

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30 年 4 月 26 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所 属 機 関・部 局 名 広島大学 医歯薬保健学研究院
職 名 講師
研 究 代 表 者 名 田中 茂

下記のとおり平成 29 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281022)

1. 共同利用研究 課題名	GPR3 結合蛋白の同定とシグナル伝達機構の解析			
2. 共同利用研究 目的	G 蛋白共役型受容体 GPR3 に結合する蛋白質を同定し、細胞内シグナル伝達メカニズムを 解明する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 田中 茂	広島大学 医歯薬保健学研究院	講師	研究の統括 GPR3 結合蛋白の単離	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル機能制御研究 部門	氏 名	齋藤 尚亮

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:281022)

6. 共同利用研究計画

GPR3 は神経細胞に豊富に発現する G 蛋白共役型受容体であり、神経細胞の突起伸張・分化・生存に寄与することを研究代表者はこれまで明らかにしてきた。しかしながら、GPR3 がどのような蛋白質と相互作用し、細胞内情報伝達系を駆動するのか、未知な点が多い。そこで、本研究では GPR3 受容体に結合する蛋白質を網羅的に同定し、細胞内シグナル伝達メカニズムを探る手がかりとなる物質を検索し、GPR3 の神経細胞における機能を明らかにすることを研究目的とする。P7 ラット小脳顆粒神経細胞、SH-SY5Y 細胞、PC12 細胞に Flag タグ付加 GPR3 発現ベクター又はコントロール Flag ベクターを電気穿孔法 (NEPA21) により遺伝子導入を行う。培養後に細胞を回収し、蛋白抽出後に抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、アクリルアミドゲルに展開する。銀染色後に、GPR3 特異的に免疫沈降される差異が観察されるバンドを同定し、GPR3 と相互作用する可能性がある蛋白質を網羅的に質量分析により解析・同定する。

7. 共同利用研究の成果

N 末端 FLAGtag 付加 GPR3 発現ベクター、C 末端 FLAGtag 付加 GPR3 発現ベクターを作製し、小脳顆粒神経細胞に遺伝子導入後に細胞を回収し、蛋白抽出後に抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、アクリルアミドゲルに展開した。CBB 染色によりコントロールプラスミド導入群と差異のあるバンドを比較検討した結果、GPR3 特異的に免疫沈降されるバンドを数本同定した。さらに、SH-SY5Y 細胞、PC12 細胞、Cos7 細胞に FLAGtag 付加 GPR3 発現ベクターを遺伝子導入し、GPR3 と免疫沈降するバンドを比較検討したところ、PC12 細胞でのみ共沈するバンドを複数確認した。次年度は、これら差異のあるバンドを質量分析により引き続き同定する予定である。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。