

機関番号： 63905
 研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20390062
 研究課題名 (和文)： スプライシングの違いにより同一遺伝子から作られる
 新規代謝型受容体と分泌蛋白の解析
 研究課題名 (英文)： Analyses of an orphan metabotropic receptor and a secretion protein
 encoded by the same gene
 研究代表者
 久保 義弘 (KUBO YOSHIHIRO)
 生理学研究所・分子生理研究系・教授
 研究者番号： 80211887

研究成果の概要 (和文)：

同一の遺伝子からスプライシングの違いにより新規 familyC 代謝型受容体 Prrt3-Long とその細胞外領域のみからなる分泌蛋白 Prrt3-Short の両方が作られるが、どちらも機能未知である。我々は、特異抗体を作成してマウス組織における発現を解析し、-Long が下垂体隆起葉等に発現していること、-Short が脳室脈絡膜に発現し脳脊髄液中に分泌されていること等を明らかにした。この発現パターンから、-Long がメラトニン受容体と協働し光周性に寄与する可能性と、-Short が液性に脳機能の調節に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Prرت3-Long is a member of family C metabotropic receptors whose ligand has not been identified yet. From the same Prرت3 gene, a secretion protein Prرت3-Short, which consists of only the N-terminal extracellular region of Prرت3-Long, is transcribed by splice variation. To obtain clues of their function, we raised specific antibodies and analyzed their expression pattern in the mouse. Prرت3-Long protein was observed to be expressed in the pars tuberalis where melatonin receptor is also known to be expressed. Prرت3-Short protein was observed to be expressed in the choroid plexus in the brain ventricles. From these expression patterns, it was suggested that Prرت3-Long possibly plays a role in the photoperiodism and that Prرت3-Short might be a humoral factor which regulates the brain function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・生理学一般

キーワード： 生理学、神経科学、生体分子、蛋白質、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

我々は、遺伝子データベースサーチにより、

family C に属するリガンド未知のオーファン代謝型受容体 Prرت3 を見いだした。Prرت3

は、以下のような特徴を持っている極めて興味深い分子である。

(1) Prrt3 は、mGluR1 や GABA_B 受容体 (GABA_BR)、Ca²⁺ 受容体、味覚受容体等と同じ、長い細胞外領域と 7 回膜貫通部位を持つ family C の代謝型受容体の新規メンバーである。

(2) Prrt3 は、genome、cDNA の登録と発現パターンに関する登録があるのみで、リガンド等をふくめ、機能については全く未知である。Orphan 受容体は多々知られているが family C に属する新規受容体は他にない。

(3) Prrt3 の同一ゲノムからスプライシングパターン異なる 2 種の分子がコードされている。Prrt3-Long が、上記の 7 回膜貫通型の代謝型受容体であるのに対し、Prrt3-Short は、その N 端細胞外領域のみからなる分泌蛋白である。

(4) Prrt3-Long と Prrt3-Short の発現や機能に関する予備実験により、本研究開始前に以下の成果を得ていた。

① まず、EST データベースに登録があるとは言え、ゲノムはあるが、発現していないという可能性が最も懸念される。そこで、RT-PCR により、発現解析を行ったところ、少なくとも、脳において確かに、1Prrt3-Long と Prrt3-Short の両方の mRNA が発現していることが確認された。

② 次に、分子は存在しても機能的な役割は全く果たしていないという可能性がある。そこで、得られた cDNA に FLAG tag を付加したコンストラクトを発現ベクターに組み入れ、HEK 293 細胞に発現させる実験を行った。通常のウシ胎児血清 10% 加の培養液で培養したところ、Prrt3-Long (受容体型) を発現させた細胞は、顕著な形態変化を起し、多数の大小の突起を出すようになることが観察された。この結果は、Prrt3 long form の、形態の劇的変化を起す何らかの細胞生理学的機能、例えば、形態変化に関わる低分子量 G 蛋白質を活性化する等の機能を示唆する。血清中にリガンドが含まれている可能性と、リガンド無しで分子自体が恒常的活性を持つ可能性とが考えられる。

2. 研究の目的

同一の遺伝子からスプライシングの違いにより、新規代謝型受容体 (Prrt3-Long) と、その細胞外領域のみの分泌蛋白 (Prrt3-Short) の両方が作られる Prrt3 について、その機能、両者の機能協働とリガンドの同定、他の代謝型受容体との複合体形成、生体中での発現分布と役割、の解明を目指す。Specific aims は以下の通りである。

(1) Prrt3-Long, Prrt3-Short 蛋白は、各々、脳内および各種臓器内で、どのような発現パターンを示すか? -Long のみを認識する C 末端に対する抗体、-Short と -Long の両方を認識する N 末端に対する抗体を作成して、免疫組織化学解析を行う。

(2) Family C メンバーは、2 量体を構成する。このことから、Prrt3 も、2 量体を構成することが予想される。Prrt3 は、mGluR1 や GABA_BR と会合するか? 共発現と免疫共沈により明らかにする。

(3) Prrt3-Long と Prrt3-Short は、分子的に、また機能的にどのような関わりがあるか? -Short は、-Long の細胞外領域に結合するか? もし結合するならば、-Short は、リガンドとして作用するか? もしくは、-Short は、細胞外のリガンドを -Long と競合して吸着する競合阻害剤として作用するか? 共発現と形態変化観察により、さらに tag を付加した -Short のレコンビナント蛋白を精製し、-Long を発現する細胞に投与することにより明らかにする。

(4) Prrt3-Long のリガンドが、Prrt3-Short では無い場合、-Long のリガンドは何か? 上述のように血清に含まれている可能性があるため、ゲルろ過等により分画し、低血清培養液に、各分画を投与することにより、絞り込みを進め、また、熱変性、protease 処理に対する耐性の有無等の情報を得て、陽性分画から精製を試みる。

(5) 生体における生理機能は何か? Prrt3-Long, Prrt3-Short の両者が破壊された遺伝子改変マウスを作成し、発生、形態、行動の側面から、フェノタイプを解析する。

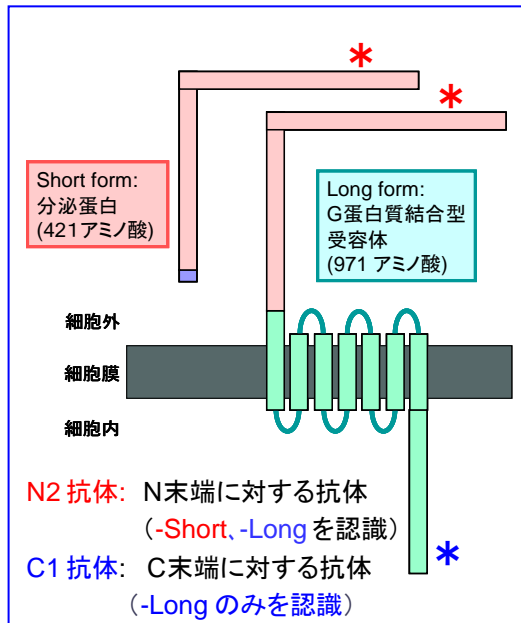
3. 研究の方法

Tag を付加したコンストラクトの作成等の分子生物学実験、免疫共沈や Western blot 等のタンパク質化学実験、免疫組織化学実験、電気生理学実験、遺伝子破壊マウス作成実験とも、定法により行った。

4. 研究成果

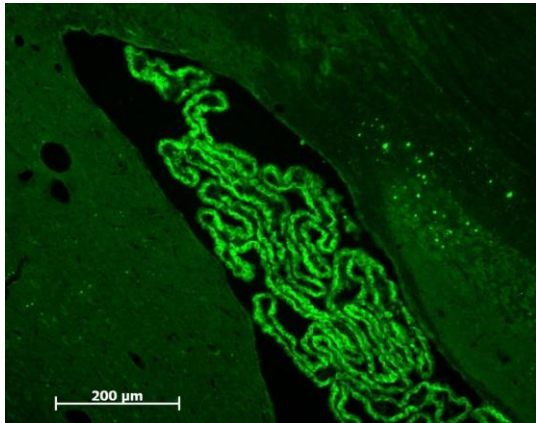
研究目的の項の番号に対応して、それぞれの成果を記述する。

(1) Prrt3-Long の N 端に対する (Prrt3-Short をも認識する) 抗体 N2 と、C 端に対する (Prrt3-Long のみを認識する) 抗体 C1 を作成した (下図)。これらの抗体は、遺伝子導入した HEK293 細胞を極めて特異的に染色することをまず確認した。マウスにおけるこれらの蛋白の発現パターンを免疫組織化学的に解析した結果、以下の発現パターンが



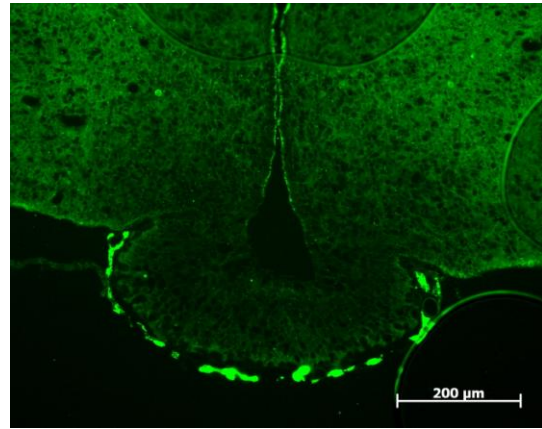
明らかになった。下述の組織染色シグナルは、いずれも、免疫前血清では観察されず、また、抗原ペプチドの前投与で吸収されるため、特異的なものであると判断されるが、最終的には Prrt3 遺伝子破壊マウスにおいてこれらのシグナルが失われることを確認することによって確定する必要がある。(5)で記すように、既に、遺伝子破壊マウスの作成に取り組み、ヘテロマウスを得ているので、ホモマウスが得られ次第、シグナルの消失を確認する実験を行う。

① Prrt3 Short は脳室の脈絡膜上皮細胞に発現している(下図)。

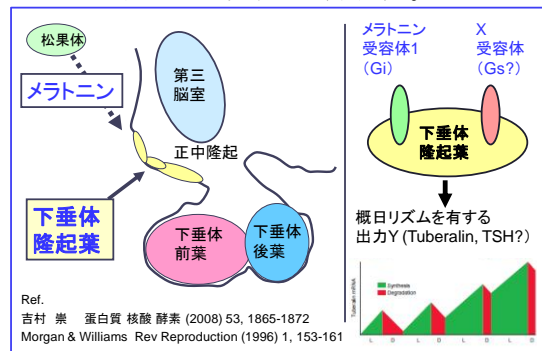


② Prrt3 Short は、脳脊髄液中に確かに分泌されている。脳脊髄液をマイクロシリンジで側脳室より採取し、Western blot を行うことにより確認した。

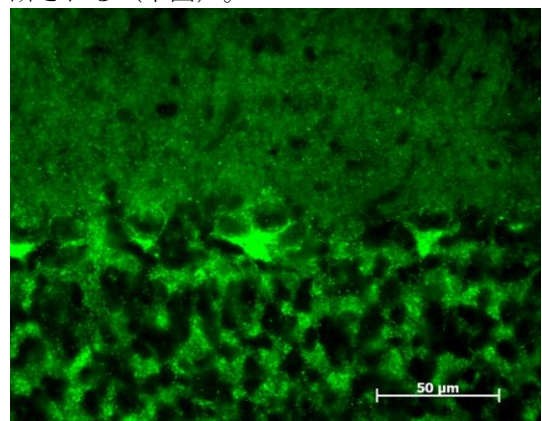
③ Prrt3-Longは、脳内では、視床下部の腹側端に位置する正中隆起の表層にある下垂体隆起葉に、最も強く発現している(下図)。



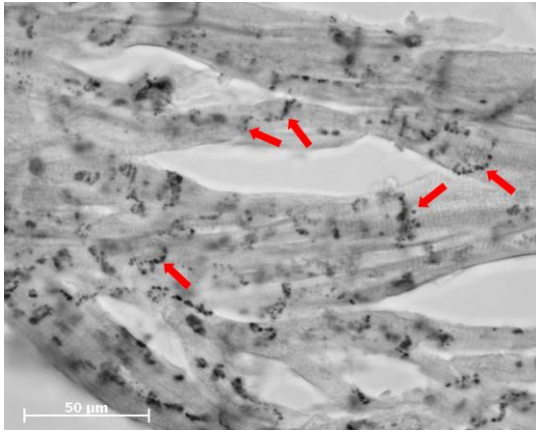
下垂体隆起葉は、概日リズムの形成に重要な役割を果たすメラトニン受容体 (Mel1R1a) が発現している場所であるため、Prprt3-Long が Mel1R1a と協調して概日リズムの形成に寄与している可能性を示唆する(下図)。



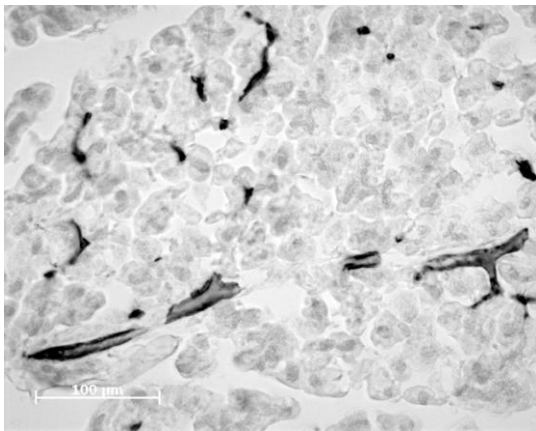
④ Prrt3 Long は、小脳プルキンエ細胞の直下の層に、プルキンエ細胞を包むように発現している。この部位は、Cerebellar Pinceau と呼ばれる、バスケット細胞がプルキンエ細胞にシナプス結合するプレシナプス終末と判断される(下図)。



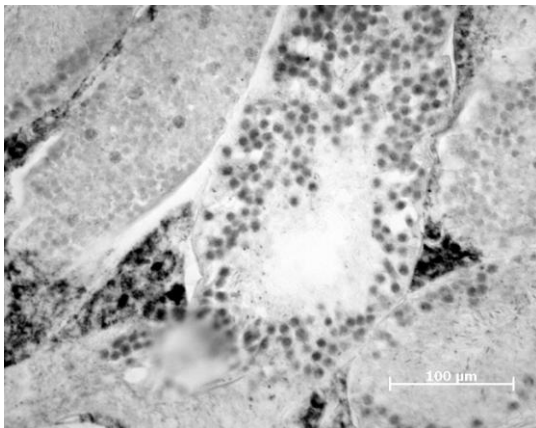
⑤ Prrt3 Long は、心筋細胞のつなぎ目部分である介在版に強く発現しており、Connexin43 と共局在している(下図)。



⑥ Prrt3 Long は、膵臓において大小の膵管壁に発現している（下図）。



⑦ Prrt3 Long は、精巣において、精原細胞および間質のライディッヒ細胞に発現が見られる（下図）。



なお、⑤、⑥、⑦ においては、これらの領域に、代謝型受容体が発現することは予想外で、その機能的意義は不明であるため、遺伝子破壊マウスにおいては染色シグナルが失われることを確認することが必要である。

(2) Family C 間に属する代謝型受容体間の会合、すなわちヘテロ多量体化の有無について解析するために、FLAG- もしくは myc- tag

を付加したコンストラクトをHEK293 細胞に発現させ、免疫共沈実験を行った。その結果、Prrt3-Long 間の共沈が認められ、ホモ2量体化が示唆された。しかし、代謝型グルタミン酸受容体やGABA_B受容体との強い共沈は見られず、ヘテロ会合の可能性は否定された。

(3) さらに、同様な発現系を用いて、Prrt3-Short がPrrt3-Long に結合する可能性も検証したが、強い結合は認められなかった。この結果は、Prrt3-Short がPrrt3-Long のリガンドである可能性は低く、むしろ両者が、競合的に共通の低分子のリガンドに結合する可能性を示唆する。

(4) Prrt3-Long のリガンドについては、下記のような実験を行ったが、未だ未同定である。ツメガエル卵母細胞に、Prrt3-Longと共に、種々の代謝型受容体の活性化をGq 型応答につなげる G タンパク質である Gα_{16/25} 等と共発現させ、リガンド候補物質に対する応答を、電気生理学的に Ca²⁺_i 依存性 Cl⁻ 電流の増加として捉えることを試みた。種々の神経伝達物質、下垂体等のホルモン、脳の抽出物、さらに、レコンビナントのPrrt3-Short 蛋白の投与を行ったが、明確な応答は見られなかった。従って、リガンドの同定は、今後の課題である。

(5) 脳脊髄液中に分泌されているPrrt3-Shortの機能的意義を探るために、レコンビナント Prrt3-Short 蛋白、もしくは特異抗体をマウス脳室に注入する実験を行った。しかし、急性投与では行動の著明な変化は見られなかった。次のステップとして慢性投与実験を計画している。

上述の概日リズムに対する寄与の可能性等を含め、Prrt3 の個体における機能的意義を明らかにするために、遺伝子破壊マウスの作成に取り組んだ。全エクソンを破壊し代わりに lacZ が入るコンストラクトを用いて相同組み替えを行った ES細胞株を米国KOMP社が樹立していたため、このES細胞株を購入した。神戸理研中尾和貴研究室にて、このES細胞株からES細胞の寄与率の高いキメラマウスを作成していただいた。そして、キメラマウスから遺伝子破壊ヘテロマウスを得ることに成功した。ヘテロマウスは、体が小さめではあるものの正常に生育した。その後、ヘテロマウス同士の交配により遺伝子破壊ホモマウスを得ることを試みたが、当初全く得られなかった。生後1週間程度で死亡する生育の悪いマウスがいることに気づき、死亡した個体のgenotyping を行ったところホモマウスが含まれていた。同腹の仔に比して母乳の摂取が下手であることによる生育不良

の可能性を想定して、生後1週間前に genotyping を行い、ホモマウスのみを残したところ、成人まで生育させることに成功した。現時点において、3匹のオスの成人の遺伝子破壊ホモマウスを得ている。次ステージの研究として、遺伝子改変ホモマウスの個体数を増やして、野生型で観察された免疫染色のシグナルの欠失を確認することにより免疫染色のパターンが正しいことを最終確定し、また、概日リズムを含む行動解析およびシナプス機能の電気生理学的解析を進めることを計画している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ① Ishii H, Nakajo K, Yanagawa Y, Kubo Y. Identification and characterization of Cs⁺-permeable K⁺ channel current in mouse cerebellar Purkinje cells in lobules 9 and 10 evoked by molecular layer stimulation. *European Journal of Neuroscience* (2010) 32: 736- 748 (査読有)
- ② Nakane Y, Ikegami K, Ono H, Yamamoto N, Yoshida S, Hirunagi K, Ebihara S, Kubo Y, Yoshimura T. A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* (2010) 107: 18862- 18867 (査読有)
- ③ 久保義弘、立山充博 G 蛋白質共役受容体の構造変化の全反射照明下 FRET 法による解析 医学の歩み 「G 蛋白質共役受容体研究」(飯利太郎編) (2010) 233: 699-703 (査読無)
- ④ Keceli B, Kubo Y. Functional & structural identification of amino acid residues of the P2X2 receptor channel critical for the voltage- and [ATP]-dependent gating. *Journal of Physiology* (2009) 587: 5801- 5818 (査読有)
- ⑤ Kurogi M, Nagatomo K, Kubo Y, Saitoh O. Effects of spinophilin on the function of RGS8 regulating signals from M2 and M3-mAChRs. *Neuroreport* (2009) 20: 1134-1139 (査読有)
- ⑥ Matsushita S, Nakata H, Tateyama M, Kubo Y. Ligand-induced rearrangements of the GABAB receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry* (2010) 285: 10291- 10299 (査読有)

⑦ Tateyama M, Kubo Y. Regulatory role of C-terminus in the G protein coupling of the metabotropic glutamate receptor1. *Journal of Neurochemistry* (2008) 107: 1036-1046 (査読有)

⑧ Fujii S, Yamazoe G, Itoh M, Kubo Y, Saitoh O. Spinophilin inhibits the binding of RGS8 to M1-mAChR but enhances the regulatory function of RGS8. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2008) 377: 200-204 (査読有)

⑨ Nagatomo K, Kubo Y. Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* (2008) 105: 17373-17378 (査読有)

[学会発表] (計1件)

山本友美、久保義弘 オーフアン代謝型受容体 Prrt3 のマウス脳における発現の免疫組織化学的解析 第32回日本神経科学大会 名古屋 (2009.9.17)

[図書] (計1件)

金井好克、竹島浩、森泰生、久保義弘 (編著) 「トランスポートソームの世界 - 膜輸送研究の源流から未来へ」 京都廣川書店 (2011) pp.1-471

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/biophys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 義弘 (KUBO YOSHIHIRO)

生理学研究所・分子生理研究系・教授

研究者番号：80211887

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し