

**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25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、ゴルジ体を経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、網膜色素変性症やシャルコー・マリー・トゥース(CMT)等の様々な疾患の原因となる。

前年度までに、ゴルジ体タンパク質である Rer1p の遺伝子ノックダウンを行うとある種の疾患原因膜タンパク質が小胞体から細胞膜、もしくはリソソームに輸送されることを見出した。そこで平成25年度は、まず疾患原因膜タンパク質の小胞体局在化における Rer1p の生理機能についてさらに詳細に解析を行う。また、Rer1 遺伝子ノックアウトマウスを作製したので、この表現型解析を行い、ほ乳動物個体における Rer1p の生理的役割を明らかにする。一方、疾患膜タンパク質を小胞体から細胞膜へと輸送させる化合物の一次スクリーニングによって得られた化合物についてさらに詳細に解析し、異常膜タンパク質が小胞体に蓄積する疾患を緩和するリード化合物の発見を目指す。

2. 研究の実施状況

今年度はまず Rer1p と網膜色素変性症の原因の一つであるロドプシンの変異タンパク質との関連について解析を行った。その結果、小胞体に蓄積する G51R 変異体が、Rer1p の欠失により細胞膜およびリソソームへと輸送されることが判明した。興味深いことに、Rer1p の欠失により野生型ロドプシンの細胞膜への輸送量も増加した。逆に、Rer1p を過剰発現させるとロドプシンが小胞体に蓄積することが明らかとなった。さらに、Rer1p は変異タンパク質だけでなく野生型ロドプシンにも結合することが明らかとなった。これらのことから、Rer1p は生理条件下では野生型ロドプシンに作用し細胞膜への輸送を調節しているが、遺伝子変異によりある種の変異タンパク質が生じると継続的に小胞体に蓄積させることが示唆された。一方、CMT 病の原因である PMP22 変異体に関しても、Rer1p が同様の作用を示すことが明らかとなり、このような疾患において Rer1p が異常膜タンパク質の小胞体蓄積に広く関与する可能性が示唆された。次に Rer1p のマウス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を作製したところ、胎生 9.5 日までに死亡することが明らかとなった。そこで、Rer1 欠損胚より胚性幹細胞を樹立し解析したところ、胚性幹細胞から胚様体

様式19 別紙1

へと分化誘導すると Rer1p を欠損した胚様体においてアポトーシスを伴う分化異常が観察された。このことから Rer1p は個体発生における細胞分化にも重要であることが明らかとなった。一方、疾患原因膜タンパク質の小胞体局在性、安定性に影響する新規化合物の1次スクリーニングにより同定された47種の化合物について、PMP22変異体にGFPを融合したタンパク質を発現する疾患モデル細胞を用いて蛍光強度を指標にさらに解析を行った。その結果、蛍光強度を増強するもの6種、減弱させるもの5種に候補化合物を絞り込むことに成功した。

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 4 件 1) Miyuki Sato, Ryosuke Konuma, Katsuya Sato, Kotone Tomura and Ken Sato. (2014) Fertilization-induced K63-linked ubiquitination mediates clearance of maternal membrane proteins. <i>Development</i> 141(6):1324-31. 2) Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Kito S, Minami N, Kubota T, Sato K, Kokubo T. (2014) Fluorescence-based visualization of autophagic activity predicts mouse embryo viability. <i>Sci Rep.</i> 31;4:4533 3) Miyuki Sato and Ken Sato. (2013) Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. <i>BBA Mol. Cell Res.</i> 833(8):1979-84. 4) Miyuki Sato and Ken Sato. (2013) Dynamic regulation of Autophagy and Endocytosis for Cell Remodeling During Early Development. <i>Traffic</i> 14(5):479-86.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件 1) 佐藤健, 佐藤美由紀. (2014) 受精における精子ミトコンドリアの運命と母性遺伝. 細胞工学 33;414-419. 2) 佐藤美由紀, 佐藤健. (2013) ミトコンドリア DNA の母性遺伝を制御する多様な分子機構. 生化学 85(5):357-362.</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 13 件</p>	<p>専門家向け 計 12 件 1) 佐藤健*. 「受精前後に展開される細胞内膜系リモデリングの分子メカニズム」 ウィンクあいち (名古屋) 2013年6月19日~21日. 第65回日本細胞生物学会大会 シンポジウム「高次生命現象を支えるメンブレントラフィック研究の最前線」. オーガナイザー及び口頭発表. 2) 佐藤美由紀*, 佐藤健. 「受精後に誘導されるエンドサイトーシスを介した細胞膜成分の再編成のメカニズム」 ウィンクあいち (名古屋) 2013年6月19日~21日. 第65回日本細胞生物学会大会. フラッシュトーク, ポスター発表. 3) 原太一*, 角田美佳, 山本正道, 堀居拓郎, 塚本智史, 畑田出穂, 佐藤健. 「哺乳動物における分子選別装置 Rer1 の生理的役割」 ウィンクあいち (名古屋) 2013年6月19日~21日. 第65回日本細胞生物学会大会. フラッシュトーク, ポスター発表. 4) Taichi Hara*, Masamichi Yamamoto, Mika Tsunoda, Satoshi Tsukamoto and Ken Sato. 「Physiological roles of a sorting receptor Rer1p during early embryogenesis in mice」 国際シンポジウム. 自然科学研究機構 岡崎カンファレンスセンター (岡崎). 2013年7月10~12日. 第61回NIBBカンファレンス Cellular community in mammalian</p>

様式19 別紙1

	<p>embryogenesis. ポスター発表.</p> <p>5) 佐藤美由紀*, 塚本智史, 原太一, 水島昇, 佐藤健. 「オートファジーによる父性ミトコンドリアの選択的分解と母性遺伝」パシフィコ横浜 (横浜) 2013 年 9 月 11 日-13 日. 第 86 回日本生化学会大会. シンポジウム「ミトコンドリアワールド: エネルギー生産から生体内環境保全まで」招待講演.</p> <p>6) 三枝慶子*, 佐藤美由紀, 佐藤克哉, 嶋田淳子, 原田彰宏, 佐藤健. 「線虫 <i>C. elegans</i> においてシャペロニン CCT は微絨毛の形態形成に重要な役割を果たす」パシフィコ横浜 (横浜) 2013 年 9 月 11 日-13 日. 第 86 回日本生化学会大会 ポスター発表.</p> <p>7) 佐藤健*. 「受精前後に展開される細胞内膜系リモデリングの分子メカニズム」岡山大学 (岡山) 2013 年 9 月 26 日~28 日. 日本動物学会 第 84 回 岡山大会. シンポジウム「受精機能と生殖戦略の進化 ~ 藻類から脊椎動物まで」招待講演.</p> <p>8) 佐藤健*. 「動物の初期発生におけるメンブレントラフィックの新たな生理機能」第 36 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3 日. シンポジウム「個体レベルのオルガネラバイオロジー」招待講演.</p> <p>9) 原太一*, 山本正道, 堀居拓郎, 角田美佳, 塚本智史, 神吉康晴, 井上剛, 金木清美, 畑田出穂, 佐藤健. 「マウス初期胚発生過程における分子選別装置 Rer1 の生理的役割」神戸ポートアイランド (神戸) 2013 年 12 月 3 日-6 日. 第 36 回日本分子生物学会年会 ポスター発表.</p> <p>10) 坂口愛沙*, 佐藤美由紀, 安藤恵子, 佐藤克哉, 中井淳一, 佐藤健. 「受精における表層顆粒の分泌を制御する RAB-11 に結合する新規因子の解析」神戸ポートアイランド (神戸) 2013 年 12 月 3 日-6 日. 第 36 回日本分子生物学会年会 ポスター発表.</p> <p>11) 富澤将太*, 佐藤美由紀, 戸村琴音, 佐藤健. 「Mechanism of selective degradation of paternal mitochondria by autophagy」神戸ポートアイランド (神戸) 2013 年 12 月 3 日-6 日. 第 36 回日本分子生物学会年会 ポスター発表.</p> <p>12) 原太一*, 佐藤健. 「細胞内メンブレントラフィックによるマウス初期胚の発生・分化制御機構の解析」自治医科大学キャンパス (栃木) 2014 年 3 月 27~29 日 シンポジウム 「オルガネラの恒常性維持機構 -疾患を見据えた細胞生物学的アプローチ」招待講演.</p> <p>* 発表者</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>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 25 年 10 月 16 日元気プラザ前橋 (前橋). 前橋商工会議所主催 まちなかキャンパス.</p>
<p>図書</p> <p>計 1 件</p>	<p>1) Ken Sato, Anne Norris, Miyuki Sato, Barth Grant. (2014) <i>C. elegans</i> as a model for membrane traffic. WormBook.:1-47. doi: 10.1895/wormbook.1.77.2.</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>

様式19 別紙1

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/reserch6.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 25 年 10 月 16 日 (水). 前橋市 (元気プラザ前橋). 参加者 32 名. 当研究内容を一般市民向けに講演した.
新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件	特になし
その他	特になし

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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	96,400,000	25,600,000	0	0
間接経費	36,600,000	28,920,000	7,680,000	0	0
合計	158,600,000	125,320,000	33,280,000	0	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	6,469,302	25,600,000	0	32,069,302	31,821,076	248,226	0
間接経費	0	7,680,000	0	7,680,000	7,680,000	0	0
合計	6,469,302	33,280,000	0	39,749,302	39,501,076	248,226	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	16,182,752	実験動物、実験器具、試薬の購入等
旅費	279,440	学会参加(研究発表及び情報収集)
謝金・人件費等	13,111,369	研究員、研究支援者給与
その他	2,247,515	ゲノムリソースセンター利用料、動物実験施設 利用料等
直接経費計	31,821,076	
間接経費計	7,680,000	
合計	39,501,076	

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
対物レンズ	UPLSAPO60XS	1	850,500	850,500	2013/12/6	群馬大学
対物レンズ	UPLSAPO30XS	1	945,000	945,000	2013/12/6	群馬大学
				0		