., Yano M., Monden M. and Sobue K. Epiregulin as a major autocrine/paracrine factor released from the ERK- and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 108, 2524-2529. (2003)
- Ebihara T, Kawabata I, Usui S, Sobue K, and Okabe S. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with green fluorescent protein. *J. Neurosci.* 23, 2170-2181. (2003)
- Usui S. Konno D. Hori K. Okabe S. and Sobue K. Synaptic Targeting of PSD-Zip45 (Homer 1c) and its involvement in the synaptic accumulation of F-actin. *J. Biol. Chem.* 278, 10619-10628. (2003)
- (国際学会)
- 1st Westburg symposium: Spinogenesis and synaptic plasticity. Germany, 8/23-26, 2004
- K. Sobue: Leucine-zipper containing PSD proteins involved in spine dynamics
- FASEB Summer Research Conferences .USA, 6/28-7/3, 2003
- K. Sobue: Modulation of VSMC phenotype by LPAs
- XIIIth International Symposium on Atherosclerosis. Japan, 9/28-10/2, 2003
- K. Sobue: Signal transduction regulating the vascular smooth muscle phenotype and early molecular events of atherogenesis