

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 25 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 26 年度

5. 課題番号

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

6. 研究課題名 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

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の作製を行っている。そのため、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の系統を複数種類樹立した。これをB6マウスと掛け合わせて安定にゲノムにインテグレーションされた系統を3種確立した。次にこの系統をCSN5 Floxマウスと掛け合せ、さらにその子孫をCSN5 Floxマウスと掛け合わせる事により、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CSN5 Floxマウスを作製した。このマウスに、タモキシフェンを腹腔内注射したところ、CSN5のFlox遺伝子座が減少し、マーカーであるGFPの陽性細胞が時間とともに減少した。次に、十数分のCSN5の条件性誘導性ノックアウトマウスを得るために、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マウスとCSN5のFloxマウスと掛け合わせているが、マウスの産子数が少なく目的の遺伝子型を持つマウスが十分に得られていない。現在、今までの掛け合せを継続するとともに、新たな方法を模索している。

上記遺伝子組換えマウスを用いた解析とともに、K562細胞を用いた巨核球分化のin vitro誘導系をセットアップした。K562細胞をTPAで処理し、巨核球分化誘導時の細胞周期、ploidy、細胞形態を調べた。さらに、TPA処理前後で種々の因子の発現を調べ比較した。

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) (4) 遅れている。

(理由)

十分数のCSN5の条件性誘導性ノックアウトマウスを得るために、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マウスとCSN5のFloxマウスと掛け合わせているが、マウスの産子数が少なく目的の遺伝子型を持つマウスが十分に得られておらず、有為な解析ができない。そのため、今までの掛け合せを継続するとともに、新たな方法を模索している。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

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系統の作製が完了し、CSN5の条件性誘導性ノックアウトマウスを得るためにCSN5のFloxed遺伝子座を持つマウスと掛け合わせているが、マウスの産子数が少なく目的の遺伝子型を持つマウスが十分に得られないため、有為な解析ができない。そのため、今までの掛け合せを継続するとともに、新たな計画として骨髄移植により目的の解析が可能なマウスの作製をすることにした。そのための条件設定を行っている。また、K562細胞を用いた巨核球分化のin vitro誘導系を用いて、TPA処理前後での種々の因子の機能を調べる予定である。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(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系統の作製が完了し、CSN5の条件性誘導性ノックアウトマウスを得るためにCSN5のFloxed遺伝子座を持つマウスと掛け合わせているが、マウスの産子数が少なく目的の遺伝子型を持つマウスが十分に得られないため、有為な解析ができない。そのため、今までの掛け合せを継続するとともに、新たな計画として骨髄移植により目的の解析が可能なマウスの作製をすることにしたため、次年度使用額が生じた。

(使用計画)

本研究を完成するため、骨髄移植によりCSN5のFloxed遺伝子座を持つ骨髄細胞にタモキシフェンにより誘導可能なCRE組換え酵素を導入したマウスを作製し、その解析を次年度に行うこととする。また、これまでの掛け合わせに工夫を凝らし、異なった遺伝子座を持つマウスを用いてCSN5の条件性誘導性ノックアウトマウスを得るための努力も行い、もし目的の遺伝子座を持つ組み換えマウスが十分数得られたならばこれも解析する。さらに、K562で既に得られた結果をもとにこのモデルをマウス個体で検証する実験もあわせて行う予定であり、そのために掛け合わせ、あるいは骨髄移植で得られるマウスを解析に用いる。次年度使用額はこれらの解析の経費に充てる。

13. 研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名		論文標題			
Yoshida A, Kato JY, Nakamae I, Yoneda-Kato N.		COP1 targets C/EBP for degradation and induces acute myeloid leukemia via Trib1.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
Blood	有	122	2	013	1750-1760
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
doi: 10.1182/blood-2012-12-476101.					

(学会発表) 計(1)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
平野太一、吉田晃洋、中前伊公子、加藤規子、加藤順也		Ploidy調節と巨核球分化におけるCOP9シグナロソームの役割	
学会等名	発表年月日	発表場所	
分子生物学会	2013年12月03日～2013年12月06日	神戸	

(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

--