

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 7 年度
5. 課題番号 

2	5	2	9	3	0	1	3
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 新しいGタンパク質共役受容体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
1 0 1 8 3 0 0 5	イトウ ヒロシ	バイオサイエンス研究科	教授
	伊東 広		

## 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
8 0 4 3 3 9 9 4	コバヤシ テツオ	バイオサイエンス研究科	助教
	小林 哲夫		

## 9. 研究実績の概要

細胞膜を七回貫通する特徴を有するGタンパク質共役受容体 ( G protein-coupled receptor, GPCR ) はホルモンや神経伝達物質など数多くの細胞外シグナルにより活性化されシグナルを細胞内へ伝達する。本研究では新しいファミリーとして見出されたadhesion GPCRに属するGPR56とLatrophilin1の活性制御機構と生理機能の解明、そして新奇Gタンパク質調節分子Ric-8のGPCRシグナルにおける役割の解明を目指している。本年度の実績の概要は以下の通りである。( 1 ) ヒトGPR56に対するモノクローナル抗体をいくつも作成し、そのうちヒトグリア腫細胞の遊走を阻害する3種類の抗体が細胞内カルシウム応答をGq依存性に起こすことを見出した。これら3つの抗体がGPR56の細胞外ドメイン ( ECD ) のうちN末側100アミノ酸とC末側100アミノ酸をそれぞれ認識することが欠変異体を用いて明らかとなった。また、アゴニスト様に働く抗体がGPR56の細胞ドメインと細胞内ドメインの相互作用を強めることが共免疫沈降実験から判明した。( 2 ) GPR56-ECDとLatrophilin1の膜貫通ドメインからなる複合体がGABA抑制性ニューロンに存在する可能性を示す免疫染色データが初代培養神経細胞と脳切片を用いて得られた。( 3 ) 心筋細胞の拍動を増強する アドレナリン受容体を介するシグナルがGq共役型受容体の持続的な活性化により減弱される。心筋細胞および繊維芽細胞で持続的なGqシグナルによりユビキチン化の増加とGsの発現量の低下が認められ、その効果がRic-8Bの過剰発現で抑制されることが判明した。( 4 ) ショウジョウバエのRic-8がGタンパク質 サブユニットの一つであるCtaの膜局在化に必要であることが原腸陥入不全を示すRic-8変異体を用いた解析より明らかとなった。

## 10. キーワード

- ( 1 ) シグナル伝達 ( 2 ) GPCR ( 3 ) Gタンパク質 ( 4 ) \_\_\_\_\_
- ( 5 ) \_\_\_\_\_ ( 6 ) \_\_\_\_\_ ( 7 ) \_\_\_\_\_ ( 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)

GPR56を認識し、アゴニスト様に働く抗体と働かない抗体が得られ、それらの抗体を用いた詳細なGPR56の活性制御機構の解析が進んでいる。共発現系で認められたGPR56とLetrophilin1からなる複合体が脳内のどの細胞で存在するかを脳切片と初代培養神経細胞を用いて解析した結果、GABA抑制性ニューロンでの両者の発現が認められた。今後、この神経細胞に絞った解析が可能となった。Ric-8Bが心筋細胞におけるGsとGqを介した2つのシグナル伝達系を結びつける分子として働いていること、そしてユビキチン化と密接に関連することが判明した。GsおよびRic-8Bのそれぞれ、あるいは両者と相互作用しユビキチン化修飾に関連するいくつかの候補分子がプロテオーム解析から見出された。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

先にGPR56の内在性リガンド候補として同定したレプリカンのリコンビナントタンパク質の調製に成功しているので、直接的なGPR56との結合を確認するとともにGPR56モノクローナル抗体とレプリカンが競合するか検討しレプリカンの結合部位の絞り込みを行う。GABA抑制性ニューロンのマーカー遺伝子であるGAD67のプロモーター下流にGFPを繋いだノックインマウスからGFPを指標としてGABAニューロンを単離し、その細胞でのGPR56とLetrophilin1からなるキメラ受容体の存在の確認と機能の解明を進めていく。Mass解析からRic-8とGs と相互作用することが示唆されたユビキチン修飾酵素のcDNAを単離し、相互作用を確認するとともに酵素活性不活化変異体を作成し、細胞内のグローバルなユビキチン化やGs のユビキチン化に対する効果を検討する。Gタンパク質 サブユニットの脂質修飾に対するRic-8の効果細胞メタボリックラベルと蛍光化学修飾を利用したClick assayによる検討する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

(使用計画)

## 13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名		論文標題			
Jenie RI et al.		Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Genes Cells	有	18	2   0   1   3	1095-1106	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
doi: 10.1111/gtc.12099					

著者名		論文標題			
Tago K et al.		Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Oncogene	有	on line published	2   0   1   4	1-9	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
doi: 10.1038/onc.2013.561					

著者名		論文標題			
伊東 広 他		三量体Gタンパク質シグナル制御機構の新たなる展開			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
生化学	有	85	2   0   1   3	531-542	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
なし					

(学会発表) 計(5)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
Riris I. Jenie et al.		心筋細胞のGタンパク質シグナルにおけるRic-8Bの機能	
学会等名		発表年月日	発表場所
第86回 日本生化学会大会		2013年09月11日～2013年09月13日	横浜、神奈川

発表者名		発表標題	
野島悠佑 他		神経細胞の分化に伴うGPR56の発現パターンの変化	
学会等名		発表年月日	発表場所
第36回 日本分子生物学会年会		2013年12月03日～2013年12月06日	神戸、兵庫

発表者名		発表標題	
鯉森貴行 他		G sユビキチン修飾を制御する分子機構の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
第36回 日本分子生物学会年会		2013年12月03日～2013年12月06日	神戸、兵庫

発表者名		発表標題	
根岩直希 他		LGRの発現とシグナル伝達の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
第36回 日本分子生物学会年会		2013年12月03日～2013年12月06日	神戸、兵庫



15.備考

--