

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 27 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 27 年度～平成 28 年度

5. 課題番号

1	5	K	1	4	5	1	0
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 蛍光共鳴エネルギー移動システムを利用した小胞体ストレス応答バイオセンサーの開発

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
1 0 5 9 8 4 0 2	コイケ マサアキ 小池 雅昭	バイオサイエンス研究科	助教

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

9. 研究実績の概要

今年度は、主に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)システムを利用した、哺乳類培養細胞における小胞体ストレスを認識するバイオセンサーの開発に取り組んだ。哺乳類発現ベクターであるpcDNAベクターに蛍光タンパク質CFPとVenusをタンデムにつなげたコンストラクトを用い、その蛍光タンパク質の両端に、それぞれ小胞体へ局在させるためのcalreticulinの小胞体移行シグナル配列と、小胞体保留シグナルとしてKDEL配列を付加したコンストラクトを作製した。次に、小胞体ストレスのセンサー部位として、CFPとVenusの間にヒトIRE1 タンパク質の自己集合領域であるcore stress-sensing region (CSSR)と、BiPタンパク質との結合領域であるSubregion-Vをタンデムに組み込んだ。このコンストラクトをHeLa細胞、またはMEF細胞に一過的に発現させたところ、CFP、もしくはVenusタンパク質の小胞体への局在が確認できた。今後は、様々な小胞体ストレス条件下により、このFRETバイオセンサーが実際に機能するかを確かめていく。また、多くのFRETバイオセンサーは安定発現細胞株を用いることで、再現性の高いデータが得られることが知られている。そこで今後は、得られたFRETバイオセンサーを安定的に発現する細胞株を樹立し、それらの細胞株を用いて小胞体ストレスによる挙動を詳細に調べていく。

10. キーワード

(1) 小胞体ストレス	(2) UPR	(3) FRET	(4) バイオセンサー
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

当初予定していたFRETバイオセンサーのコンストラクトが完成し、その作製したFRETバイオセンサーが小胞体へ局在することが確認できた。今後は、小胞体ストレス処理により、FRETバイオセンサーが機能するか調べていく。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

まずは、作製したFRETバイオセンサーが機能するかを調べていく。もしうまく機能しない場合には、センサー部位のCSSR領域とSubregion-Vの並びや、間の距離などを変えたりするなどの工夫を行う。また、多くのFRETバイオセンサーは安定発現細胞株を樹立することで、再現性の高いデータが得られているため、機能したFRETバイオセンサーが得られた際には、安定発現細胞株の樹立を行い、小胞体ストレスによる挙動を調べていく。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

今年度は主にコンストラクトの開発に費やしたためである。

(使用計画)

次年度は、さらなるバイオセンサーの改変に加え、安定発現細胞株の作製など培養細胞を用いた実験が増えることが考えられる。

(課題番号： 15K14510)

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件/うち査読付論文 計(0)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(0)件

著者名		論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
オープンアクセス						

(学会発表) 計(0)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(0)件

発表者名		発表標題	
学会等名	発表年月日	発表場所	

(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

(課題番号: 15K14510)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

17. 備考

--