

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔事後評価用〕

平成15年度採択分

平成20年 3月31日現在

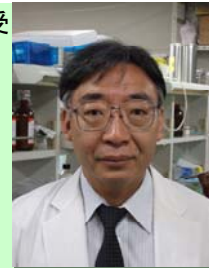
研究課題名（和文）神経および血管細胞可塑性研究を基盤とした膜貫通型受容体立体構造解析システムの創成

研究課題名（英文）Establishment of a novel analytical system for three-dimensional structure of transmembrane receptors based on neuronal and vascular cell plasticity

研究代表者

祖父江憲治（Sobue Kenji）

大阪大学大学院・医学系研究科・教授



研究の概要：細胞膜貫通型受容体（以降、膜貫通型受容体）は広汎な細胞機能に対応して、数多くの存在が報告されている。中でもG蛋白質共役受容体（GPCR）は、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1000種近くの巨大ファミリーを形成すると推測され、生物現象における重要な役割を果していると考えられる。GPCRを初めとする膜貫通型受容体の立体構造解明は、新規標的蛋白質の検索・拮抗ペプチドや創薬の開発などへの発展が期待されている。しかしながら膜貫通型受容体は不溶性の場合が多く、一部の例外を除くと従来の手段での構造解析は困難な点が多かった。本研究は、GPCRを含む広汎な膜貫通型受容体立体解析に応用可能な立体構造解析システムの確立を行う。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経科学・細胞生物学

キーワード：構造生物学・シナプス、シナプス後肥厚部(PSD)、血管平滑筋細胞、動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、神経細胞可塑性研究からシナプス後肥厚部(PSD)蛋白質、PSD-Zip45 (Homer 1c, VesL)を見出した。PSD-Zip45は代謝性グルタミン酸受容体をはじめとするシナプス膜蛋白質や他のPSD蛋白質と結合するとともに、PSD-Zip45自体の特殊なロイシン・ジッパーモチーフにより強力な自己集積能を有する。また、血管細胞可塑性研究において、研究代表者の研究室で確立した分化型血管平滑筋細胞培養系を用いて、動脈硬化症の発症因子候補として不飽和LPAを見出した。以上のような背景から、PSD-Zip45の特性を利用した膜貫通型受容体（ドーパミン受容体、LPA受容体などのGPCR）の立体構造解析システム確立の研究を開始した。また、本研究の基盤である神経と血管細胞可塑性研究も行った。

2. 研究の目的

構造生物学の隆興により、これまでに膨大な数の蛋白質の立体構造が明らかになり、この構造情報に基づく創薬開発など幅広い分野に研究が展開されている。しかしながら、立体構造が解明された大多数は水溶性蛋白質である。研究の発展が期待されつつも膜貫

通型受容体は非水溶性のものが多く、一部例外を除くと可溶化→精製→結晶化→立体構造解析という手法の導入が困難であった。本研究は、神経と血管細胞可塑性研究を基盤として、生細胞の細胞膜上で2次元準結晶レベルの膜貫通型受容体クラスターを作製し、膜貫通型受容体構造解析システムの確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、改変PSD-Zip45によりPSD-Zip45結合配列を付加した膜貫通型受容体（ドーパミン受容体、GPCR）を生細胞の細胞膜上で2次元クラスター化（準結晶レベル）し、このクラスターを大量・高純度精製し、精製クラスター標品を超低温電子顕微鏡により立体構造解析を行う。さらに、本法を普遍化する膜貫通型受容体解析例として、LPA受容体（GPCR）についても同様の方法で行った。神経と血管細胞可塑性研究については、シナプスダイナミクスと動物モデルおよび転写制御から各々解析を行った。

4. 研究の主な成果

膜貫通型受容体の立体構造解析システムの構築
PSD-Zip45のN末端側に膜ターゲティングシ

グナル(神経可塑性研究で得られた PSD-Zip70 の N 末端)の付加とロイシン・ジッパ一モチーフの改変により、生細胞の細胞膜上で直径 3-6 μ m に及ぶ巨大なドーパミン受容体の 2 次元クラスター化が可能となった。このドーパミン受容体/改変 PSD-Zip45 クラスターを細胞より分離後、同クラスターを大量かつ高純度精製し、最後に改変 PSD-Zip45 を除去してドーパミン受容体クラスターとして精製した。この精製標品は電顕像のフーリエ変換で準結晶レベルであることを確認した(投稿準備中)。現在、ドーパミン受容体クラスター標品を用いて極低温電子顕微鏡による立体構造解析を行っている。また、本法による立体構造解析システムの普遍化例として、改変 PSD-Zip45 による LPA 受容体の 2 次元クラスター化が可能となり、立体構造解析に向けた高純度精製を行っている。

神経細胞可塑性の研究

PSD-Zip45, PSD-Zip70 など PSD 蛋白質の役割を解析し、PSD-Zip45 がスパイン(シナプス後部)における最多の PSD 蛋白質でありスパインダイナミクスに重要な役割を果す事、PSD-Zip70 はスパイン成熟に必須の蛋白質である事を明らかにした。また、ストレス・グルココルチコイド(GC)による大脳皮質形成の一過性障害に関して、GCによる神経前駆細胞でのカルデスモン発現亢進によることを明らかにした(投稿中)。さらに、大脳皮質形成初期において重要な現象である上皮間葉転換に関して、Smad と MRTF 系による細胞内シグナル伝達と転写制御による分子メカニズムを明らかにした。

血管細胞可塑性の研究

動脈硬化症の初期発症因子とその増悪因子として、不飽和 LPA とエピレギュリンを見出し、その各々の in vivo での役割を証明した。動脈硬化症末期の石灰化において、BMP(骨形成因子)がホメオ転写因子 Msx の発現誘導により myocardin/SRF 系による血管平滑筋細胞特異的転写制御を阻害し、血管平滑筋細胞脱分化により石灰化に至ることを明らかにした。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

膜貫通型受容体の立体構造解析は、構造生物学のなかで大きなトピックである。本研究開始時から現在に至るまでに、十数種類の膜貫通型受容体解析の報告が行われたが、本研究で行ってきた膜貫通型受容体解析システムによる報告例はない。本研究でドーパミン受容体の準結晶レベルの 2 次元クラスター化標品を得ることが可能となり、現在その立体構造解析中である。LPA 受容体においてもその C 末端に PSD-Zip45 結合配列を付加するだけで改変 PSD-Zip45 によるクラスター化が可

能となり、本研究における膜貫通型受容体解析システムの普遍化が可能となった。以上のように本システムは今後数多くの膜貫通型受容体構造解析に応用可能であり、膜構造生物学における学術創成として大きなインパクトを与えるものと確信している。

また本研究の基盤となった神経と血管細胞可塑性研究においても、スパインダイナミクス・大脳皮質形成と動脈硬化発症の分子メカニズムで新しい分野を開拓することが出来たと考えている。同時に、神経と血管細胞可塑性研究に得られた PSD-Zip70 及び LPA 受容体の成果が、膜貫通型受容体の立体構造解析システムの確立に大きく寄与した。

6. 主な発表論文

1, Dual roles of MRTFs in epithelial-mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. T. Morita, T. Mayanagi, K. Sobue, J. Cell Biol. 179,1027-1042 (2007) 2, T. Morita, T. Mayanagi, T. Yoshio, K. Sobue Changes in the balance between caldesmon regulated by PAKs and the Arp2/3 complex govern podosome formation. J. Biol. Chem. 282, 8454-8463 (2007) 3. Bone morphogenetic protein-induced Msx1 and Msx2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. K. Hayashi, S. Nakamura, W. Nishida, K. Sobue, Mol Cell Biol. 26, 9456-9470 (2006) 4, Determination of absolute numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. Y. Sugiyama, I. Kawabata, K. Sobue, S. Okabe Nature Methods 2, 677-684 (2005) 5. Dendritic spine maturity involves PSD-Zip70 in collaboration with its binding partner; SPAR. H. Maruoka, D. Konno, K Hori, K. Sobue J. Neurosci. 25. 1421-1430 (2005) 6, Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. K. Yoshida W. Nishida, K. Hayashi, Y. Ohkawa, A. Ogawa, J. Aoki, H. Arai, K. Sobue, Circulation 108, 1746-1752 (2003) 7, M. Takahashi, K. Hayashi, K. Yoshida, Y. Ohkawa, T. Komurasaki, A. Kitabatake, A. Ogawa, W. Nishida, M. Yano, M. Monden, K. Sobue, Epregrulin as a major autocrine/paracrine factor released from the ERK- and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells. Circulation, 108, 2524-2529 (2003)

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/nbiochem/index.html>

sobue@nbiochem.med.osaka-u.ac.jp