

様式 Z - 7

平成26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25年度～平成27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 伊東 広	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
8 0 4 3 3 9 9 4	コバヤシ テツオ 小林 哲夫	バイオサイエンス研究科	助教

9. 研究実績の概要

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は細胞外シグナルを認識して細胞応答を引き起こす際に重要な働きをしている。本研究では多細胞生物への進化の過程で現れた、Adhesion GPCRとGタンパク質制御因子Ric-8によるシグナル伝達の調節機構に関する研究を行い、以下のような成果を得た。1. 私共は先にGPR56に対する機能性モノクローナル抗体をいくつか得ていたが収量が低いため大量調製を目指した。マウス腹水へのハイブリドーマの移植によりmg単位で抗体が得られるものがあることが判明した。得られた抗体を用いてマウス内でのヒトグリオーマ細胞の生着・増殖に対する作用を検討することが可能となった。2. いくつかの機能性抗体を産生するハイブリドーマから抗体の重鎖と軽鎖をコードするcDNAを単離した後、抗体発現プラスミドを構築し、リコンビナント抗体の産生が認められるものがあった。3. 機能性抗体のエピトープを調べるため欠失および変異導入受容体を用いて解析し、どちらもアゴニスト様に働く異なる抗体がN末側とC末側の別々の領域を認識して作用を発揮する可能性が得られた。4. Adhesion GPCRの一つであるLetrophilin1の細胞外ドメインが細胞外ドメインを欠いたGPR56の膜貫通ドメインと複合体を形成し、Latrotoxininによるカルシウム応答を引き起こすことが明らかとなった。5. Ric-8Bと相互作用することで自身のユビキチン化が抑制され安定化されるGタンパク質サブユニットG_sと相互作用するE3リガーゼ、脱ユビキチン化酵素の候補分子をMass解析よりいくつか同定し、G_sの発現に関与するかどうか過剰発現とノックダウンにより検討した。6. ショウジョウバエのRic-8がG_{12/13}ホモログであるCtaのアルミトイル化を促進することが判明した。

10. キーワード

- (1) Gタンパク質 (2) GPCR (3) シグナル伝達 (4) _____
- (5) _____ (6) _____ (7) _____ (8) _____

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(1/6)

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の活性化機構と生体内での機能を調べるためには生体内のリガンドや受容体の活性を変化させる抗体が極めて有用である。機能性抗体は得られる量が少なく、また産生するハイブリドーマが不安定である場合が多い。これらの問題を解決するためにマウス腹水での産生、およびリコンビナント抗体の作成を試み、有用性を示唆する結果が得られている。Ric-8に関して、Gタンパク質のPALMITOYL化を検出する系の立ち上げに成功し、実際、Ric-8がPALMITOYL化を細胞内で促進することが判明した。また、G_sのユビキチン化修飾に關与するE3リガーゼ、脱ユビキチン化酵素の候補分子の同定に成功し、それぞれの遺伝子の単離とノックダウンのためのsiRNAの入手も済んでいる。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

急性骨髄性白血病由来細胞AML1のGPR56をノックダウンすると細胞の増殖が阻害されることが判っている。そこで、AML1細胞の増殖を阻害する抗ヒトGPR56抗体の作成を行っており、これまでに得られている抗体と比較しながら、そのシグナル伝達系に与える影響を検討していく予定である。GPR56の膜貫通ドメインとLatrophilin1の細胞外ドメインを発現しているGABA作動性ニューロンをGAD67-GFPノックインマウスよりFACSでソーティングして調製し、その細胞におけるキメラ受容体の存在と機能の実証を目指す。Ric-8のPALMITOYL化促進がPALMITOYL化酵素の活性促進か、脱PALMITOYL化酵素の阻害のどちらであるか、in vitroのPALMITOYL化反応系を立ち上げて検証する。G_sのユビキチン化修飾に關与する酵素を細胞レベルで同定するとともに、in vitroの系においての検証も試みる。

(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26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			
Ohta S, Sakaguchi S, Kobayashi Y, Mizuno N, Tago K, Itoh H.		Agonistic Antibodies Reveal the Function of GPR56 in Human Glioma U87-MG Cells.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Biol Pharm Bull	有	38	2 0 1 5	594-600	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1248/bpb.b14-00752					

著者名		論文標題			
Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, Yanagisawa K		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	34	2 0 1 5	314-322	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038 /onc.2013.561					

(学会発表) 計(7)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
Koimori Takayuki, Tetsuo Kobayashi, Hiroshi Itoh		Analysis of molecular mechanism for G s ubiquitination	
学会等名	発表年月日	発表場所	
The 2014 ASCB meeting	2014年12月06日～2014年12月10日	Philadelphia, U.S.A.	

発表者名		発表標題	
小坂 隆二, 岩崎 剛, 中村 陽介, 松田 直樹, 多胡 憲治, 小林 哲夫, 伊東 広		Gタンパク質共益受容体GPR56の結合分子Leprecan1の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
第37回日本分子生物学会		2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

発表者名		発表標題	
太田 麗央, 小林 哲夫, 伊東 広		一次繊毛におけるRab-likeファミリータンパク質群の機能解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
第37回日本分子生物学会		2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

発表者名		発表標題	
中園 昂亮, 小林 哲夫, 徳田 滯, Brian David Dynlacht, 伊東 広		膵管癌細胞における一次繊毛消失機構の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
第37回日本分子生物学会		2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

発表者名		発表標題	
多胡 憲治, 多胡 めぐみ, 杉山 直幸, 伊東 広, 柳澤 健		新規がん抑制遺伝子産物TRB3はkB-RasのSUMO化を介してRas(G12V)の発がんシグナルを制御する	
学会等名		発表年月日	発表場所
第37回日本分子生物学会		2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

発表者名	発表標題	
伊達山 泉, 小林 哲夫, 伊東 広	一次繊毛を介したセロトニンシグナル伝達機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第66回日本細胞生物学会	2014年06月11日～2014年06月13日	奈良県新公会堂、奈良県奈良市

発表者名	発表標題	
水野 憲一, 太田 茂之, 小林 祐希, 坂口 さや香, 伊東 広	機能抗体を用いた癌細胞におけるGPR56の機能解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第66回日本細胞生物学会	2014年06月11日～2014年06月13日	奈良県新公会堂、奈良県奈良市

(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

--