10. キーワード

(1) 微小管	(2) チューブリン	(3)	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の計画通りには進展しなかった実験がいくつかある一方、計画を見直し当初予定になかった実験を行ったことでむしろ計画より明らかな結論を得るに至った実験もあることから、全体を通してみればおおむね順調に進展しているといえる。チューブリン精製の実験については試行錯誤の連続であった。まず変異チューブリンを発現させる培養細胞の選択に試行錯誤があった。当初形質転換が容易であることからAlex培養細胞の利用を検討していたが、チューブリンが十分量精製できなかったことから、チューブリン収量に優れるMM2d培養細胞を用いた。しかしながら逆に形質転換に難があり、最終的に高チューブリン収量、高形質転換効率の両方を満たす細胞としてT87培養細胞を採用するに至った。チューブリンの精製タグについても試行錯誤を重ね、当初計画したc-mycタグでは非変性条件下でチューブリンを回収することが結局できず、断念せざるを得なかった。しかしながら、これらの試行錯誤の結果、T87培養細胞にてHisタグ挿入型のチューブリンを発現させることで、それほどの手間をかけずに特定のチューブリン分子の精製を行う手法が確立された。

DCXの実験については、当初ねじれ植物内でDCXをGFP融合タンパク質として発現させ、in vivoにおけるDCX-GFPの微小管上への結合性を評価する計画であったが、これについてはまず微小管をmCherry-TUBで可視化し、さらにそこにDCX-GFPを導入する必要があり、年度末によやく種子の回収をみた。一方で細胞膜ゴーストの実験は当初計画にはなかったが、ねじれ変異体にmCherry-TUB遺伝子を導入した時点で早々に実行可能であり、簡便な系であることから明らかな結果が得られる可能性が高いと判断し挑戦した。これによりin vivo解析の遅れを補って余りある成果が得られた。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

平成27年度については当初の計画に基づき、変異型チューブリンの大量精製と、それを用いたin vitro微小管重合解析を行う。チューブリンの大量精製はまだ全ての変異体について完了していないので、引き続きこれを行う。その後、変異型チューブリンを一定量含むチューブリンをin vitroで重合させ、できた微小管の微細構造を電子顕微鏡観察する計画である。原繊維数への知見を得るため微小管の断面を観察する。急速凍結-凍結置換法により固定、樹脂包埋し、超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡により観察する予定である。続いて微小管をそのままクライオ電子顕微鏡法で観察し、側面の微細構造を観察することで変異チューブリンを含む微小管が構造的に歪んでいないか詳細に調べる。一方、変異型チューブリンが重合し微小管となる過程を動的に観察するため、全反射顕微鏡上でその重合のダイナミクスを計測する。

DCXの実験については平成26年度に完了しなかったin vivo観察を行う予定である。細胞膜ゴーストを用いた実験ですでに明らかになったように、一部の變異体ではDCX-GFPが微小管に結合しない、すなわち微小管の原繊維数に異常がある可能性が考えられるので、これらの変異体については特に重点的にin vivoでのDCX-GFPの局在性を精査する方針である。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

変異型チューブリン精製の手法を確立するまでの過程で多くの試行錯誤があったため、当初計画したように平成26年度内に全ての變異型チューブリンの大量精製を完了するに至らなかった。これに伴い、チューブリン精製カラム作製や、精製作業そのものによる各種消耗品の購入が平成27年度にずれこんだこと、またこの遅れにともない当初予定した国際学会への参加を見合わせたことにより次年度使用額が発生した。

(使用計画)

計画した全ての變異型チューブリンの精製については平成27年度の計画実行にあたっては不可欠であることから、急ぎ完了を目指す。今回生じた次年度使用額についてはこれらの実験に必要な消耗品、試薬の購入に充てられる。

13. 研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件 うち査読付論文 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	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

(学会発表) 計(1)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
堀田 崇、橋本 隆		TOGカラムを用いた植物培養細胞からのチューブリン精製	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第56回日本植物生理学会年会	2015年03月16日～2015年03月18日	東京農業大学世田谷キャンパス(東京都)	

(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

--