

様 式 Z - 7

## 平成 2 5 年度科学研究費助成事業 実績報告書 ( 研究実績報告書 )

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(B)

4. 研究期間

平成 2 5 年度 ~ 平成 2 8 年度

5. 課 題 番 号

2 5 2 9 0 0 2 2

6. 研究課題名

認知機能に関係する神経可塑性プロテアーゼ基質の網羅的探索とそのシグナル系の解析

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 1 2 7 2 3 3	シオサカ サダオ 塩坂 貞夫	バイオサイエンス研究科	教授

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
6 0 2 8 3 9 3 3	ミヤイ カズマサ 宮井 和政	秋田大学・医学 ( 系 ) 研究科 ( 研究院 )	准教授
2 0 3 4 4 5 7 5	バンドウ ヨシオ 板東 良雄	旭川医科大学・医学部	准教授
9 0 3 4 6 3 2 0	イシカワ ヤスユキ 石川 保幸	前橋工科大学・工学部	准教授

9. 研究実績の概要

tPA、トロンピン、ニューロトリプシンおよびカリクレイン 6 はいずれも脳に存在するセリンプロテアーゼ群であり、構造的にもよく類似している。そこで我々はニューロプシンにおいてすでに実用化したDirect-protease-substrate interaction(Dips法)による天然基質候補のスクリーニングを行った(参考: Tamura et al., J. Neurosci., 32:12657, 2012)。

作製する結合能維持変異型プロテアーゼは各プロテアーゼのLoop Gの一部を変異させたExpression vectorを作製する。この作業は後述するそれぞれの担当者が各大学で行う。いずれも数種類の変異遺伝子を作製し、結合能維持変異型プロテアーゼが出来たかどうかは細胞への遺伝子導入を行い、ウェスタン法によってプロテアーゼの理論分子量より大きいコンプレックスが出来たものを候補とする。この研究では適切な変異プロテアーゼを得ることが条件であり、カリクレイン 6、トロンピンはLoopGの構造がきわめてよく類似し(Kishi et al., J. Biol. Chem., 274, 4220, 1999)、ジスルフィド結合を作るC208は保存されているため、これを解くため同様にC208S変異を導入する。しかしコンプレックスが出来ない場合には僅かに位置を変え検討する。

基質複合体の質量分析検索

これらの内いくつかについてコンプレックスが出来れば、それを優先して解析を進める。こうして得られたコンプレックスはMycあるいはHis-tagによって分離することが容易である。得られた高分子コンプレックスをTof-Mass解析を行う ( 基質スクリーニング )。Tof-Mass解析については奈良先端科学技術大で行い、分析結果を分担者と共有する。

10. キーワード

(1) 天然基質

(2) 神経可塑性

(3) 認知機能

(4) プロテアーゼ

(5) 組織プラスミノゲンアク  
ティベータ

(6) tPA

(7) neuropsin

(8)

## 11. 現在までの達成度

( 区分 ) ( 2 ) おおむね順調に進展している。

( 理由 )

組織プラスミノゲンアクティベータ ( t P A ) ミュータントの作成、すなわち基質に結合するがそれを切断分離することのないミュータントトリコンビナントタンパク質の作成、に成功し、代表的な基質とされているプラスミノゲンを結合させることによって確かめた。また、マウスのみならずヒト型タンパク質についても同様に成功した。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

( 今後の推進方策 )

t P A についてミュータントトリコンビナントタンパク質の作成に成功したので、血漿タンパク質および脳ホモジェネートを用いて、コンプレックスを作成し、この結合タンパク質を M y c あるいは H i s T a g による免疫沈降などによって分離して、M A S S による検討を行う予定である。

( 次年度使用額が生じた理由と使用計画 )

( 理由 )

石川准教授は平成25年3月31日に奈良先端科学技術大学院大学より前橋工科大学の准教授として異動した。そのため、最初の4か月は研究室の準備に忙殺され、当初の計画に沿った研究ができなかった。そのため、370,368円の未使用研究費が生じた。平成26年度は計画に沿った使用が可能である。

( 使用計画 )

370,368円の次年度繰越額に平成26年度配分額加えて、870,368円配分される。  
物品費 ( 抗体など )、870,368円の使用を予定している。

## 13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計( 0 )件    うち査読付論文 計( 0 )件

著 者 名		論 文 標 題			
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
			<div></div> <div></div> <div></div>		
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

(学会発表) 計( 1 )件    うち招待講演 計( 0 )件

発 表 者 名		発 表 標 題	
谷川美由紀、俵一平田佳江、田村英紀、塩坂貞夫		Unbiased search for potential substrate for proteases	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	
第87回日本薬理学会年会(仙台)	2014年03月19日～2014年03月21日	仙台国際センター(宮城県、仙台市)	

(図書) 計( 0 )件

著 者 名		出 版 社	
書 名		発行年	総ページ数
		<div></div> <div></div> <div></div>	

## 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