

課題番号	LS069
------	-------

**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	細胞分裂軸の新たな制御機構の解析と皮膚の形成・恒常性維持における役割
研究機関・ 部局・職名	京都大学・ウイルス研究所・教授
氏名	豊島文子

1. 当該年度の研究目的

本研究は、申請者が同定した新規の細胞分裂軸制御因子である c-Abl, PCK1, AK2 の分子機序と皮膚の組織構築における役割の解明を目指すものである。本年度の目的は以下の2項目である。

- 1) c-Abl がマウス皮膚基底細胞の分化に及ぼす影響の解析
- 2) 分裂軸制御における PCK1 のシグナル伝達機構の解析。
- 3) AK2 ノックアウトマウスの作製。

2. 研究の実施状況

- 1) c-Abl がマウス皮膚基底細胞の分化に及ぼす影響の解析
c-Abl1 ノックアウトマウスを用いて、胎児皮膚発生過程における、皮膚細胞の分化、組織形成について解析を行った。その結果、基底細胞の分裂軸の異常は顕著に認められたが、皮膚組織の多層化、角質層の分化、組織形態に大きな異常は観察されなかった。おそらく、細胞分裂の方向がランダムになっても、それを補完するメカニズムが存在するため、組織全体としては大きな影響が出ないと思われる。ただし、増殖性幹細胞の数に変化が出る可能性があるため、今後は、cKO を用いて、大人の皮膚恒常性について検討する必要がある。
- 2) 分裂軸制御における PCK1 のシグナル伝達機構の解析。
昨年度までの研究により、PCK1 が HeLa 細胞における分裂軸制御に必要であること、またそのキナーゼ活性が必要であることが分かった。本年度は、この機構における PCK1 の基質の同定を試みた。HeLa 細胞に野生型 PCK1 あるいはドミナントネガティブ型 PCK1 を導入し、分裂期に同調させ、細胞抽出液を得た。また、コントロール細胞と PCK1 ノックダウン細胞をそれぞれ分裂期に同調させ、細胞抽出液を調整した。それぞれの細胞抽出液からリン酸化ペプチドを精製、濃縮し、LC-Mas によりリン酸化プロテオーム解析を行った。リン酸化プロテオーム解析は、京都大学薬学研究科の石濱泰教授との共同研究で行った。野生型 PCK1 を導入した細胞よりもドミナントネガティブ型 PCK1 を導入した細胞でリン酸化が減少し、かつ、コントロール細胞よりも PCK1 ノックダウン細胞でリン酸化が減少したペプチドを選択したところ、15 遺伝子が同定された。15 遺伝子に対してそれぞれ2種類の siRNA を設計し、HeLa 細胞に導入して、2種類の siRNA でも分裂軸が異常になるものを検索したところ、KAP0、PCTY1A、TLE3、NUCKS1 の4遺伝

様式19 別紙1

子に絞り込まれた。KAP0は石濱泰教授の研究により、PCTK1の基質となるとの予備的結果が得られていたため、KAP0に焦点を絞り解析を行った。HeLa細胞においてKAP0をsiRNAでノックダウンすると分裂軸が異常になった。この異常はsiRNA耐性の野生型KAP0によりレスキューされるが、PCTK1によるリン酸化サイトのSer83をAlaに変換したKAP0-S83Aではレスキューされなかった。また、PCTK1のノックダウンで誘導される分裂軸の異常も野生型KAP0ではレスキューされるが、KAP0-S83Aではレスキューされなかった。このことから、PCTK1によるKAP0のSer83のリン酸化が分裂軸制御に必要であることが分かった。KAP0はPKAの制御サブユニットであるが、PKAの阻害剤では分裂軸には異常が生じない。よって、KAP0はPKAのキナーゼ活性非依存的に分裂軸を制御すると考えられる。現在、分裂軸制御におけるKAP0の結合因子の同定を試みている。

3) AK2 ノックアウトマウスの作製。

理化学研究所との共同研究により作製していたAK2コンディショナルノックアウトマウスの作製が完了した。Germ lineへの伝達も確認された。皮膚で特異的にノックダウンするため、K14-Cre-ERT TGマウスを共同研究により愛媛大学医学系研究科の花川靖博士より分与して頂いた。今後は、掛け合わせにより、タモキシフェン誘導的にAK2を皮膚でノックダウンし、皮膚基底細胞の分裂軸と皮膚の組織構築への関与を検討する予定である。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計2件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計1件 Matsumura S, and Toyoshima F. ABL1 joins the cadre of spindle orientation machinery. Cell Struct. Funct. 37, 81-87, 2012 (掲載済み一査読無し) 計1件 松村繁 豊島文子 「細胞の非対称分裂から見る細胞社会」 実験医学増刊 Vol. 31, No. 2, pp114-121, 2013 (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計6件</p>	<p>専門家向け 計6件 豊島文子:細胞分裂軸を決めるリン酸化ネットワーク. 第85回 日本生化学会、福岡、2012年12月16日(シンポジウム) Mayumi Hamasaki Shigeru Matsumura Fumiko Toyoshima: Pregnenolone regulates centriole engagement. 第35回 分子生物学会、福岡、2012年12月11-14日(ポスター) Shigeru Matsumura, Fumiko Toyoshima: Mitotic Plasma Membrane Domain Components Regulate Spindle Orientation. 分子生物学会、福岡、2012年12月11-14日(口頭、ポスター) 岩野 さやか, 松村 繁, 佐藤 綾香, 若林 真樹, 石濱 泰, 豊島 文子: 新規細胞分裂軸</p>

様式19 別紙1

	<p>制御因子 PCK1 の機能解析. 第35回 分子生物学会、福岡、2012年12月11-14日 (ポスター)</p> <p>Mayumi Hamasaki Shigeru Matsumura Fumiko Toyoshima: Pregnenolone Associates with Mitotic Spindles and Functions in Centriole Cohesion. 代謝国際シンポジウム、東京、2012年9月27-28日 (ポスター)</p> <p>Fumiko Toyoshima: A novel role of pregnenolone in centriole cohesion. Jaques Monod Conference, Sep. 5-9,2012. Roscoff, France (oral)</p> <p>一般向け 計0件</p>
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab.toyoshima.html
国民との科学・技術対話の実施状況	科学技術フェスタ in 京都、平成25年3月16-17日、パルスプラザ京都、一般、約50名、一般人対象に、理系と文系の研究内容の違いと共通点について対談した。
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

無し

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	114,000,000	56,320,000	28,840,000	28,840,000	0
間接経費	34,200,000	16,896,000	8,652,000	8,652,000	0
合計	148,200,000	73,216,000	37,492,000	37,492,000	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	9,742,969	28,840,000	0	38,582,969	37,449,699	1,133,270	0
間接経費	12,893,633	8,652,000	0	21,545,633	327,131	21,218,502	0
合計	22,636,602	37,492,000	0	60,128,602	37,776,830	22,351,772	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	28,602,114	実験試薬、実験用動物(マウス)、細胞等
旅費	951,920	研究成果発表旅費(細胞生物学会、日本分子生物学会等)
謝金・人件費等	2,990,443	技術補佐員雇用費、英文論文校正謝金等
その他	4,905,222	マウス開発試験費(作製等)、DNAシーケンス解析、遺伝子改変動物の飼育費等
直接経費計	37,449,699	
間接経費計	327,131	
合計	37,776,830	

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
				0		
				0		
				0		