

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成24年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成24年度～平成25年度

5. 課題番号

2	4	6	5	7	1	3	7
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 哺乳類エンドサイクルの理解とシグナロソームによる制御

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
0 0 2 7 3 8 3 9	カトウ ジュンヤ 加藤 順也	バイオサイエンス研究科	教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
1 0 2 5 2 7 8 5	カトウ ノリコ 加藤 規子	バイオサイエンス研究科	助教

9. 研究実績の概要

(1) COP9シグナロソームの酵素活性中心のサブユニット(CSN5)を組織特異的に条件性ノックアウトできるマウスシステムを作製する。方法としては、誘導可能なCRE組換え酵素をCSN5/Jab1 Floxマウスの骨髄で発現させる。まず、タモキシフェンにより誘導可能なCRE組換え酵素をコードするcDNAを、骨髄で特異的に活性化されるエンハンサーとプロモーターに連結した組織特異的発現ベクターを構築した。これを、B6マウスの受精卵にマイクロインジェクションすることにより、タモキシフェンにより誘導可能なCRE組換え酵素を骨髄で特異的に発現するトランスジェニックマウスの系統を数系統樹立した。これをB6マウスと掛け合わせるにより、安定な系統を3種確立した。次にこの系統をCSN5/Jab1 Floxマウスを掛け合せ、さらにこの子孫をCSN5/Jab1 Floxマウスと掛け合わせるにより、タモキシフェンにより誘導可能なCRE組換え酵素(CRE-ER)を持つCSN5/Jab1 Floxマウス(CSN5Flox(f/-、f/f、あるいはf/+)+CRE-ERマウス)を作製した。現在、CSN5(f/+)+CRE-ERマウスにタモキシフェンを腹腔内注入しCSN5遺伝子座がノックアウトされるか検討している。用いたエンハンサー/プロモーターが造血幹細胞に発現する活性を持つことを考慮し、タモキシフェン投与後、5FUを注入することにより、CSN5遺伝子がノックアウトされた細胞がより多く増殖するように工夫を加えた方法を試す予定である。

10. キーワード

(1) COP9 シグナロソーム	(2)	(3)	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

研究の性質上マウスを用いた実験を多く行っており、その中で誘導性条件性ノックアウトマウスを作製しているが、他研究機関にて作製したため、維持、交配とスクリーニングに予想以上の手間と時間がかかり、また、搬送時に当初の予定に無かったクリーニングのステップが加わったため、実験の日数が大幅に伸びた。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

速やかにマウスの交配を進め、目的の遺伝型のマウスと細胞を得て研究を進める。

(次年度の研究費の使用計画)

「未使用額が生じた状況(理由)」 タモキシフェンにより誘導可能なCRE組換え酵素を骨髄で特異的に発現するトランスジェニックマウスの系統を他研究機関にて作製したため、維持、交配とスクリーニングに予想以上の手間と時間がかかり、また、搬送時に当初の予定に無かったクリーニングのステップが加わったため、実験の日数が大幅に伸びた。また、研究の性質上、特異的な遺伝子型を持つマウスを交配により作製する必要があるが、一時的に交配の効率が下がり、目的の遺伝子型を持つマウスを得るのに時間がかかった。

(1) CSN5の条件性ノックアウトマウスシステム 平成24年度に作製したBM/CRE-ER, CSN5 floxed/-マウスにタモキシフェンを投与し、末梢血や骨髄細胞を調べることで、巨核球形成に及ぼす影響を調べ、in vivoにおけるエンドサイクルの開始ポイントを特定しその前後における細胞の動態を調べる。また、BM/CRE-ER, CSN5 floxed/-マウスより骨髄細胞を単離して培養し、in vitro培養系でタモキシフェンを投与し、骨髄細胞の分化系列に対する影響を調べる。

(2) K562細胞を用いた巨核球分化のin vitro誘導系 TPA処理したK562細胞を用い、エンドサイクル誘導前後における細胞サンプルを取得し、これまでエンドサイクルに関与すると報告のある因子(サイクリンE、M期制御因子APC/C、Cdkインヒビターp57/p27など)を含めて、細胞周期、シグナル伝達等に係るさまざまな因子の発現量、活性化状態、細胞内局在などの動態を調べ、エンドサイクル開始前後における分子的变化の実態を把握する。最終的に、エンドサイクル開始因子の候補を絞り込み、エンドサイクル誘導の仕組みを解析する。

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名	論文標題【掲載確定】				
Yoshida A, Yoneda-Kato N, Kato JY.	CSN5 specifically interacts with CDK2 and controls senescence in a cytoplasmic cyclin E-mediated manner.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
Sci Rep.	有	3	2	013	1054
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038/srep01054.					

著者名	論文標題【掲載確定】				
Kobayashi S, Yoneda-Kato N, Itahara N, Yoshida A, Kato JY.	The COP1 E3-ligase interacts with FIP200, a key regulator of mammalian autophagy.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
BMC Biochem.	有	14	2	013	1
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
なし					

著者名	論文標題【掲載確定】				
Tsujimoto I, Yoshida A, Yoneda-Kato N, Kato JY.	Depletion of CSN5 inhibits Ras-mediated tumorigenesis by inducing premature senescence in p53-null cells.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
FEBS Lett.	有	586	2	012	4326-31
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1016/j.febslet.2012.10.042.					

〔学会発表〕計(1)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名	発表標題【発表確定】		
Kato, J.Y	CSN5 specifically interacts with CDK2 to control senescence		
学会等名	発表年月日	発表場所	
Zomes VII国際会議(招待講演)	2012年09月20日	Munich, Germany	

〔図書〕計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

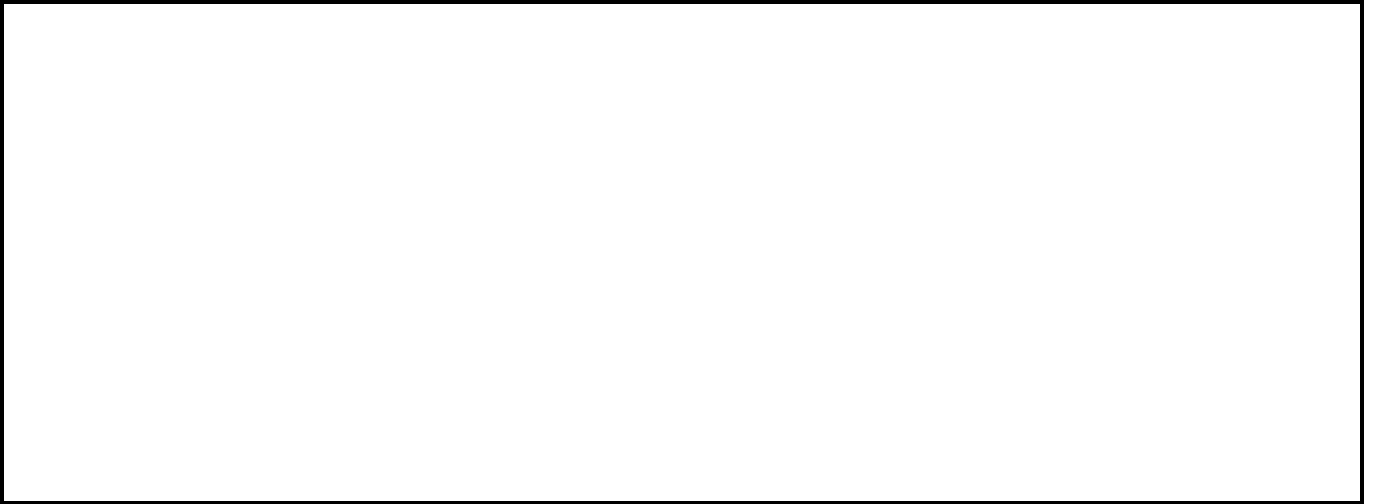
〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考

A large, empty rectangular box with a black border, intended for writing preparation notes. It occupies the upper half of the page.