

**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23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	細胞内Mg ²⁺ 制御の分子実体解明とがん悪性化シグナル
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・微生物病研究所・教授
氏名	三木 裕明

1. 当該年度の研究目的

本研究では、がん転移を促す因子 PRL の新規結合蛋白質として見つけた MagEx の機能解析を行う。特に平成23年度においては、(1) MagEx 蛋白質自身が Mg²⁺排出に機能することを示す、(2) Mg²⁺から mTOR 活性制御に至るシグナル伝達カスケードを明らかにする、(3) PRL/MagEx の増殖・運動性などにおける重要性を培養細胞レベルにおいて明らかにする、(4) MagEx 遺伝子ノックアウトマウスを作成する、(5) 線虫における PRL、MagEx 相同分子の発現部位の特定およびそれぞれの遺伝子変異体線虫を得る、を具体的な課題として実験に取り組むこととしていた。これらの課題を実施することにより、MagEx が Mg²⁺排出を行う分子実体であることを明らかにする。一方、細胞内 Mg²⁺がいかにして mTOR シグナル伝達カスケードを作動させるのか、PRL/MagEx がそれをどのように制御しているのか明らかにする。さらに、PRL の高発現ががん転移を引き起こす仕組みについて細胞、個体レベルにおいて明らかにする。最後に個体レベルでの MagEx の役割を明らかにするために、マウスや線虫での遺伝子改変体、変異体を得て、次年度以降の解析につなげる。

2. 研究の実施状況

上記の項目1-5に関して項目別に記す。(1) MagEx の Mg²⁺排出に関して精製蛋白質とリポソームを用いた in vitro アッセイを試行していたが、現状では実験系がうまく動いていない。その代理として電気生理実験を行うことで、MagEx 発現細胞が確かに Mg²⁺を通していることを実験的に確認できた。(2、3) 転移能の高い PRL 安定発現 B16 メラノーマ細胞の挙動を調べたところ、通常の培養条件下では増殖等に特に違いは見られず、増殖関連シグナル伝達にも特に変化はなかった。しかし、低酸素状態で培養するとコントロール細胞では速やかに mTOR シグナルが減弱するのに対し、PRL 発現細胞では mTOR 活性が維持されていた。mTOR シグナルへの影響をさらに解析したところ、mTOR の上流で機能することが知られる Akt の関与が明らかになった。さらにイメージング解析から、MagEx 発現により膜脂質 PIP₃ が減少することを示唆する結果も得ている。(4) MagEx の遺伝子ノックアウトマウスの作製に関しては、MagEx2 と MagEx4 に関して完了している。MagEx1 と MagEx3 についてもキメラマウス作製までは完了している。(5) 線虫での CePRL および CeMagEx の発現に関してレポーター解析を行い、それぞれ特定の神経細胞や腸組織等での特異的な発現を確認した。また、CePRL、CeMagEx2、CeMagEx3 の遺伝子変異体をそれぞれ単離している。特に、CePRL 変異体では細胞内膜系に異常が起こることを確認した。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計6件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計4件 Morinaka A, Yamada M, Itofusa R, Funato Y, Yoshimura Y, Nakamura F, Yoshimura T, Kaibuchi K, Goshima Y, Hoshino M, Kamiguchi H, Miki H. Thioredoxin Mediates Oxidation-Dependent Phosphorylation of CRMP2 and Growth Cone Collapse. <i>Science Signal</i>. 2011, 4(170):ra26. Morinaka A, Funato Y, Uesugi K, Miki H. Oligomeric peroxiredoxin-I is an essential intermediate for p53 to activate MST1 kinase and apoptosis. <i>Oncogene</i>. 2011, 30(40):4208-4218. Yoshimura Y, Miki H. Dynamic regulation of GEF-H1 localization at microtubules by Par1b/MARK2. <i>Biochem Biophys Res Commun</i>. 2011, 408(2):322-328. Miki H, Funato Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. <i>J Biochem</i>. 2012, 151(3):255-261.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計2件 三木裕明. チオレドキシンによる CRMP2 の酸化依存性リン酸化と成長円錐崩壊. 実験医学. 2011, 29(14):2267-2270 三木裕明. 可逆的なタンパク質酸化によるシグナル伝達制御. 細胞工学. 2012, 31(2):160-164.</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計3件</p>	<p>専門家向け 計3件 三木裕明. 活性酸素による蛋白質酸化とシグナル伝達. 小樽. 2011年7月9日. レドックスフォーラム講演会 三木裕明. マグネシウムとがん転移. 吹田. 2011年9月15日. 大阪大学蛋白質研究所コロキウム 三木裕明. セマフォリン刺激応答における過酸化水素産生と蛋白質酸化. 京都. 2011年9月24日. 第84会日本生化学会大会フォーラム</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計1件</p>	<p>岡田雅人, 三木裕明, 宮崎香(編集). タンパク質実験ノート. 羊土社. 2011年. 全211ページ</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next 大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>タンパク質のジスルフィド結合形成によるシグナル伝達の制御. 2011年11月14日. 千里ライフサイエンスセンタービル. 一般の聴衆(約100人)向け講演を行い、本事業で行っている研究内容について説明し討論した。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計1件</p>	<p>阪大の三木教授、がん転移促進因子であるPRLの分子機能を解明. 日経バイオテク ONLINE. https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20111121/158003/</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	113,000,000	37,500,000	10,000,000	65,500,000	0
間接経費	33,900,000	11,250,000	3,000,000	19,650,000	0
合計	146,900,000	48,750,000	13,000,000	85,150,000	0

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	当該年度返還 額
直接経費	37,100,000	10,000,000	0	47,100,000	47,100,000	0	0
間接経費	11,250,000	3,000,000	0	14,250,000	7,651,157	6,598,843	0
合計	48,350,000	13,000,000	0	61,350,000	54,751,157	6,598,843	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	27,749,132	共焦点レーザー走査型顕微鏡、全反射蛍光顕微鏡等
旅費	121,920	情報収集(北海道大学)
謝金・人件費等	10,410,195	特任研究員人件費、派遣料金
その他	8,818,753	マウス作製等
直接経費計	47,100,000	
間接経費計	7,651,157	
合計	54,751,157	

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
共焦点レーザー走査 型顕微鏡	オリンパス・ FV1000-D ALL LDセット BX61組合 せ	1	11,928,000	11,928,000	H23.11.18	大阪大学
全反射蛍光顕微鏡	オリンパス・IX2- RFAEVAW	1	6,972,000	6,972,000	H24.3.2	大阪大学