

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成24年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成24年度～平成26年度

5. 課題番号

2	4	5	9	0	1	1	3
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 大脳皮質形成における多様なGタンパク質シグナル制御機構の解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
9 0 2 1 2 2 3 2	ミズノ ノリカズ 水野 憲一	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

<p>(1) 大脳皮質形成における新規Gタンパク質制御機構の機能解析 大脳皮質形成におけるRic-8の機能を解析するために、内在性Ric-8AおよびRic-8BをノックダウンするためのshRNA発現アデノウイルスベクターの作製を行った。これを用いてマウス培養神経前駆細胞に対するRic-8AおよびBの機能解析を行った。神経前駆細胞の増殖に対する効果を検討したところ、Ric-8AおよびRic-8Bともにノックダウンすることにより、増殖能が减弱した。また、ポイデンチャンパー法を用いて細胞遊走能に対する効果を調べたところ、Ric-8Aのノックダウンは効果がなかったが、Ric-8Bのノックダウンにより神経前駆細胞の遊走能が減少した。われわれはGsシグナルが細胞遊走促進に働くこと、Ric-8BがGsシグナルを増強することを既に報告しているが、この結果から神経前駆細胞においてRic8BがGsシグナルによる細胞遊走促進活性に寄与していることが考えられた。</p> <p>(2) オーフアンGPCRに対する機能抗体の作製 ヒトGPR56に対するモノクローナル抗体を作製し、機能抗体としてのスクリーニングを、細胞内Ca濃度上昇、U87グリオーマ遊走能を指標に行った。その結果、3種類のアゴニスト様抗体を得ることができた。また、これら機能抗体による効果は、Gq特異的阻害剤であるYM684790により阻害されたことから、Gqを介したシグナルが示唆された。一方、大脳皮質において発現しているGPR49(LGR5)およびlatrophilinに対する機能抗体を作製するために、Sf9/バキュロウィルスの発現系を用いて、細胞外ドメインのリコンビナントタンパク質の調製を試みた。しかしながら、抗原として用いるまでの収量および精製度に至っておらず、条件を検討している。</p>
--

10. キーワード

(1) シグナル伝達	(2) 神経科学	(3) 脳・神経	(4) 薬学
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

神経前駆細胞における新規Gタンパク質調節因子Ric8の機能に関しては、ノックダウンさせることにより内在性の機能、特に増殖、細胞遊走に対する効果を見いだすことができた。またノックダウンさせるためのアデノウイルスを用いて脳切片培養系での詳細な細胞動態の検討を行っている。

オーファンGPCRに対する機能抗体作製に関しては、ヒトGPR56に対する機能抗体を3種類得ることに成功した。これらの抗体を用いて、抗体認識部位の同定を行っているところである。しかしながら、予定していた脳に発現するオーファンGPCRであるGPR49およびlatrophilinに対する機能抗体の作製にあたり、抗原として用いるための細胞外ドメインのリコンビナントタンパク質をSf9/バキュロウイルス発現系を用いて作製を行ったが、収量および精製が進行しておらず、抗体作製までに至っていない状況である。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

神経前駆細胞におけるRic-8の機能解析においては、増殖および細胞遊走におけるGタンパク質やリガンドおよびそのGPCRとの関係を明らかにし、機構について解明を進める。さらにそれぞれの下流シグナルを探る。

GPR56に対する機能抗体に関しては、得られた抗体を用いて抗体の結合部位を同定し、結合部位の変異体を作製することにより、活性化機構解析およびアゴニスト様抗体の結合部位をターゲットとした内在性リガンド探索を行う。

GPR49およびlatrophilinなどオーファンGPCRに対する機能抗体の作製に関しては、細胞外ドメインをさらにドメインごとに分断することで、抗原として用いることができるだけの収量と精製度を目指す。

(次年度の研究費の使用計画)

該当なし

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(2)件 うち査読付論文 計(2)件

著者名		論文標題【掲載確定】			
Saito Y., Kaneda K., Suekane A., Ichihara E., Nakahata S., Yamakawa N., Nagai K., Mizuno N., Kogawa K., Miura I., Itoh H., Morishita K.		Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Leukemia.	有	印刷中	2 0 1 3	印刷中	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038/leu.2013.75.					

著者名		論文標題			
Toriyama M., Mizuno N., Fukami T., Iguchi T., Toriyama M., Tago K., Itoh H.		Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
J. Biol. Chem.	有	287	2 0 1 2	12691-12702	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1074/jbc.M111.316307.					

〔学会発表〕計(0)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
学会等名	発表年月日	発表場所	

(図書) 計(0)件

著者名	出版社			
書名			発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

分子情報薬理学 (伊東研究室)
<http://bsw3.naist.jp/itoh/>