

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成22年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	形態形成における微小管細胞骨格の役割の解析
研究機関・ 部局・職名	独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・光学イメージング解析ユニット・ユニットリーダー
氏名	清末 優子

1. 当該年度の研究目的

本プロジェクトの目的は、個体発生や生命維持における、細胞内の微小管細胞骨格と周囲の細胞とのコミュニケーションのメカニズムを明らかにするために、微小管配向を制御する因子に依存して極性輸送・分泌される因子を探索し、形態形成におけるその機能を明らかにすることである。この中で当該年度では、微小管捕捉因子依存的な分泌因子を特定するための、微小管捕捉因子を阻害した細胞を樹立し、実験条件の検討を行った。また、得られた候補分子が目的とする特性を有するかどうかの評価を行うため、ライブイメージングのための蛍光タンパク質発現細胞の樹立や、所属機関での業務として本申請者が担当している共同利用イメージング施設の導入や整備を行った。

2. 研究の実施状況

実験系の検証を行うために、まず、微小管捕捉因子として申請者らが解析を行ってきた LL5(LL5 α と LL5 β) と APC 癌抑制因子を、RNA 干渉法(RNAi)により恒常的に阻害した細胞を樹立するため、これら因子に対する shRNA を作成し、レトロウィルスベクターに組み込み、リコンビナントウィルスを用いて HeLa 細胞株に導入、標的因子の恒常的ノックダウンを確認した。樹立した細胞をカルチャーインサート上に播種し、無血清培地中で数日間培養、経時的に培養液を回収、濃縮後、アクリルアミド電気泳動を行い、培地中のタンパク質分子を比較した。検出された多数のバンドの中、培養 3 日目以降で、ノックダウン細胞で特異的な変化が見られるバンドが数本検出された。今後、変化がみられたバンドの分子を質量分析で同定するとともに、明確な差がみられていない分画についても含まれる因子を網羅的に解析する予定である。同定される分子の解析結果により、今後の実験の拡張あるいは戦略の方針を検討する。

また、得られた候補因子が微小管捕捉因子に依存的に分泌される因子であるか否かは、生化学実験のほか、分泌過程の直接イメージングによって確認する予定である。この目的のため、分泌因子と同時に微小管やその動態、微小管捕捉因子を可視化するために、蛍光タンパク質融合タンパク質各種(GFP-tubulin, EB1-GFP, RFP-tubulin など)をリコンビナントウィルスを用いて細胞に導入し、各種発現細胞を樹立、高精細イメージングでの使用に足るクオリティを確認した。

さらに、分泌因子の局在や動態をイメージングするための、共同利用施設としてのレーザー共焦点顕微鏡、スピニングディスク共焦点顕微鏡、全反射顕微鏡等の導入、調整を行った。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

雑誌論文 計1件	(掲載済み一査読有り) 計1件 1. Kosodo Y, Suetsugu T, Suda M, <u>Mimori-Kiyosue Y</u> , Toida K, Baba SA, Kimura A, Matsuzaki F. “Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain.” EMBO J. 2011, 30, 1690-704. (掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件
会議発表 計0件	専門家向け 計0件 一般向け 計0件
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	http://www.cdb.riken.jp/oia/
国民との科学・技術対話の実施状況	Web ページの作成以外には、22年度中には実施なし。
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	10,000,000	0	6,000,000	4,000,000
間接経費	3,000,000	0	1,800,000	1,200,000
合計	13,000,000	0	7,800,000	5,200,000

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	6,000,000	0	6,000,000	1,068,654	4,931,346
間接経費	0	1,800,000	0	1,800,000	0	1,800,000
合計	0	7,800,000	0	7,800,000	1,068,654	6,731,346

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	1,068,654	サーマルサイクラー、実験試薬等
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	0	
直接経費計	1,068,654	
間接経費計	0	
合計	1,068,654	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
				0		
				0		
				0		