

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390045

研究課題名(和文)下垂体隆起葉に発現する新規代謝型受容体とスプライシング変異による分泌蛋白の解析

研究課題名(英文)Analyses of the function of Prrt3, an orphan family C metabotropic receptor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：Prrt3は、オーファン代謝型受容体である。我々は、分子機能の解明に向けて、ノックアウト(KO)マウスを作製した。KOホモは低い生存率を示し数の確保が困難だったため、KOヘテロを用いて行動解析を行ったところ、空間学習記憶の長期保持、恐怖条件付け記憶の長期保持に低下がみられた。特異抗体を作成し、脳内発現パターンを解析したところ、視床、大脳皮質、海馬、黒質等で、強い発現が見られた。海馬での発現パターンから、Prrt3タンパク質は、細胞体ではなく神経突起に発現していることが示された。特異抗体を用いたwestern blot解析から、N末端細胞外領域が切断されたタンパク質が存在することが示された。

研究成果の概要(英文)：Prrt3 is an orphan family C metabotropic receptor with a large N-terminus extracellular domain and 7 transmembrane regions. To approach the function of Prrt3, we made a gene knock-out (KO) mice. As the survival rate of KO homo was very low, we performed behavioral test battery analyses using KO hetero mice. KO hetero mice abnormality in the long term retention of spatial memory and fear-conditioning memory. We also analyzed the expression pattern of Prrt3 protein in the brain by specific antibodies, and observed specific staining in thalamus, cerebellar cortex, hippocampus and substantia nigra. By comparing the protein and mRNA expression patterns in the hippocampus, it was shown Prrt3 protein is localized not in neuronal cell bodies but in neurites. We also observed by western blotting using specific antibodies that truncated form of Prrt3 lacking the N-terminus extracellular region exist.

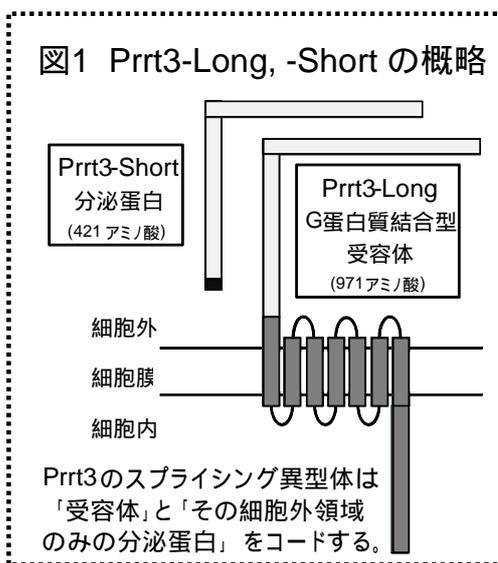
研究分野：医歯薬学

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 代謝型受容体 オーファン

1. 研究開始当初の背景

我々は、本研究の開始時点より数年前に、7回膜貫通型蛋白をコードする遺伝子 Prrt3 をデータベース上に見いだした。Prrt3 は、大きな細胞外領域を持つことを特徴とし、代謝型グルタミン酸受容体と同じ family C に属する G 蛋白質結合型受容体であると考えられた。しかし、先行研究は皆無で、機能は全く未知であった。Prrt3 の際だった特徴は、上述の受容体 Prrt3-Long に加えて、同一遺伝子からスプライシングの違いによりつくられる、細胞外領域のみからなる分泌蛋白 Prrt3-Short が存在することであった(図1)。これらの分子的特徴に興味を持ち、我々は研究を開始し、本申請研究の研究開始時点では、以下の知見を得ていた。



- (1) マウス Prrt3-Long を HEK293 細胞に発現させると細胞形態が著しい変化を遂げて不整形になり、かつ多数の細かい突起を出すようになった。これは、Long が無機能ではなく、形態変化に関わる低分子量 G 蛋白質を活性化する等の何らかの機能を有することを示す。
- (2) C 末端細胞内領域に対する抗体を作成して Prrt3-Long のマウス組織内の発現を解析したところ、下垂体の付け根に位置する正中隆起の表層の下垂体隆起葉に強く発現していた。また、小脳バスケット細胞の神経終末がブルキンエ細胞の細胞体に絡みつく、cerebellar pinceau に発現が見られた。
- (3) -Long は、心筋細胞の gap junction で Connexin 43 と共局在していた。
- (4) N 末端細胞外領域に対する抗体を作成して分泌型の Prrt3-Short の発現を解析したところ、脳室脈絡膜上皮細胞に明確な発現が見られた。また、脳脊髄液中に分泌されていることが確認された。
- (5) Prrt3 の機能にアプローチするため、遺伝子破壊 (KO) マウスを作成に取り組み、キメラマウスから、KO ヘテロマウスが誕生した。

2. 研究の目的

以上の背景、研究状況に基づいて立案した、研究開始時点での主たる研究目的は以下の通りであった。

- (1) 組織内分布については抗体で既に調べているが、抗体の非特異的結合による可能性も否定できない。そこで、KO ホモマウスを用いて、抗体染色のシグナルが消失することを確認する。また、KO マウスでは、Prrt3 遺伝子の代わりに lacZ が発現するようデザインされているので、KO マウスの X-gal 染色も行う。これらの結果を併せて組織内分布について最終決着をつける。
- (2) KO ホモマウスを用い、光周性、光による概日リズムのリセット等に特に着目して行動実験を行う。また、-Long が、cerebellar pinceau に発現していることから、視機能眼球運動等の小脳機能解析も行う。さらに、-Short が全脳的制御に関与している可能性もあるので網羅的行動バッテリーテストによる解析も行う。
- (3) Prرت3 -Short の分子機能の同定へ向け、遺伝子導入した HEK293 細胞の培養上清からアフィニティー精製した -Short のレコンビナント蛋白を脳室内に持続注入して、行動変化を解析する。また、作成した抗体が機能抑制的に働く可能性を期待して、抗体の脳室内持続注入実験も行う。
- (4) Prrt3-Long は、メラトニン受容体と機能共働する可能性が高いので、両者を *in vitro* 発現系で共発現させ、メラトニン受容体による Gi 系のシグナルを、FRET-base の蛍光プローブを用いた cAMP の減少等によりモニターし Long による機能修飾を解析する。
- (5) Prrt3-Long および -Short の機能を探る目的で、組織からの免疫共沈蛋白の同定を行う。また、併行して、yeast two hybrid 法により、結合蛋白の分子同定をはかる。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウス作成用のコンストラクト作成等の分子生物学実験、免疫共沈や Western blot 等の生化学実験、免疫組織化学的実験、行動解析実験、質量分析実験とも、常法により行った。方法論の詳細は、紙面の関係で割愛する。

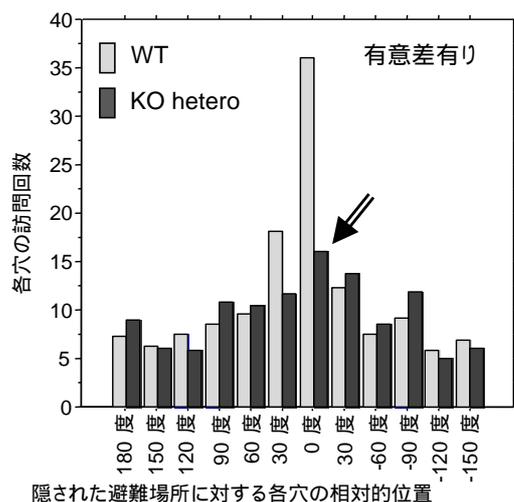
4. 研究成果

- (1) KOヘテロマウスを用いた網羅的行動解析 我々は、その機能の解明を目的として、これまで、KO マウスの作成を進めてきた。その結果、KO ホモマウスは、母乳の摂取行動に問題があるためか、生育が遅れ、ほとんどの個体が 1 週間以内で死亡することを見いだした。ただし、生後数日で KO ホモマウスのみを残すと、母乳の摂取が良好に行くためか、生存するホモマウス個体も時折見られた。KO ヘテ

ロマウスは正常に生育した。KO マウスの行動解析には十分な数の個体の確保が必要であるため、ホモマウスでの実施は不可能だった。そこで、KO ヘテロマウスを用い、藤田保健衛生大学・宮川研究室の協力を得て、行動解析を行った。その結果、野生型に比して、空間学習記憶の長期保持、および恐怖条件付け記憶の長期保持が低い等の異常がみられることが明らかになった(図2)。

図2 Barnes probe test

空間学習が成立した後で避難場所を隠し、4週間後における避難場所の記憶の解析



mGluR1 等の脳の代謝型受容体 KO のフェノタイプはヘテロでは見られず、また、ホモでも致死になることは希有であるため、この実験結果は、Prprt3 が脳内で極めて重要な機能を果たしていることを示している。

(2) KOマウスにおける他遺伝子の発現変化の microarray による解析

Prprt3の機能の手掛かりを得るために、Prprt3のKOの結果引き起こされる他遺伝子の発現の変化を知ることは有効である。そこで、東京都医学総合研究所・岡戸研究室の協力を得て、KOホモマウスと野生型マウスの脳を用いて、microarrayによる遺伝子発現の比較解析を行った。多数の増減遺伝子のリストを得て、解析を進めている。

(3) Prprt3タンパク質の脳内発現部位のKOホモマウスを用いた再確認

背景の項に記したように、研究初期にC末端、及びN末端細胞内領域に対する抗体を作成してPrprt3- Longのマウス組織内の発現を解析し、下垂体隆起葉(C末端抗体)、脈絡膜上皮細胞(N末端抗体)が染色されるという知見を得ていた。抗体の特異性については、遺伝子導入(+)(-)のHEK293細胞を用いた免疫染色実験、また、抗原ペプチドによるシグナルの消失等に基づき確認していたが、その時点では、KOマウスが無かったために、抗体染色が他タンパク質とのクロス反応によるも

のではないという最終的な確証は得られていなかった。この点は、今後の研究の方向を決定する上で、極めて重要な点であるため、KOホモマウスが得られた時点で、直ちに、免疫染色の消失を確認する実験を行った。

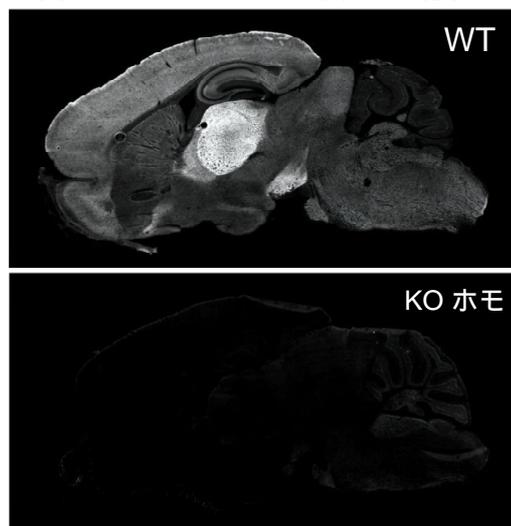
KOホモマウス脳を用いた抗体染色の結果、野生型マウスでみられたパターンが消失せず、これまでの染色結果が、抗体の他蛋白とのクロスリアクションによることが明らかになった。この結果、下垂体隆起葉に発現しているというデータに基づき立案した研究計画は、大幅に方向を修正することとなった。

なお、KOの代わりに挿入されるようデザインしたlacZ遺伝子の発現は、海馬錐体細胞と小脳プルキンエ細胞に高いことが観察された。この結果は、Allen brain atlasに登録されているPrprt3 RNAの発現パターンとほぼ合致し、また、KOにより空間学習記憶の保持が低下することとも、関連するものである。

(4) 特異抗体の再作成と脳内発現部位の免疫染色解析

脳内発現部位を明らかにすることは、重要課題なので、北大・渡辺研究室の協力により、抗原部位を変えて、多種の新たな特異抗体の作成を行った。その結果、Western blot解析にて、野生型マウスにおいてKOマウスでは見られない特異的バンドを検出し、免疫組織染色にても、野生型マウスにおいてKOマウスでは見られない特異的染色を示す、すなわち、特異性の高い抗体数種を得ることに成功した。無固定急速凍結脳切片を用いた解析で、C末端抗体、N末端抗体どちらによっても、KOホモマウスで消失する特異的染色が、視床、海馬、黒質、大脳皮質等に検出された(図3)。

図3 Prprt3タンパク質の脳内発現部位



なお、これらの抗体による染色は、無固定急速凍結脳切片で最もよく検出され、4%パラホルムによる還流固定を行った標本では、検出が困難だった。シナプス関連タンパクの複合体に組み込まれている等による抗体のアク

セスの阻害によるものと想定された。

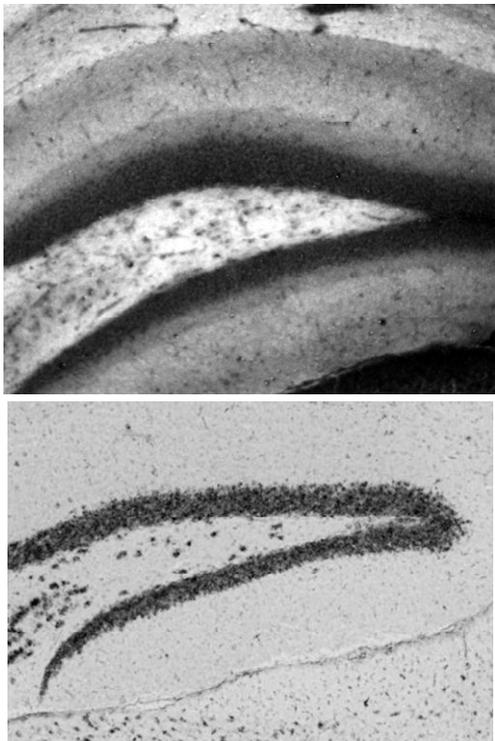
(5) 神経細胞における細胞内局在の解析

海馬は、神経細胞の細胞体と神経突起の層が明確に分かれているので、細胞内局在の解析に適している。Allen brain atlas では、海馬の錐体細胞や顆粒細胞に強い mRNA の発現が見られるが、我々の免疫組織染色結果では、Prpt3 タンパク質は、細胞体の層を明確によけるように発現していた(図4)。この結果は、Prpt3 タンパク質が、神経突起に存在していることを示す。さらに、脳タンパク質を生化学的に分画して、Western blot を行った結果、Prpt3 タンパク質は、PSD 分画以外のシナプス分画に存在した。この結果は、シナプス前終末、もしくは、シナプス後部位のシナプス周辺部位に存在していることを示す。

図4 海馬における Prpt3 の発現

上: タンパク質の発現(白)(IHC)

下: mRNAの発現(黒)(ISH, Allen)



(6) Prpt3 タンパク質の修飾の解析 #1

Western blot 解析により、HEK293 細胞に発現させた -Long は、計算値に近い約 110 kDa であるのに対し、脳では 110 kDa のバンドに加え、約 140 kDa の major バンドが検出された(図5)。この差違の理由は未解決であるが、説明できる splicing isoform は無いいため、何らかの修飾によるものと考えられる。これまでのところ、糖鎖修飾、リン酸化修飾によるものではないことが確定しているが、分子機構について、未解明である。

(7) Prpt3 タンパク質の修飾の解析 #2

C 末端抗体を用いた場合には、脳タンパク質

の Western blot 解析で 80kDa, 70 kDa の明瞭なバンドが検出された(図6)。これは、N 末端細胞外領域が根元近くで切断された長さに対応し、-Long が、細胞外領域の切断によって活性化する受容体(Protease activated receptor: PAR) である可能性も想定される。

図5 N末端抗体による western blot 解析

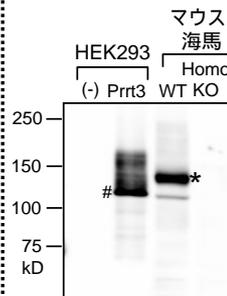
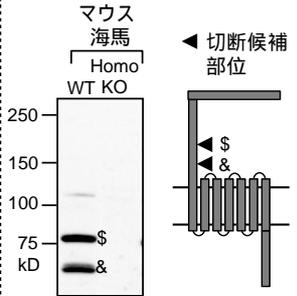


図6 C末端抗体による western blot 解析



切断しているプロテアーゼの同定は重要な課題である。神経細胞の活動に依存して細胞外に放出され神経伝達効率の変化等に役割を果たしている細胞外プロテアーゼとして、例えば、tissue plasminogen activator (tPA), plasmin, thrombin, Neuropsin, Neurotrypsin 等のセリンプロテアーゼが知られている。脳の全長タンパク質を N 末端抗体を用いた免疫沈降により精製し、in vitro で、切断実験を行ったところ、80 kDa のバンドが、plasmin, thrombin によっては観察されなかったが、tPA によってうすく観察された。しかし、tPA の KO ホモマウスにおいても、80 kDa の Prpt3 は野生型と同じく観察されたため、切断酵素は、tPA では無いことが確定した。同様に、KO ホモマウスを用いた実験で、切断酵素が、Neuropsin, Neurotrypsin では無いことも確定した。現時点で、Prpt3 の切断酵素は不明である。

(8) 結合蛋白同定のための tag 付加遺伝子を発現する transgenic (TG) マウスの作成

Prpt3 の機能を知る上で、結合タンパク質、ないし分子複合体を形成するタンパク質の同定は重要なヒントとなる。-Long、もしくは -Short を含む分子複合体の解析を行うため、各々に、FLAG- 6x His tag を付加したタンパク質を発現する TG マウス数系統を、生理研平林准教授研究室の協力により作成した。Western blot により高い発現が確認された。

(9) 結合タンパク質の質量分析装置による同定

Prpt3 が、分子複合体を構成する場合、その結合タンパク質の同定は、分子機能を探る上で重要な手掛かりを与える。そこで、上記の tag 付加遺伝子を高発現する TG マウス、および野生型マウスを用いて、免疫沈降により

Prmt3 タンパク質を精製し、共沈降するタンパク質の質量分析装置による同定を、生理研・深田研究室の協力により行った。多数の候補分子が得られたが、非特異的に頻出するものも多数見られたため、候補分子につき、精査を進めている。

(10) flox マウスの作成

生存率の低いKOホモマウスでの行動解析を可能とするためには、条件的KOマウスの使用が有効である。そこで、新潟大学・崎村研究室の協力により、条件的KOを行うための、Prmt3 遺伝子のflox マウスの作成に取り組んだ。既に、ヘテロのfloxマウスが得られているため、条件的KOに成功するのは確実な状況である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Tateyama M, Kubo Y
Analyses of the effects of Gq protein on the activated states of the muscarinic M3 receptor and the purinergic P2Y1 receptor. *Physiological Reports* 1(5) e00134 (2013)
PMID: 24303197 査読有り

Tateyama M, Kubo Y
Binding of Gq protein stabilizes the activated state of the muscarinic receptor type 1. *Neuropharmacology* 65, 173-181 (2013)
PMID: 23085334 査読有り

Nakajo K, Nishino A, Okamura Y, Kubo Y
KCNQ1 subdomains involved in KCNE modulation revealed by an invertebrate KCNQ1 orthologue. *Journal of General Physiology* 138, 521-535 (2011)
PMID: 22042987 査読有り

Nakajo K, Kubo Y
Nano-environmental changes by KCNE proteins modify KCNQ channel function *Channels* 5, 397-401 (2011)
PMID: 21654200 査読有り

Tateyama M, Kubo Y
The intra-molecular activation mechanisms of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1 differ depending on the type of G proteins. *Neuropharmacology* 61, 832-841 (2011)
PMID:21672544 査読有り

[学会発表](計 5件)

Yamamoto T, Hattori S, Kiyonari H, Nakao K, Miyakawa T, Kubo Y
Comprehensive behavioral battery analyses of the gene targeted mice of prmt3, an orphan metabotropic receptor. 第91回日本生理学会大会(2014年3月16日、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県)

Yamamoto I, Konno K, Yamamoto T, Watanabe M, Kubo Y
Expression patterns of an orphan metabotropic receptor Prmt3 in mice. 第91回日本生理学会大会(2014年3月16日、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県)

Tateyama M, Kubo Y
Stabilizing effects of G protein on the active conformation of the adenosine receptor type1a differ depending on the type of G protein. 第91回日本生理学会大会(2014年3月16日、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県)

Tateyama M, Kubo Y
Binding of the Gq protein stabilizes the active conformation of the M1R and M3R, but not of P2Y1R. 第90回日本生理学会大会(2013年3月28日、タワーホール船堀、東京都)

Tateyama M, Kubo Y
Effects of the Gq coupling on the activated states of the receptor differ depending on the type of the receptors. 第35回日本神経科学大会(2012年9月18日、名古屋国際会議場、愛知県)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

該当なし

取得状況(計 0件)

該当なし

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

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4) 備考 -- 研究協力者

山本 泉
生理学研究所・ポスドク研究員
山本 友美
生理学研究所・技術職員
宮川 剛
藤田保健衛生大学・教授
服部 聡子
藤田保健衛生大学・助教
岡戸晴生
東京都医学総合研究所・副参事研究員
西藤 泰昌
東京都医学総合研究所・技術スタッフ
渡辺 雅彦
北海道大学大学院医学系研究科・教授
今野 幸太郎
北海道大学大学院医学系研究科・助教
平林 真澄
生理学研究所・准教授
三宝 誠
生理学研究所・技術職員
深田 正紀
生理学研究所・教授
深田 優子
生理学研究所・准教授
横井 紀彦
生理学研究所・特任助教
崎村 建司
新潟大学脳研究所・教授
周 麗
新潟大学脳研究所・ポスドク研究員
夏目 理恵
新潟大学脳研究所・技術職員