

先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業
「安定同位元素イメージング技術による産業イノベーション」利用成果報告書

北海道大学 創成研究機構長 殿

下記の通り、利用成果を報告します。

利用者名	株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング			
代表者	氏名	畠 賢一郎	役職	常務取締役 研究開発部長
	所属部署	研究開発部		
	所在地	〒443-0022 愛知県蒲郡市三谷北通 6 丁目 209 番地の 1		
	電話番号		FAX 番号	
	メール			
連絡担当者	氏名	同上	役職	
	所属部署			
	所在地	〒		
	電話番号		FAX 番号	
	メール			
利用課題名	内耳ギャップ結合複合体の分子イメージングによる遺伝性難聴の分子病態解析			
利用施設名	北海道大学 同位体顕微鏡システム			
利用期間	平成24年5月1日 ~ 平成25年3月31日			
	<input checked="" type="checkbox"/> 報告書公開の延期を希望する。(平成26年5月まで)			

● 利用成果

【利用の目的・内容】 異分野の方にも理解できるよう簡潔に記述してください。

遺伝性難聴は 2000 出生に一人と高頻度に発生し、現在世界で最も高頻度に検出されている原因遺伝子はコネキシン 26 (Cx26) をコードする GJB2 遺伝子である。複数のコネキシン分子で構成されるギャップ結合複合体は半減期が 1~2 時間と短く、短時間で起こる合成と崩壊の過程を分子イメージングできれば病態進行メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられる。本研究では難聴モデルマウス、Cx26 欠損マウスおよび Cx26 優性阻害変異導入マウスの蝸牛組織を用いてギャップ結合巨大分子複合体の形成過程および崩壊過程を詳細に解析する技術を構築することを目的とした。

【成果の概要】

本研究ではギャップ結合複合体の形成変化を解析するため、遺伝性難聴モデルマウス、Cx26 欠損マウス、Cx26 優性阻害変異導入マウスおよび正常マウスの蝸牛組織を摘出し、組織培養用培地に器官培養を行った。Cx26 のアミノ酸組成では、フェニルアラニンが豊富に存在するため、培地に窒素安定同位体 (^{15}N) で標識したフェニルアラニンを添加した。その 17 時間後に蝸牛組織を固定処理し、同位体顕微鏡観察によりギャップ結合の形成及び崩壊過程を解析した。解析用の蝸牛サンプルは、①蝸牛コルチ器の有毛細胞周辺を上皮に対して水平に薄切した凍結切片、および②シリコンウェーハに直接接着させた蝸牛組織 (蝸牛ホルマウント)、の二種類を比較検討した。いずれのサンプルにおいても細胞に ^{14}N との比較により、細胞内に取り込まれたと思われる ^{15}N を検出することが可能であった。細胞形状の認識に関しては凍結切片が蝸牛ホルマウントに比べて優れていた。また同サンプルにおいて ^{31}P 、 ^{32}S 、 ^{12}C の検出も行い、細胞内局在の特定と新規合成タンパク質の検出が可能であった。

【社会・経済への波及効果の見通し】 研究成果によってもたらされる知的資産の形成、新技術の創製などを記述してください。

ギャップ結合複合体は多くの臓器において重要な機能的分子複合体であるが、単一分子での解析のみが進んでおり、複合体での形成や崩壊を解析することは困難であった。この巨大分子複合体の可視化技術が構築できれば様々な疾患 (心疾患、白内障、皮膚疾患) の病態メカニズムや薬剤効果を可視化でき、創薬スクリーニング等に応用可能と考えられる。

受付日	平成 26 年 7 月 31 日	受付者	阿部
-----	------------------	-----	----