

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1．養成技術者氏名：真板 宣夫

2．養成カリキュラム名：膜受容体の細胞内トラフィック機構の解明とその利用

3．養成カリキュラムの達成状況

本業務は、細胞内輸送機構を解明する目的で、膜蛋白質の構造解析を中心に行うものである。シンポジウムなどに積極的に参加して、膜蛋白質の精製・結晶化に関する情報を集め、有効な方法を検討している。膜蛋白質の構造解析については、製薬企業の協力で膜受容体の精製を行い、結晶化スクリーニングを試みているが、結晶は得られていない。また、小胞輸送にかかわる蛋白質では、ユビキチンとの結合を確認することができた。針状の結晶が得られたものの、構造解析のレベルには達していない。

全体的に見て、膜蛋白質は性質が不安定で結晶化レベルの調整が困難な為、計画にやや遅れが生じている。

その他、疾病に係わる蛋白質及び核酸複合体の結晶化に取り組んでいる。

4．成果

G蛋白質共役受容体に代表される一群の膜受容体は、細胞の外界からのシグナル認識の殆どを担うため、細胞活性の最も重要な構成成分である。膜受容体の重要な活性調節の一つが、細胞膜上での受容体の数量調節である。すなわち細胞は、ダイナミックに膜上の受容体数を変化させることによって、外界からのシグナルに対する細胞応答を調節している。また活性化された受容体は膜からの細胞質への移行により、活性が負に制御される。こういった膜上での受容体数の調節は、ゴルジ体から膜への、あるいは膜からエンドソームへの細胞内小胞輸送によって担われる。この小胞輸送の機構を明らかにするのが、本研究開発の目的である。膜受容体の重要な調節機構である小胞輸送の機構が明らかになると、薬の殆どは膜受容体を直接的なターゲットとしているため、新薬開発等における重要な基盤技術となると期待される。

現在GPCRの中で原子レベルで解明されているものはロドプシンのみであり、ロドプシンを使った他のGPCRのモデリングが行われているが、精度の高いモデリングを行う上では不十分である。このため、別のGPCRの立体構造を解くことは薬学的に重要な他のGPCR解析にも役に立つことが期待される。製薬企業の好意により研究所に Outreach、昆虫細胞で発現させたGPCRの精製を行った。精製サンプルを 3 mg/mLまで濃縮した後、結晶化スクリーニングを試みた結果、結晶化に適していると思われる条件はいくつか見られたが、結晶化には成功していない。

膜蛋白質の細胞膜と小胞体間の輸送は小胞輸送によって行われている。蛋白質がユビキチン化されることで小胞輸送されるが、その際小胞膜とユビキチン化蛋白質のリンカーとして働く蛋白質が同定されている。そ野蛋白質にはユビキチン結合モチーフ (UIM) があり、ここでユビキチンと

結合すると考えられている。UIMを含む領域を発現させ、大量スケールで培養・精製を行った。精製した蛋白質について結晶化スクリーニングを行い、ある条件で針状結晶が得られた。しかしながら、この結晶は不安定で数週間後に消滅してしまった。この条件をベースにして、結晶の改善を試みている。また、NMRのタイトレーション実験およびQCM装置を用いて、精製品とユビキチンの結合が確認できた。

その他、疾病に係わる蛋白質及び核酸複合体の結晶化に取り組んでいる。蛋白質と核酸の複合体は結晶化に成功し、2.2 のデータを収集することが出来た。もうひとつの蛋白質は2.0 のデータが取れ、現在構造の精密化を行っている。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済、または査読済を対象。)

本養成プログラムに関する論文発表はない。

(2) 口頭発表(発表済を対象。)

本養成プログラムに関する学会口頭発表はない。

(3) 特許等の出願件数

本養成プログラムに関する特許出願はない。