

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

2023年 4月 10日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 医学研究科

職 名 特定准教授

氏 名 浅田 秀基

助 成 の 種 類	令和4年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	生理活性脂質の炭化水素鎖長により変化するシグナル選択性の構造基盤と 創薬応用			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	脂質受容体であるS1PR3(Sphingosine-1-phosphate receptor3)にGタンパク質 を共役させ、これをクライオ電子顕微鏡単粒子解析法で測定した。			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) なし			
発表学会文献等	なし			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	842,276	
		備品費	156,800	
郵便・宅配便料		924		
当財団の助成に つ いて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)			

## 成果の概要／浅田秀基

研究課題名：生理活性脂質の炭化水素鎖長により変化するシグナル選択性の構造基盤と創薬応用

本研究は、脂質受容体である S1PR3(Sphingosine-1-phosphate receptor3)の生理活性が、受容する脂質リガンドの脂肪酸差長の違いにより異なる G タンパク質シグナルを惹起する機構を構造から明らかにすることを目的とした。

生理活性を有する脂質は脂質メディエーターと呼ばれ、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。本研究で対象とする S1PR3 は、5 種類存在するリゾリン脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸を受容する 7 回膜貫通型膜タンパク質の G タンパク質共役受容体(GPCR)である。S1PR3 は、神経、免疫系、循環系、消化管、肺などの様々な組織に広く分布し、それぞれの組織における細胞の成長、運動、分化、生存など様々な生理的機能に関与することが知られている。我々は、S1PR3 に炭化水素鎖長の異なる S1P が結合することで G タンパク質の選択性が変化し、これが生理活性を制御している要因である可能性を S1P が結合した S1PR3 の構造から明らかにした (Maeda et al., Science Adv. 2021)。この機構の詳細を明らかにするため、新しい膜タンパク質構造解析手法である、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) による単粒子解析法を用いて検討を行った。

cryo-EM 単粒子解析法では、S1PR3、G $\alpha$ 、G $\beta$ 、G $\gamma$ 、scFV16、NB35 など多くのタンパク質を

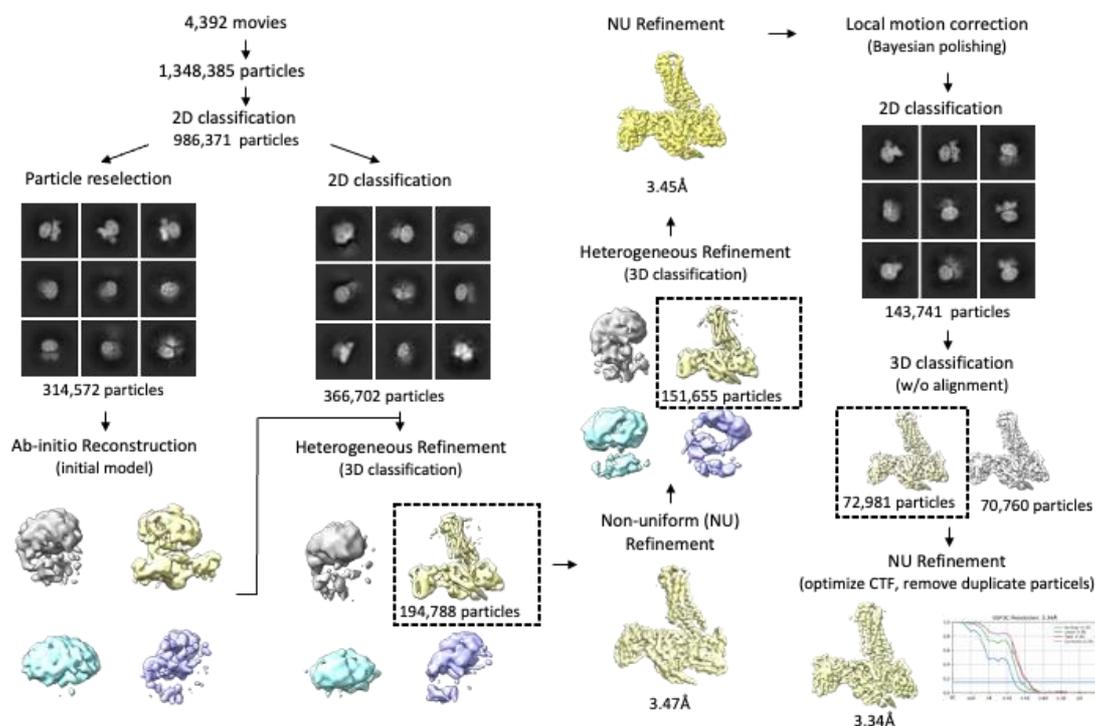


図 cryo-EM workflow (d18:1 S1P-S1PR3-Gq $\beta$  $\gamma$ )  
d18:1 S1P-S1PR3-Gq $\beta$  $\gamma$  複合体の cryo-EM 測定データを取得し、そのデータ解析ワークフローを示す。解析の結果、3.34Å のデータ取得に成功した。

発現、精製する必要がある。S1PR3、G $\alpha$ 、G $\beta$ 、G $\gamma$  は Sf9 昆虫細胞で発現するが、S1PR3、は単独で、G $\alpha$ ・G $\beta$ ・G $\gamma$  は 3 種類を同時に発現しそれぞれ精製する。また scFV16、NB35 は Brevibacillus を用いて発現・精製を行った。これらの精製サンプルを全て混合することで複合体を形成させ、さらにゲル濾過法により複合体を形成したサンプルのみを精製した。これを最終精製品とし、cryo-EM 単粒子解析を行うためにカーボン膜のグリッドに塗布し、測定用のオートグリッドを複数枚作製した。オートグリッドは、京都大学医生物学研究所に設置されている cryo-EM (Glacios, 加速電圧 200kV) でまず測定を行い、得られたデータを解析した。この結果、ハイエンドの cryo-EM で測定すれば構造を決定できる可能性があったため、大阪大学蛋白質研究所に設置の cryo-EM (Titan, 加速電圧 300kV) で測定した。そこで得られたデータを解析した結果、3.34Å の構造データを得ることに成功した (図)。現在、構造の精密化を進めている所であり、この構造が得られれば G $\alpha$  の異なる 3 量体 G タンパク質との複合体の構造決定、または脂肪酸鎖の短いバイアス型リガンドが結合した構造をそれぞれ決定することで G タンパク質のバイアス活性機構を構造から明らかにしたいと考えている。