

課題番号	LS083
------	-------

**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	細胞内Mg ²⁺ 制御の分子実体解明とがん悪性化シグナル
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・微生物病研究所・教授
氏名	三木 裕明

1. 当該年度の研究目的

本研究では、がん転移を促すことが知られる PRL の新規結合蛋白質として見つけた MagEx の機能解析を行う。特に平成24年度においては、(1)MagEx 遺伝子ノックアウトマウスの作製・解析、(2)MagEx 遺伝子変異体線虫の作製・解析、(3)Mg²⁺の関わるシグナル伝達の解析、を具体的な課題として実験に取り組むこととしていた。これらの研究計画を実施することにより、MagEx の生理的重要性をマウスや線虫などモデル生物を用いた個体レベルでの解析によって明らかにする。特に、腸でのマグネシウム吸収における役割など全身性のマグネシウム恒常性制御との関連を明らかにするとともに、マウスでの解析では、がん悪性化との関連を明らかにすることも重要な課題と位置付けている。これらノックアウトマウスや変異体線虫を用いた遺伝学的な解析手法によって、MagEx の重要性を明確に示すことが24年度の大きな目的の一つである。また MagEx の分子機能の本態としての細胞内 Mg²⁺制御の重要性を分子レベルで明らかにする。前年度までの成果として PI3 キナーゼや Akt/mTOR シグナル伝達との関連が明らかとなっていたが、Mg²⁺とそれらのシグナル伝達系とを結びつける分子機構についての解析を進める。また、各 MagEx ファミリーについても細胞レベルでの解析を行い、それぞれの分子機能を明らかにする。

2. 研究の実施状況

上記の項目(1)–(3)に関して各項目別に記す。(1)MagEx4-KO マウスの解析から、腸でのマグネシウム吸収量が大きく減少していることを明らかにできた。また、このマウスでは歯のエナメル質形成も異常になっていることを見つけた。MagEx2-KO マウスはホモ欠損で胎児期に死亡していた。発現部位の解析から、腎臓の尿細管上皮での強い発現が見られ、腎臓でのマグネシウム再吸収に働く可能性が示唆された。この他、MagEx1 や MagEx3 についても遺伝子 KO マウスの作製が完了した。(2)PRL の変異体で腸細胞での小胞に異常が見られていたが、小胞輸送に関わる Rab ファミリーの局在を調べたところ、後期エンドソームとの関連が知られる Rab7 でのみ凝集が観察され、特定の膜輸送等に影響している可能性が示唆された。また MagEx ファミリーの変異体単離も完了し、産卵数が減少する表現型を示すものも見つかった。ただ、成長停止や死亡など、全身性のマグネシウム恒常性異常から想定される強い表現型を示すものは無かったので、多重変異体作製のための掛け合わせを開始した。(3)全反射蛍光顕微鏡を用いた PIP₃ イメージング解析を行った。MagEx を強制発現させた細胞では、培地中の Mg²⁺濃度を変化させることで即時的に細胞内 Mg²⁺が変動するので、その時の PIP₃ 量を調べたところ、Mg²⁺変動に応じたダイナミックな量変化が認められた。細胞膜での PIP₃量を制御するシグナル因子としての Mg²⁺の重要性を明らかにすることができた。また、各 MagEx ファミリーの分子機能解析から、少なくとも MagEx2 は MagEx4 と同等の、MagEx1 も弱いながらも Mg²⁺排出機能を持つことが分かった。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計4件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計2件 (1) Terabayashi T, Sakaguchi M, Shinmyozu K, Ohshima T, Johjima A, Ogura T, <u>Miki H</u>, Nishinakamura R. Phosphorylation of Kif26b promotes its polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation during kidney development. PLoS One. 2012, 7(6):e39714. (2) Ishii T, Funato Y, <u>Miki H</u>. Thioredoxin-related Protein 32 (TRP32) Specifically Reduces Oxidized Phosphatase of Regenerating Liver (PRL). J Biol Chem. 2013, 288(10):7263-7270. (掲載済み一査読無し) 計2件 (1) <u>三木裕明</u>. 微小管モータータンパク質 GAKIN/KIF13B による神経細胞の極性制御. 生体の科学. 2012, 63, 200-204. (2) 船戸洋佑, <u>三木裕明</u>. Nucleoredoxin によるシグナル伝達のレドックス制御. 生化学. 2013, 85, 174-178. (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計4件</p>	<p>専門家向け 計4件 (1) <u>三木裕明</u>, 船戸洋佑, 山崎大輔. がん転移因子 PRL のレドックス応答とマグネシウム制御. 福岡. 2012年9月26日. 第84回日本遺伝学会大会シンポジウム (2) <u>三木裕明</u>, 船戸洋佑, 山崎大輔. がん転移因子 PRL による細胞内マグネシウムと mTOR シグナル伝達の制御. 福岡. 2012年12月12日. 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ (3) 船戸洋佑, <u>三木裕明</u>. 蛋白質の可逆的な酸化修飾を介したシグナル伝達の制御. 福岡. 2012年12月15日. 第85回日本生化学会大会シンポジウム (4) <u>三木裕明</u>. 上皮細胞を横断する Mg²⁺ のベクトル輸送. 京都. 2013年3月9日. 新学術領域研究「活性酸素シグナル」領域班会議での特別講演 一般向け 計0件</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>(1) 大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next (2) 大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>(1) 大阪大学学術研究機構会議主催のサイエンスカフェ(12/18、京阪中之島線なにわ橋駅)にて、約60人の一般聴衆向けに本研究で得られた研究成果やその背景となる情報について、「マグネシウムと生命:がん研究から明らかになってきた意外なつながり」と題したレクチャーおよび対話を行った。 (2) 武田薬品工業株式会社・第6回癌創薬ユニットセミナー(12/7、藤沢市武田薬品湘南研究所)にて、癌創薬ユニットを中心に約50人の聴衆向けに本研究で得られた研究成果やその背景となる情報について、「がん転移因子 PRL によるマグネシウム制御」と題した講演、質疑応答を行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

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	113,000,000	47,500,000	33,000,000	32,500,000	0
間接経費	33,900,000	14,250,000	9,900,000	9,750,000	0
合計	146,900,000	61,750,000	42,900,000	42,250,000	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	0	33,000,000	0	33,000,000	33,000,000	0	0
間接経費	6,598,843	9,900,000	0	16,498,843	13,669,031	2,829,812	0
合計	6,598,843	42,900,000	0	49,498,843	46,669,031	2,829,812	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	16,425,557	倒立型顕微鏡、顕微鏡用培養装置等
旅費	194,080	情報収集(九州大学)
謝金・人件費等	13,403,406	特任研究員人件費、派遣料金
その他	2,976,957	マウス作製等
直接経費計	33,000,000	
間接経費計	13,669,031	
合計	46,669,031	

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
倒立型顕微鏡	オリンパス IX81-FV1000	1	4,086,600	4,086,600	H24.7.31	大阪大学
顕微鏡用培養装置	東海ヒット INUBG2-ONICS	1	1,499,400	1,499,400	H24.8.31	大阪大学
sCMOSカメラ (MetaMorphシステム 機能拡張)	米国モレキュラーテッパ イス C11578-22C	1	2,118,900	2,118,900	H24.9.27	大阪大学
顕微鏡デジタルカメ ラ	オリンパス DP73	1	1,415,400	1,415,400	H24.12.17	大阪大学
マウス非観血血圧 測定装置	ソフロン BP-98A-LAセット	1	995,400	995,400	H25.1.17	大阪大学
吸光スペクトル	コロナ電気 SH9000機能追加	1	708,750	708,750	H25.1.23	大阪大学
高性能マイクローム リトラーム	大和光機工業 REM710-CBH	1	1,498,350	1,498,350	H25.2.20	大阪大学
分光蛍光光度計	島津製作所 RF-5300(PC)S	1	1,974,000	1,974,000	H25.2.20	大阪大学