

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25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. 研究課題名 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) Ric-8の機能解析 昨年度は培養神経前駆細胞においてRic-8Bの発現抑制が自己複製能および細胞遊走を阻害することを報告した。今年度は心筋細胞を用いてRic-8Bの機能を調べた。われわれは、心肥大病態モデルマウスの心臓においてユビキチン化が亢進していることに着目し、培養心筋細胞を用いて、GqシグナルがGsタンパク質のユビキチン化を促進し、Gs発現量の減少およびアドレナリン作動性受容体刺激によるcAMPレスポンスを減弱させることを見いだした。さらにRic-8Bは、Gqシグナルのこれらの効果を抑制することがわかった。このことから、Ric-8BはGsの量的変化によりシグナル伝達を制御していることが示唆された。この結果は論文および学会発表により報告した。脳におけるRic-8の機能については、Ric-8A及びRic-8Bをノックダウンした脳組織切片における細胞の動きを継続的に観察し、さらにRic-8をノックダウンした培養神経前駆細胞の遊走に対して誘因物質や忌避物質の効果を検討中である。</p> <p>(2) オーフアンGPCRに対する機能抗体の作製 ヒトGPR49の細胞外ドメイン(GPR49ECD)のリコンビナントタンパク質を大腸菌発現系を用いて精製した。その結果、2 Lの大腸菌培養から約100 μgのリコンビナントタンパク質を得ることができた。マウスに免疫を行い、ハイブリドーマを作製し、144のクローンを得ることができた。さらにELISAにより16の陽性クローンを得た。またGPR49は筋芽細胞C2C12において高発現していることを見だし、筋分化に伴うGPR49の機能を解析した。この結果は学会発表により報告した。さらに急性骨髄性白血病細胞AML1におけるGPR56の機能解析を行うにあたり、研究課題において作製したGPR56に対する抗体を用い、論文として発表している。</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、昨年度の結果をさらに発展させ、Ric8をノックダウンさせることにより、各種誘因物質および忌避物質による細胞遊走に対して効果を見いだすことができた。この結果は、Ric-8をノックダウンさせるためのアデノウイルスを用いた脳切片培養系での細胞遊走促進効果を裏付ける結果となった。しかし、今後さらなる再現性、また細胞の動きなどを詳細に検討する必要がある。
抗体作製に関しては、ヒトGPR56に続き、GPR49においてもリコンビナントタンパク質の調製に成功した。さらにlatrophilinに対する細胞外ドメインのリコンビナントタンパク質も、細胞外ドメインの一部分に限定して調製できるようになった。現在、latrophilinに対する抗体作製に関しても進行中である。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後の研究の推進方策

得られた抗体に対して、さらに機能抗体としての作用の有無、結合部位の同定を行う。またGPR49やlatrophilinを発現している細胞を得られた抗体を用いて同定し、その細胞におけるGPCRの機能や、そのシグナル伝達系について解析を行う。

次年度の研究費の使用計画

次年度より、青森大学に異動するため、本研究を継続するための研究室セットアップに昨年度の次年度使用分を費やす予定である。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

次年度より奈良先端科学技術大学院大学より青森大学に異動になるため、研究室のスタートアップのための費用が必要と判断したため

(使用計画)

本研究課題遂行のため、クリーンベンチが必要である。備品としてクリーンベンチを購入する予定である。さらに次年度分の消耗品で足りない部分を次年度分で補う。

13.研究発表(平成25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					
Jenie R.I., Nishimura M., Fujino M., Nakaya M., Mizuno N., Tago K., Kurose H., and Itoh H..		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)							
10.1111/gtc.12099							

著者名		論文標題					
Saito Y., Kaneda K., Suekane A., Ichihara E., Nakahata S., Yamakawa N., Nagai K., Mizuno N., Kogawa K., Miura I., Itoh H., and 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	27	2	0	1	3	1637-1649
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)							
10.1038/leu.2013.75							

(学会発表) 計(3)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
水野 憲一, Riris Istighfari Jenie, 仲矢 道雄, 多胡 憲治, 黒瀬 等, 伊東 広		心筋細胞でのGqシグナルによるGs抑制機構に対するRic-8Bの関与	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第86回日本生化学会	2013年09月11日~2013年09月14日	横浜	

発表者名	発表標題	
野島 悠佑, 水野 憲一, 伊東 広	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	2013年12月03日 ~ 2013年12月05日	神戸

発表者名	発表標題	
根岩 直希, 水野 憲一, 小林 哲夫, 伊藤 友里, 伊東 広	LGR5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	2013年12月03日 ~ 2013年12月05日	神戸

(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

--