

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

令和元年 5月 7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30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 30年 4月 1日 ~ 平成 31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6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9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。さらに最近では、GPR3が小脳顆粒神経細胞の神経成熟過程で発現が増加し、神経突起先端部へ運ばれ、突起先端局所のPKA活性化に寄与する事を明らかにしている。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、どのようなアダプター蛋白質を介して神経突起内で運搬されるのかなど未知な点が多い。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。

7. 共同利用研究の成果

1) シナプシンは、cAMP依存性蛋白キナーゼの主要な基質でシナプス前終末に豊富に存在することが報告されている。したがって、GPR3はシナプス前終末でシナプシンと相互作用し、シナプシン機能を調節する可能性がある。そこで、ラット副腎褐色腫細胞(PC12細胞)を用いて、GPR3発現がシナプシン蛋白質に与える影響について検討した。PC12細胞を血清減少とNGF添加により分化誘導し、GPR3、シナプシンmRNA発現変化をReal-time PCR法により評価した。神経細胞分化に伴うGPR3動態観察には、PC12細胞にGPR3-GFP融合蛋白質を遺伝子導入し、蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察を行った。また、GPR3がシナプシンリン酸化に与える影響を検討するために、PC12細胞にGPR3shRNAを遺伝子導入し、シナプシンリン酸化をウェスタンブロッティング法により評価した。PC12細胞を血清減少とNGF添加により分化させると、分化刺激12~48時間後でGPR3mRNA発現上昇を認めた。同様に、シナプシン2mRNAは刺激後48時間後まで発現上昇を認めたが、シナプシン1、シナプシン3mRNAの発現量は低下した。また、PC12細胞においてGPR3-GFP融合蛋白質は神経突起先端方向に運ばれ突起先端に集積した。細胞分化に伴うGPR3発現をshRNAにより抑制すると、分化48時間後においてシナプシン2リン酸化の減弱傾向を認めた。GPR3は神経細胞分化に伴い発現が増加し、シナプシン2の発現とリン酸化に影響を与えることにより、プレシナプス機能を修飾する可能性が示唆された。

2) GPR3は神経細胞に豊富に発現し、GPR3プロモーター活性が線条体、内側手綱核、視床、海馬CA2、皮質の一部で高いことを報告している。しかしながら、神経細胞におけるGPR3の機能について、これまでに十分明らかにされておらず、機能推定にはGPR3がどのようなサブタイプの神経細胞に発現するか明らかにすることが重要である。最近、diphenyleneiodonium chloride(DPI)がGPR3に対しアゴニスト作用を有し、IP3経路を介した小胞体からのカルシウムの動員を促進することが報告されている。さらに近年、パルプアルブミン、カルレチニン、カルビンジンなどのEF hand型カルシウム結合蛋白質は、特定の細胞や脳の領域の神経マーカーとして広く利用されている。そこで、EF hand型カルシウム結合蛋白質の中でも、海馬CA2特異的な発現が報告されているneuronal Ca²⁺-binding protein 2(NECAB2)に着目し、GPR3発現細胞と比較検討した。免疫組織化学と共焦点レーザー顕微鏡による解析により、線条体、内側手綱核、視床、海馬CA2領域、脳幹背側のGPR3プロモーター活性が高い細胞の大部分がNECAB2陽性であった。一方で、NECAB1はGPR3陽性細胞と部分的な共局在が観察された。NECAB2はアデノシンA2A受容体やmGluR5受容体と相互作用し、受容体機能を修飾することが報告されている。したがって、GPR3はNECAB2陽性神経細胞に豊富に発現し、特定の神経細胞においてカルシウムシグナリング修飾に関与する可能性が示唆される。

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。