

課題番号	LS138
------	-------

**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 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	循環器システムを司る分子実体の解明
研究機関・ 部局・職名	独立行政法人理化学研究所 生命システム研究センター・循環器分子動態研究 ユニット・研究ユニットリーダー
氏名	川原 敦雄

1. 当該年度の研究目的

循環器システムは、心臓と血管網で構成される生命活動を支える重要な器官である。本研究は、循環器システムの構築を制御する分子の実体解明とその分子機能を明らかにすることを目的とする。我々が作製した循環器系に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の機能解析から、循環器制御因子の同定を試みる。我々は、二股心臓の表現型を示す変異体の機能解析から、新規膜分子 Spns2 がスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の輸送体として機能していることを明らかにしている。本年度は、Spns2 変異体を用いたマイクロアレイ解析から心機能不全の過程で特異的に発現が変動する遺伝子を検索する。さらに、人工ヌクレアーゼを用いた効率的な遺伝子改変ゼブラフィッシュの作製技術を開発し、S1P 関連分子や循環器制御因子を破壊したゼブラフィッシュを作製し、それらの in vivo 解析から循環器系における分子機能を明らかにする。

2. 研究の実施状況

本研究は、循環器系に異常を示すゼブラフィッシュ変異体を活用し、循環器システムの形成機構を分子レベルで解明することを目的としている。平成 24 年度は、以下の研究結果が得られた。

- 1) 心臓発生に異常を示す ko063 変異体のゲノムマッピングにより titin 分子に変異を見出した。titin は、心臓の筋原繊維の構成分子であるので、その機能異常が心臓浮腫の原因と考えられた。
- 2) S1P 輸送体に異常を示す Spns2 変異体において発現が変動する遺伝子をマイクロアレイ法で調べた結果、転写因子 nkx2.3 や endothelin 受容体(ednra)の発現が抑制されていることが分かった。我々は、これまでに S1P シグナルが接着因子 fibronectin と協調的に機能し心臓や顎の形態形成を制御していることを明らかにしているが、今年度は、さらに、Spns2-S1PR2 シグナルの標的遺伝子である ednra が fibronectin と協調的に心臓発生に寄与することを明らかにした。
- 3) 人工ヌクレアーゼ TALEN (transcription activator-like effector nuclease)を用いた効率的な遺伝子改変ゼブラフィッシュの作製技術を開発し、全ての S1P 受容体(S1PRs)を破壊したゼブラフィッシュ変異体を作製した。我々が作製した S1PR2 変異体がこれまでに報告されている二股心臓の表現型を示したことから、我々の遺伝子改変ゼブラフィッシュの作製技術が機能していることが分かった。
- 4) 心臓・血管発生の可視化システムを用いて、形態・機能異常を指標に循環器系の発生過程に影響を与える低分子化合物を検索した。リン酸化酵素や脱リン酸化酵素の阻害剤として知られる低分子化合物が心臓の拍動異常や節間血管の形成異常などを誘導することが明らかとなった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件 Kawahara A., Endo S., Dawid I.B. Vap (Vascular Associated Protein): a novel factor involved in erythropoiesis and angiogenesis Biochem. Biophys. Res. Commun. 421, 367-374 (2012) Hisano Y., Nishi T., Kawahara A. The functional roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) in immunity J. Biochem. 152, 305-311 (2012) Sakuma T., Hosoi S., Woltjen K., Suzuki K., Kashiwagi K., Wada H., Ochiai H., Miyamoto T., Kawai N., Sasakura Y., Matsuura S., Okada Y., Kawahara A., Hayashi S., Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications Genes to Cells 18, 315-326 (2013) Hisano Y., Ota S., Arakawa K., Muraki M., Kono N., Oshita K., Sakuma T., Tomita M., Yamamoto T., Okada Y., Kawahara A. Quantitative assay for TALEN activity at endogenous genomic loci Biology Open 12, 363-367 (2013) (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 1 件 Ota S., Hisano Y., Muraki M., Hoshijima K., Dahlem T.J., Grunwald D.J., Okada Y., Kawahara A. Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays Genes to Cells in press (2013)</p>
<p>会議発表 計 4 件</p>	<p>専門家向け 計 3 件 脂質マシナリー国際シンポジウム (福岡県福岡市, 6/6-7, 2012) Atsuo Kawahara: Functional roles of sphingosine-1-phosphate during early embryogenesis 日本分子生物学会ワークショップ (福岡県福岡市, 12/11-14, 2012) 川原敦雄: TALEN を活用した遺伝子改変ゼブラフィッシュの作成技術の開発 国際高等研究所 研究プロジェクト (京都府木津川市, 2/22-23, 2013) Atsuo Kawahara: Quantitative detection of TALEN-mediated genome modifications in zebrafish 一般向け 計 1 件 兵庫県高等学校教育研究会生物部会 (兵庫県神戸市, 12/6, 2012) 川原敦雄: モデル生物・ゼブラフィッシュを用いた生命科学研究</p>
<p>図書 計 0 件</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>http://www.riken.jp/research/labs/qbic/cardiovasc_mol_dyn/</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>2012年10月20日:理化学研究所一般公開において、ゼブラフィッシュ胚の血球や血管の発生過程を来場者に見せる形で、研究内容の紹介を行った。 2012年12月6日:兵庫県高等学校教育研究会において、高校の教職員の方に研究紹介を行うとともに研究内容への質問に答える形で議論や交流を行った。 理化学研究所のホームページを通じて、研究内容に関する情報発信を行っている</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計 1 件</p>	<p>日経バイオテックの取材を受け、「人工ヌクレアーゼでゲノム編集」という特集で我々の研究の取り組みが紹介された(2012年11月5日発行:日経バイオテック)。</p>
<p>その他</p>	

様式19 別紙1

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24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	114,000,000	42,000,000	42,000,000	30,000,000	0
間接経費	34,200,000	12,600,000	12,600,000	9,000,000	0
合計	148,200,000	54,600,000	54,600,000	39,000,000	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	5,954,531	42,000,000	0	47,954,531	46,651,305	1,303,226	0
間接経費	0	12,600,000	0	12,600,000	12,600,000	0	0
合計	5,954,531	54,600,000	0	60,554,531	59,251,305	1,303,226	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,279,198	共焦点レーザ走査装置、微量高速冷却遠心機等
旅費	1,327,800	海外渡航費、出張費等
謝金・人件費等	20,580,305	研究員3名人件費、パートタイマー4名人件費等
その他	1,464,002	DNA解析料、論文別刷り料、学会参加費等
直接経費計	46,651,305	
間接経費計	12,600,000	
合計	59,251,305	

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
共焦点レーザ走査 装置	オリンパスメディカ ルサイエンス販売機	1	11,980,500	11,980,500	2013/2/28	QBic 川原ラボ