

課題番号	LS128
------	-------

**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	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

本研究プログラムの目的は、微小管細胞骨格の配置制御に関わる「微小管捕捉因子」に依存して新規なメカニズムで輸送、分泌され、個体や組織の形態形成や恒常性の維持に重要に寄与する因子の探索と解析を行い、基礎生物学へ新知見を加えると共に医学・創薬に貢献することである。

今年度には、前年度までに細胞生物学的手法を用いて見出してきた、生命活動の維持に重要な因子の新規分泌メカニズム(下記)に関して、その生物学的重要性を確認するため、臓器特異的な機能の解析や動物レベルでの検証を進めて、創薬等における実用化の可能性を検討、成果発表を行う。

2. 研究の実施状況

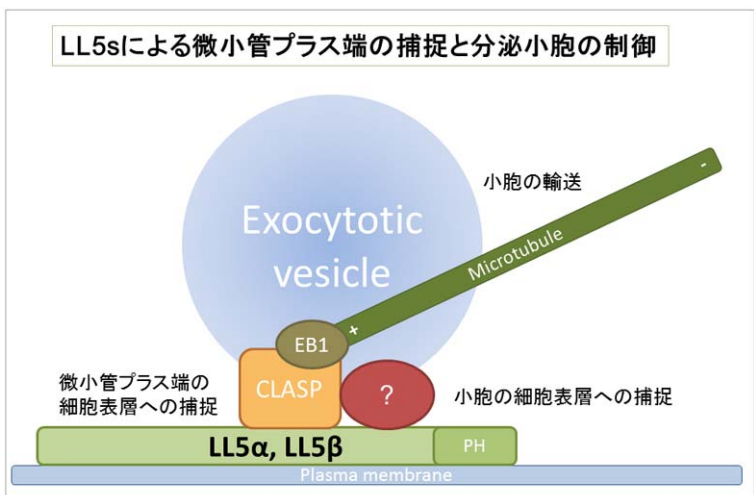
研究の背景と計画

生物の体の形成を制御したり恒常性を維持したりするためには、個々の細胞で合成、分泌されて体内を循環する、ホルモン等の生理活性物質が重要な役割を果たす。微小管細胞骨格は細胞内物質輸送のレールであるため、微小管の制御は分泌因子の細胞内輸送から細胞外放出に至るプロセスの中で重要や役割を果たしていると予測されるが、微小管制御因子と分泌制御の関連は調べられていない。本研究課題では、申請者が「微小管プラス端捕捉因子」として同定してきた分子群(LL5 や APC 癌抑制因子など)が生理活性物質の分泌プロセスに関与する可能性を仮定し、微小管プラス端捕捉因子依存性分泌因子の生化学的な同定と解析を行い、ヒト疾患治療等における利用の可能性が認められる知見が得られれば実用化を進めることを目指している。また、本研究課題に関連して、同定した因子の作用を個体や組織の中でイメージング技術を利用して解析するために、組織内部の微細構造観察のための光学顕微鏡開発を平行して行っている。

微小管プラス端捕捉因子依存性分泌因子の探索と解析

前々年度までに、実験ツールの準備と設備の導入を行い、前年度には、LL5 ノックダウン HeLa 細胞が分泌する因子を解析し、脊椎動物の恒常性維持に非常に重要なタンパク質分子(まだ特許出願の検討を終了していないため、念のためここでは具体名を記載しない)の分泌が特異的に減少していることを見出し

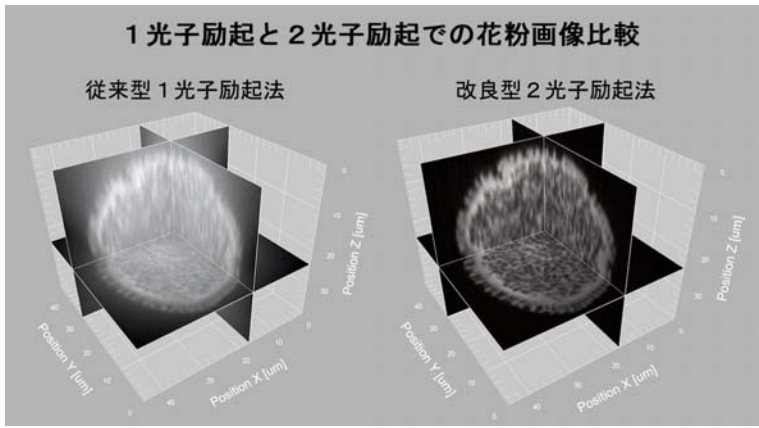
た。全反射顕微鏡を用いてこの分子と LL5 の関係を調べると、LL5 が分泌のためのスキヤッフオールドとして機能していることが明らかになり、このプロセスに関係する分子群を特定することができた(右図)。この分泌タンパク質にはファミリー分子があり、それぞれ臓器特異的な機能を持ち、これらの機能不全がヒトの疾患の原因となっていることが知られている。そこで今年度には、LL5 によるこのファミリー分子の臓器特異的な分泌制御機構を培養細胞で詳しく調べた後、モデル動物での検証を進め、ヒト疾患治療への LL5 関連経路の制御の利用の可能性を検討(ライセンス化検討)、論文発表する。



また、APC 癌抑制因子ノックダウン細胞では、分泌因子の大きな変動が予備的に観察されているので、このメカニズムを詳しく調べる。これまでに、ZFN テクノロジーを用いて APC 遺伝子をノックアウトしたヒト由来上皮細胞株や、癌抑制機能を有する最小領域のみを含む APC 変異体を発現する APC 変異マウスを入手し、実験準備を進めてきた。今年度には、これらのツールを利用して分子機能解析を進める。

組織内部の微細構造観察のための光学顕微鏡開発

近年の細胞生物学の発展はイメージング技術の進歩に依るところが大きく、本人の研究も高精細イメージング技術を活用して新しいタイプの微小管制御因子の発見やその機能解析を進めてきた。今後これまでの培養細胞レベルでの研究を in vivo での研究に発展させて生物学的重要性の検証を進めていく際にも、分子動態を直接可視化する技術は重要なツールである。しかし現状、個体や組織のような厚みがあるサンプルの内部を高精細にライブ・イメージングできる手段は無い。培養細胞のような薄いサンプルの観察においては、横河電機㈱の CSU™ を利用したスピニングディスク共焦点顕微鏡による高速・高精細イメージングが現在最も優れた手法の一つである。スピニングディスク共焦点顕微鏡は多点スキャンを行うことで高速化を可能とした手法であるが、多点を同時に励起すると各励起点で発生して広がった蛍光が周囲のピンホールに混入して共焦点性を失わせるため(pinhole cross-talk 現象)、多量の背景光を発する厚みがあるサンプルの内部観察への適用は困難である。そこで、メーカーとの共同で、pinhole cross-talk を低減する設計とした新たな仕様の CSU を用い、2 光子励起法を導入することで非焦点面での蛍光発生を根本的に抑えることで pinhole cross-talk を防ぐ装置を開発し、従来のスピニングディスク共焦点顕微鏡では観察できなかった生物個体内部の微細構造の高速イメージングを可能とすることを確認した(右図)。この研究開発の結果は 2012 年度に学会発表を行い、論文投稿中である。



3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計1件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計1件 1. <u>Mimori-Kiyosue Y.</u> “Shaping microtubules into diverse patterns: molecular connections for setting up both ends” Cytoskeleton (Hoboken). 2011 Nov;68(11): 603-18. doi: 10.1002/cm.20540. Epub 2011 Oct 26. Review. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021191 (掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計2件</p>	<p>専門家向け 計2件 1. ポスター発表 : <u>Yuko Mimori-Kiyosue</u>, Togo Shimozawa, Satoko Nakamura “Dissecting biological function of EB1 family and Dis1/TOG/XMAP215 family proteins in interphase HeLa cells” 2011 American Society for Cell Biology Annual Meeting, Dec 3-7, 2011, Denver, Colorado, USA. 2. 会議の企画ならびに口演 : <u>Yuko Mimori-Kiyosue</u>, Satoko Nakamura “Microtubule patterning in cells: controlling at the plus end” 理研 CDB-QBiC ジョイントシンポジウム『Toward innovation in Developmental Cell Biology: The Impact of Emerging Technologies』 2011年6月30日-7月1日, 理研 CDB, 神戸. 一般向け 計0件</p>
<p>図書 計2件</p>	<p>会議抄録集 1. 会議発表 1 : 2011 American Society for Cell Biology Annual Meeting プログラム, 2011, 248 page. 2. 会議発表 2 : 理研 CDB-QBiC ジョイントシンポジウム『Toward innovation in Developmental Cell Biology: The Impact of Emerging Technologies』抄録集, 2011, 61 page.</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>1. NEXT プログラム『微小管細胞骨格と形態形成』ウェブサイト : http://www.cdb.riken.jp/oia/home_en.html 2. 細胞生物学会ホームページ : http://www.jscb.gr.jp/glossary/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1. 平成 24 年度に開催の研究所の所内公開で公開予定。 2. 細胞生物学会が、学会内外に情報発信し一般の来訪者を獲得するために学会ホームページにプロトコル集や用語集の掲載を開始したことを受け、関連記事を掲載している (Web ページ 2)。</p>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載計〇件	
その他	

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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	10,000,000	6,000,000	0	4,000,000	0
間接経費	3,000,000	1,800,000	0	1,200,000	0
合計	13,000,000	7,800,000		5,200,000	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	4,931,346	0	0	4,931,346	4,931,346	0	0
間接経費	1,800,000	0	0	1,800,000	1,800,000	0	0
合計	6,731,346	0	0	6,731,346	6,731,346	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	4,628,706	細胞培養試薬、電気泳動関連試薬、抗体など
旅費	302,640	学会参加費
謝金・人件費等	0	
その他	0	
直接経費計	4,931,346	
間接経費計	1,800,000	
合計	6,731,346	

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
トミー精工 微量高 速冷却遠心機	MX-305	1	740,460	740,460	23. 4.28	独立行政法人理 化学研究所
				0		
				0		