

課題番号	LS020
------	-------

**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	異常膜タンパク質の小胞体局在化疾患の分子基盤の解明と創薬に向けた研究開発
研究機関・ 部局・職名	群馬大学・生体調節研究所・教授
氏名	佐藤 健

1. 当該年度の研究目的

細胞膜で機能する膜タンパク質は、まず小胞体で合成後、ゴルジ体を經由して細胞膜へと輸送される。しかしながら、遺伝子変異によって生じるある種の異常膜タンパク質は小胞体における品質管理機構にトラップされ、小胞体に蓄積するか分解除去される。そのため、機能を保持しているタンパク質でさえ細胞膜へと輸送されないため、様々な疾患の原因となる。

平成24年度はまず、これらの疾患原因膜タンパク質を発現する動物培養細胞、遺伝子改変線虫を用いた小胞体局在化関連因子の探索および解析を行う。また、これらの異常膜タンパク質の小胞体局在化に関与する因子のノックアウトマウスの作製を行い、この遺伝子破壊による異常膜タンパク質の局在変化や動物個体への影響について解析する。一方、これらの疾患原因膜タンパク質の小胞体局在化を緩和する薬剤の1次スクリーニングも完了させ、候補薬剤を探索する。このようにして様々な異常膜タンパク質の小胞体局在化疾患モデルを用いて、これらの小胞体局在化に関与する因子の同定と作用機作について解析を行い、分子機構の解明と小胞体局在化を緩和する薬剤の発見を目指す。

2. 研究の実施状況

前年度に引き続き、疾患原因膜タンパク質の小胞体局在化に関与と思われる Rer1 の解析を行った。腎尿崩症、網膜色素変性症、シャルコーマリーツース病等の疾患原因膜タンパク質のタンパク量、細胞内局在性に対する Rer1 遺伝子のノックダウンの効果を解析したところ、ある種の変異膜タンパク質がタンパク量の増加とともに細胞膜に移行することが明らかとなってきた。この変異膜タンパク質は小胞体から一部漏れ出るタイプであることから、ゴルジ体に輸送されてきた変異膜タンパク質の小胞体局在化に Rer1 が関与していると考えられる。次に、この Rer1 の動物個体における生理機能を解析するためにノックアウトマウスの作製を行った。その結果、rer1 ノックアウトマウスは発生初期に胎生致死になることが判明した。このことから、Rer1 の機能は個体発生に必須であることが明らかとなった。現在、組織特異的ノックアウトマウスを構築しており、完成後、各疾患との関連性について検討を行う予定である。一方、小胞体からほとんど輸送されないタイプの疾患原因膜タンパク質についても、酵母 two-hybrid 法によって相互作用する因子を探索した。その結果、14種の新規候補因子を同定した。このうち5種は共免疫沈降法によっても相互作用が確認された。現在、各遺伝子について遺伝子ノックダウンを行い、疾患原因膜タンパク質の安定性および細胞内局在性に与える影響について検討中である。一方で、疾患原因膜タンパク質の小胞

様式19 別紙1

体における分解に関与する因子の探索も行った。その結果、ある遺伝子をノックダウンするとシャルコーマリーツース病の原因遺伝子である PMP22 の変異タンパク質が増加することを見出した。この遺伝子は小胞体膜タンパク質をコードしており、現在細胞内におけるこのタンパク質の生理機能についてさらに解析を進めている。また、ノックアウトマウスの作製も開始しており、今後膜タンパク質の安定性および局在性を与える影響、小胞体ストレスの有無などについて解析を進める。さらに疾患モデル細胞に化合物ライブラリーを添加し、疾患原因膜タンパク質のタンパク量、細胞内局在性に影響を与える化合物の1次スクリーニングを行い、複数の候補化合物を得た。

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1件 1) Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato K, Kokubo T. (2012) Functional Analysis of Lysosomes During Mouse Preimplantation Embryo Development. J Reprod Dev 2013;59(1):33-9.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計3件 1) 佐藤健, 佐藤美由紀 (2012) 精子由来ミトコンドリアは受精依存的に誘導されるオートファジーによって選択的に分解される. 細胞工学 31:590-591. 2) 佐藤美由紀, 佐藤健 (2012) ミトコンドリアゲノムの母性遺伝のメカニズム. 化学と生物 50:479-480. 3) 佐藤健, 佐藤美由紀 (2012) 動物におけるミトコンドリア DNA の母性遺伝の分子機構. 生体の科学 63:436-437</p> <p>(未掲載) 計2件 1) Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. Biochim Biophys Acta. MCR. 2013. in press. 2) Sato M, Sato K. Dynamic regulation of autophagy and endocytosis for cell remodeling during early development. Traffic. 2013. in press.</p>
<p>会議発表 計6件</p>	<p>専門家向け 計5件 1) Miyuki Sato and Ken Sato. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in <i>C. elegans</i> embryos. 神戸. 2012年5月30日 Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. 2) 佐藤健. 線虫受精卵における父性ミトコンドリアのオートファジーによる選択的分解と母性遺伝. 大阪. 2012年8月31日 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会. シンポジウム(基礎2)「卵子の老化と発生能力」 3) Miyuki Sato and Ken Sato. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in <i>C. elegans</i> embryos. 沖縄. 2012年10月29日 The 6th International Symposium on Autophagy. 4) Taichi Hara, Satoshi Tsukamoto, Miyuki Sato, Ken Sato. Analysis of novel physiological roles of membrane trafficking in animal models 福岡. 2012年12月14日 第85回日本生化学会大会 Symposium「Roles of membrane trafficking on the construction of higher organisms」 5) Miyuki Sato, Taichi Hara, Satoshi Tsukamoto, Noboru Mizushima and Ken Sato Fertilization-triggered autophagy degrades paternal mitochondria in <i>C. elegans</i> early embryos. 福岡. 2012年12月15日 第85回日本生化学会大会 Symposium「Autophagy: half a century since its discovery」</p> <p>一般向け 計1件 1) 佐藤健. 「ミトコンドリア・イブ～ミトコンドリアは母からの贈り物～」. 平成24年10月25日(木)前橋商工会議所主催 まちなかキャンパス. 前橋市(元氣プラザ前橋)</p>
<p>図書 計1件</p>	<p>1) 岩波 生物学辞典 第5版 2013 (共著者)</p>

様式19 別紙1

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)	群馬大学生体調節研究所細胞構造分野ホームページ http://traffic.dept.med.gunma-u.ac.jp/research6.html
国民との科 学・技術対話 の実施状況	1) 前橋商工会議所主催 まちなかキャンパス、「ミトコンドリア・イブ～ミトコンドリアは母からの贈り物～」。佐藤健. 平成24年10月25日(木). 前橋市(元気プラザ前橋). 参加者25名. 当研究内容を一般市民向けに講演した. 2) 前橋商工会議所主催 まちなかキャンパス、「アンチエイジングの栄養学」。原太一(当分野准教授担当). 平成24年11月13日(木). 前橋市(元気プラザ前橋). 参加者25名. 当研究内容を一般市民向けに講演した. 3) 最先端生命科学セミナー. 平成25年3月9日(土) 前橋市(群馬大学生体調節研究所). 坂口愛沙(当分野助教担当)参加者 高崎女子高校スーパーサイエンスハイスクール(教師2名学生42名). 当研究に関する講義および研究体験実習を行った.
新聞・一般雑 誌等掲載 計1件	Nature 誌(12月5日出版)のNature Spotlight(Spotlight on Gunma: A big hope for patients with genetic diseases)で研究内容が紹介.
その他	特になし

4. その他特記事項

特になし.

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せん

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	122,000,000	64,134,000	32,266,000	25,600,000	0
間接経費	36,600,000	19,240,200	9,679,800	7,680,000	0
合計	158,600,000	83,374,200	41,945,800	33,280,000	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	10,700,020	32,266,000	0	42,966,020	36,496,718	6,469,302	0
間接経費	0	9,679,800	0	9,679,800	9,679,800	0	0
合計	10,700,020	41,945,800	0	52,645,820	46,176,518	6,469,302	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,328,342	共焦点レーザー走査型顕微鏡, 超低温フリーザー等
旅費	281,340	研究成果発表旅費(日本細胞生物学会等)等
謝金・人件費等	12,321,662	博士研究員および技術補助員雇用費
その他	565,374	生体情報ゲノムリソースセンター利用料等
直接経費計	36,496,718	
間接経費計	9,679,800	
合計	46,176,518	

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
超低温フリーザー 1 式	Panasonic MDF- U384B	1	1,182,300	1,182,300	2013/1/16	群馬大学
共焦点レーザー走査型 顕微鏡1式	オリンパス社製 FV1200	1	11,991,000	11,991,000	2013/2/26	群馬大学
対物レンズ駆動型ピ エゾシステム1式	ソリューションシステム CSU-PIEZ-GUM	1	1,845,375	1,845,375	2013/2/27	群馬大学