

課題番号	LS138
------	-------

**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	循環器システムを司る分子実体の解明
研究機関・ 部局・職名	独立行政法人理化学研究所 生命システム研究センター・循環器分子動態研究 ユニット・研究ユニットリーダー
氏名	川原 敦雄

1. 当該年度の研究目的

心臓と血管網で形成される循環器システムは、酸素、栄養分、生理活性物質や老廃物の運搬など我々の生命活動に必須の役割を担っている。本研究は、循環器システムがどのように構築されるかを分子レベルで明らかにすることを目的としている。我々は、心臓発生に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の機能解析から脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の輸送体 Spns2 が心臓の形態形成を制御していることを明らかにしている。本年度は、人工ヌクレアーゼ TALEN や CRISPR/Cas9 システムといったゲノム編集技術を用い S1P 合成・分解酵素および S1P 受容体を網羅的に破壊したゼブラフィッシュ変異体を作製し、それらの表現型および生化学的な解析から、S1P シグナルの循環器システムの形成過程における役割を明らかにする。

2. 研究の実施状況

本研究は、ゲノム編集技術あるいは順遺伝学的解析手法を用いて作製したゼブラフィッシュ変異体の機能解析から循環器システムの形成機構を明らかにすることを目的としている。平成25年度は、以下の研究結果が得られた。

- 1) 平成24年度は、人工ヌクレアーゼ TALEN およびゲノム編集活性の測定法の開発に成功したが、平成25年度は、新たに CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム改変技術を確立し、ゼブラフィッシュにおいて複数遺伝子の同時破壊、さらにそれらの変異が生殖系列に移行できることを初めて報告した。
- 2) 上記の手法を用いて、S1P 合成酵素 (SphK1, SphK2) および S1P 分解酵素 S1P リアーゼに対する遺伝子破壊に成功し、加えて全ての S1P 受容体 (S1PR1-S1PR5) に対する遺伝子破壊ゼブラフィッシュを樹立した。さらに、これら S1P 受容体変異体型が S1P 応答性を消失していることを見出した。
- 3) マウスでは S1PR1 の遺伝子破壊は血管発生異常を示すが、ゼブラフィッシュ S1PR1 変異体では顕著な血管発生を示さず、S1P 受容体間の機能補完の可能性が示唆された。SphK2 変異体の機能解析から、母性および接合体由来の SphK2 が心臓発生を制御することが明らかとなった。さらに、S1PR3b 変異体の機能解析から、心臓の形態形成に必須の役割を担うことが明らかとなった。

本研究により S1P シグナルである S1P 合成酵素、S1P 輸送体、S1P 受容体が協調して心臓発生を巧妙に制御していること、また、血管発生においては S1P 受容体間の機能補完の存在が考えられた。今後、S1P 受容体に対する網羅的な多重遺伝子破壊を遂行し循環系における表現型解析を行う。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 11 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 10 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ota S, Hisano Y, Muraki M, Hoshijima K, Dahlem TJ, Grunwald DJ, Okada Y., Kawahara A Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays <i>Genes to Cells</i> 18, 450–458 (2013) 2. Hisano Y, Ota S, Arakawa K, Muraki M, Kono N, Oshita K, Sakuma T, Tomita M, Yamamoto T, Okada Y, Kawahara A Quantitative assay for TALEN activity at endogenous genomic loci <i>Biology Open</i> 2, 363–367 (2013) 3. Hisano Y, Ota S, Takada S, Kawahara A Functional cooperation of <i>spns2</i> and fibronectin in cardiac and lower jaw development <i>Biology Open</i> 2, 789–794 (2013) 4. Tsuge K, Iwasaki R, Morimoto K, Inazumi T, Kawahara O, Kawahara A, Tsuchiya S, Sugimoto Y Molecular and pharmacological characterization of zebrafish relaxant prostanoid receptors <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 436, 685–690 (2013) 5. Iwasaki R, Tsuge K, Morimoto K, Inazumi T, Kawahara O, Kawahara A, Tsuchiya S, Sugimoto Y Molecular and pharmacological characterization of zebrafish contractile and inhibitory prostanoid receptors <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 438, 353–358 (2013) 6. Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujiura T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, Obuse C, Kurumizaka H, Kawahara A, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H Genetically encoded system to track histone modification in vivo <i>Scientific Report</i> 3, 2436 (2013) 7. Nishi T, Kobayashi N, Hisano Y, Kawahara A, Yamaguchi A Molecular and physiological functions sphingosine-1-phosphate transporters <i>BBA</i> 1841, 759–765 (2013) 8. Nakanaga K, Hama K, Kano K, Sato T, Yukiura H, Inoue A, Saigusa D, Tokuyama K, Tomioka Y, Nishida H, Kawahara A, Aoki J Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo <i>J Biochem.</i> 155, 235–241 (2014) 9. Ota S, Kawahara A Zebrafish: a model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders <i>Congenital anomalies</i> 54, 8–11 (2014) 10. Hisano Y, Ota S, Kawahara A Genome editing using artificial site-specific nucleases in zebrafish <i>Dev. Growth Differ.</i> 56, 26–33 (2014) <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ota S, Hisano Y, Ikawa Y, Kawahara A Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish <i>Genes to Cells</i> in press (2014)
<p>会議発表 計 7 件</p>	<p>専門家向け 計 7 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 日本発生生物学会 (島根県島根市, 5/29–31, 2013) Kawahara Atsuo: TALEN-mediated genome modification in zebrafish 2. 日本先天異常学会 (大阪府豊中市, 7/21–23, 2013) 川原敦雄: 循環器系の形成機構 ゼブラフィッシュを用いた遺伝学的解析の有用性 3. FASEB Summer Research Conference (北海道 ニセコ, 8/4–9, 2013) Kawahara Atsuo: Functional analysis of S1P signaling using the TALEN-mediated genome modification 4. バイオフォーラム 2013 (京都府京都市, 9/6, 2013) 川原敦雄: 脂質メディエーター・スフィンゴシン-1-リン酸の初期発生における機能 5. 日本発生生物学会秋季シンポジウム (兵庫県神戸市, 11/18–19, 2013) 川原敦雄: ゼブラフィッシュにおけるゲノム改変 6. 日本分子生物学会 (兵庫県神戸市, 12/3–6, 2013)

様式19 別紙1

	<p>川原敦雄:CRISPR/Cas9 を用いたゼブラフィッシュにおけるゲノム編集 7. International Symposium on RNAi and Genome Editing Research (徳島県徳島市, 3/14-16, 2014) Kawahara Atsuo: Targeted genome modification in zebrafish by the CRISPR/Cas9 system 一般向け 計0件</p>
<p>図書 計5件</p>	<p>1. 川原敦雄、岡田康志 TALENによる遺伝子改変ゼブラフィッシュの作成 細胞工学 32, 558-563 (2013) 2. 久野悠、川原敦雄 ゼブラフィッシュを用いた脂質メディエーター研究 遺伝子医学 MOOK 24, 112-116 (2013) 3. 木下政人、安齋賢、久野悠、川原敦雄 小型魚類における TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子改変 実験医学別冊, 169-179 (2013) 4. 久野悠、川原敦雄 スフィンゴシン-1-リン酸の分泌機構と生理機能 医学のあゆみ 248, 1014-1018 (2014) 5. 太田聡、川原敦雄 ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集と生命科学への応用 実験医学 in press (2014)</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>生命システム研究センター 循環器分子動態研究ユニット http://www.qbic.riken.jp/japanese/research/outline/lab-20.html</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>2013年10月19日:理化学研究所で開催された一般公開において、来場者に心臓や血管の形成過程を蛍光タンパク質の発現で観察していただき、我々の研究内容の紹介を行った。 2014年2月2日:兵庫県の高校生が主催するサイエンスフェア神戸に参加し、高校生や一般来場者の方に研究紹介を行うとともに、高校生からの研究内容や質問に答える形で議論や交流を行った。 発表論文に関する情報を理化学研究所のホームページを通じて発信している</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	114,000,000	84,000,000	30,000,000	0	0
間接経費	34,200,000	25,200,000	9,000,000	0	0
合計	148,200,000	109,200,000	39,000,000	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	1,303,226	30,000,000	0	31,303,226	31,076,112	227,114	0
間接経費	0	9,000,000	0	9,000,000	9,000,000	0	0
合計	1,303,226	39,000,000	0	40,303,226	40,076,112	227,114	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	18,685,848	極微量分光光度計、UVランプ等
旅費	771,640	海外渡航費、出張費等
謝金・人件費等	10,989,203	研究員2名人件費、パートタイマー3名人件費等
その他	629,421	論文投稿料、学会参加費等
直接経費計	31,076,112	
間接経費計	9,000,000	
合計	40,076,112	

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
極微量分光光度計	(株)アズバイオ	1	1,491,000	1,491,000	2013/5/9	QBIC 川原ラボ
UVランプ	白井松器械(株)	1	941,409	941,409	2013/5/31	QBIC 川原ラボ
デジタルカメラ	オリンパスメディカ ルサイエンス販売 株式会社	1	1,138,725	1,138,725	2013/8/23	QBIC 川原ラボ
発光イメージング解 析装置株	株式会社アズバ イオ	1	3,617,250	3,617,250	2013/11/28	QBIC 川原ラボ