

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25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・悪性化を促す 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。細胞外への Mg²⁺排出に関わる MagEx の機能解析を行うことで、Mg²⁺の生命機能制御における役割を明らかにすることを全体の目的としている。特に平成25年度においては、(1)MagEx ファミリー遺伝子 KO マウスを用いた解析、(2)MagEx ファミリー遺伝子変異体線虫を用いた解析、(3)培養細胞を用いた解析、を実施する。(1)では MagEx4 のエナメル質形成や、腸でのがん化・悪性化における役割を MagEx4-KO マウスを用いて解析し、また他の MagEx ファミリーの KO マウスの表現型解析を行う。(2)では、線虫での MagEx 遺伝子変異体の解析、特にそれらの多重変異体の作製を進めて明確な表現型を示すものを探して解析する。(3)では、哺乳動物系の培養細胞を用いて Mg²⁺によって制御されるシグナル伝達、特に PI3 キナーゼ/Akt など mTOR シグナルに至るシグナル伝達の分子機構に関する解析を行う。これらの研究計画を実施することにより、Mg²⁺制御の生理的重要性やその破綻の影響を個体レベルで理解できるようにするとともに、それに関わる具体的な分子機構を明らかにする。

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 マウスでは歯のエナメル質形成が異常になっていたが、実際に MagEx4 がエナメル質を作る上皮細胞に強く発現し Mg²⁺輸送を行っていることを明らかにした。MagEx2-KO マウスはホモ欠損で胎児期に死亡したので、ヘテロ欠損マウスで解析を行ったところ、腎臓でのマグネシウム再吸収に重要であることが分かった。また、MagEx4-KO マウスに関しては、腸でポリープを形成する Apc ヘテロ欠損マウスと掛け合わせ、その結果、ポリープの約半数が筋層に浸潤したがんが悪性化することを見つけた。(2)線虫での MagEx ファミリーの多重変異体を作製したところ、全身的に発現する MagEx1 と MagEx3 の二重変異体で不稔になった。その原因は生殖腺が発達しないことであり、この表現型は Mg²⁺を培地中に加えることで回避できた。またこの二重変異体では脂肪の蓄積や寿命の短縮なども起こっていることも分かった。(3)培養細胞で siRNA を用いて PRL のノックダウンを行うと mTOR シグナルが阻害されたが、意外にも Akt の活性化状態に変化はなかった。Akt 以外の mTOR 上流因子が関与していると考えて解析を進め、エネルギー状態のセンスに重要な AMP キナーゼが活性化していることを見つけた。また、この効果が過剰 Mg²⁺の培地への添加でキャンセルできることも分かった。

様式19 別紙1

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) srGAP1 regulates lamellipodial dynamics and cell migratory behavior by modulating Rac1 activity. Yamazaki D, Itoh T, <u>Miki H</u>, Takenawa T. Mol Biol Cell. 2013, 24(21):3393-3405. (2) Nucleoredoxin regulates glucose metabolism via phosphofructokinase 1. Funato Y, Hayashi T, Irino Y, Takenawa T, <u>Miki H</u>. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 440(4):737-742. (3) Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across epithelia: a mouse model. Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y, Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S, Mizukami S, Kikuchi K, <u>Miki H</u>. PLoS Genet. 2013, 9(12):e1003983. (4) Reversible oxidation of PRL family protein-tyrosine phosphatases. Funato Y, <u>Miki H</u>. Methods. 2014, 15;65(2):184-189. (掲載済み一査読無し) 計1件 <u>三木裕明</u>. 活性酸素センサー分子の可逆的酸化によるシグナル伝達の制御. 医学のあゆみ. 2013, 247, 800-805. (未掲載) 計1件 Mg²⁺-Dependent Interactions of ATP with the Cystathionine-β-Synthase (CBS) Domains of a Magnesium Transporter. Hirata Y, Funato Y, Takano Y, <u>Miki H</u>. J Biol Chem. (in press)</p>
<p>会議発表 計3件</p>	<p>専門家向け 計3件 (1) <u>Hiroaki Miki</u>, Yosuke Funato. Metastasis-promoting protein PRL regulates energy metabolism by inhibiting extrusion of magnesium ion. 横浜. 2013年9月13日. 第86回日本生化学会インターナショナルセッション (2) <u>三木裕明</u>. 活性酸素による細胞内マグネシウムイオンの制御と疾患. 京都. 2013年12月14日. 第30回臨床フリーラジカル会議 (3) <u>三木裕明</u>. 細胞内マグネシウムのレドックス制御とがん悪性化. 東京. 2014年3月7日. 第7回レドックス・ライファイノベーションシンポジウム 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>平成25年10月10日、大阪府立高津高等学校にて講演を行った。約50人の高校生や高校教員向けに、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「がんの転移・悪性化と細胞のエネルギー制御」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ず

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	80,500,000	32,500,000	0	0
間接経費	33,900,000	24,150,000	9,750,000	0	0
合計	146,900,000	104,650,000	42,250,000	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	0	32,500,000	0	32,500,000	32,479,083	20,917	0
間接経費	2,829,812	9,750,000	0	12,579,812	12,579,812	0	0
合計	2,829,812	42,250,000	0	45,079,812	45,058,895	20,917	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	14,570,998	超高感度ディテクタ、サーマルサイクラ—等
旅費	142,500	第86回日本生化学会大会参加等
謝金・人件費等	13,682,473	特任研究員・技術補佐員・派遣職員等
その他	4,083,112	航空輸送費、学会参加費、動物実験施設利用料等
直接経費計	32,479,083	
間接経費計	12,579,812	
合計	45,058,895	

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
超高感度ディテクタ	オリンパス・FV12- HSD	1	7,234,500	7,234,500	H25.9.24	大阪大学
				0		
				0		