

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2019年 5月 13日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 京都大学大学院生命科学研究所 生体制御学分野

職 名 CREST特定助教

氏 名 佐藤 慎哉

助 成 の 種 類	平成30年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	マウス錐体視細胞の生体機能イメージング系確立と新規シグナル伝達制御機構の同定			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	(該当なし)			
助成金充当に関 わる共同研究者	(該当なし)			
発表学会文献等	<p>学会発表</p> <p>1) Sato S. My 7-year PhD study, in 30 min. Cell Biology, Developmental Biology and Systems Biology Course, and Faculty of Biostudy Annual Retreat (Cottage Biwako Club, Shiga, Japan), 2019.1.27 口頭発表(英語)</p> <p>2) Sato S and Matsuda M. Single-cell kinase activity measurements from the mouse retina by two-photon ex vivo live imaging. International Meeting on Bioimaging for Young Researchers Chanpuru (Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST), Okinawa, Japan), 2018.10.29 ポスター発表</p> <p>3) 佐藤慎哉、松田道行 Single-cell kinase activity measurements of the mouse retina by two-photon ex vivo imaging. (邦題: 二光子顕微鏡によるマウス単離網膜での一細胞キナーゼ活性測定) 第56回日本生物物理学会年会(岡山) 2018.9.16 口頭発表(英語)</p> <p>4) 佐藤慎哉、松田道行 二光子顕微鏡によるマウス単離網膜での一細胞キナーゼ活性測定 日本動物学会第89回札幌大会(札幌) 2018.9.13 ポスター発表(胆振東部地震により開催中止、要旨Web公開にて発表扱い、2018.12.9の代替イベント(東京)でポスター発表)</p> <p>5) 佐藤慎哉、松田道行 多光子顕微鏡を用いた単離網膜ライブイメージング法で観測したマウス桿体視細胞におけるProtein kinase A の活性変化 視覚科学フォーラム2018 第22回研究会(茨木) 2018.9.6 口頭発表(優秀発表賞を受賞)</p> <p>論文発表 (該当なし)</p>			
成果の概要	別紙に記す。			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		研究試薬	180,000	
	研究機器	820,000		
当財団の助成につ いて	<p>今後も当研究助成を末永く続けて頂けると幸いです。私の場合では、留学からの帰国直後で最初の科研費申請が不採択となり、研究の遂行がとてつもない困難な状況となっておりましたが、当助成金のおかげで非常に貴重な予備的なデータを多数取得し、今年度の科研費の獲得に至り、それだけではなく得られたデータだけで論文執筆が可能な段階まで研究を進めることができました。今後も京都大学に集まってくる若く才能を持つ研究者にご支援をどうぞよろしくお願い申し上げます。</p>			

京都大学教育研究振興財団助成事業 平成 30 年度・研究活動推進助成
成果概要報告書 佐藤慎哉

研究内容

キナーゼ活性を可視化する人工タンパク質、FRET バイオセンサーを全身で発現する遺伝子組換えマウスを用いて、網膜内のキナーゼ活性を二光子蛍光ライブイメージング法によって可視化する実験系を確立することを第一の研究目標とした。そして、確立した手法を用いて網膜内の新規シグナル伝達制御機構を同定することを第二の研究目標とした。

研究成果

上記両方の目標を達成した。第一の目標であるイメージング法の確立に関しては、既報を参考に網膜を灌流培養下で顕微鏡観察する手法を検討し、少なくとも 12 時間以上の間、網膜のキナーゼ活性をイメージングできる系を確立した。検討においては、当助成金で購入させていただいた試薬と機器を用いて、培地の種類、培地の pH 管理、網膜試料付近の培地温度管理、培養チャンバーの形状、培地の注入・排出法の最適化を行った。

第二の目標である新規シグナル伝達制御機構の同定に関しては、光依存的、視細胞特異的な Protein kinase A の活性制御機構を同定した。同定に当たっては、当助成金で購入させていただいた部品を使用して、網膜を局所的に光刺激する LED 装置を作製した。そして、いくつかのキナーゼ活性について光応答性の検討を行った結果、Protein kinase A (PKA) の活性が光に反応して視細胞特異的に活性を大きく変化させることを見出した (PKA 光応答)。この活性変化は、二種類の視細胞、桿体視細胞と錐体視細胞を比較すると、特に桿体で強く生じる事が分かった。さらに、非常に興味深いことに、黒毛のマウスと白毛 (アルビノ) のマウスを比較すると、黒毛のマウスでは光 OFF に反応した PKA 活性化が観測され、アルビノでは光 ON に反応した PKA 抑制という真逆の変化が観測された。また、これらの成果を発表した視覚科学フォーラム 第 22 回研究会で優秀発表賞を獲得した。

今後の見通し

まず、これまでの研究成果の論文発表を 2019 年中に行うことを予定し、現在原稿を作成している。米国で関連の研究を行う研究者と連絡をとっており、同時発表、あるいは国際共同研究にすることを考えている。

次に、イメージング法については、これまで技術難易度の低い単離網膜の手法を追求してきたが、PKA 光応答が真に生理的に重要な現象か検討するには、生きた動物から直接観測することが重要となる。そこで今後は、生体内イメージング法確立にも注力していきたい。そのためにマウス頭部固定具などを、当助成金で購入させていただいた。

最後に、PKA 光応答の分子メカニズムと生理的な意義を追求したい。特に分子メカニズムについては、アルビノと黒毛の間で顕著な差異が見られたので、アルビノで欠損するチロシナーゼという酵素とその代謝物、特にドパミンの関与を疑っている。そこで、当助成金で購入したドパミン受容体に作用する試薬を用いた薬理学的な検討を進めていきたい。