

(様式第9 別紙2:公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: モハマド カムルル ハサン

2. 養成カリキュラム名: 癌抑制経路のリアルタイム可視化と癌治療への応用

3. 養成カリキュラムの達成状況

このカリキュラムは、当初計画通り、順調に進んでいる。

4. 成果

生細胞は、複雑な生体内機能を担う一定のゲノム発現プログラムを維持している。この作用において、各単一タンパク質は、単独で、あるいは、他のタンパク質と相互作用しながら、最適条件下、生理学的状態を保持したまま、特定の働きをする。しかし、細胞内条件は、様々な種類のタンパク質の機能状況の変性により、変化する。これらの変化により、細胞は病的状態になる。例えば、細胞周期を保持する機能を持つ、癌抑制タンパク質 p53 は、その機能を阻止することにより、癌の進行を導き、最終的に、細胞の無制御増殖を引き起こす。一方で、生存促進性タンパク質であり、細胞の癌化及び不死化に関わるモータリンは、ミトコンドリア、小胞体、ペルオキシゾーム、形質膜のような様々な細胞部位に存在し、正常細胞と癌細胞において異なる分布を示す。それ故に、細胞内の異なる局在において、様々な分子と相互作用することにより、多様な機能を担っている。以前の我々の研究で、モータリンは、p53 と結合し、その機能を不活性化させることを示した。最近の研究では、p53 がミトコンドリアにおいても局在することやいくつかの生存促進遺伝子を不活性化することにより、細胞死を誘導することを示した。これらの知見は、タンパク質が自然界において、固定的でなく、動的である事が示唆される。単一分子は、一つの場所から他の場所まで動くことができ、単独で、あるいは、異なる部位で他の分子と相互作用したり、細胞内環境において、複雑なネットワークを形成し、様々な働きをする。もし、我々が、リアルタイムで単一分子の動態観察を行うことができれば、生細胞内の様々な過程を理解する方法として、多大な進展をもたらすことができる。さらに、生細胞内におけるタンパク質—タンパク質間相互作用及び細胞内輸送をリアルタイムで解析できる技術の発展が必要とされる。

本カリキュラムの主目的は、次項目を含む顕微鏡の開発である。

1. 高解像度:小胞体やペルオキシゾームのような微細構造における相互作用の解析を容易にする。
2. 高速:リアルタイムでのタンパク質の相互作用及び局在の追跡
3. マルチチャンネル:複数の相互作用を特徴付けるために2種以上のタンパク質を同時に検出する。

4. 低信号対雑音比(SN比) : 検出感度の改善

この高解像度高速リアルタイム顕微鏡を用いて、生細胞におけるタンパク質動態を分子レベルで観察する可視化解析を行うことが可能になる。これは、複雑な細胞内環境において、リアルタイムでの単一分子及びその相互作用パートナーに関する機構的・視覚的な詳細を理解する助けになる。例えば、生細胞において、モータリンが p53 及びその他の結合パートナーと相互作用をリアルタイムで観察することにより、モータリンのメカニズムを視覚化することができる。これらの細胞内過程の理解は、抗癌やその他の疾患治療薬の開発のような医学的観点からも非常に重要な研究と考えられる。

また、モータリンは p53 と結合し、その機能を不活性化にするが、癌細胞において、いつ、どこで、どのように二つのタンパク質が相互作用しているか明らかになっていない。プロトタイプ顕微鏡を使った異なる種類の可視化技術を用いて、我々は、モータリンや p53 及びその他の癌抑制・癌化・老化に關与するタンパク質間の相互作用のメカニズムを解明していく。現段階において、生細胞内における可視化解析のために、モータリンや p53 等相互作用の考えられるタンパク質を GRF(緑)、RFP(赤)、YFP(黄)等でプラスミド標識化、免疫染色のために、V5、myc、flag 等でエピトープ標識化した。さらに、p53-GFP の欠失変異体を構築し、p53 のモータリン結合領域を明確にした。また、高解像度顕微鏡の開発のため、様々な情報源から得られた異なるカメラの特性の比較を試みた。高精細型プロトタイプ機のカメラ、並びに共焦点スキャナユニットを用いて、蛍光標識化したヒト細胞固定サンプルの画像撮影を行った。撮影した写真の解像度は、従来型顕微鏡で撮影したものに比べ、極めて高いという結果を得た。現在、高精細型プロトタイプ機を用いて、生細胞におけるモータリン-RFP 及び p53-GFP 間の相互作用の観察を開始している。今後、モータリンや p53、その他の癌抑制遺伝子や発癌遺伝子の相互作用が細胞周期でどのように変化するか、リアルタイムで観察し、解析していく。この相互作用が癌治療における詳細な時間及び段階を標的化することができると期待している。さらに、これらの知見及びアンチセンス技術に基づき、結合パートナーを標的化し、その相互作用の変化についても観察する。例えば、癌抑制タンパク質 p53 をモータリンから自由にするにより、細胞死や増殖抑制のシグナルが癌細胞へ伝達されることも考えられるため、この研究の成果は、化学療法抗癌剤のドラッグデザインへと展開する可能性が高く、バイオ産業の発展に有用である。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済、または査読済を対象。)

1. Wadhwa, R., Yaguchi, T., Hasan, M. K., Sugihara, T., Taira, K., and Kaul, S. C. Mortalin –MPD (mevalonate pyrophosphate decarboxylase) interactions and their role in control of cellular proliferation. *BBRC*. 302:735-742, 2003.
2. Wadhwa, R., Sugihara, T., Hasan, M. K., Duncan E.L., Taira, K. and Kaul, S. C. A Novel putative

collaborator of p19^{ARF}. *Exp. Gerontol.* 38: 245-252, 2003.

3. Wadhwa, R., Hasan, M. K., and Kaul, S. C. Cellular Senescence Pathways in Mouse and Humans. S.C Kaul and R. Wadhwa, eds (Kulwer Academic Publishers), *Aging of Cells In and Outside the Body*, pp 225-238, 2003.

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

Hasan, M. K., Wadhwa, R., Yaguchi, T., Taira, K., and Kaul, S. C. (2003) ARF-independent function of CARF, collaborator of ARF. The American Society for Cell Biology. 43rd Annual Meeting, San Francisco, USA, December 13-17, 2003.

(3) 特許等の出願件数

なし