

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) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されません

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	10,000,000	10,000,000	0	10,000,000	10,000,000	0	0
間接経費	3,000,000	3,000,000	0	3,000,000	3,000,000	0	0
合計	13,000,000	13,000,000	0	13,000,000	13,000,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	1,068,654	4,628,706	3,388,294	0	9,085,654
旅費	0	302,640	297,250	0	599,890
謝金・人件費等	0	0	0	0	0
その他	0	0	314,456	0	314,456
直接経費計	1,068,654	4,931,346	4,000,000	0	10,000,000
間接経費計	0	1,800,000	1,200,000	0	3,000,000
合計	1,068,654	6,731,346	5,200,000	0	13,000,000

4. 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		

5. 研究成果の概要

本研究課題では、生物の形態形成や恒常性維持に必須な細胞内基盤構造である“微小管”細胞骨格の配置制御に関わる分子群、“微小管プラス端集積因子(+TIPs)”(発表論文1)の、個体レベルでの生物学的な新規役割の解明を目指している。微小管はモータータンパク質による極性輸送のレールとして機能している。そこで、このレールの配置の制御は重要な生理活性物質の輸送や分泌に関与していると仮定し、+TIPsに依存的な被輸送物質の特定と輸送制御の分子機構の解析を行い、さらに、見出した新規物質輸送機構の解析をモデル動物で行う準備を進めている。また平行して、微小管のような微細構造を生物個体や組織の内部で観察するための基盤技術開発を行っている。

24年度までに、本プログラムの途中段階の主な成果として、①微小管プラス端を細胞表層に繋ぎ止めるための新規機構(発表論文2)について、ならびに②in vivoイメージングのための顕微鏡開発(発表論文3)について、論文発表を完了し、プレス発表を行った。①では、最新の超解像顕微鏡法を用いて、+TIPsの局在を25ナノメートル分解能で解析し、微小管最先端部に存在する新しい構造領域の発見につなげた。②では、スピニングディスク顕微鏡法に二光子励起法を適用して、既存の技術では困難であった生物内部の高速・高精度イメージングを達成し、現在、実用化・製品化に向けた取り組みが進められている。これまでの進捗に引き続き、+TIPs依存的物質輸送に関する論文公表の準備を進めている。

<発表論文>

1. Mimori-Kiyosue Y. "Shaping microtubules into diverse patterns: molecular connections for setting up both ends" Cytoskeleton. 68: 603-618, 2011. doi: 10.1002/cm.20540.

2. Nakamura S, Grigoriev I, Nogi T, Hamaji T, Cassimeris L, Mimori-Kiyosue Y. "Dissecting the nanoscale distributions and functions of microtubule-end-binding proteins EB1 and ch-TOG in interphase HeLa cells" PLoS ONE. 7: e51442, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0051442.

3. Shimozawa T, Yamagata K, Kondo T, Hayashi S, Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F, Takayama J, Onami S, Nakayama H, Kosugi Y, Watanabe TM, Fujita K, Mimori-Kiyosue Y. "Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging" Proc Natl Acad Sci U S A. 110: 3399-3404, 2013. doi: 10.1073/pnas.1216696110.

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) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	形態形成における微小管細胞骨格の役割の解析
	Analysis of Microtubule Function in Morphogenesis
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	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
	Unit Leader, Optical Image Analysis Unit, Center for Developmental Biology, RIKEN
氏名 (下段英語表記)	清末 優子
	Yuko Mimori-Kiyosue

研究成果の概要

(和文): 「細胞骨格」は、生物を形づくる単位「細胞」の形態制御や機能維持に必須な基盤構造体である。本研究課題では、物質輸送のレールである「微小管」細胞骨格の配置を制御する分子群、“微小管プラス端集積因子(+TIPs)”の、発生や生命維持における役割を解明する。微小管の先端が物質輸送のターミナルであると仮定して、+TIPs に依存的な被輸送物質の探索と解析を行い、細胞間コミュニケーションに重要な細胞外シグナル分子の輸送への関与を明らかにした。ヒトの病気に関わる分子に関しては創薬等への実利用をめざした努力を継続している。また平行して、個体や組織内部にある細胞の微細構造の高速・高精細イメージングを可能とするための新しい顕微鏡の開発を行い、実用化に向けた取り組みにつなげた。

(英文): "Cytoskeleton" is the infrastructure which is indispensable to morphogenesis and functioning of a cell, a unit of organisms. This research project is aimed to clarify the developmental and vital function of “microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs)” regulating the organization of microtubule networks, which serve as rails for intracellular trafficking. We hypothesized that the microtubule plus ends act as terminals of intracellular trafficking and searched and analyzed the +TIPs-dependent cargos. We found its involvement in trafficking of extracellular signaling molecules, key

factors for intercellular communication. We are continuing efforts to put our findings to practical use such as drug development. In addition, we developed a new microscope that enables high-speed and high-resolution live imaging of fine structures inside of animals and organs, and connected it with an action for the practical use.

1. 執行金額 13,000,000 円
(うち、直接経費 10,000,000 円、 間接経費 3,000,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年3月31日

3. 研究目的

細胞内輸送を司るモータータンパク質は微小管の“向き”を感知し、生命活動を担う物質を正しい方向に運ぶ。従って微小管の適切な配置は生命維持のために重要なタスクである。これを担う分子機構の解明を目指して本研究者は先行研究において、微小管プラス端の挙動を制御する分子を探索し、“微小管プラス端集積因子(+TIPs)”を見出してきた。引き続き(1)+TIPs が微小管配置を調節する新規メカニズムを解明し、さらに、(2)+TIPs 依存的に輸送される物質を見出しその個体活動への影響を明らかにすることで、+TIPsによる微小管制御の生物学的意義を解明することを目指した。特定しようとする物質は、生物の発生や病気に関わる重要な物質である可能性がある期待されることから、創薬などへの実利用を念頭に進めた。一方で、細胞骨格のような微細構造の挙動を個体や組織などの厚みがある試料の内部で観察することは、既存の技術では困難であったことから、(3)深部の高速・高精細イメージングを可能とするための技術開発を並行して行った。開発した技術は実用化され広く普及されることを目指した。

4. 研究計画・方法

(1)微小管プラス端を制御する新規分子機構の解析

微小管プラス端に作用する分子の分布を、最新の超解像顕微鏡と画像解析技術を利用して、従来の光学顕微鏡の分解能を超えた 100 ナノメートル以上の分解能で解析を行う。さらに、ライブイメージングによる直接可視化を重視した細胞生物学手法による分子機能解析を行う。

(2)+TIPs 依存的物質輸送の解析

+TIPs 依存的に輸送される分子の特定とその役割の解明のため、培養細胞を用いた細胞生物学解析とモデル生物(主にマウス)の表現型解析の双方向からの解析を行う。培養系では、各種顕微鏡技術を駆使しながら細胞生物学手法による分子機能解析を行い、マウスの解析では発生過程や行動、形態などの解析から原因となる臓器や細胞種を特定した後、培養系や再構成系に

において詳しい分子機構解析を行う。

(3) In vivo 高精細イメージングのための顕微鏡開発

近年の細胞生物学では、多点走査方式の採用により高速共焦点イメージングを可能としたスピニングディスク型共焦点顕微鏡の有用性が広く認知されている。しかし従来のモデルでは、厚みがある試料では、非焦点面で発生する背景光の混入(“ピンホール・クロストーク”)により共焦点像を得ることが困難であるため、背景光の発生と混入を根本的に抑えることにより厚みがある試料への適用が可能な新型スピニングディスク型共焦点顕微鏡を構築する。

5. 研究成果・波及効果

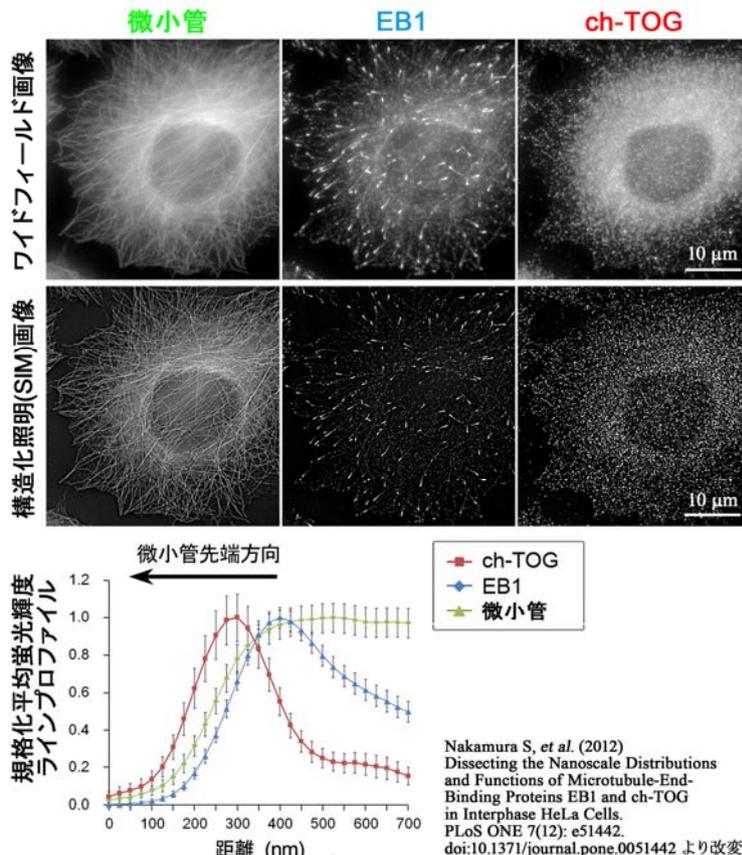
(1) 微小管プラス端を制御する新規分子機構の解析

微小管先端に作用しその動態を制御する End-Binding 1 (EB1) と推定癌遺伝子 colonic-hepatic tumour-overexpressed gene (ch-TOG) の局在を 25 ナノメートル分解能で解析し(図1)、微小管の最先端部 100 ナノメートルの領域を住み分けることで微小管に対して異なる作用を及ぼすことを明らかにした。この結果は同時に、これまでに検出されることがない微小管先端の 100 ナノメートルに及ぶ新しい構造

領域の存在を明らかにした。これらの結果については論文発表、プレス発表を完了している。他の+TIPs および微小管最先端部 100 ナノメートル部分の性状の解析については論文発表を準備中である。

微小管ダイナミクスは細胞の増殖に必須であるため抗癌剤の標的のひとつとして確立されている。微小管の新たな構造領域は適正な微小管動態に必要であることが明らかになったことから、抗癌剤の新しい標的として新規化合物の開発に用いられる可能性があり、また、得られた知見は抗癌剤の作用機序解析に役立つと期待される。

【図1 超解像顕微鏡法を用いて観察した+TIPsの局在】



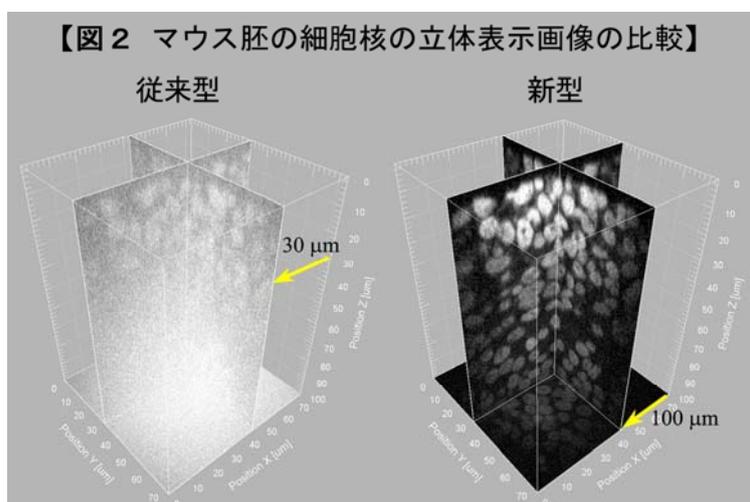
(2)+TIPs 依存的物質輸送の解析

本研究者が微小管プラス端捕捉因子として解析を行ってきた LL5 と APC 癌抑制因子に関する解析から開始した。LL5 はアポリポタンパク質ファミリー分子などを含む輸送小胞と結合し、その細胞外への放出に関与した。この分子機構の個体レベルでのインパクトを明らかにするためにはマウスモデルを用いた解析を行う必要がある。APC 癌抑制因子については、これが培養細胞系において物質輸送に複雑に影響し得ることを観察したが、個体において重要な働きを持つ分子を特定するため、マウスモデルの表現型の解析からのアプローチも行った。APC が微小管結合能を喪失している変異マウスでは、初期発生での問題に起因する形態異常や、細胞外シグナル分子の分布に異常が認められた。これらの結果から、微小管プラス端は生物の発生や病気に関わる重要な物質の輸送に関与していることが確かめられ、生命機能に重要な分子の新規な輸送機構が見出された。これらの結果は論文発表の準備中である。

本課題での発見がヒトの治療や創薬に応用できるか否かはマウスとヒトとの間の相関を検証する必要があるが、創薬プログラムに参画するなどして実利用を目指した活動を継続している。

(3)In vivo 高精細イメージングのための顕微鏡開発

厚みがある試料内部で微小管のような微細な構造のイメージングを可能とするため、従来のスピニングディスク型共焦点顕微鏡法の問題であった“ピンホール・クロストーク”問題を解消した新しい顕微鏡を開発した。背景光の発生を抑制できる“二光子励起法”を適用し、スピニングディスクを改良して新型顕微鏡を構築、GFP 融合タンパク質を発現するマウスやショウジョウバエなど各種モデル生物を用いて有効性を検証した。その結果、解像度と撮影速度において、既存の顕微鏡法に比べて格段の改善があることを確認し(図2)、既存の技術では観察できなかった数十ミクロン深部での微小管伸長を可視化することに成功した。ただし現在入手可能なレーザーの出力では観察できる範囲と深さが不十分であった。これらの結果は論文報告、プレス発表を完了している。



現在、高出力レーザーの開発を含めて実用化の取り組みが進められており、近い将来に広く普及できると期待される。この装置は、基礎研究において利用されるのみならず、ヒトから摘出した組織内部の癌細胞などの異常細胞を高速にくまなく探したり、移植した細胞の内部活動を検出したりするなど、医療を含む広いライフサイエンス分野で有用であると期待される。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文</p> <p>計5件</p>	<p>(掲載済み－査読有り) 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Shimozawa T, Yamagata K, Kondo T, Hayashi S, Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F, Takayama J, Onami S, Nakayama H, Kosugi Y, Watanabe T.M, Fujita K, Mimori-Kiyosue Y. “Improving spinning disc confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging” <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2013 Feb 26;110(9):3399-404. doi: 10.1073/pnas.1216696110. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401517 *プレス発表 (大阪大学と共同発表) 2. Nakamura S, Grigoriev I, Nogi T, Hamaji T, Cassimeris L, Mimori-Kiyosue Y. “Dissecting the Nanoscale Distributions and Functions of Microtubule-End-Binding Proteins EB1 and ch-TOG in Interphase HeLa Cells” <i>PLOS ONE.</i> 2012;7(12):e51442. doi: 10.1371/journal.pone.0051442. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251535 *プレス発表 3. Tran LD, Hino H, Quach H, Lim S, Shindo A, Mimori-Kiyosue Y, Mione M, Ueno N, Winkler C, Hibi M, Sampath K. “Dynamic microtubules at the vegetal cortex predict the embryonic axis in zebrafish” <i>Development.</i> 2012 Oct;139(19):3644-52. doi: 10.1242/dev.082362. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949618 4. Mimori-Kiyosue Y. “Shaping microtubules into diverse patterns: molecular connections for setting up both ends” <i>Cytoskeleton (Hoboken).</i> 2011 Nov;68(11): 603-18. doi: 10.1002/cm.20540. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021191 5. Kosodo Y, Suetsugu T, Suda M, Mimori-Kiyosue Y, 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.” <i>EMBO J.</i> 2011, 30, 1690-704. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441895 <p>(掲載済み－査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表</p> <p>計3件</p>	<p>専門家向け 計4件</p> <p>【研究発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Satoko Nakamura, Ilya Grigoriev, Tomoko Hamaji, Lynne Cassimeris, Yuko Mimori-Kiyosue “Dissecting the nanoscale distributions and functions of microtubule-end-binding proteins EB1 and ch-TOG in interphase HeLa cells”

<p>計1件</p>	<p>American Society for Cell Biology Annual Meeting, Dec 15-19, 2012, San Francisco, USA.</p> <p>2. Togo Shimozawa, Kazuo Yamagata, Hiroshi Nakayama, Yasuhito Kosugi, Yuko Mimori-Kiyosue “Improving spinning disc confocal microscopy using two-photon excitation for live imaging of GFP-transgenic animals” ワークショップ『High-technology and Bioimaging』第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会, 2012年5月28-31日, 神戸.</p> <p>3. Yuko Mimori-Kiyosue, Togo Shimozawa, Satoko Nakamura “Dissecting biological function of EB1 family and Dis1/TOG/XMAP215 family proteins in interphase HeLa cells” American Society for Cell Biology Annual Meeting, Dec 3-7, 2011, Denver, Colorado, USA.</p> <p>【会議の企画ならびに口演】</p> <p>4. シンポジウムの企画：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. (国内演者15名、海外招待演者7名による国際シンポジウム) 口演：Yuko Mimori-Kiyosue, Satoko Nakamura “Microtubule patterning in cells: controlling at the plus end”</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計4件</p>	<p>【会議抄録集】</p> <p>1. 会議発表1：第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会抄録集, 2012, 335 page.</p> <p>2. 会議発表2：2012 American Society for Cell Biology Annual Meeting プログラム, 2012, 280 page.</p> <p>3. 会議発表3：2011 American Society for Cell Biology Annual Meeting プログラム, 2011, 248 page.</p> <p>4. 会議発表4：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>【研究内容紹介ウェブサイト】</p> <p>■ 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</p> <p>■ 細胞生物学会ホームページ (研究領域の一般向け紹介) http://www.jscb.gr.jp/glossary/</p>

	<p>【研究成果プレスリリース】</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 理化学研究所 HP / 広報活動 / プレスリリース (研究成果) 2012年12月13日 「細胞の維持に必須な微小管の最先端構造が明らかに —光学顕微鏡の限界を超えたイメージング技術でとらえた新たな構造—」 http://www.riken.jp/pr/press/2012/20121213/ ■ 理化学研究所 HP / 広報活動 / プレスリリース (研究成果) 2013年2月12日 「生物内部を高速・高精細にイメージングが可能に —多点共焦点顕微鏡法を二光子励起法の適用で生体観察向けに改良—」 http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130212_1/ ■ 大阪大学 HP / 最新情報 / 研究成果リリース 2013年2月12日 「生物内部を高速・高精細にイメージングが可能に —多点共焦点顕微鏡法を二光子励起法の適用で生体観察向けに改良—」 http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/02/20130212_1 <p>【YouTube 理研チャンネルへの研究関連動画の掲載】</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Rikenchannel “Timelapse movie of EB1-GFP in a living myoblast cell” https://www.youtube.com/watch?v=Fplo6wRbkAM ■ Rikenchannel “Timelapse movie of EB1-GFP in living fibroblasts” https://www.youtube.com/watch?v=vNhFKKeYpic <p>【理研 発生・再生科学総合研究センターHP / ニュース】</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Recent News, 2012年12月28日 「超解像顕微鏡で明らかになった微小管の最先端構造」 http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/12/121228_eb1chtog.html ■ Recent News, 2013年2月25日 「生体試料深部の高速・高精細なイメージングを可能に」 http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/13/130225_sdcmicroscopy.html
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 理化学研究所 神戸研究所「一般公開」における展示 表題：光る！動く！蛍光イメージングの世界。最先端の技術がつまった、最新の顕微鏡をご紹介します。「最先端・次世代研究開発プログラム」公開企画 実施日：2012年10月20日、理研神戸研究所 発生・再生科学総合研究センター内 対象者：一般 参加者数：1530名（神戸研究所来場者総数として） 内容：本プログラム課題を紹介するポスター展示、細胞内動態を可視化したムービーの上映、関連資料の配布、GFP融合タンパク質を発現する細胞の蛍光顕微鏡観察の解説と実演、各種先端的光学顕微鏡の見学会を実施しそれぞれの特徴や利用目的の解説を行った。 ■ 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（研究内容紹介ウェブサイト）。
<p>新聞・一般雑誌等掲載計11件</p>	<p>【新聞】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 神戸新聞 2012年12月13日（木）夕刊8面 「細胞の微小管とがん関連物質 理研が結合の仕組み解明」 2. 日経産業新聞 2013年2月13日（水）朝刊7面

	<p>「組織・細胞内部を詳細観察」</p> <p>3. 日刊工業新聞 2013年2月13日(水) 朝刊 21面 「30倍鮮明に観察」</p> <p>4. 神戸新聞 2013年2月16日(土) 朝刊 12面 「生きたまま深部を鮮明に」</p> <p>5. 読売新聞(大阪) 2013年2月18日(月) 朝刊 22面 「細胞内 精密に高速連続撮影」</p> <p>6. 化学工業日報 2013年2月21日(木) 「新イメージング装置 ―生物内部を高速・高精細描写―」</p> <p>【インターネット・ニュース】</p> <p>7. 神戸新聞 電子版 2012年12月13日(木) 09時40分 「細胞の微小管とがん関連物質 理研が結合の仕組み解明」 http://www.kobe-np.co.jp/news/iryoku/201212/0005595548.shtml</p> <p>8. マイナビニュース 2012年12月14日(金) 09時15分 「理研、「微小管」の先端に新しい構造領域とその機能を発見」 http://news.mynavi.jp/news/2012/12/14/030/index.html</p> <p>9. マイナビニュース 2013年2月12日(火) 18時40分 「理研など、厚みのある資料の高速・高精細に蛍光イメージング装置を開発」 http://news.mynavi.jp/news/2013/02/12/192/ *当サイトの複製を多数のサイトで掲載</p> <p>10. 日経新聞 電子版 2013年2月13日(水) 11時03分 「理化学研究所と阪大、生物内部を高速・高精細にイメージング可能にする装置を開発」 http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=330086&lindID=5</p> <p>【雑誌】</p> <p>11. 理化学研究所発行広報誌『理研ニュース』 2013年2月5日, p.14. 「微小管の先端構造が明らかに」</p>
<p>その他</p>	

7. その他特記事項

現時点では産業財産権出願は0件であるが、今後の進捗により出願を目指している。