

ISSN 2186-5507

京都産業大学総合生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences
Kyoto Sangyo University



《第1号》

2010
平成22年

目 次

巻頭言	1
研究室メンバー・事務室スタッフ一覧・全学委員会委員一覧	3
平成22年活動記録	
生命システム学科	
永田和宏 教授 (学部長)	5
嶋本伸雄 教授 (副学部長)	10
中田博 教授 (学科主任)	13
黒坂光 教授 (副学科主任)	16
板野直樹 教授	19
佐藤賢一 教授	22
瀬尾美鈴 教授	25
中村暢宏 教授	29
浜千尋 教授	31
福井成行 教授	34
横山謙 教授	36
伊藤維昭 客員教授	38
八杉貞雄 客員教授	41
吉田賢右 客員教授	45
生命資源環境学科	
山岸博 教授 (学科主任)	49
野村哲郎 教授 (副学科主任)	51
津下英明 教授	53
寺地徹 教授	56
米澤勝衛 教授	60
金子貴一 准教授	63
河邊昭 准教授	66
木村成介 准教授	68
高橋純一 准教授	70
本橋健 准教授	73
動物生命医科学科	
大槻公一 客員教授 (学科主任)	76
竹内実 教授 (副学科主任)	81
加藤啓子 教授	84
齋藤敏之 教授	87
前田秋彦 教授	89
松本耕三 教授	92
村田英雄 教授	94
高桑弘樹 准教授	96
西野佳以 准教授	98
今野兼次郎 助教	100
染谷梓 助教	102
棚橋靖行 助教	103
年報発刊にあたって～総合生命科学部事務室から～	105
セミナー等開催記録	106
新聞掲載記事	110

巻 頭 言

総合生命科学部長
永 田 和 宏

京都産業大学総合生命科学部は、平成22年4月からその活動を開始した。旧工学部生物工学科を改組し、新たに「生命システム学科」「生命資源環境学科」「動物生命医科学科」の3学科からなる、京都産業大学では8番目の学部である。

本学において「情報通信工学科」「生物工学科」の2学科からなる「工学部」が発足したのは平成元年のことであった。両学科とも当時の私学においては先見の明に富んだ画期的な学科であり、学部であった。それから20年余を経て、「情報通信工学科」が新たに「コンピュータ理工学部」として改組されたのを受け、旧「生物工学科」の改組が計られた。平成18年より諮問委員会が発足し、外部の諮問委員を交えて、時代の要請にあった新たな学部をどのように構築するのか、真摯な協議の場が数多く持たれ、現在の3学科からなる「総合生命学部」が設置されることとなった。

21世紀はまさに生命科学、ライフサイエンスの時代と言っても過言ではない。本学部ではそれら「生命科学」を「総合」的に、かつ多角的に教育・研究するため、3つの学科が相互補完的な役割と目的を担っている。「生命システム学科」では、生命現象をシステムとして統合的に捉えるため、分子、細胞、組織、個体レベルでの生命活動の分子的基盤を明らかにする。「生命資源環境学科」では、植物を含めた地球上の生命と環境とのインターフェイスに注目し、限りある生命資源の有効な活用を計るための基礎研究を行う。また「動物生命医科学科」では、個体レベルの生命現象として、動物の病態を理解することで、人獣共通感染症などヒトの病気の理解と治療へ役立てるための教育、研究を行う。

生命科学は未知の部分のほうが圧倒的に多い新しい分野である。生命現象は複雑であり、すでに膨大で多角的な知識体系が構築されてきたが、学生が卒業して社会でそれらの知識を役立てるためには、本当に基礎な知識を、総合的かつ統合的な価値観のもとに選択して理解・研究することが必須である。そこで、3つの学科の壁をできるだけ少なくして、学科に偏らない教育を行うことが、きわめて重要なこととなる。

私学においては、学生に優れた教育を保障することが、大学としての最重要の課題である。しかしながら、本学部は、教育だけを行っていて、

それで教員としての義務を全うしているとは考えない。良質の教育を行うことは必要条件ではあるが、十分条件ではない。大学という場における良い教育は、研究者としても優れた教員にしかできないと、私は考えている。研究者としても優れた業績を残せるような学部でありたいというのは、学部発足にあたっての希望であり、また大学からの要請でもあった。

そこで本学部においては、教員自らの自己評価、相互評価、客観評価の基礎資料として、毎年「年報」を出版することにした。どのような項目を網羅し、どのような形にするのかなどは「年報・評価委員会」の議論を経て、教授会で決定された。

本年は年報としては最初の年にあたり、慎重を期すために、出版が大幅に遅れた。次年度からは、4月上旬に出るよう努力したい。これらの資料は、本学部の教員だけではなく、他学部の教員、および本学部の大学院生、学生とも共有することになっている。一部は、他大学の分野の近い研究者にも送付する予定である。

発足して第一号である。種々、不行き届きの点、不備などもあるはず、お気づきの方があれば、ぜひご指摘、ご注意をいただければ幸いである。

総合生命科学部教員研究室一覧

学科	役職	職名	氏名	スタッフ等名簿				
				助教・講師	特定研究員 (PD)	特定研究員 (TR)	客員研究員	嘱託・契約職員
生命システム	学部長	教授	永田和宏	寶 関 淳	平山尚志郎 森戸大介 Chu Xiaqing	石田玉美		金森和美子 福田泰
	副学部長	教授	嶋本伸雄	中山秀喜	畠山明子		RajanBabu, Suganthan 高橋麻矢子	竹内実
	学科主任	教授	中田博	秋田宗薫 戸田宗豊		谷田周平	河野正孝	
	副学科主任	教授	黒坂光	中山喜明 中村直介			肥塚靖彦	
		教授	瀬尾美鈴				上野信洋	
		教授	福井成行					
		教授	佐藤賢一	ハサ AKM マフ				横山明子
		教授	板野直樹				中村武志	
		教授	中村暢宏					
		教授	浜千尋	中山実				
		教授	横山謙		岸川淳一			中西温子
		客員教授	伊藤維昭	千葉志信			潮田亮	
	客員教授	八杉貞雄	石井泰雄					
	客員教授	吉田賢右	元島史尋	寿野良二也 野島達也	元島優子	中村純治	石崎陽子 中嶋晶	
生命資源環境	学科主任	教授	山岸博	高橋亮	田中義行 安本景太			
	副学科主任	教授	野村哲郎				古高肇	
		教授	米澤勝衛					
		教授	寺地徹	高橋亮		辻村真衣子 吉見麻衣子	野添幹雄 山本真紀	富岡関子 植村香織 ギヤリヤフアラト 山下陽子
		教授	津下英明	鶴村俊治				
		准教授	金子貴一					
		准教授	河邊昭					
		准教授	木村成介				中山尚美 大庭伸也 竹内剛 清拓哉 内海俊介	
	准教授	高橋純一						
	准教授	本橋健	桶川友季					
動物生命医科	学科主任	客員教授	大槻公一					
	副学科主任	教授	竹内実				佐倉正明 松田修	
		教授	松本耕三					
		教授	加藤啓子					西畚大貴
		教授	齋藤敏之					
		教授	前田秋彦					
		教授	村田英雄					
		准教授	高桑弘樹					
		准教授	西野佳以					
		助教	今野兼次郎					
	助教	染谷梓						
	助教	棚橋靖行						

分子細胞生物学研究室

Laboratory of Molecular and Cellular Biology

教授 永田 和宏

Prof. Kazuhiro Nagata, Ph.D

助教 寶関 淳

Assist. Prof. Jun Hoseki, Ph.D



1. 研究概要

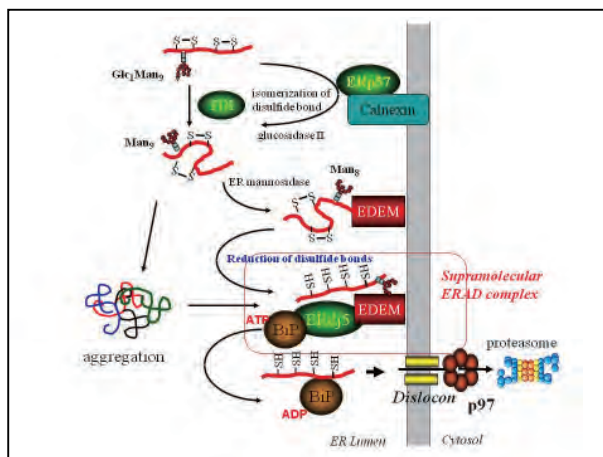
分子細胞生物学研究室では、「タンパク質の一生」を大きな研究の枠として設定し、その誕生から死までのメカニズムを中心に、中でも、特に「分子シャペロンによるフォールディングと細胞機能制御」および「タンパク質品質管理機構」に焦点をあてて研究を進めている。

タンパク質は正しく合成され、正しい構造をとって初めて本来の機能を発揮するが、それには種々の分子シャペロンが重要な働きをしている。またいったん正しい機能を獲得したタンパク質も、細胞に不断にかかる種々のストレスによって変性したり、遺伝的変異によってどうしても正しい構造をとれないタンパク質も存在する。このようないわゆる「不良タンパク質」は、単に機能を持たないだけでなく、細胞毒性によって細胞死を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の神経変性疾患の原因ともなっている。従って、タンパク質を正しく合成する productive folding と、ミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための品質管理機構とをともどもに研究することは、タンパク質動態の恒常性、細胞レベルでの生命システムの恒常性の維持という観点からは、必須の研究領域である。

本研究分野では具体的に次の諸点について研究を展開している。

1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

コラーゲン合成においてコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 は必須の役割を果たしている。ノックアウトマウスなどを駆使して、本研究室で発見した Hsp47 の機能解析を行う。



2) 小胞体関連分解に関与する新規タンパク質群の機能解析

小胞体でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ逆輸送されてからユビキチンプロテアソーム系によって分解される(ERAD)。この過程で重要な役割を果たす EDEM および ERdj5 という分子を発見した。これらの機能解析を行い、小胞体関連分解機構の全貌を明らかにする。

3) タンパク質品質管理における小胞体レドックスネットワークの意義

小胞体におけるジスルフィド結合の形成、解離は、タンパク質品質管理においてきわめて重要な反応である。小胞体における酸化還元に関わる分子群の網羅的解析を通じて、品質管理に重要なオキシドレダクターゼの機能を解明する。

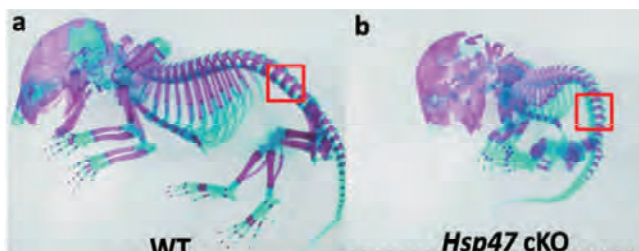
4) オルガネラ横断品質管理機構の分子機構

核において変性したタンパク質は核内のユビキチンプロテアソーム系によって分解処理されると長い間信じられてきた。本研究室で最近発見した Ubin および Post という2つの新規因子によって、核内のミスフォールドタンパク質もサイトゾルへ逆輸送されて分解される可能性が示唆された。この分子機構を解明する。

2. 本年度の研究成果

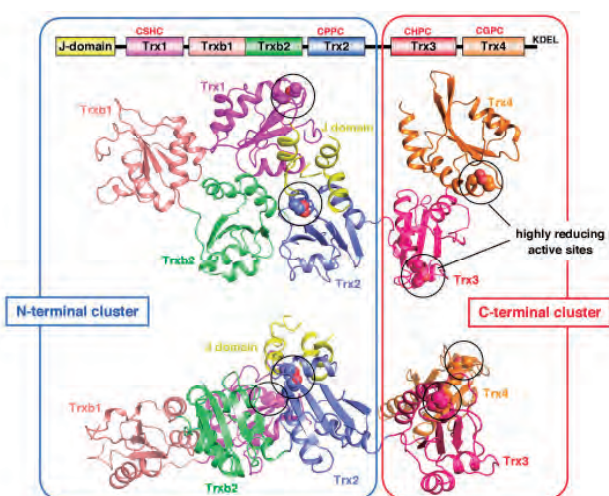
1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

Hsp47 の機能を特定するため、マウスにおけるコンディショナルノックアウト(cKO)を試み、軟骨細胞特異的に Hsp47 をノックアウトすることに成功した。cKOマウスは、誕生直後に死亡し、体躯、手肢の形成不全、軟骨形成不全など、II型コラーゲンの関与する組織に典型的な異常を示した。これらのことから、Hsp47が従来我々が明らかにしてきた、I型およびIV型コラーゲンの分子成熟に必要なだけでなく、II型コラーゲンの分子成熟にも必須の分子シャペロンとして働いていることが明らかになった。



2) 小胞体関連分解に関与する新規タンパク質群の機能解析

EDEM1と強調して働き、ミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元開裂し、ERADを促進する還元酵素ERdj5に関して、X線結晶解析を行った。2.5 Åの解像度で構造を解くことに成功し、ERdj5が従来予想していた4つのチオレドキシンドメインの他に、2個の酵素活性を持たないチオレドキシンドメインを持つこと、C末端側の2個のチオレドキシンドメインにERAD促進活性があることなどを明らかにし、種々の生化学的解析と併せて、糖タンパク質ERADの基質の流れを明らかにした。



3) タンパク質品質管理における小胞体レドックスネットワークの意義

小胞体には20種類を越えるオキシドレダクターゼ（酸化還元酵素）が存在する。それぞれのオキシドレダクターゼにタグを付け、免疫沈降によって結合してくるタンパク質を質量分析によって網羅的に解析した。興味深いネットワーク形成を確認し、その詳細な解析を行っている。

4) オルガネラ横断品質管理機構の分子機構

核においてミスフォールドし、ユビキチン化されたタンパク質が我々の研究室で発見した新規因子 UBIN とPOSTによってサイトゾルに輸送され、プロテアソームによって分解処理される可能性を示すことができた。これは従来の核内のタンパク質品質管理にまったく新しい概念を持ちこむものであり、今後の発展に期待をしている。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the productive folding of nascent polypeptides by molecular chaperones and protein quality control mechanism for misfolded proteins within the cells. Particularly, we have been devoted our activity on the following three major research projects:

1: Functional analysis of collagen-specific molecular chaperone Hsp47. We have succeeded in establishing conditional knockout mice in which hsp47 gene is specifically deleted in the cartilage. Mice died just after birth with apparent abnormality in the lack of arms and legs. Chondrogenic bone formation was severely impaired in these mice due to the failure of molecular maturation of type II collagen in the cartilage. These results suggest Hsp47 plays essential role in type II collagen maturation as a chaperone in addition to types I and IV collagens.

2: Analysis of molecular mechanism of ER-associated degradation. We previously found EDEM1 molecule (EMBO Rep., 2001, Science 2003), which recognizes misfolded proteins through mannose-trimming of their N-glycans and segregates them from productive folding pathway to degradation pathway, so called ER-associated degradation (ERAD). We also found a novel ER-resident reductase ERdj5 (Science 2008), which associates with EDEM1 and reductively cleaves the disulfide bonds of misfolded proteins to facilitate the ERAD. We succeeded to solve the crystal structure of ERdj5 this year at 2.5 Å resolution. After extensive biochemical experiments, we established the substrate transfer pathway for glycoprotein ERAD, and this figure was adopted as a cover of Molecular Cell.

3. Analysis of ER redox networks in the ER quality control system. More than 20 oxidoreductases have been reported in the mammalian ER most of which contain thioredoxin domains with CXXC motifs for their enzymatic activity. We performed the interactome analysis by cloning all of them, making CXXA mutant of each proteins to stabilize the interaction with downstream proteins, transfecting them and immunoprecipitating the associated proteins followed by identification by mass spectroscopic analysis. We are now analyzing the detailed features of these thousands of interactions.

4. Analysis of trans-organelle quality control mechanism. We cloned novel two proteins, UBIN and POST, involved in the quality control of proteins misfolded within the nucleus. In general, nuclearly misfolded proteins have been thought to be degraded in the nucleus, because nucleus have both ubiquitin lygase and proteasomes. However, we have got the evidence that some aggregation-prone proteins misfolded in the nucleus are ubiquitinated in the nucleus and exported to the cytosol with the aid of UBIN and POST for the degradation by cytosolic proteasomes. This study is now undergoing.

4. 発表論文

- M. Hagiwara, K. Maegawa, M. Suzuki, R. Ushioda, K. Araki, Y. Matsumoto, J. Hoseki, K. Nagata and K. Inaba: Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol. Cell* in press
- K. Araki and K. Nagata : Functional in vitro analysis of ERO1 and protein-disulfide isomerase (PDI) pathway. *J. Biol. Chem.* in press
- Y. Masago, A. Hosoya, S. Kawano, A. Nasu, J. Toguchida, K. Fujita, H. Nakamura, G. Kondoh and K. Nagata : Molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J. Cell Sci.* in press
- W. Liu, D. Morito, (18 名省略), K. Nagata, N. Hashimoto and A. Koizumi : Identification of RNF213 as a Susceptibility Gene for Moyamoya Disease and Its Possible Role in Vascular Development. *Plos one* in press
- N. Yamagishi , M. Yokota , K. Yasuda , Y. Saito , K. Nagata and T. Hatayama : Characterization of stress sensitivity and chaperone activity of Hsp105 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* in press
- Y. Iida, T. Fujimori, K. Okawa, K. Nagata, I. Wada, & N. Hosokawa: SEL1L critically determines the stability of the HRD1-SEL1L ERAD complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates *JBC* in press
- H. Kitamura, S. Yamamoto, H. Nakase, Y. Honzawa, K. Matsumura, Y. Takeda, N. Uza, K. Nagata and T. Chiba: Role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun.* in press
- D. Hasegawa, R. Fujii, (12名省略), K. Nagata, H. Senoo, S.L. Friedman, K. Nishioka, Y. Yamano, F. Itoh, T. Nakajima: E3 ubiquitin ligase Synoviolin is involved in liver fibrogenesis. *Plos one* 5(10):e13590 (2010)
- J. Hoseki, H. Sasakawa, Y. Yamaguchi, M. Maeda, H. Kubota, K. Kato and K. Nagata: Solution structure and dynamics of mouse ARMET. *FEBS Lett.* 584:1536-1542 (2010)
- Y. Sugiura, K. Araki, S. Iemura, T. Natsume, J. Hoseki and K. Nagata: The novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *J. Biol. Chem.* 285(10):7135-7142 (2010)
- Y. Honzawa , H. Nakase, Y. Takeda, K. Nagata and T. Chiba: Heat shock protein 47 can be a new target molecule for intestinal fibrosis related to inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 16(12):2004-2006 (2010)
- N. Hosokawa, L.O. Tremblay, B. Sleno, Y. Kamiya, I. Wada, K. Nagata, K. Kato and A. Herscovics: EDEM1 accelerates the trimming of α 1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans.

Glycobiology 20(5):567-575 (2010)

- J. Hoseki, R. Ushioda and K. Nagata: Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Biochem.* 147: 19-25 (2010)

5. 著書および総説

- K. Araki and K. Nagata : Protein Folding and Quality Control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* in press
- R. Ushioda, K. Nagata : The Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Disulfide Reductase ERdj5. *Methods Enzymol.* in press
- Y. Ishida and K. Nagata : Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone. *Methods Enzymol.* in press
- H. Kubota, A. Kitamura and K. Nagata : Analyzing the aggregation of polyglutamine-expansion proteins and its modulation by molecular chaperones. *Methods* in press
- 永田和宏 : ストレス応答戦略の多様性。世界思想 2010 春 37 号 44-48 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

- K Araki, R. Ushioda, J. Hoseki and K. Nagata: Quality control & Redox regulatory network. Gordon Research Conference, Lucca (Italy), 2010.5.11
- Kazuhiro Nagata: Regulation of electron transfer networks among endoplasmic reticulum oxidoreductases. The 8th International Workshop for CSSI, South Korea, 2010.6.2
- 永田和宏 : 細胞内タンパク質品質管理機構. 京都産業大学総合生命科学部バイオフィオーラム、京都市、2010.7.5
- 永田和宏 : コラーゲン分子成熟と小胞体タンパク質品質管理機構、関西医科大学大学院企画セミナー「Cell Biology から再生医療まで」、守口市、2010.9.10
- K. Nagata: Regulation in the electron transfer cascade among the oxidoreductases in the endoplasmic reticulum. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, 2010.9.14
- 永田和宏 : 特別講演「タンパク質の一生と品質管理機構」、杏林予防医学研究所、第5回分子整合医学指導者のためのセミナー、京都市、2010.9.19
- 永田和宏 : タンパク質品質管理機構. 第4回形態科学シンポジウム (日本学術会議主催)、札幌市、2010.11.4

7. 学会発表

- J. Hoseki and K. Nagata : Reduction mechanism of the ERAD enhancing disulfide reductase, ERdj5. Gordon Research Conference, Lucca (Italy), 2010.5.9-14
- 森戸大介、劉万洋、山崎悟、人見敏明、小林果、松浦範夫、 著方宏州、原田浩二、高島成二、宮本亨、橋本信夫、小泉昭夫、

- 永田和宏：新規巨大 ATP アーゼ/ユビキチンリガーゼ Mysterin は血管新生を制御し、モヤモヤ病（ウイリス動脈輪閉塞症）に関与する。第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪市、2010.5.19-21
- 新木和孝、家村俊一郎、David Ron、夏目徹、永田和宏：小胞体酸化還元酵素の制御機構の解析、第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪市、2010.5.19-21
- 垣花太一、S. Vavassori、新木和孝、家村俊一郎、夏目徹、R. Sitia、永田和宏：ERp44 はペルオキシレドキシン 4 と結合し分泌を制御する。第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪市、2010.5.21
- 潮田亮、永田和宏：ジスルフィド還元酵素 ERdj5 を介した小胞体関連分解。」第 2 回高遠シンポジウム、伊那市、2010.8.19-20
- J. Hoseki and K. Nagata : Glutathione is Required for Activation of the ERAD Enhancing Disulfide Reductase, ERdj5. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- D. Morito, W. Liu, S. Yamazaki, T. Hitomi, H. Kobayashi, N. Matsuura, H. Hashikata, K. Harada, S. Takashima, S. Miyamoto, N. Hashimoto, K. Nagata and Akio Koizumi: Novel ATPase/ubiquitin ligase Mysterin is responsible for familial Moyamoya disease and is involved in proper angiogenesis. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- R. Ushioda, J. Hoseki and K. Nagata: Two distinct pathways for recruitment of misfolded proteins to ERdj5. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- Y. Sugiura, K. Araki, S. Iemura, T. Natsume, J. Hoseki and K. Nagata: The novel thioredoxin-related transmembrane protein 4 works as a reductase in the endoplasmic reticulum. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- M. Hagiwara, K. Maegawa, M. Suzuki, R. Ushioda, K. Araki, Y. Matsumoto, J. Hoseki, K. Inaba and K. Nagata: The role of ERdj5 in glycoprotein ERAD pathway. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- T. Kakahana, S. Vavassori, K. Araki, S. Iemura, T. Natume, R. Sitia and K. Nagata: The novel mechanism for localization of antioxidative enzyme Peroxiredoxin-4 (Prx4) in the ER. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- N. Hosokawa, Y. Iida, K. Okawa, K. Nagata : Formation of HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex that regulates the mammalian ERAD. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Kato, K. Nagata and N. Hosokawa : Functional analysis of a mammalian lectin XTP3-B in the endoplasmic reticulum quality control. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16
- 杉浦仁美：チオレドキシシン様ドメインを持つ小胞体膜タンパク質 TMX4 は還元酵素として機能する。第 5 回臨床ストレス応答学会大会、徳島市、2010.11.19-20
- Y. Sugiura, K. Araki, S. Iemura, T. Matsume, J. Hoseki, K. Nagata : The Nobel thioredoxin-related transmembrane protein 4 works as a reductase in the endoplasmic reticulum. 第 3 3 回日本分子生物学会年会、第 8 3 回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10
- T. Kakahana, S. Vavassori, K. Araki, S. Iemura, T. Natsume, R. Sitia, K. Nagata : The novel mechanism for localization of antioxidative enzyme Peroxiredoxin-4(Prx4) in the ER. 第 3 3 回日本分子生物学会年会、第 8 3 回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10
- T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Kato, K. Nagata, N. Hosokawa : Functional analysis of a mammalian lectin XTP3-B in the endoplasmic reticulum quality control. 第 3 3 回日本分子生物学会年会、第 8 3 回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10
- 北村朗、稲田のりこ、久保田広志、松本弦、永田和宏、金城政孝：筋委縮性側索硬化症を引き起こす原因タンパク質の脱凝集過程と細胞毒性の関係性。第 3 3 回日本分子生物学会年会、第 8 3 回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

8. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・学術創成研究

課題名：タンパク質品質管理機構

研究代表者：永田和宏、取得年度：H19-23 年(5 年)

科学研究費補助金・特定領域研究「タンパク質の社会」

課題名：小胞体におけるタンパク質品質管理機構

計画班研究代表者：永田和宏、取得年度：H19-23 年(5 年)

戦略的国際科学技術協力推進事業・日本(JST)ー南ア(NRF)研究

交流、課題名：熱帯マラリア原虫 Plasmodium falciparum) の

小胞体に局在する Hsp40 シャペロン Pfj2 の機能解析

研究代表者：永田和宏、取得年度：H21-23 年(3 年)

科学研究費補助金・学術創成研究

課題名：タンパク質品質管理機構

研究分担者：竇関淳、取得年度：H22-23 年(2 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：チオレドキシシン様ドメインを持つ小胞体膜タンパク質の機能解析

研究代表者：杉浦仁美、取得年度：H22-23 年(2 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 は軟骨形成、
内軟骨性骨化に重要である

研究代表者：真砂有作、取得年度：H22-23年(2年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

永田和宏：科学研究費委員会専門委員（主査）

永田和宏：「最先端・次世代研究開発支援プログラム」審査委員
会委員（主査）

永田和宏：科学研究費補助金における評価に関する委員会
（がん領域評価委員会）審査委員

永田和宏：科学研究費補助金評価（審査）委員

永田和宏：日本学会会議（細胞生物学）連携会員

永田和宏：科研費特定領域研究「タンパク質分解による細胞・
個体機能の制御」（水島班）外部評価委員

永田和宏：科研費新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」
（吉森班）評価委員

永田和宏：ロレアル-ユネスコ女性科学者日本奨励賞 審査員

永田和宏：京都大学大学院生命科学研究科 非常勤講師

永田和宏：秋田大学工学資源学部 非常勤講師

永田和宏：放送大学 非常勤講師

4) 受賞等 なし

5) その他 研究室メンバーの写真



ナノバイオロジー研究室

Laboratory of Nanobiology

教授 嶋本 伸雄

Professor Nobuo Shimamoto

助教 中山 秀喜

Ass. Professor Hideki Nakayama



1. 研究概要

分子生物学では、生体の働きを、タンパク質などで出来た微小な機械の働きとして理解する。この分子の機械の大きさは、1-100nm で、転写、複製、翻訳、輸送、情報伝等を担っている。これらの分子機械の作用機構は、分子機械の動きや形の変化として理解することがナノバイオロジーである。走査プローブ顕微鏡、新光学技術、ナノ操作技術の発展により可能になった。本研究室は遺伝子発現、特に翻訳のナノバイオロジーを研究している。本年は、ナノバクテリオロジーの確立を目指した。

1) 大腸菌の増殖期 ECM と微小細胞の発見

大腸菌は、性質が均一な独立細胞として増殖し、定常期でのみ biofilm という Extracellular Matrix (ECM) 内で生存するとされていた。これらの結論は、主に光学顕微鏡による観察から得られていた。細胞固定や重金属染色を行い SEM による細胞像も得られていた。しかしそのような方法では、光学顕微鏡の古典的分解能以下のものや、洗浄で除かれるものはこれまで無視されていた。

そこで、洗浄を SEM 観察に必須な脱塩だけを行い、filter にトラップし、最も低温で真空中蒸着が可能な Os 用いた観察で新構造体を研究した。

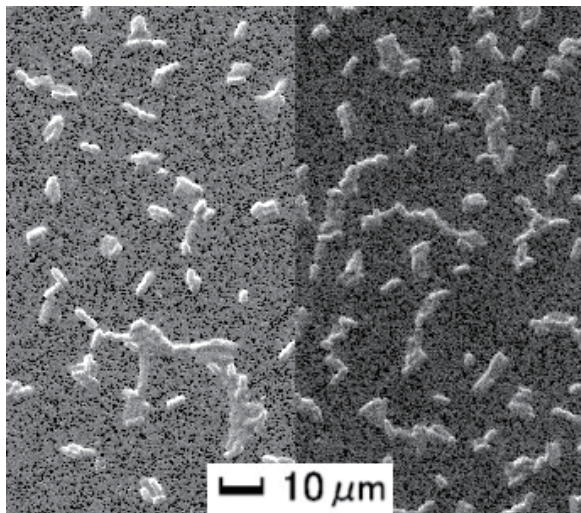


図1 野生株大腸菌 W3110(左)と MG1655(右)の新発見 ECM によりクラスターを形成した増殖期の細胞

2) tmRNA の新機能の発見

tmRNA は、傷ついた mRNA やアミノ酸飢餓によって翻訳が阻害されたときに、alanyl-tRNA として、ペプチド鎖を伸長し、次に自身が mRNA としてアミノ酸への分解を指令するペプチド配列を付加し、翻訳を終結する。細菌界に保存された、真核のコピキチンとオートファジーに対応する重要機能を司る分子である。しかし、tmRNA の欠失が大腸菌にもたらす表現型はほとんど無いという矛盾が存在していた。

2. 本年度の研究成果

1) 2つの新構造体の発見が有った。第一は、標準の増殖条件、L 培地、温度 37° C で、野生株とされる W3110 や MG1655 は、増殖期・定常期を問わず、ECM は存在するという発見である。ECM で複数の菌体が接触しているものは 12 時間で最小になる(半数)。その後 ECM で連結した菌のクラスターは大きくなる。この、特に 12 時間以前の ECM は、洗浄すると観測されなくなった。

第二の発見は、長径が 0.5-1 μm の微小な細胞様構造体(小胞と略)の発見である。小胞も全ての時期に存在し、定常期中期に増大する。この時には、DNA 合成は停止しており、これらの小胞の一部は、完全なゲノムを収納する体積が無く、DNA がはみ出している細胞の像が得られた。また、これは、大腸菌が定常期にも分裂を停止せず小胞という死細胞を生み出していることを示している。つまり、大腸菌の定常期は、活動が停止した stationary ではなく、生細胞が一定の steady であり、酵母の定常期と類似して居ることが判明した。

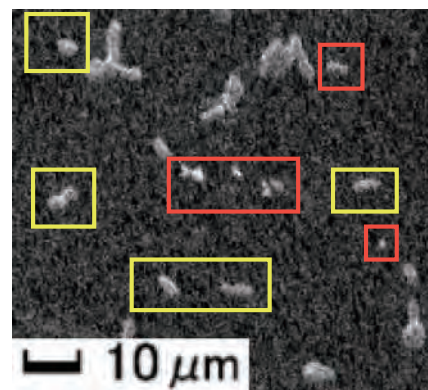


図2 W3110 に見られる、標準的な大きさの大腸菌(黄枠)とそれより小さい小胞(赤枠)

2) tmRNA の欠損株 (Δ ssrA) の表現型を新しい知見をもとに再解析すると、光学顕微鏡でも、SEM でも、野生株に比べて、定常期に小胞の割合が多く、正常な大きさの細胞が有意に減少していた。 Δ ssrA の小胞は定常期で増え続けたが、野生株では正常な大きさの細胞と同様一定値を保った。さらに、対数増殖期後期から Δ ssrA の生存率低下が始まり定常期中期では 10%程度になることが発見された。

また、 Δ ssrA からさらに tmRNA に関わるペプチダーゼを欠失させると、致死になるだけでなく、培養条件を変えると、致死にならなくなるという興味深い変異株を得た。この株を用いると、大腸菌が germ line とそれに栄養を供給する cell とに分化することを証明できる可能性を得た。このように、大腸菌の増殖や生存に関わる新概念が得られつつある。

3. Research projects and annual reports

Nobuo Shimamoto and Dr. Hideki Nakayama, are now interested in rewriting the conventional view of the survival strategy of bacteria by using the newest tools of nano-manipulation in combination with genetics. Bacteria such as *E. coli* have been believed as a simplest creature which grow as isolated cells which have the same characteristics. Cell division is supposed to be stopped in stationary state. The cell-cell communication and cell differentiation of bacteria have been believed be exceptional. We are challenging to these long-standing hypotheses by introducing new nano-techniques.

Elongation of peptide is catalyzed by 70S ribosome, while translation initiation takes place in the form of dissociated sub-particles, 30S and 50S. Therefore, the cycle should involve dissociation of 70S and dissociation of mRNA from ribosome. A long-standing contradiction is which dissociate first. Our results showed that 70S dissociates earlier than the dissociation of mRNA in the regular cycle. We also clarified the mechanism of hibernation of ribosome in stationary state.

We also found that the order of dissociation is reversed, if tmRNA is present. The tmRNA, in combination several peptidases and SmpB, is the prokaryotic counterpart of the ubiquitin degradation machinery in eukaryote. Irrespective of this important role of tmRNA, the mutant lacking tmRNA gene (Δ tmRNA) has been reported to show little phenotype.

Our new SEM technique enabled us to detect the variety of cell shapes and ECM-mediated clustering of cells. Applying these new technique, we found distinct phenotype of Δ tmRNA. By constructing more than 40 related single, double, and triple mutants, we also found a new physiological role of tmRNA. We are opening a new bacteriology of *E. coli*

involving the cell-cell communication for adaptation to nutrient deficient, and cell differentiation.

4. 発表論文

Imashimizu M, Tanaka K, [Shimamoto N](#), Comparative study of cyanobacterial and *E. coli* RNA polymerases: misincorporation, abortive transcription, and dependence on divalent cations" *Genet. Internat. Res.* In press
Geertz M, Mehandziska S, Sobetsko P, Janga S, [Shimamoto N](#), Muskhelishvili G, Travers A. Structural coupling between RNA polymerase composition and DNA supercoiling in coordinating transcription: a global role for the omega subunit? *mBio.* In press

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

[N. Shimamoto](#) and M. Imashimizu, Role of branched pathway of initiation: Comparative study of cyanobacteria and *E. coli*, 11th Asian and Oceanian Conference of Transcription, Nakijin, Okinawa, JAPAN

[H. Nakayama](#) and [N. Shimamoto](#), Stationary state is not stationary in *E. coli*, 11th Asian and Oceanian Conference of Transcription, Nakijin, Okinawa, JAPAN

[嶋本伸雄](#):「機能するタンパク質」KAST教育講座「分子生物学コース」2010.6.14

[嶋本伸雄](#):「1分子ダイナミクスに見られる DNA とタンパク質との結合平衡:生物学と化学のパラドクス」シンポジウム力学と統計力学の狭間(岡山大学・立命館大学共催)、大津市、2010.9.25-6

7. 学会発表

中山秀喜、嶋本伸雄:「"stationary phase"で大腸菌は stationary でない」第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド、2010.12.7-10

畠山明子、嶋本伸雄:「線虫初期胚の単一割球への電気的物質導入」第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド、2010.12.7-10

8. その他特記事項

1. 外部資金

オリンパス(株) 共同研究

日本学術振興会 二国間学術交流(インド) ACT 11 支援

東京倶楽部(財) ACT 11 支援

沖縄県今帰仁村日米交流基金 ACT 11 支援

2. 知財権等

なし

3. 学外活動

国際学会主催 Asian and Oceanian Conference of Transcription, の
会頭として11回学会を沖縄今帰仁村にて主催した。10カ国107名
(40%が国外参加者)が参加した。2010.7.1-5



図3ACT11では、Beach Session等の新企画が参加者の親睦を深め、
「一番楽しい国際学会」の名称を守ることが出来た。

Asian and Oceanian Conference of Transcription 国際委員会日本代
表委員

分子生物学会若手支援富澤基金審査委員

生物物理学会分野委員

Genes to Cells transfer editor

未踏技術協会(社)研究会「生命をはかる」幹事

嶋本伸雄:「機能するタンパク質」KAST 教育講座「分子生物学コー
ス」講師 2010.6.14

4. 授賞等

なし

5. その他

国際ワークショップ「大学院をアジアに向かって開くには？」

“Exposure of our graduate schools to Asian countries” 2010.7.7

世話人

嶋本伸雄、中村暢宏、津下英明、加藤啓子、大学院間協定のため
の第一次訪タイ団: Faculty of Science, Mahidol University,
Chulabhorn Research Institute. Faculty of Veterinary Science,
Mahidol University. Faculty of Science, Kasetsart University
2011, 2.28-3.5

嶋本伸雄、村田英雄、井上朋広、大学院間協定のための第二次訪
タイ団, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University 2011,
3.28-31

免疫糖鎖生物学研究室

Laboratory of Immunoglycobiology

教授 中田 博

Prof. Hiroshi Nakada, Ph.D

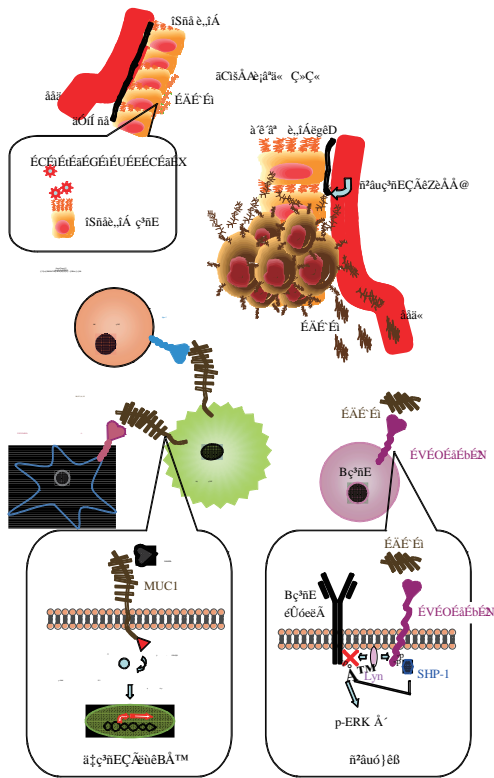
助教 秋田 薫

Assist. Prof. Kaoru Akita, Ph.D



1. 研究概要

ムチンは、呼吸器、消化器、生殖器等の上皮組織内腔表面を覆う主要成分であり、多数のO-グリカンを持つ高分子の糖タンパク質である。私達は、インフルエンザウイルスの感染や上皮細胞の悪性化と関連してムチンの機能を研究している。下図は研究内容を組織レベル、細胞レベルおよび分子レベルでの反応を模式的に示した。



1) インフルエンザウイルス受容体の解析

インフルエンザウイルスが最初に私達の体に侵入するとき、上皮細胞表面の糖タンパク質のシアル酸にウイルスのもつ被膜タンパク質であるヘマグルチニン(HA)が結合する。ウイルスの感染機構を研究する上で、HA と結合する受容体を単離し、調べるのが重要で、ムチンはその候補分子である。

2) 上皮性癌細胞の産生するムチンの生物学的意義

大半のがんは上皮細胞由来であることは良く知られている。正常な上皮組織では、細胞の極性が保持され、合成されたムチンは細胞のアピカル(頂端部)側に輸送されて、

分泌されたり、あるいは膜タンパク質となる。癌化すると極性が無くなることにより、ムチンは細胞表面全体に輸送され、一部は癌組織全体に分泌され、血流中にも放出される。血流中に多くのムチンが存在する患者の5年生存率は低いことが知られているが、ムチンの生物学的意義はほとんど明らかにされていない。免疫細胞上には多くのレクチン(糖鎖を認識するタンパク質)が発現していることから、我々はムチンがシグレックファミリーのようなレクチンと結合するのではないかと考えた。多くのシグレックは免疫細胞上に発現していることに加えて、糖鎖上のシアル酸に結合することと免疫細胞を負に制御するモチーフをもっていることを特徴としている。ムチンとこれらのレクチンを介した相互作用は、免疫細胞と癌細胞に相互のシグナルとなり、前者には免疫抑制作用、後者には癌の進展を促進する作用をもたらすことが予想される。私達はこのような研究を通じて、癌の悪性化を克服する方法を開発することを目的としている。

2. 本年度の研究成果

1) インフルエンザウイルス受容体の解析

ニワトリ気道粘膜より鳥インフルエンザウイルス(H5N3)に結合するムチンを単離した。ムチンへのウイルスの結合は、ムチンを固相化したプレートへのウイルスの結合、あるいはムチンを電気泳動後、ウエスタンブロッティングした膜上へのウイルスの結合により確認された。単離したムチンは、MDCK 細胞へのウイルスの結合および感染を部分的に抑制した。

2) 上皮性癌細胞の産生するムチンの生物学的意義

ヒト大腸癌由来細胞の産生するムチンがヒト未熟樹状細胞上に発現するシグレック-9 に結合し、IL-12 の産生を抑制することを見いだした。

がん微小環境において、浸潤した未熟樹状細胞上のシグレック-9 と上皮性癌細胞上の MUC1 とが相互作用する可能性が組織化学的に示された。MUC1 強制発現細胞へのシグレック-9 の結合は、MUC1 の細胞質ドメインへのβ-カテニンのリクルートや ERK1/2 のリン酸化の亢進をもたらした。

CA125 は卵巣癌の腫瘍マーカーとして広く用いられているが、子宮内膜症などの良性疾患においても発現する。CA125 のコアタンパク質(MUC16)上に発現するシアルル Tn 抗原のレベルの差異により卵巣癌と子宮内膜症を識別するサンドイッチ ELISA 法を開発した。

3. Research projects and annual reports

Mucins are major components covering the luminal surfaces of the epithelial respiratory, gastrointestinal, and reproductive tracts, and are high molecular weight glycoproteins with a number of O-glycans. We have been studying on the function of these mucins with respect to infection of influenza virus and tumor progression.

The first stage of influenza virus entry to a host cell is recognition of terminal sialic acids on glycosylated epithelial cell surface molecules by the viral HA protein. To elucidate the infection mechanism, it is essential to isolate and characterize the influenza virus receptor from the epithelial tissues. Since the mucins contain a variety of sialylated O-glycans, they may play a role as the influenza virus receptor.

It is well-known that most of tumor cells are derived from the epithelial cells. Since normal epithelial cells exhibit a clear polarity, synthesized mucins are transported to be the apical cell surface and become secretory or membrane-bound glycoproteins. Upon malignant transformation, mucins are transported to whole cell surface, and then some mucins are secreted into tumor tissues and/or bloodstream of cancer patients because of loss of the cell polarity of epithelial tissues. It has been reported that patients with a higher amount of mucins in their bloodstream have a lower 5-year survival rate. However, little is known regarding the biological significance of mucins.

Since many lectins (carbohydrate recognition proteins) are found in many immune cells, we predict that mucins may interact with these lectins such as siglec family, many of which are characterized by binding to sialoglycans and possessing immune regulatory motif. Binding of mucins to the siglec family may lead to down-modulation of immune cells. On the other hand, when membrane-bound mucins expressed on the epithelial tumor cells interact with the siglec family, the signaling through the membrane-bound mucin may play a role in tumor progression. Our aim is to develop clinical ways to overcome tumor progression based on these researches.

1: Analyses of influenza virus receptor

We isolated mucins from the avian respiratory tract and found that avian influenza virus (H5N3) could bind to the mucins coated on the plate and transferred onto the membrane after SDS-PAGE. The mucins partially inhibited the binding and infection of the influenza virus to MDCK cells.

2: Biological significance of epithelial tumor cell-produced mucins

Mucins produced by human colon cancer cells could bind to Siglec-9 expressed on immature DCs, leading to down-modulation of IL-12 production. We found that infiltrated immune cells such as DCs could interact with tumor cells through Siglec-9 and MUC1 expressed on DCs and tumor cells, respectively. Binding of Siglec-9 to MUC1 on tumor cells enhanced the recruitment of β -catenin to MUC1 C-terminal domain and phosphorylation of ERK1/2.

CA125 is commonly used as an ovarian cancer marker, but its elevated expression is also found in a number of benign conditions including endometriosis. We found that sialyl-Tn antigen is expressed on the CA125 core protein prepared from many patients with ovarian cancer but not from patients with endometriosis. We developed a sandwich ELISA to discriminate ovarian cancer from endometriosis.

4. 発表論文

- M. Hamaguchi, Y. Kawahito, H. Ishino, N. Takeuchi, D. Tokunaga, T. Hojo, A. Yamamoto, M. Kadoya, T. Seno, M. Kohno, and H. Nakada: Mucin from rheumatoid arthritis synovial fluid enhances interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Hum. Immunol.* in press, (2011)
- T. Kizumi, A. Matsumoto-Takahashi, H. Nakada, M. Nakata, and Y. Fujita-Yamaguchi: Preparation of asialo-agalacto-glycophorin A for screening of anti-Tn antibodies. *Biosci. Trends.* **4**(6):308-311 (2010)
- M. Ohta, A. Ishida, M. Toda, K. Akita, M. Inoue, K. Yamashita, M. Watanabe, T. Murata, T. Usui, and H. Nakada: Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**(4): 663-669 (2010)
- H. Ishino, Y. Kawahito, M. Hamaguchi, N. Takeuchi, D. Tokunaga, T. Hojo, M. Wada, A. Yamamoto, M. Kadoya, Y. Tsubouchi, M. Kohno, and H. Nakada: Expression of Tn and sialyl Tn antigens in synovial tissues in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **28**(2): 246-249 (2010)
- H. Kajihara, M. Toda, T. Mine, H. Nakada, H. Wariishi, and T. Yamamoto: Visualization of sialic acid produced on bacterial cell surfaces by lectin staining. *Microbes Environ.* **25**:152-155 (2010)

5. 著書および総説

- S. Sirko, K. Akita, A. von Holst, and A. Faissner: Structural and functional analysis of chondroitin sulfate proteoglycans in the neural stem cell niche. *Methods Enzymol.* **479**: 37-71 (2010)

M. Toda and H. Nakada: Immunosuppressive effect of carcinoma-produced mucins on B cell function. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **22**: 226-238 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

H. Nakada: Signal transduction through MUC1-Siglec 9 interaction. The 7th International Symposium on Glycosyltransferases, GlycoT 2010 Tokyo, 2010.7.31-8.1

中田 博:免疫細胞のムチン結合分子を背景とする免疫制御剤の開発. 近畿バイオインダストリー振興会議、大阪市、2010.12.6

7. 学会発表

T. Murata, T. Hattori, Y. Honda, M. Toda, E. Y. Park, T. Usui, and H. Nakada: Chemoenzymatic synthesis of artificial mucins carrying sialylated O-linked glycans with a poly lactosamine extension and interactions with CD22/siglec-2. The 25th International Carbohydrate Symposium, Chiba, 2010.8.1-6

中田 博、井上瑞江:シグレック9との相互作用によるMUC1を介したシグナル伝達. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010.9.22-24

井上瑞江、高桑弘樹、常國良太、藪田淑予、伊藤壽啓、大槻公一、中田 博:ニワトリ気道上の鳥インフルエンザウイルス結合蛋白質の検索. 第 58 回日本ウイルス学会学術総会、徳島市、2010.11.7-9

G. P. Subedi, T. Satoh, S. Hanashima, A. Ikeda, H. Nakada, R. Sato, M. Mizuno, N. Yuasa, Y. Fujita-Yamaguchi, and Y. Yamaguchi: Establishment of overproduction procedure for anti-Tn antigen MLS128 single-chain Fv fragment toward the structural studies. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010.12.7-10

岩倉健司、岡 修平、戸田宗豊、碓氷泰市、村田健臣、中田 博:硫酸化糖含有人工ムチンと P-セレクトインとの相互作用解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010.12.7-10

増田直也、ザムリ ノールマイザ、永井祐宜、矢島由紀子、中田 博、山口(藤田)陽子:抗 Tn 抗体 MLS128 のヒト結腸がん細胞 HT29 に対する増殖抑制作用. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010.12.7-10

谷田周平、秋田 薫、戸田宗豊、井上瑞江、中田 博:Siglec-9 の結合に伴う MUC1 を介した情報伝達. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010.12.7-10

戸田宗豊、山下継史、渡邊昌彦、石田有希子、秋田 薫、井上瑞江、村田健臣、碓氷泰市、中田 博:Immunosuppressive effect of mucin on splenic marginal zone B cells in tumor-bearing state. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010.12.7-10

石田有希子、戸田宗豊、秋田 薫、井上瑞江、中田 博:シグレック 3 による Toll-like receptor-4 シグナル伝達の抑制、第33回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010.12.7-10

8. その他特記事項

1)外部資金

NEDO 糖鎖機能活用技術開発

2)知的財産等

特許:CA125 上の STn 抗原の有無に基づく子宮内膜症と卵巣癌の差別化

3)学外活動

徳島大学非常勤講師、京都バイオフォーラム幹事、科学技術振興機構戦略的イノベーション推進部アドバイザー、NEDO ピアレビューアー、日本生化学会評議員、日本糖質学会評議員

4)受賞等

なし

5)その他

なし

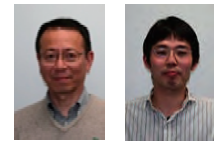


神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中山喜明

Assist. Prof. Yoshiaki Nakayama Ph. D.

1. 研究概要

タンパク質への糖鎖の付加は、主要な翻訳後修飾反応の一つであり、付加された糖鎖は細胞間の接着や認識などに重要な働きをする。糖鎖の構造は、糖とタンパク質の結合様式によっていくつかのタイプに分類されるが、我々は N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)やマンノース(Man)とタンパク質中のセリン、トレオニン残基のヒドロキシル基との間に形成される O-グリコシド型結合(GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr, Man α 1 \rightarrow Ser/Thr)に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr の構造を有する糖鎖は、消化器官、呼吸器官等の上皮細胞が分泌する粘性タンパク質であるムチンに多く見られることから、ムチン型糖鎖とも呼ばれる。この構造の糖鎖はムチン分子のみならず、他の多くの細胞表面や分泌糖タンパク質中にも存在して、粘膜の保護だけでなく、リンパ球と血管内皮細胞の相互作用、微生物や毒素の認識などの生物現象に関与することが知られている。一方、ほ乳類における Man α 1 \rightarrow Ser/Thr の構造を有する O-Man 型糖鎖は、筋肉や神経系などの限定されたタンパク質にのみ存在しており、その合成異常は筋ジストロフィーなどの疾病と関係している。

複雑な細胞間ネットワークを形成する神経系の細胞では、複合糖質の糖鎖が重要な役割を果たしており、プロテオグリカンやN-グリコシド型糖鎖(GlcNAc β 1 \rightarrow Asn)が、シナプスの形態変化や神経回路の形成に関わるなどの報告がなされてきた。しかし、O-グリコシド型糖鎖の神経系におけるはたらきについては、ほとんど解析されていない。このような背景を踏まえ、我々の研究室では、O-グリコシド型糖鎖、およびそれに関連した分子の脳における機能解析を研究の目的として、次のような研究を行っている。

1) 神経特異的なムチン型糖鎖の合成反応と、糖鎖の機能解析

ムチン型糖鎖の生合成の開始反応は、UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (以後 GalNAc-T と略する) が触媒する。この酵素はタンパク質中のムチン型糖鎖の数と位置を決定する重要な酵素である。近年我々は、神経特異的に発現する GalNAc-T9, および GalNAc-T と高い相同性を持つ分子をクローニングした。後者の分子は精神遅滞を伴う遺伝

病である Williams-Beuren 症候群(WBS)の欠失領域(WBS critical region)に含まれる WBSCR17 遺伝子としても知られている。GalNAc-T9, WBSCR17とも *in vitro* の酵素活性、およびその分子の機能は全く理解されていない。我々は脳におけるムチン型糖鎖の働きを調べるために、これらの分子の生化学的な特徴、さらに脳の発生・分化における役割を、培養細胞やゼブラフィッシュを用いて解析してきた。これまで、ゼブラフィッシュを用いた実験系では、脳特異的な GalNAc-T9, GalNAc-T13, および WBSCR17 に対するアンチセンスモルホリノオリゴを用いて、それぞれの分子の発現を抑制し、発生に与える影響を調べ、WBSCR17 の発現抑制胚で最も顕著に後脳領域において発生異常が起こることを報告してきた。

2) α -dystroglycan のムチン型、および O-Man 型糖鎖に関する研究

α -dystroglycan (以降 α DG) は、O-Man 型糖鎖とムチン型糖鎖を有する。ある種の先天性筋ジストロフィーでは筋肉の症状とともに、特徴的に知的発達遅滞やてんかんなど中枢神経症状を呈するが、その原因として α DG の O-Man 型糖鎖に合成不全が起こり、 α DG のリガンドへの結合能が低下することが考えられている。今日では α DG の糖鎖修飾異常により引き起こされる疾患は α -dystroglycanopathy と呼ばれているが、その一方で α DG のムチン型糖鎖の機能についてはほとんど調べられていない。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて α DG の翻訳後修飾、特にムチン型糖鎖の修飾と α DG の機能の関係を明らかにすることを目的としている。

2. 本年度の研究成果

1) 神経特異的なムチン型糖鎖の合成反応と、糖鎖の機能解析

GalNAc-T 遺伝子ファミリーと高い相同性を持つが、酵素活性が検出されていない WBSCR17 の生化学的な性質を調べた。WBSCR17 の細胞内局在性を、ヒト WBSCR17 と GFP の融合タンパク質を HeLa 細胞、Cos7 細胞で発現させて調べたところ、融合タンパク質は他の GalNAc-T と同様に cis-Golgi を中心とした細胞内膜系に多く発現していた。このことは、WBSCR17 が糖転移酵素として機能する可能性を示唆している。次に、Tn 抗原、T 抗原などを認識するレクチンを用いて、細胞染色、レク

チンプロット解析, および N-アジドアセチルガラクトサミン (GalNAz)を用いた糖鎖の代謝標識法を用いて糖鎖の解析を行った. レクチンを用いた解析では, WBSCR17 発現細胞とコントロール細胞間での違いは見られなかったが, 代謝標識した糖タンパク質糖鎖をシュタウディングー連結反応によりプローブを結合させて検出する実験においては, WBSCR17 発現細胞で発現が増加するバンドを検出した. この結果は, WBSCR17 が糖転移活性を持つことを示唆している.

ゼブラフィッシュを用いた実験系では, WBSCR17 の発現を抑制したときに見られる後脳領域での発生異常の原因を調べるために, WBSCR17 発現抑制胚における後脳のマーカー分子の発現を分析した. その結果, *wnt1*, *rfng* などの後脳の境界の形成に関わる分子の発現パターンが消失あるいは乱れていることを見いだした. さらに, 特異的なアンチセンスモルホリノオリゴを用いて *wnt1*, *rfng* の発現抑制胚を作製したところ, WBSCR17 抑制胚とよく似た表現型の異常を示したことから, WBSCR17 は *wnt1*, *rfng* などのシグナル系に関連している可能性が考えられた.

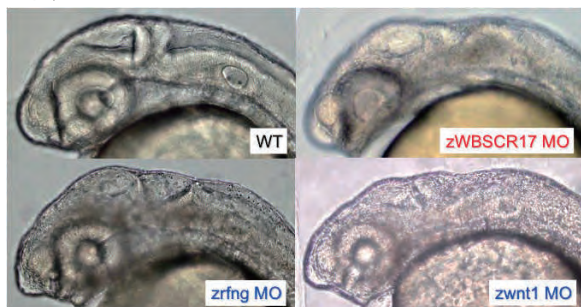


図 WBSCR17 の発現抑制による後脳領域の発生異常
WBSCR17 の発現抑制胚は, *rfng* および *wnt1* 発現抑制胚とよく似た表現型を示す.

2) α -dystroglycan のムチン型, および O-Man 型糖鎖に関する研究

この実験ではゼブラフィッシュの初期胚に FLAG タグを有する α DG を発現させる. その際, アンチセンスモルホリノオリゴを用いて特定の GalNAc-T の発現を抑制して, どのアイソザイムが α DG のムチン型糖鎖生合成に関わっているかをスクリーニングする. 今年度は, 組換 α DG のコンストラクトを作製した.

3. Research projects and annual reports

O-Glycosylation is an important post-translational modification of proteins, and is classified into several subtypes based on the carbohydrate-protein linkage

structures. GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr) is the most frequently observed linkage, and O-glycans with this structure are called the mucin carbohydrates since they are highly expressed on mucins secreted from epithelial cells. There is another O-glycosidic structure, Man α 1 \rightarrow Ser(Thr). Contrary to the mucin sugars, the occurrence of O-mannosylated carbohydrates is mostly confined to the tissues, such as muscle and brain. Our interest is to define functional roles of these two types of O-glycosylation in the brain, and we carried out the following experiments.

1) Analysis of synthesis and function of neuron-specific mucin-type carbohydrates

a UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase (GalNAc-T) catalyzes the initial step in the biosynthesis of mucin-type glycans. We previously cloned a novel neuron-specific isozyme, designated GalNAc-T9, and more recently identified a putative GalNAc-T gene, which is also mainly expressed in the embryonic and adult brain. The gene for this putative isozyme is also known as WBSCR17, one of the genes identified in the region critical to Williams- Beuren syndrome (WBS). We carried out biochemical characterization of WBSCR17, and knockdown of brain-specific isozymes (GalNAc-T9, -T13, and WBSCR17), and obtained the following data.

- i) WBSCR17 was predominantly expressed in the cis-Golgi as is the case with other GalNAc-T isozymes, when its recombinant molecule with GFP was expressed in mammalian cells. The subcellular localization suggests that WBSCR17 may work as a glycosyltransferase.
- ii) Carbohydrate profiles were studied in the cells with constitutively expressed WBSCR17 by metabolic labeling of carbohydrates using GalNAz. The detection of metabolically labeled glycoproteins from the cells with overexpressed WBSCR17 demonstrated bands with enhanced expression, indicating the possible glycosylation by WBSCR17.
- iii) The knockdown (KD) of WBSCR17 in zebrafish generated most severe malformation of hindbrain compared with the other brain-specific isozymes. We then examined the expression of some hindbrain markers, and found that *wnt1* and *rfng* were lost or ectopically expressed. The KD of either *wnt1* or *rfng* in zebrafish showed the similar phenotype to that

of the WBSR17 KD embryos. All these data indicate the WBSR17 is somehow related to signal transduction of wnt1 and/or rfng.

2) Analysis of functions of O-glycosidic carbohydrates in α -dystroglycan (α DG)

The aim of this project is to identify GalNAc-T isozymes involved in mucin-type O-glycosylation of α DG, and to identify the roles of α DG mucin-carbohydrates. To express FLAG-tagged α DG in zebrafish, we generated its construct. We are introducing the construct into the embryos.

4. 発表論文

K. Yamauchi, and A. Kurosaka: Expression and function of glycogen synthase kinase-3 in human hair follicles. **Arch. Dermatol. Res.** **302**(4): 263-270 (2010)

I, Kimura, Y. Nakayama, M. Konishi, T. Kobayashi, M. Mori, M. Ito, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, M. Ohta, N. Itoh, M. Fujimoto: Neuferricin, a novel extracellular heme-binding protein, promotes neurogenesis. **J. Neurochem.** **112**(5): 1156-1167 (2010)

5. 著書および総説

S. Sasaki, Y. Nakayama, M. Konishi, A. Miyake, N. Itoh: The FGF Family in Humans, Mice, and Zebrafish: Development, Physiology, and Pathophysiology. **Genetic Disease**. in press

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

N. Nakamura, M. Tawara, K. Nishimura, K. Hachiga, H. Nishizaki, Y. Nakayama, A. Miyake, N. Itoh, A. Kurosaka, The Biological Roles of Brain-specific Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Yokohama (Japan), 2010.8.1-6.

A. Kurosaka, S. Toba, T. Satoh, N. Nakamura, Y. Nakayama, K. Ozaki: Suppression of a novel brain-specific UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase causes cell death in P19 embryonic carcinoma cells during neural differentiation. International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Yokohama (Japan), 2010.8.1-6.

N. Nakamura, M. Tawara, K. Nishimura, K. Hachiga, H. Nishizaki, Y. Nakayama, A. Miyake, Nobuyuki Itoh, A. Kurosaka, The Biological Roles of WBSR17, a Gene

Homologous to Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同年会, 神戸市, 2010.12.7-10

H. Fujiwara, T. Satoh, Y. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka, Functional analysis of brain-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-related genes, 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同年会, 神戸市, 2010.12.7-10

Y. Nakayama, Y. Tsuji, N. Nakamura, A. Kurosaka, Characterization of brain-specific polypeptide GalNAc-transferases in P19 cells, 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同年会, 神戸市, 2010.12.7-10

8. その他特記事項

1. 外部資金
科学研究費 基盤研究(C) (代表), 基盤研究(B) (分担)
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (分担)
2. 知財権等 なし
3. 学外活動 なし
4. 受賞等 なし
5. その他
産学協同 (インタープロテイン社との共同研究)
高大連携事業 SPP の実施



研究室の集合写真(15号館テラスにて)

抗老化医学研究室

Laboratory of Anti-Aging Medicine

教授 板野 直樹

Prof. Naoki Itano, Ph.D.

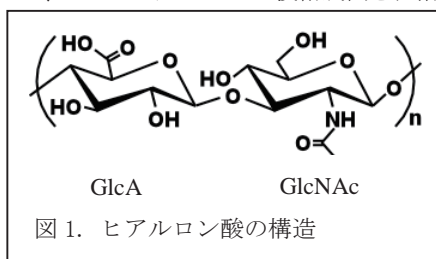


1. 研究概要

高齢化社会の急速な進行を背景として、介護など様々な問題の解決が急務の課題となっている。当研究室の目標は、老化に特徴的な病的な状態に介入し、長寿の質(元気に長寿を享受できる状態)を確保するための革新的な技術を確立することである。抗老化医学研究室では、この目的のため、分子生物学、細胞生物学、生化学、そして、遺伝子工学の先端技術を駆使して、以下の研究課題に取り組んでいる。

1:ヒアルロン酸生合成機構の解明とアンチエイジング技術への展開

関節機能の低下が原因で寝たきりになる高齢者が増えている。この要因として、関節でクッションや潤滑の役割をするヒアルロン酸の減少がある。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcA)が、 β -1,3と β -1,4結合で交互に連結した2糖ユニットの繰り返し構造からなる高分子多糖であり(図1)、特に結合組織の細胞外マトリックス成分として広く存在している。私達は、世界に先駆けて、動物のヒアルロン酸合成酵素を見出し、ヒアルロン酸合成機構の解明に取り組んできた。そして、合成酵素遺伝子組換えタンパク質を用いた試験管内ヒアルロン酸合成システムの開発に成功し、酵素を活性化する化合物の探索を始めている。今後、ヒアルロン酸生合成機構の全容解明に取り組み、その研究を通じて、アンチエイジングへの技術展開を目指す。



2:癌微小環境形成の分子機構と癌幹細胞ニッチを標的とした治療の基盤研究

高齢化社会の到来によって、我が国では、癌が主な死因となり、その克服が社会的要請となっている。癌は、生命システムの精巧なコントロールを逸脱して細胞が増え続けることで発症するが、癌の進展、転移、再発の正確な機構については、未だ十分な解明がなされていない。近年、多くの癌において、「癌幹細胞」の存在が報告されており、この細胞が癌の源であるという考えに注目が集まっている。癌幹細胞は、従来の化学療法や放射線治療に抵抗性を示すことから、転移

や再発を引き起こす最大の要因と考えられ、根治的治療の標的として重要視されている。

癌幹細胞は正常幹細胞と同様に、特殊な微小環境(幹細胞ニッチ)内で生存し、その幹細胞性を維持していると考えられている。従って、癌幹細胞の幹細胞性を喪失させ、悪性形質転換を阻止するためには、癌幹細胞ニッチを標的とすることが重要である。本研究の主目的は、癌幹細胞ニッチの形成を支配している細胞成分及び分子を同定し、その形成をコントロールすることにより、癌を休眠に導くための新規治療法を確立することである。

2. 本年度の研究成果

私達は最近、腫瘍関連マクロファージが、ヒアルロン酸リッチ腫瘍微小環境に依存して、腫瘍間質に動員されることを明らかにした。マクロファージ動員に対する間質由来ヒアルロン酸の寄与を調べるため、私達は間質線維芽細胞におけるヒアルロン酸合成酵素2(Has2)の選択的な遺伝子破壊を行った。そして、線維芽細胞におけるヒアルロン酸合成の欠損が、腫瘍間質へのマクロファージの動員と腫瘍血管・リンパ管の新生を何れも顕著に抑制することを明らかにした。上記結果は、間質由来線維芽細胞の形成するヒアルロン酸リッチな腫瘍微小環境が、腫瘍関連マクロファージの動員とその後の血管・リンパ管新生に重要な役割を果たして、がん進展に寄与していることを示唆している。

(以上の成果はCancer Res.2010にて公表)

3. Research projects and annual reports

We here in Japan are facing a multitude of problems caused by the rapid growth of what has been termed the “super-aged society”. The aims of our research are to improve the morbidities that are characteristic of age progression and to establish innovative technologies that can ensure a comfortable quality of life (QOL) for elderly. To this end, our laboratory has been pursuing the following research programs using advanced technologies in molecular and cellular biology, biochemistry, and genetic engineering:

1: Elucidation of the Biosynthetic Process of Hyaluronan and its Application to Anti-aging Technologies

There are an increasing number of bedridden elderly people in Japan with a loss of joint function due to conditions like osteoarthritis. Hyaluronan (HA) acts as a cushion and lubricant in articulating joints. It is an integral component of

the synovial fluid between joints, but becomes reduced by age and thereby causes functional disorders. HA is a high molecular-mass polysaccharide found in the extracellular matrix, especially of that of connective tissues, and is composed of repeating disaccharide units in which *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucuronic acid (GlcUA) are linked together by alternating β -1,3 and β -1,4 linkages (Figure 1). Our laboratory discovered the first mammalian HA synthase (HAS) gene and has been thoroughly investigating the mechanism of HA biosynthesis ever since. Recently, we succeeded in establishing an *in vitro* reconstitution system using a recombinant HAS protein and developed a screening system for compounds that have HAS activation potential. Our future challenge is therefore to understand the entire mechanism of HA biosynthesis and apply this knowledge to developing innovative anti-aging technologies.

2: Studies on Cancer Microenvironment Formation and the Establishment of Therapies Targeting Cancer Stem Cell Niches

Cancer has become the leading cause of death in our country due to increased longevity, and as such the eradication of cancer has become a social mission. Although it is well known that uncontrolled cell proliferation leads to the development of cancers, the precise mechanisms underlying metastatic tumor progression and recurrence have not been fully resolved. Cancer stem cells (CSCs) have recently been reported to exist in many malignancies and have attracted remarkable attention because they are believed to be the only cells capable of initiating cancer growth. Because CSCs are relatively resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy, and because they are closely associated with cancer metastasis and recurrence, targeting them is now a primary goal in cancer therapy.

CSCs, like normal stem cells, reside and maintain their stemness within a specialized microenvironment called a stem cell niche. Thus, strategies to limit their stemness and malignant transformation must focus on the importance of targeting this CSC niche. The main purpose of our research in this domain is to identify the cellular and molecular cues that govern the formation of the specialized CSC niche microenvironment and establish novel therapies to induce a state of cancer dormancy by controlling the niche.

3: Recent progress in our laboratory

We recently discovered that tumor-associated macrophages preferentially traffic to stromal areas formed within tumors in a manner dependent on an HA-rich tumor microenvironment. To address the role of stroma-derived HA in macrophage recruitment, we disrupted the murine HA synthase 2 (Has2) gene in stromal fibroblasts using conditional gene targeting. The Has2-null fibroblasts showed severe impairment in recruiting macrophages when inoculated with tumor cells into nude mice, suggesting a key role of HA in tumor targeting. Furthermore, a deficiency in stromal HA attenuated tumor angiogenesis and lymphangiogenesis concomitantly with impaired macrophage recruitment. These results suggest that stroma-derived HA serves as a microenvironmental signal for the recruitment of tumor-associated macrophages, which are key regulatory cells involved in tumor neovascularization. (Published in *Cancer Res.*2010)

4. 発表論文

- H. Yamazaki, M. Takeoka, M. Kitazawa, T. Ehara, N. Itano, H. Kato, and S. Taniguchi: ASC plays a role in the priming phase of the immune response to type II collagen in collagen-induced arthritis. *Rheumatol Int.* (2011) in press.
- N. Kobayashi, S. Miyoshi, T. Mikami, H. Koyama, M. Kitazawa, M. Takeoka, K. Sano, J. Amano, Z. Isogai, S. Niida, K. Oguri, M. Okayama, J.A. McDonald, K. Kimata, S. Taniguchi, and N. Itano: Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res.* **70**(18):7073-7083 (2010)
- K. Nakajima, M. Takeoka, M. Mori, S. Hashimoto, A. Sakurai, H. Nose, K. Higuchi, N. Itano, M. Shiohara, T. Oh, and S. Taniguchi: Exercise effects on methylation of ASC gene. *Int. J. Sports Med.* **31**(9):671-675 (2010)
- A. Sugaya, M. Takeoka, N. Itano, A. Taguchi, T. Ehara, and S. Taniguchi: Calponin h1-S175T point mutation enhances resistance to actin cytoskeleton perturbation in human cancer cells. *Anticancer Res.* **30**(4):1071-1078 (2010)
- K. Kanyama, H. Yabushita, Y. Obayashi, M. Noguchi, L. Zhuo, N. Itano, K. Kimata, and A. Wakatsuki: Role of hyaluronan synthase, hyaluronan and serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP)-hyaluronan complex in endometrial cancer. *J. Aichi Med. Univ. Assoc.* **38**(1-4):29-42 (2010)

5. 総説・著書および総説

板野直樹 ヒアルロン酸合成酵素 生化学 82(7), 657, 2010.

6. 招待講演、シンポジウム等

板野直樹 ヒアルロン酸合成異常とがん進展 第 173 回日仏生物学会、京都市 2010.12.4

N. Itano: Stromal hyaluronan accelerates macrophage mobilization and tumor neovascularization. Hyaluronan 2010 (International Society for Hyaluronan Sciences, 8th International Conference), Kyoto (Japan), 2010.6.7

7. 学会発表

なし

8. その他特記事項

1. 外部資金

Mizutani foundation for Glycoscience
SBI アラプロモ株式会社共同研究経費

2. 知財権等

なし

3. 学外活動

日本結合組織学会評議委員
日本がん転移学会評議委員
プロテオグリカンフォーラム世話人会役員
Hyaluronan 2010 (International Society for Hyaluronan Sciences, 8th International Conference)事務局長、プログラム委員

4. 受賞等

なし

5. その他

なし

発生情報学研究室

Laboratory of Cell Signaling and Development

教授 佐藤 賢一

Prof. Ken-ichi Sato, Ph.D

助教 マブブハサン AKM

Assist. Prof. Mahbub Hasan A.K.M., Ph.D



1. 研究概要

細胞内外のシグナル伝達と発生生物学的な生命現象をキーワードとして、2つのテーマを扱っている。1つめは、主にアフリカツメガエルをモデル生物とする受精成立の分子機構である。特に精子と卵が細胞膜レベルでコンタクトしたときに起こる、発生開始のシグナル伝達機構に興味がある。2つめは、主にヒトの培養細胞株をモデル実験系とするがん細胞の生物学的機能である。特にがん細胞に特有の、正常細胞にはない生物学的機能(たとえば、ある環境下における細胞死抵抗性)の分子基盤に興味がある。これらは、一見お互いに関係のない、あるいは生物個体の誕生と死にそれぞれ関係するという意味で相反するテーマであるように映るかもしれない。しかし私たちは、2つの生命現象に、共通の遺伝子産物がかかわる共通の作動原理があるのではないかと考えて取り組んでいる。生き物の生と死は背中合わせの関係、などと言うことがある。私たちは、細胞レベルの生と死が互いに背中合わせの関係にある可能性を分子レベルで検証していきたいと考えている。受精をテーマとする研究では以下の3点に重点を置いている。

- 1) 受精に伴う卵細胞チロシンキナーゼ Src (サーク)の活性化の分子機構と生理的意義
- 2) 卵細胞膜微小領域(膜マイクロドメイン)の精子との相互作用や Src 活性化の場としての働き
- 3) 卵の形成、成熟、および受精に伴う母性 mRNA の翻訳活性化とプロテオームの変化

また、がんをテーマとする研究では、以下の3点に重点を置いている。

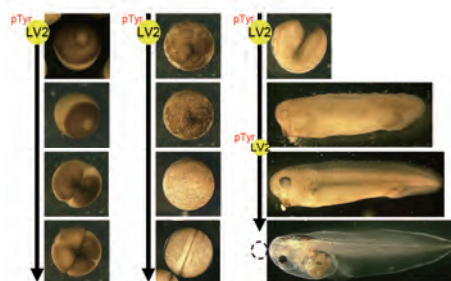
- 1) がん細胞の各種ストレス環境下(血清飢餓・低酸素・低接着など)における細胞死回避メカニズム
- 2) 細胞内外の環境を感知し応答する場としての細胞膜微小領域(膜マイクロドメイン)の働き
- 3) がん細胞の生物学的機能における細胞膜レベルの non-genomic 機構と核レベルの genomic 機構の相互作用

なお、本研究は総合生命科学部プロジェクト研究「有性生殖機構における生殖細胞膜シグナル伝達の研究」の一環として行われている。

2. 本年度の研究成果

1) ツメガエル卵黄タンパク質リポビテリン2のチロシンリン酸化の解析

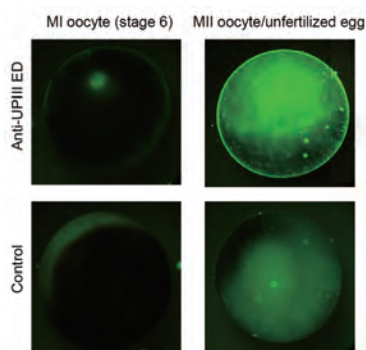
リポビテリン2(LV2)は、ツメガエルのメス成体内の肝臓で合成される前駆体タンパク質ピテロジェニンが卵巣組織に送られて卵母細胞内に取り込まれる際に部分分解を受けた結果生じる卵黄タンパク質である。私たちはこの LV2 がチロシンリン酸化されていることを明らかにした。LV2 のチロシンリン酸化は、卵形成初期から卵成熟、受精および初期発生(卵黄タンパク質が消失するオタマジャクシ幼生期まで)を通じて恒常的に観察された。一般にタンパク質チロシンリン酸化が細胞膜近傍で、細胞内外の諸環境の変化に応じて一過的に観察されることを考えると、LV2 のケースは特異であり興味深い。ホルモン刺激による卵母細胞の成熟が、チロシンリン酸化型 LV2 の卵母細胞への微小注入によって阻害されるという実験結果が得られた。チロシンリン酸化型および非リン酸化型の LV2 に生理機能の違いを示唆する結果として、今後の研究展開に生かしていきたい。(論文発表あり)



2) 卵細胞膜マイクロドメイン局在タンパク質ウロプラキン III の解析

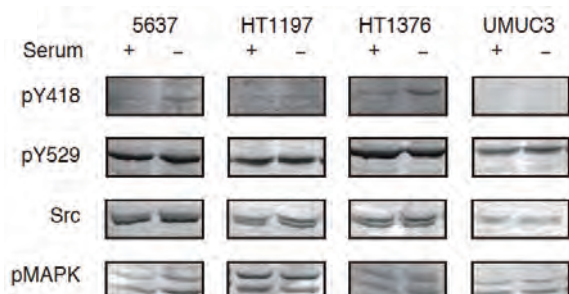
卵細胞膜マイクロドメインに局在する膜貫通型タンパク質ウロプラキン III (以下、UPIII) の細胞内局在に関する生化学的・免疫組織化学的解析を行ったところ、UPIII は卵巣組織における卵細胞形成初期からタンパク質発現をしている一方で、卵細胞表面における発現は排卵後の未受精卵に限られることを示唆する結果を得た。このことは、精子受容体の候補分子である UPIII の機能的発現メカニズムの観点から興味深い。今後は UPIII の卵細胞状における発現の実体をさらに詳細に解析し、卵形成期のどの時点で精子を受容することが可能に

なるかという点と合わせて明らかにしていきたい。(総説論文
発表あり)



3) がん細胞ウロプラキシン III および Src の細胞死抵抗性シグナリングにおける機能の解析

UPIII のヒトホモログを発現する各種ヒトがん細胞株を用いて、血清飢餓抵抗性の細胞増殖機構を明らかにするための以下の実験を行った。膀胱がん4種(5637 など)、結腸がん1種(HT29)、および腎臓がん1種(ACHN)のそれぞれのがん細胞において、血清飢餓環境下でのタンパク質リン酸化酵素 Src の活性化状態、および細胞増殖における Src 依存性を解析したところ、3種類の膀胱がんで、Src の活性化と Src 依存的な細胞増殖が観察された。このことは、膀胱がん細胞が UPIII/Src 依存的血清飢餓抵抗性メカニズムを普遍的に有している可能性を示唆しており興味深い。(論文作成中)



3. Research projects and annual reports

Research in our laboratory focuses on the biological functions of gamete cells and cancer cells. More specifically, we are interested in analyzing signal transduction in fertilization and activation of development, and cancer cell's anti-death behavior and its relevance to cellular malignancy. Molecules of interest include extracellular signals such as hormones (e.g. EGF), membrane receptors (e.g. EGF receptor), membrane-associated enzymes (e.g. Src tyrosine kinase), transcription factors (e.g. myc, STATs), and other adaptor or functional molecules (e.g. MAPK, Shc, PLCg, hnRNP K). We also have substantial interest in investigating structure and function

of membrane microdomains (MDs), where a specific subset of signaling molecules as described above are pre-organized and/or transiently localized from other cellular compartments. By combining studies on the fertilization system by using frog eggs and the cancer system by using human cancer cell lines, we will explore the idea that life and death of the cell system are regulated by a similar signal transduction mechanism.

In 2010, we have published one research paper on tyrosine phosphorylation of lipovitellin 2, a yolk-associated protein in *Xenopus laevis* oocytes, eggs, and early embryos. Shown below is the summary of the study (partly taken from the published paper): A tyrosine-phosphorylated protein of 33 kDa is shown to be present in the solubilized yolk fraction of *Xenopus laevis* oocytes, eggs, and early embryos. The phosphoprotein is lipovitellin 2 as demonstrated by immunoprecipitation and Mass spectrometry studies and is termed pp33/LV2. pp33/LV2 is stably present during oogenesis, oocyte maturation, and early embryogenesis. In vitro enzyme assays with the use of the tyrosine phosphatase LAR and the tyrosine kinase Src demonstrate a reversible nature of the tyrosine phosphorylation of pp33/LV2. Microinjection studies demonstrate that the solubilized yolk fractions, but not those of immunodepleted of pp33/LV2 or those pretreated with LAR inhibit progesterone-induced oocyte maturation. A pp33/LV2-like protein seems to present in two *Xenopus* subspecies, one other frog species, and two fish species, but not in other amphibian species such as newt and salamander. These results suggest that LV2, in its tyrosine-phosphorylated form, serves in a cellular function in a species-specific manner.

4. 発表論文

S. Kushima, G. Mammadova, A.K.M. Mahub Hasan, Y. Fukami, and K. Sato: Characterization of lipovitellin 2 as a tyrosine-phosphorylated protein in oocytes, eggs, and early embryos of *Xenopus laevis*. *Zool. Sci.* in press, 2011.

5. 著書および総説

A.K.M. Mahub Hasan, Y. Fukami, and K. Sato: Gamete membrane microdomains and their associated molecules in fertilization signaling. *Mol. Reprod. Dev.* in press, 2011.

A.A. Tokmakov, T. Iwasaki, K. Sato and Y. Fukami: Analysis of signal transduction in cell-free extracts and rafts of *Xenopus* eggs. *Methods* **51**(1):177-82 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

Ken-ichi Sato: Molecular mechanisms of *Xenopus* egg fertilization: Roles of egg membrane microdomains and their associated signaling molecules. Friday Harbor labs Research Symposium: Mechanisms of Egg Maturation and Fertilization, Friday Harbor (WA, USA), 2010.9.12

佐藤賢一: Signaling mechanisms of fertilization and activation of development: Roles of egg membrane microdomains and their associated molecules. 日本動物学会大会シンポジウム、東京、2010.9.24

佐藤賢一: 膜マイクロドメインを足場とする精子受容と発生開始シグナルの分子機構、麻布大学生殖・発生工学セミナー、相模原市、2011.3.6

7. 学会発表

佐藤賢一、玖島将太: 卵細胞膜マイクロドメインを足場とする受精シグナル伝達機構。第4回生殖研究ワークショップ、下田市、2010.8.18-20

玖島将太、佐藤賢一: ツメガエル卵細胞膜マイクロドメイン局在性タンパク質の機能解析。第4回生殖研究ワークショップ、下田市、2010.8.18-20

K. Sato, Y. Kawada, N. Yamamoto, Y. Fukami: Serum-independent growth and anti- apoptosis of human bladder carcinoma cells require functions of membrane microdomain- associated proteins such as Src and uroplakin III. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

玖島将太、松本尚士、Mahbub Hasan A.K.M.、佐藤賢一: アフリカツメガエル生殖細胞を用いた Uroplakin III 及びその他の受精関連タンパク質の解析。第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

8. その他特記事項

1. 外部資金

文部科学省新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証機構の解明」公募研究・研究代表者 研究課題名：細胞膜マイクロドメインを足場とする配偶子間認識と膜融合の分子機構 (参考 URL : <http://allo-authentication.net/>)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「オルガネラゲノムの研究成果を基盤とする有用植物の育成」研究分担者 共同研究 (旭化成株式会社)

2. 知財権等

該当なし

3. 学外活動

共同世話人として第4回生殖研究ワークショップを開催した (2010年8月18日~20日、筑波大学下田臨海実験センター、参考 URL : <http://seishokuwakate.com/>)

大学院集中講義非常勤講師 (2010年9月2日~3日、山口大学大学院理工学研究科)

4. 受賞等

該当なし

5. その他

Zoological Science 発表論文 (Kushima et al.) の掲載号 (2011年8月号の予定) の表紙デザインに採用された。

研究室ホームページ (日本語及び英語) を以下の URL で公開した。 <http://web.me.com/kksateau/LABHPI/Welcome.html>



研究室写真: 15号館南側にて、卒業記念アルバム用に撮影 (2010年10月)

血管と神経生物学研究室

Laboratory of Vascular and Neuronal Biology

教授 瀬尾 美鈴

Prof. Misuzu Seo, Ph.D



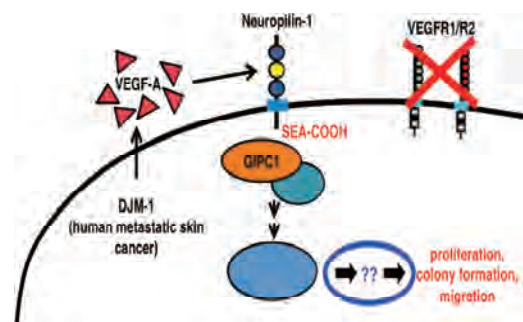
1. 研究概要

線維芽細胞増殖因子 (FGF) や血管内皮増殖因子 (VEGF)の情報を細胞外から受け取るレセプターが活性化され細胞内に伝える情報 (シグナル) は、細胞の生死、増殖、分化、運動、形態の制御に深く関与している。これらの細胞内シグナル伝達の異常が先天性疾患やがんなど、様々な病気を引き起こす。細胞増殖因子のレセプターが、正常な状態では細胞内にどのようなシグナルを引き起こすのか明らかにし、がんおよび先天性神経系疾患においてはシグナル伝達のどの過程に異常をきたしているのかを分子レベルで解明し、患者の治療法の手がかりを見つける (分子標的治療法)。

本研究室では、以下の研究テーマについて研究を遂行している。

1) VEGF-A/ニューロピリン-1(NRP1)のシグナル伝達経路とがん細胞の悪性化機構

血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)は、胎児期における血管形成に重要な役割を果たすだけでなく、がん細胞から分泌され腫瘍血管新生を誘導することによってがん細胞の生存と転移を促進する。本研究室では、がん細胞が自分の産生する VEGF-A の情報を NRP1 がレセプターとし



て受け取り (autocrine)、がん細胞の生存と遊走を促進している事を見いだした。NRP1 の細胞内シグナル伝達経路を解明し、がん治療の新しい分子標的を発見する (図1)。

図1 悪性腫瘍における VEGF-A/NRP1 シグナル伝達

2) 悪性扁平上皮癌における Fibroblast Growth Factor レセプター(FGFR)の発現亢進と転移機構

腫瘍形成過程において、癌細胞の増殖により腫瘍が増大するに伴い、腫瘍内部は低酸素、低栄養状態になる。その結果、癌細胞の遺伝子発現が変化し、悪性化が誘導される。以前、本研究室で食道がん患者のがん組織では、FGFR 3 のアイソフォームである FGFR3IIIc の発現が上昇していることを見いだした。FGFR3 は選択的スプライシング

によって FGFR3IIIb、IIIc、可溶性 FGFR3ΔTM の3種類のアイソフォームを生じる。これらのアイソフォームは、FGF に対する特異性が異なっており、FGFR3IIIc の発現上昇は食道がん患者の予後不良に関わっている可能性が高い。FGFR3IIIc は正常な上皮細胞における発現はほとんど認められず、間葉系の細胞に発現している。腫瘍内部の環境変化によって、上皮間葉移行(EMT)が誘発され通常は発現しない FGFR3IIIc の発現が誘導されることにより転移性が高まると考えられる。FGFR3IIIc が癌細胞の転移を促進する機構を明らかにする。

3) 神経細胞の発生と分化-カルマン症候群の病因解明

カルマン症候群(KS)の原因遺伝子である KAL-1 遺伝子と KAL-2 遺伝子の機能解析と、それぞれがコードしている Anosmin-1 と FGF レセプター 1(FGFR1)の関連について研究を遂行している。KS とは原因遺伝子の変異によって、嗅覚障害・消失を伴った低ゴナドトロピン性性腺機能低下症や思春期の欠如が見られる先天性疾患である。Anosmin-1 は細胞接着分子または局所誘導分子として機能し、嗅球の軸索分岐を刺激し、細胞接着や神経突起伸長を促進する。2番目の遺伝子は第8染色体上の KAL-2 遺伝子で、膜貫通型チロシンキナーゼレセプターである FGFR1 をコードしている。FGFR1 は、そのチロシン酸化部位を認識するアダプタータンパクを介して細胞内シグナル伝達経路を活性化し、神経幹細胞の増殖と分化を促進する。FGF が FGFR1 に結合するとき、細胞膜上で Anosmin-1、ヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用し、細胞内シグナル伝達を増強することが報告されている。anosmin-1 と FGFR1 の変異が、KS の原因となるゴナドトロピン(GnRH)分泌神経細胞の発生異常や嗅球形成異常をどのように引き起こすのか、その分子機構を解明する。

2. 本年度の研究成果

1) VEGF-A/ニューロピリン-1(NRP1)のシグナル伝達経路とがん細胞の悪性化機構

VEGF-A による悪性がん細胞のオートクリン増殖のシグナルがニューロピリン-1 (NRP1) によって媒介されている事を明らかにした。さらに、NRP1 の下流シグナルに働いているタンパク質発現を siRNA によってノックダウンすると、がん細胞の足場非依存性増殖を抑制する事を示した。転移性扁平上皮癌細胞 DJM1 は、恒常的に VEGF-A を細胞外へ分泌し腫瘍血管新生を誘導する。DJM1 細胞を VEGF-A siRNA で処理すると、VEGF-A の分泌が低下し、足場非依存性増殖が強く抑制された。VEGFR kinase inhibitor では足場非依存性の増殖を抑制し

なかったが、NRP1 の siRNA では VEGF-A 依存性の増殖を抑制したことから、VEGF-A/NRP1 シグナルが DJM1 細胞の生存と増殖を促進している事がわかった。NRP1 の下流シグナルタンパク質に対する siRNA によっても、VEGF-A 依存性のコロニー形成が強く抑制された。以上の結果から、新たながんの分子標的として NRP1 のシグナル伝達経路を選択することが有効であると考えられる。

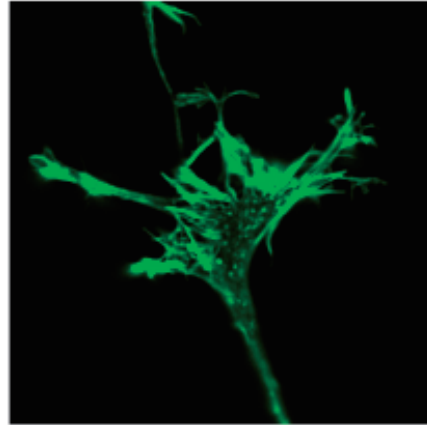
2) カルマン症候群患者の新規 acid box 変異型 FGFR1 の機能解析と嗅球の形成不全との関連

新規カルマン症候群の患者では、嗅覚の低下と嗅球の形成不全が認められた。この患者では、FGFR1 の Acid Box に 1 アミノ酸挿入変異(D132_133 insD ; FGFR1 mutant)があった。正常型 FGFR1 (FGFR1 WT) と FGFR1 mutant を BaF3 細胞に発現させた。FGFR1 mutant は FGF 刺激により細胞増殖を促進し、FGFR1 WT との増殖に違いは見られなかった。FGF2 の親和性は、FGFR1 WT と mutant では同様であった (Kd :10 ng/ml)。PC12 細胞を用いた神経突起伸長アッセイでは、FGFR1 mutant は FGFR1 WT より神経突起伸長が短かった(約 50%)。FGFR1 mutant ではなぜ神経突起伸長が短くなるのか、その原因を調べるため FGFR1 の主要な細胞内シグナル伝達経路である Ras/MAPK(ERK1/2)経路、PI3K/Akt 経路、PLC γ 経路について調べた。FGF2 刺激は、WT と mutant を介して MAPK(ERK1/2)と Akt のリン酸化を同様に引き起こしたが、FGFR1 WT と FGFR1 mutant への PLC γ の結合は、mutant では低くなっていた。以上の結果から、神経突起伸長の差は PLC γ の経路が関与していると考えられた。FGFR1 の Acid Box における 1 アミノ酸挿入変異が、神経細胞の神経突起の伸長に障害を及ぼし、その結果生体内では嗅球の形成に影響を与えていることが示唆された。

3) カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 は神経成長円錐の形成を促進する

組換え型 Anosmin-1 タンパク質の作製を行った。PC12 細胞にヒト正常型 FGFR1 WT を安定発現させ、FGF2 と Anosmin-1 で刺激し神経突起を伸長させた。その結果、FGF2 単独で神経突起の伸長が促進されたが、Anosmin-1 存在下で成長円錐の形成が促進されることがわかった。Anosmin-1 は Cdc42、Rac1 の活性化を引き起こした。カルマン症候群を引き起こす変異型 Anosmin-1 は成長円錐形成促進を誘導しなかった。Anosmin-1 は濃度依存的に成長円錐形成を促進したが、神経突起は Anosmin-1 単独では伸長しなかった。成長円錐形成のシグナルを調べたところ、Anosmin-1 刺激で Cdc42 が活性化していた。以上の結果は、FGFR1 と Anosmin-1 が神経突起伸長と成長円錐の形成に重要な役割を担っていることを示している。Anosmin-1 が成長円錐の形成を促進することは初めての報告である (図 2)。

図. 2 Anosmin-1 添加による神経成長円錐の形成促進



3. Research projects and annual reports

Solid tumor growth in animals and in man is accompanied by neovascularization called angiogenesis. New capillary growth is elicited by a diffusible factor such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) generated by malignant tumor cells. There is evidence that overexpression of VEGF and FGF correlate poor prognosis. We are investigating the molecular mechanisms whereby VEGF and FGF mediate tumor progression. Anti-VEGF antibodies (such as Avastin) have received much attention lately for their ability to block tumor angiogenesis and prolong the life of cancer patients. Neuropilins (NRP1 and NRP2) are receptors for the VEGF family of angiogenesis stimulators. Previously, it was shown that VEGFs act via VEGF receptor tyrosine kinases, but it now appears that VEGF activity is also modulated by NRPs, which have no kinase activity. We focus on developing new antitumor agents, which target the VEGF/NRPs and/or FGF mediated cell signaling in malignant tumor cells.

Another important project of our group is to investigate the molecular mechanisms of congenital disorders caused by neuronal impairment. FGF regulates the survival and motility of neural cells in vertebrates. Especially, loss of the function of FGF signaling in the central nervous system accounts for many hereditary and congenital disorders. We are actively studying the role of FGF receptor 1 (FGFR1) and downstream signaling cascades in Kallmann syndrome (KS).

KS is defined by the combination of hypogonadotropic hypogonadism (HH) and anosmia/ hyposmia. Loss-of-function mutations in the KS gene *KAL2/FGFR1* account for roughly 10% of KS cases, leading to the autosomal dominant form the diseases. The smell deficiency in KS is related to a defect in olfactory bulb development, and hypogonadism is due to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency, which presumably results from a failure of the embryonic migration of neuroendocrine GnRH cells from the olfactory epithelium to the forebrain. Clinical spectrum in *KAL2/FGFR1* mutation positive patients ranges widely from typical KS phenotype to apparently normal

phenotype with fertility, including anosmia/ hyposmia only phenotype.

Our contributions in these research fields are expected to lead to the development of regenerative therapies for neuronal disorder patients, which are currently the center of attention, as well as novel cancer treatments.

1: *VEGF-A induces VEGFR-independent signaling, Neuropilin dependent Tumorigenesis.*

Tumor-secreted VEGF-A is a crucial factor for tumor malignancy i.e tumor angiogenesis. Besides the aspect of tumor angiogenesis, there are reports to account that VEGF-A may promote proliferation and survival of tumor themselves. DJM1 cells, obtained from a metastatic squamous cell carcinoma patient, secrete high levels of VEGF-A (1.4 ng/ml, 1×10^6 cells, 48h) *in vitro*. Indeed, DJM1 tumor highly induced microvessels *in vivo*, and the conditioned medium from DJM1 cells stimulated growth and migration of HUVEC. VEGF-A siRNA treatment decreased VEGF-A secretion and the colony formations of DJM1 cells in soft agar. However, VEGFR2 kinase inhibitor did not suppress the colony formations. siRNA for neuropilin-1, another VEGF-A receptor, suppressed the colony formations, too. These results suggest that VEGF-A induces tumor angiogenesis and the survival and growth of tumor cells.

2: *A novel acid box mutant of FGFR1 confers olfactory bulb aplasia in a Kallmann syndrome patient.*

We found a novel *KAL2/FGFR1* mutant which induces the KS symptom. The proband was a 7-year-old Japanese girl who came to us because of anosmia. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed aplasia of bilateral olfactory bulbs, and an alinamin test indicated the lack of olfactory acuity. FGFR1 consists of three extracellular Ig-like domains D1-D3, an acid box domain, one transmembrane domain and one tyrosine kinase domain. A heterozygous 3 bp insertion mutation (D132_D133insD; ABinsD) leading to an expansion of the Asp repeat from six to seven was identified at exon 4 of FGFR1 in the girl. Our objective is to explore that the mutation in the Acid box domain of FGFR1 causes functional defects during FGF signaling. We transfected PC12 cells with expression vectors of FGFR1^{WT} or FGFR1^{ABinsD}, and cloned the stable expression cells. Using the clone for FGFR1^{WT} and the clone for FGFR1^{ABinsD}, we analyzed the neurite outgrowth assay. FGF2, the ratio of the neurite bearing cells was higher and the length of the neurites were longer in the FGFR1^{WT}-expressing PC12 cells compared to the FGFR1^{ABinsD}-expressing PC12 cells. These results demonstrate that the acid box of FGFR1 is important for neurite outgrowth in PC12 cells and the acid box mutation may be responsible for the olfactory aplasia in the KS patient.

4. 発表論文

なし

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

吉田亜佑美、寺田基剛、清水昭男、瀬尾美鈴：血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGFR)に依存しない、VEGF-Aの腫瘍形成促進。第57回日本生化学会近畿支部例会 生駒市、2010.5.22

大嶋朗、岡本沙矢香、寺田基剛、森川勇貴、清水昭男、佐藤直子、緒方勤、瀬尾美鈴：カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1はFGFR1活性化による成長円錐形成を促進する。第57回日本生化学会近畿支部例会、生駒市、2010.5.22

岡本沙矢香、森川勇貴、吉廣美里、大嶋朗、寺田基剛、清水昭男、佐藤直子、緒方勤、瀬尾美鈴：線維芽細胞増殖因子受容体1 (FGFR1) Acid Box 領域は神経突起伸長に重要な役割を果たす。第57回日本生化学会近畿支部例会、生駒市、2010.5.22

吉田亜佑美、瀬尾美鈴：VEGF-AのNeuropilinを介した癌細胞の増殖促進。第14回日本がん分子標的治療学会学術集会、東京船堀、2010.7.8

吉田亜佑美、寺田基剛、岡本沙矢香、清水昭男、Michael Klagsbrun、瀬尾美鈴：VEGF-A Promotes Tumor Proliferation in Skin Cancer Cells Expressing Neuropilin-1. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

Sayaka Okamoto, Akira Ohshima, Motoki Terada, Akio Shimizu, Naoko Sato, Tsutomu Ogata, Misuzu Seo :A novel acid box mutant of FGFR1 confers olfactory bulb aplasia in a Kallmann syndrome patient. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

大嶋朗、岡本沙矢香、寺田基剛、森川勇貴、清水昭男、佐藤直子、緒方勤、瀬尾美鈴：Kallmann症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1は神経成長円錐の形成を促進する。第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

8. その他特記事項

1. 外部資金

- 1) 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業研究者、研究代表:大槻公一「新型インフルエンザ対策に係る自然科学および社会科学融合研究」
- 2) 科学研究費補助金基盤 C 研究者、研究代表:黒坂 光「神経発生とアポトーシスに関わる脳特異的ムチン型糖鎖合成酵素の機能解析」
- 3) 共同研究、インタープロテイン株式会社「VEGF システム調節薬のスクリーニング系に関する研究」

2. 知的財産権

なし

3. 社会的貢献

京都府発明等功労者表彰審査委員として、第55回京都府発明等功労者表彰の審査を行った。2011年3月

4. 受賞等 なし

5. その他

- 1) 論文査読:Cancer Science (Wiley Blackwell), 2010年9月
- 2) 学会座長:第57回日本生化学会近畿支部例会 奈良先端
科学技術大学院大学、生駒市、2010.5.22
- 3) 学内役職:図書館長 (2010.10.1～)

発生細胞生物学研究室

Laboratory of Cell and Developmental Biology

1. 研究概要

ゴルジ体(装置)は小胞輸送経路の中心に位置し、分泌タンパク質や膜タンパク質の修飾や一部の脂質、糖脂質の合成を担当している。ゴルジ体は、また合成修飾されたタンパク質群の品質管理を行うとともに、完成したタンパク質群を最終目的地にしたがって選別し配送する機能も担っている。近年、当研究室での研究から、細胞の増殖や死、組織形成にともなう細胞の分化や分極において、ゴルジ体が大きな役割を果たしている事が明らかとなってきている。

細胞はゴルジ体の機能状態をモニターして、その構造や細胞内での局在を、細胞の機能発現に合わせて巧妙に調節していると推察されるが、その解析はほとんど進んでいない。そこで、ゴルジ体に局在するタンパク質、特に細胞周期や細胞運動の制御や細胞死の情報伝達への関与が示唆されているタンパク質の挙動や機能を生化学的・分子生物学的・細胞生物学的・発生生物学的手法を用いて解析し、①ゴルジ体の構造維持の分子機構やその細胞周期調節との連関を明らかにするとともに、②ゴルジ体から核や細胞質全体へどのような情報伝達が行われているのかを明らかにすることを目的として研究を進めている。また、初期発生の観察が容易でかつ培養細胞系での細胞生物学的解析が可能である、ゼブラフィッシュをモデル系として、③ゴルジ体が発生・組織形成や分化などの細胞の高次機能発現にどのような役割を果たしているかを明らかにする事を終局的な目的として研究を行っている。特に、初期発生でのゴルジ体、及びゴルジ体関連タンパク質の細胞内動態を解析するとともに、細胞の形態形成におけるゴルジ体の役割を明らかにする事を目指している。

2. 本年度の研究成果

小胞体からゴルジ体への輸送に機能する事が報告されている酵母 Yip1p/Yif1p の哺乳動物細胞における相同タンパク質として同定された9つのタンパク質(YIPF/Yip domain family)のうち、ゴルジ体に局在しており、Blue-Native PAGE で相互作用の可能性が示唆された YIPF3 と YIPF4 の機能解析を進めた。

免疫蛍光染色および免疫電子顕微鏡解析の結果、YIPF3 と YIPF4 は明らかにシスゴルジに濃縮して存在することが明らかとなった。YIPF4 タンパク質は、遺伝子から予想される単一の分子量の産物として検出されたが、YIPF3 は、3種の異なる分子量の産物として検出された。

[35S]を用いたトレーサー法と、各種糖鎖分解酵素処理を用いた生化学的解析、また免疫蛍光染色法による解析によって、YIPF3 は、まず小胞体でN型糖鎖が付加した後(40kDa)、

教授 中村 暢宏

Prof. Nobuhiro Nakamura, Ph.D



ゴルジ体で O 型糖鎖の不可を受け(46kDa)、さらに、ゴルジ体で C 末端の膜内腔部位が切断される(36kDa)ことが明らかとなった。

YIPF3 と YIPF4 はゴルジ体で複合体を形成し、この複合体形成が YIPF3 と YIPF4 の局在と機能に重要であることが示唆された。YIPF3 あるいは YIPF4 のいずれのノックダウンによっても有意なゴルジ体の分散化が観察されたことから、YIPF3 と YIPF4 が、ゴルジ体の構造維持に機能している事が示唆された。

3. Research projects and annual reports

Research Projects

The Golgi apparatus is situated at the center of the vesicular transport pathway. It is an organelle where secretory and membrane proteins and some glycolipids are synthesized and modified. The Golgi apparatus inspects the quality of the synthesized and modified proteins and only the approved proteins are selected, sorted and dispatched to their final destinations. Our recent experimental results indicated that the Golgi apparatus plays important roles in the cell differentiation and polarization during the cell growth, death and tissue development.

It is proposed that the cell somehow monitors the functional state of the Golgi apparatus and efficiently regulates its localization and structure according to the needs of cellular functions. However, the regulatory mechanism has not been well understood. We, therefore, trying to elucidate (1) the molecular mechanism of the maintenance of the Golgi structure and its relationship with the cell cycle control, (2) the mechanism of the signal transduction from the Golgi apparatus to the cytoplasm and the nucleus, by analyzing the functions and dynamics of the proteins which are propose to be involved in the cell cycle control, cell movement and cell death using biochemical, molecular, cellular and developmental biological methods.

We are also trying to find (3) the role of the Golgi apparatus in the expression of the higher ordered cellular functions during embryonic and tissue development using zebrafish, which is suitable for the observation of embryogenesis and cell biological analyses, as a model organism. Especially, we are focusing on the dynamics of the Golgi apparatus and the associated proteins during the early

embryogenesis to understand the role of the Golgi apparatus in the cellular morphogenesis and movement.

Annual report

The Yip1 domain family (YIPF) proteins are homologues of yeast Yip1p and Yif1p, which are proposed to function in ER to Golgi transport. We characterized YIPF3 and YIPF4, homologues of human Yif1p and Yip1p, respectively. Immunofluorescence and immuno-electron microscopy showed that both YIPF3 and YIPF4 are clearly concentrated in the cis-Golgi. While YIPF4 was detected as a single mobility form consistent with its predicted molecular weight, three different mobility forms of YIPF3 were detected by western blotting. Biochemical and immunofluorescence experiments strongly indicated that YIPF3 is synthesized in the ER as a N-glycosylated form (40 kDa), is then O-glycosylated in the Golgi apparatus to become a lower mobility form (46 kDa) and finally becomes a higher mobility form cleaved at its C-terminal luminal domain (36 kDa). YIPF3 and YIPF4 form a complex in the Golgi apparatus, and this was suggested to be important for their proper localization and function. The knockdown of YIPF3 or YIPF4 in HeLa cells induced fragmentation of the Golgi apparatus, suggesting their involvement in the maintenance of the Golgi structure.

4. 発表論文

M. Sohda, Y. Misumi, A. Yamamoto, N. Nakamura, S. Ogata, S. Sakisaka, S. Hirose, Y. Ikehara and K. Oda. Interaction of Golgin-84 with the COG complex mediates the intra-Golgi retrograde transport. *Traffic* **11**: 1552-1566 (2010)

5. 著書および総説

N. Nakamura. Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci* **112**: 255-264 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

D. Tamura and N. Nakamura: Involvement of phospholipase A2 and rab GTPase in the disassembly of the Golgi apparatus induced by low pH treatment. 第 62 回、日本細胞生物学会大会(大阪)2010 年、5 月 19-21 日

N. Nakamura and N. Sakai: Yip1 domain family members localizing in the *trans*-Golgi/*trans*-Golgi network. BMB2010, 第 3 回、日本

分子生物学会年会, 第 83 回、日本生化学会大会、合同大会(神戸)2010 年 12 月 7 日-10 日

M. Sohda, Y. Misumi, A. Yamamoto, N. Nakamura and K. Oda: Interaction of golgin-94 with the conserved oligomeric Golgi (COG) complex mediated the intra-Golgi retrograde transport. BMB2010, 第 3 回、日本分子生物学会年会, 第 83 回、日本生化学会大会、合同大会(神戸)2010 年 12 月 7 日-10 日

8. その他特記事項

N. Nakamura: Emerging new role of the Golgi apparatus in higher order cell functions: Presentation as a member of Kyoto Sangyo University delegates, Faculty of Science, Mahidol University (Bangkok, Thailand), March 1, 2011

N. Nakamura: Emerging new role of the Golgi apparatus in higher order cell functions: Presentation as a member of Kyoto Sangyo University delegates, Chulabhorn Research Institute (Bangkok, Thailand), March 2, 2011

N. Nakamura: Emerging new role of the Golgi apparatus in higher order cell functions: Presentation as a member of Kyoto Sangyo University delegates, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University (Bangkok, Thailand), March 3, 2011

N. Nakamura: Emerging new role of the Golgi apparatus in higher order cell functions: Presentation as a member of Kyoto Sangyo University delegates, Faculty of Sciences, Kasetsart University (Bangkok, Thailand), March 4, 2011

神経回路発生研究室

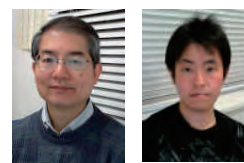
Laboratory of Neural Network Development

教授 浜 千尋

Prof. Chihiro Hama, Ph.D

助教 中山 実

Assist. Prof. Minoru Nakayama



1. 研究概要

われわれが日常、物を考えたり、学習、記憶したりすることができるのは、脳の複雑さの中にわれわれの知識を超えた未だ謎と呼ぶべき機構が存在するからである。そして、その謎を明らかにすることで混沌とした脳に法則性を示すことができるようになる。われわれは、脳の個々の発生現象の制御機構を分子レベルで明らかにすると共に、脳全体の発生を統御する遺伝プログラムの解明を目指して研究を進めている。以上の問題にアプローチするために、10万個の神経細胞からなるシンプルな脳(ヒトの脳の百万分の一)を持つショウジョウバエをモデル動物として研究に用いている。

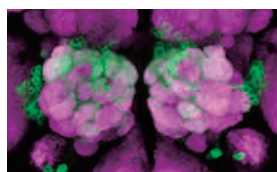
脳の機能は、多数の神経回路が協調的に作動することにより生まれる。そして微視的には、それぞれの回路を作る神経細胞が線維を伸長させて互いに特異的に接続し、その接続部であるシナプスが正常に働かなければならない。われわれは、この回路ができあがる過程で異常を生む遺伝子変異の解析をもとに、神経回路の発生機構に関する以下の2つのテーマについて研究している。

1) Hig タンパク質の機能の解明

活動性の低下および「ふるえ」を示す変異表現型の原因遺伝子として同定された *hikaru genki* (*hig*) 遺伝子はシナプス間隙に局在する分泌性タンパク質をコードしている。この Hig タンパク質のシナプス分化における役割は未だ謎であり、その機能および作用機構を分子レベルで解明することを目標とする。さらにヒトで見いだされた類似遺伝子は「てんかん」や精神遅滞、脳構造の異常等の遺伝性疾患の原因遺伝子として同定されており、その産物と Hig タンパク質との機能的関連性を解析する。

2) 嗅覚神経の軸索投射が異常になる変異株の解析

嗅覚神経細胞の軸索投射パターンに異常が生じる変異株をわれわれはクローン解析を用いたスクリーニングにより複数分離してきている。その原因遺伝子の同定と産物の機能解析を進めることにより、精密な軸索投射を制御する分子機構を明らかにしていく。



左図 ショウジョウバエの脳内にある嗅覚一次中枢(緑および白)。

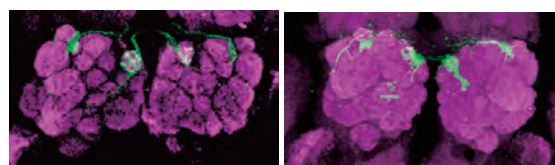
2. 本年度の研究成果

1) Hig タンパク質と相互作用する分子の同定

Hig タンパク質は補体調節タンパク質ドメインを複数持つことから、他のタンパク質と複合体を形成して機能することが予想される。そして、その複合体の構成タンパク質を同定することにより Hig の機能が解明される可能性がある。われわれは、その構成タンパク質を同定する目的で、*hig* 変異株と同様に活動性が低下する変異株の探索をすすめたところ、新たに2つの遺伝子の変異、*dig* (*defective localization of Hig*) と *higl* (*hig-like*) を同定した。興味深いことに *dig* 変異体の脳では、Hig タンパク質のシナプス領域における局在が消失していた。すなわち、*Dig* は Hig タンパク質のシナプス間隙への局在に必要であることが明らかとなった。*Dig* と *Hig* が実際にタンパク質複合体を形成する可能性については今後検証していく。また、*Dig* が *Hig* のシナプスにおける安定性に関与するのか、あるいはシナプス間隙への輸送に関与するのか明らかにしていく必要がある。もうひとつの *higl* 遺伝子については、その発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べたところ、胚においては中枢神経系の一部の細胞で発現していることが明らかとなった。

2) 嗅覚神経細胞の投射異常を示す変異遺伝子の同定

今までに分離してきた嗅覚神経細胞の軸索投射に異常を示す複数の変異株に対して変異マッピングを行ったところ、3種類の変異株について原因遺伝子の同定に成功した。そのうちのひとつは、ヒストンのメチル化制御に関与するタンパク質をコードしていた。その変異による表現型は、軸索が本来とは異なる位置にも投射する、あるいは正しい標的位置からさらに軸索が過伸長するというものであった(下図右。左は野生型)。これらの結果は、ヒストンのメ



野生型

変異型

チル化により軸索投射を制御する遺伝子の発現が制御されていることを示唆している。今後は、変異株における表

現型の詳細をさらに解析していくと共に、具体的に影響を受けている軸索投射制御遺伝子を同定していく。

3. Research projects and annual reports

How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We study molecular mechanisms underlying specific neuronal events that occur during nervous system development and also try to understand a genetic program that globally governs the circuit formation in the brain. To approach these problems, we employ a small brain of *Drosophila* comprising 10^5 neurons, only a millionth of the human brain. Our research, based on the analysis of the mutants that show either a behavioral or morphological phenotype, is focused on two themes concerning neural circuit formation.

1: A role of Hig protein in synaptic clefts.

The *hig* (*hikaru geneki*) gene, identified by a mutant phenotype of reduced locomotor activity, encodes a secreted protein localized to synaptic clefts in the brain. The goal of this project is to reveal a role for Hig in synaptic clefts. In addition, the absence of one of the human proteins resembling to Hig is known to cause epilepsy, mental retardation or brain malformation. Thus, we are also interested in the functional relationships between Hig and the human protein.

2: Analysis of the mutants showing abnormal axonal projection of olfactory receptor neurons (ORNs).

We have isolated several mutants in which ORN axons exhibit abnormal projection patterns in the first-order olfactory center in the brain. The purpose of this project is to reveal the molecular mechanisms that regulate the precise axonal projection of ORNs through the analysis of the mutants and causal genes.

Annual reports

1-1: Identification of a protein that affects the localization of Hig in synaptic clefts.

Hig is predicted to form a complex with other proteins because Hig contains several CCP (Complement Control Protein) domains. Identifying such a complex component would help us reveal the function of Hig. We therefore decided to search the mutants exhibiting reduced locomotor activity, a phenotype similarly shown by *hig* mutants, and found two mutants, tentatively named *dig* and *higl*. Notably, Hig disappeared in the synaptic regions of the *dig* mutant brains, which indicates that Dig is required for Hig localization in synaptic clefts. Whether Dig forms a complex with Hig has to be tested by immunoprecipitation experiments in the near future. It also remains to be clarified whether Dig

regulates the stability of Hig or transport of Hig to synaptic clefts. Another gene *higl*, as analyzed by *in situ* hybridization, is expressed in a subset of neurons in the embryonic central nervous system.

1-2: Hig protein as a possible component of the synaptic cleft extracellular matrix.

Immunofluorescence with newly generated Hig antibody reveals that Hig is present in most synaptic regions in the adult brain and tightly adjacent to both presynaptic and postsynaptic proteins (Bruchpilot and ALS, respectively), being consistent with Hig localization in synaptic clefts. During rescue experiments, we found that Hig-GFP protein expressed by a glia-specific driver recovered the locomotor activity and longevity of *hig* mutants. Notably, Hig-GFP produced by the glia cells is predominantly present in the synaptic regions. This suggests that Hig protein transported from a distance through extracellular spaces and not from synaptic terminals can be incorporated into synaptic clefts. We propose that Hig protein specifically binds to some of scaffold components that constitute an extracellular matrix in synaptic clefts.

2: Identification of the responsible genes for the mutants showing abnormal axonal projection of ORNs.

We have successfully identified the genes responsible for three mutations that affect ORN axonal projection. One of the genes encodes a protein that is involved in the regulation of histone methylation. The mutant phenotype is ectopic axonal targeting or overshooting from the correct target. These data suggest that histone methylation regulates expression of a gene that controls axon guidance. We will further examine the details of the phenotype and identify the guidance cue expressed under the epigenetic control.

4. 発表論文

M. Nakayama, H. Sato, T. Okuda, N. Fujisawa, N. Kono, H. Arai, E. Suzuki, M. Umeda, H.O. Ishikawa and K. Matsuno. *PLoS One* in press, 2011.

H.O. Ishikawa, T. Ayukawa, M. Nakayama, S. Higashi, S. Kamiyama, S. Nishihara, K. Aoki, N. Ishida, Y. Sanai and K. Matsuno. *J. Biol. Chem.* **285**(6):4122-4129 (2010)

5. 著書および総説

M. Nakayama and C. Hama: Modulation of neurotransmitter receptors and synaptic differentiation by proteins containing complement-related domains. *Neuroscience Research* in press, 2011.

浜 千尋: ショウジョウバエ嗅覚神経回路の発生機構.

ブレインサイエンスレビュー2010 185-208 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

浜 千尋:ショウジョウバエ嗅覚神経回路の形成機構. 京都産業大
学総合生命科学部バイオフィオーラム、京都市、2010.12.21

7. 学会発表 なし

8. その他特記事項

1. 外部資金

日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究(B)
「シナプスを形成する神経細胞間の発生過程における相互
作用」(代表)

2. 知財権等

なし

3. 学外活動

日本学術振興会 特別研究員等審査会専門委員

4. 受賞等

なし

5. その他

なし



糖質生物学研究室

Laboratory of Glycobiology

1. 研究概要

糖鎖は原核細胞と真核細胞に広く存在する多様な情報を持つ分子で、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンとして存在する。糖鎖の担う生物学的な役割はこれまでの多くの研究から、タンパク質高次構造の監視 (quality control)、胚発生の初期のコンパクションに代表される細胞間の接着、免疫系細胞の血管系からリンパ系への移動に関わるセレクトインが糖鎖を識別すること、多くのホルモン (FGF や HGF など) と細胞増殖因子がそれらの受容体と結合して生じるシグナル伝達を糖鎖が調節していること、免疫系細胞のリクルートや活性化に関わるケモカインやサイトカインの局所部位への蓄積、感染ウイルスの docking site の形成、などに糖鎖が深く関わることが明らかにされている。また、細胞のがん化に伴って発現される特異糖鎖も明らかとされ、がん細胞の増殖と転移との関わりについても注目されている。しかしながら、細胞接着・認識や細胞増殖などに関わる多くのタンパク質がどのような特異糖鎖構造と相互作用して生理活性が調節されているのかについては不明な点が多く残されている。

これまで糖鎖の意義に関する研究を続けてきたが、最近の末梢神経細胞(PC12,PC12D 細胞)のニューロンへの分化に関わる糖鎖構造の比較研究から、未分化 (NGF 無刺激) 状態にある PC12 細胞にあっては、細胞膜表面にある糖タンパク質に結合しているポリラクタサミン鎖の発現量がニューロンへと分化する過程で抑制されること。また、興味深いことに、PC12 細胞から変異細胞として分離された PC12D 細胞では、NGF に反応性が高く、短時間でニューロンへと分化する能力を備えていることと、ポリラクタサミン鎖の発現量の減少とがよく一致した。そこで、ポリラクタサミン鎖含有糖タンパク質を PC12 細胞の膜面分から分離精製し、その主要な糖タンパク質の 1 つについて、アミノ酸配列分析の決定、遺伝子データベースの検索、ポリラクタサミン分解酵素によるタンパク質の挙動の観察などから、主要なポリラクタサミン含有糖タンパク質の 1 つが CD24 であることが突き止められた。

得られた結果から、NGF 刺激による PC12 細胞のニューロンへの分化の過程で、何らかの影響によって細胞膜表面の CD24 の発現が抑制され、その結果膜表面に発現されるポリラクタサミン鎖が減少すること。そして、神経突起を短時間で形成する変異株の PC12D 細胞では NGF 未刺激であっても、CD24 発現量が抑制されていた

教授 福井 成行

Prof. Shigeyuki Fukui,Ph.D



ために、ポリラクタサミン鎖の発現量が少なかったことが明らかとなった。

CD24 はこれまでの多くの研究から、免疫系 (特に未分化 B-細胞)、神経系細胞やいくつかの癌化細胞などに発現されることが知られ、また、SDS-PAGE 上の特異な行動について報告されていたが、その原因のみならず、生物学的な役割についても不明とされている。

最近、糖鎖と相互作用するタンパク質のリガンドとなる糖鎖構造を検索する方法として、人工糖脂質 (ネオグライコリピド) を応用した糖鎖マイクロアレイ法を考案し、高感度で結合糖鎖の構造を推定することを可能とした。

そこで現在は、1) ポリラクタサミン鎖を含有することを明らかにした PC12 細胞の CD24 が普遍的なものであるのかを知るために、新たに開発した CD24 精製法を用いて、神経細胞のみならず、リンパ系の細胞、がん細胞からも分離精製し、組織間における CD24 に結合している糖鎖構造の共通点や違いを明らかにする。2) CD24 が癌細胞を含めて未分化細胞に発現されることから、CD24 の発現を抑制した時の分化過程への影響に興味を持たれる。そこで、RNAi 法を用いて PC12 細胞の CD24 発現を抑制させて NGF 刺激による PC12 細胞のニューロンへの分化の影響を観察する。また、NGF の受容体結合によるシグナル伝達に及ぼす CD24 の役割も追及する。3) ポリラクタサミン鎖以外に、CD24 分子上には様々な糖鎖が結合している。それら糖鎖の役割を追及するために、CD24 から分離した糖鎖をネオグライコリピド化し、糖鎖マイクロアレイ法に応用して、CD24 分子上の様々な糖鎖の構造を明らかにするとともに、それら糖鎖、特にポリラクタサミン糖鎖と相互作用する生体物質を同定する。4) 免疫系の B-細胞に関して、鳥類では骨髄で生まれた未熟 B-細胞は総排泄腔の末端にあるファブリキウス嚢で分化増殖して成熟 B-細胞となることが知られている。新型鳥インフルエンザ研究の一つとして、インフルエンザウイルスの感染する宿主細胞の 1 つで、免疫系に影響を与える標的糖タンパク質としても CD24 が考えられた。そこで、ニワトリのファブリキウス嚢にある B-細胞に対してのインフルエンザウイルスの感染の有無、ニワトリの脳や B-細胞から分離精製した CD24 の糖鎖構造を明らかにする。その第一として、ニワトリ CD24 に対する抗体が必要である。そこで、遺伝子データベースから CD24 遺伝子を推定し、そのアミノ酸配列を利用し

て抗体の作成を試みている。現在、特異抗体を含む抗血清を得た状態である。

2. 本年度の研究成果

1) PC12 細胞から、レクチンカラムを応用したポリラクトサミン鎖含有糖タンパク質の精製と、アミノ酸配列の分析、特異酵素による SDS-PAGE 上の挙動から、主要なポリラクトサミン鎖含有糖タンパク質の 1 つが 62kDa の CD24 であることが突き止められた。2) CD24 は GPI アンカー型糖タンパク質であり、物理的な性状が糖脂質のそれと類似することから、有機溶媒を用いた精製方法を用いることで効率よく分離できることを明らかとした。また、この性質から、CD24 は糖鎖マイクロアレイ法に直接応用できた。糖鎖マイクロアレイの結果から PC12 細胞由来の CD24 は、ポリラクトサミン糖鎖以外に、 α 2,3 結合や α 2,6 結合したシアル酸、fucose 含有糖鎖などを含む多様性に富む分子であることが明らかになった。興味深いことに、CD24 は由来する組織によってポリラクトサミン糖のみならず糖鎖の構成を異にしていた。

3. Research projects and annual reports

To explore the biological role of carbohydrate chains in the process of nerve cell differentiation, I have carried out characterization of the carbohydrate structure of glycoproteins by comparing conventional PC12 cells with variant cells (PC12D). Previously we showed that the length and content of poly-N-acetyllactosamine chains obtained from the membrane fraction differed significantly between PC12 and PC12D, and also that NGF stimulation decreased the content of poly-N-acetyllactosamine chains of PC12 cells, but had no effect on PC12D cells. The isolated PL-GPs were analyzed by SDS-PAGE and fluorography as well as the susceptibility to endo- β -galactosidase. The amino acid sequence analysis of 62kDa PL-GP quite resembled that of rat CD24.

CD24 is a GPI-glycoprotein that is anchored to the surface of cell membrane. To characterize carbohydrate chains on 62kDa PL-GP (i.e. CD24), the nitrocellulose based microarray system on which partially purified CD24 was immobilized, were applied. This assay revealed that CD24 had not only poly-N-acetyllactosamine chains, but also the poly-N-acetyllactosamine chains were terminated with O-blood type fucose residues, but not Lewis x and/or sialyl Lewis x structures, for example. This microarray assays also suggested that the reason for the less content and having shorter poly-N-acetyllactosamine chains in PC12D cells

might be originated in less expression of CD24 gene in addition to the less GnT-i activity.

4. 学会発表

1. S. Fukui and M. Kawahara; Characterization of one of major Poly-N-acetyl-lactosamine-carrying glycoproteins in PC12 cells and its variant cells, PC12D. 第25回国際糖質シンポジウム 2010年8月 東京(千葉) 幕張
2. S. Murakoshi, S. Mizumoto, K. Kalayamanitra, S. S. Deepa, S. Fukui, P. Kongtawelert, S. Yamada and K. Sugahara; A series of novel hexasaccharides isolated from chondroitin sulfate of shark fin cartilage and recognized by the antibody that stains mouse brain sections. 第25回国際糖質シンポジウム 2010年8月 東京(千葉) 幕張

5. その他特記事項

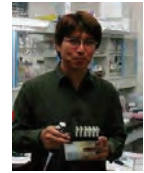
なし

膜エネルギー代謝分野

Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism

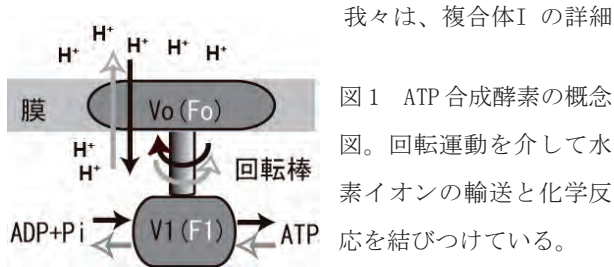
教授 横山 謙

Prof. Ken Yokoyama, Ph.D



1. 研究概要

生命の維持にはエネルギーが必要である。生命がエネルギー作り出す仕組みを研究するのが、生体エネルギー学 (Bioenergetics) である。生命のエネルギー通貨である ATP の大部分は、呼吸による酸化的リン酸化により効率よく作られる。我々の体では、細胞内器官であるミトコンドリアに存在する呼吸鎖酵素群がその役割を担っている。呼吸鎖酵素のトップバッターが複合体 I といわれる NADH 脱水素酵素である。呼吸鎖酵素の II から IV までの構造は詳細に解明されており、その仕組みの理解もだいぶ進んでいる。複合体 V すなわち ATP 合成酵素は、複合体 I-IV によって作られたプロトン濃度勾配と膜電位 (プロトン駆動力) を回転力に変換し、回転力によって ADP をリン酸化して ATP を合成する (図 1 参照)。回転と ATP 合成の関係は、構造生物学と 1 分子観察という手法でその理解が進んでいる。しかし、プロトン駆動力で回転する仕組みは、よくわかっていない。



な構造、およびプロトン駆

動力による回転の仕組みの解明を、構造生物学、1 分子観察、生化学 の手法を用いて取り組んでいる。生命がエネルギーを変換したり利用する過程は、一方で、老化や老化に伴う疾病と深い関係がある。寿命を変化させる遺伝子の中には、エネルギー代謝関係の酵素が沢山あり、エネルギー摂取量そのものが寿命を規定することも報告されている。我々は、エネルギー代謝の中心物質である ATP の細胞内濃度と寿命との関係を、分子イメージングという手法で解明する研究に着手したところである。生体エネルギー学の視点から老化・寿命の問題にとりくんでいく予定である。

本研究分野では次の諸点について研究を展開している。

1) V-ATPase の回転触媒機構の解明

我々は、生化学、生物物理学 (1 分子観察)、構造生物学の手法を用いて、生体内で最も重要で創薬ターゲットでもある V-ATPase の機能・構造の解明を進めている。

回転触媒機構によるエネルギー変換やイオン輸送機構の解明、V-ATPase を標的とした創薬につながる知見を得ることが目的である。

2) 個体での ATP レベルイメージング

栄養状態と寿命との関連が近年指摘されている。栄養制限により多くの生物種で寿命が延びることも報告されている。エネルギー代謝の要ともいえる ATP の産生・消費と寿命との関連を線虫 *Caenorhabditis elegans* を材料にして明らかにする。

3) 複雑な膜タンパク質の構造解析。

V-ATPase のような複雑なサブユニット構造をもつ膜タンパク質の構造が解けた例は多くない。というのは結晶構造学に適した超分子膜タンパク質の精製が難しいからである。V-ATPase の精製系で用いている好熱菌を宿主としたタグ精製系を応用し、従来困難であった複雑な膜タンパク質の精製系を確立し、構造解明を目指す。Psr (呼吸鎖タンパク質の一種)、呼吸鎖酵素の Complex I、繊毛複合体の一部に関してヒスチジンタグ精製系の確立に成功しており、結晶も得られている。網羅的な構造生物学でカバーしきれない複雑な膜タンパク質の構造情報を提供するとともに、次の研究材料を探索するのが目的である。

2. 本年度の研究成果

1) V-ATPase のイオン輸送輸送に関係した動きの解明

直径 40 nm という微小な粒子を V-ATPase に結合させ、ATP の加水分解に伴う回転運動を観察した。その結果回転分子モーターにおけるイオン輸送の素過程に関係した動きを直接観察することに世界で初めて成功した。これにより、イオンの動きと回転運動間のエネルギー変換過程の仕組みの一端が解明された。

2) 老化に伴う ATP 濃度変化の検出

老化・寿命研究において最も実績のあるモデル生物である *C. elegans* を材料とし、加齢に伴う ATP 濃度変化の有無、ATP 濃度と老化や細胞・個体死との直接関係の有無を調べた。1 個体の ATP 量をルシフェリン・ルシフェラーゼを用いた燐光で測定した。その結果、加齢に伴う著しい ATP 濃度変化が起こることがわかった。次に *C. elegans* に ATP センサータンパク質である ATeam を導入した。定常的に ATeam を特定の細胞 (筋肉、神経細胞等) で発現する遺伝子導入線虫を作成した。

3. Research projects and annual reports

1. Rotary mechanism of V-ATPase

Vacuole-type ATPases (V_oV_i) and F_oF_1 ATP synthases couple ATP hydrolysis/synthesis in the soluble V_i or F_1 portion with proton (or Na^+) flow in the membrane-embedded V_o or F_o portion through rotation of one common shaft. Here we show at submillisecond resolutions the ATP-driven rotation of isolated V_i and of the whole V_oV_i from *Thermus thermophilus*, by attaching a 40-nm gold bead for which viscous drag is almost negligible. V_i made 120° steps, commensurate with the presence of three catalytic sites. Dwells between the steps involved at least two events other than ATP binding, one likely ATP hydrolysis. V_oV_i exhibited twelve dwell positions per revolution, consistent with the twelve-fold symmetry of the V_o rotor in *T. thermophilus*. Unlike F_1 that undergoes 80° - 40° substepping, chemo-mechanical checkpoints in isolated V_i are all at the ATP-waiting position, and V_o adds further bumps through stator-rotor interactions outside and remote from V_i .

2. ATP sensing system in whole nematode

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is the major energy currency and is involved in many biological processes. The ATP monitoring system of the single cell of living animal in real-time can be helpful to study the relation between energy metabolism and biological processes. The fluorescent ATP biosensor ATeam, which has been reported to monitor free ATP levels inside living cultured cells based on fluorescence resonance energy transfer (FRET), was then introduced into nematodes by microinjection and UV-irradiation method. It is confirmed whether ATeam function in nematode cells using cultured cells derived from the transgenic nematode. The ATeam expressed and worked in nematode cells. Their vulval cells allowed detection of different ATP levels in the cytosol compared to mitochondria. These experiments demonstrate that ATeam is available for detection of ATP levels change in nematode cells.

4. 発表論文

Furuike, S., Nakano, M., Adachi, K., Noji, H., Kinoshita Jr., K., and Yokoyama, K. Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilus* H^+ -ATPase/synthase with an essentially drag free probe. *Nature Communications*, 2 in press

5. 著書および総説

なし。

6. 招待講演、シンポジウム等

横山 謙: 老化と ATP濃度. 第2回 膜輸送体研究会 (特定領域革新的ナノテクノロジー 主催)、余市市、2010.12.22

7. 学会発表

Furuike S., Nakano M., Adachi K., Noji H., Kinoshita K. Jr., Yokoyama K.

Resolving stepping rotation of V-ATPase with an essentially drag-free probe. 16th European Bioenergetics conference

(Warsaw, Poland. 7/17-22)

Kishikawa J., Fujikawa M., Imamura H., Yasuda K., Ishii N., Mitani S., Noji H., Yokoyama K.

ATP concentration change in *Caenorhabditis elegans*. 16th European Bioenergetics conference

(Warsaw, Poland. 7/17-22)

岸川 淳一, 藤川 誠, 今村 博臣, 安田 佳代, 石井 直明, 三谷 昌平, 野地 博行, 横山 謙

線虫 *Caenorhabditis elegans* の加齢に伴う ATP 濃度変化の測定 第36回 日本生体エネルギー研究会

(大阪大学・銀杏会館. 11/19-20)

古池 晶, 木下 一彦, 横山 謙

無負荷回転プローブによる好熱菌 V_oV_i/V_i のステップ解析 第36回 日本生体エネルギー研究会

(大阪大学・銀杏会館. 11/19-20)

岸川 淳一, 藤川 誠, 今村 博臣, 安田 佳代, 石井 直明, 三谷 昌平, 野地 博行, 横山 謙

線虫の加齢に伴う細胞内 ATP 濃度の変化 日本分子生物学会・日本生化学会 合同大会

(神戸ポートアイランド. 12/7-10)

8. その他特記事項

1. 外部資金

受託研究 ターゲットタンパク研究プログラム 「創薬に繋がる膜輸送体の構造、機能の解明」分担代表研究者: 横山 謙
科学研究補助金基盤研究 B「電子顕微鏡による複合体 I および V-ATPase の構造解析」 研究代表者: 横山 謙

タンパク質バイオジェネシス研究室

Laboratory of Protein Biogenesis

教授 伊藤 維昭

Prof. Koreaki Ito

助教 千葉 志信

Assist. Prof. Shinobu Chiba



1. 研究概要

タンパク質バイオジェネシス研究室では、新たな研究分野「合成途上鎖の分子生物学」の開拓と推進を行っている。生命活動を進行させる中心的な生体分子であるタンパク質は、DNA に書き込まれ mRNA に写し取られた遺伝情報に従った順番でアミノ酸が順次結合することによって作られる。この遺伝情報の翻訳過程はリボソームの内部において進行し、伸長しつつある合成途上鎖 (polypeptidyl-tRNA) はリボソーム内部のトンネルを通してポリペプチド部分がリボソームの外に出て行く。通常、タンパク質はリボソームから生まれ落ちた後、立体構造を獲得して働くと考えられているが、我々は、「合成途上で働く」という、タンパク質の新たなあり方に関する研究を進めている。具体的には、タンパク質の細胞外への分泌を監視して膜透過モータータンパク質 SecA の発現制御を行う大腸菌 SecM や、膜タンパク質の細胞膜への挿入過程を監視して膜挿入装置 YidC の翻訳制御を行う枯草菌 MifM などを取りあげている。

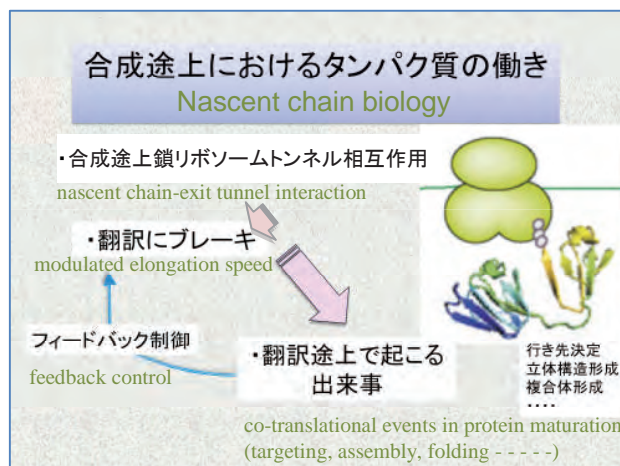
細胞機能を監視して遺伝子発現を制御するこれらのモニタータンパク質はリボソームトンネルの内部でトンネル成分と相互作用して翻訳にブレーキをかける「アレスト配列」を持つ一方、リボソームの外に出た「センサー」部分はタンパク質分泌装置や膜挿入装置などの働きを受け、それらの活性に呼応して翻訳にブレーキをかけるかどうかを決めている。このようにして mRNA 上でのリボソームの動きが制御され、mRNA 分子の状態変化と標的遺伝子の翻訳制御が行われる。我々は、SecM や MifM の発見により示した新事実——【リボソームによる翻訳のスピードが合成途上鎖のアミノ酸配列およびその動的状態により影響されることがある】——の機構や意義を解明すると同時に、さらに発展させて、翻訳スピードの微調整が、より一般的にタンパク質の細胞内配置、立体構造の獲得、複合体形成などの成熟過程を促進している可能性を追求している。このため、細胞に於ける合成途上鎖 (未だ tRNA 分子に結合しているポリペプチド鎖) に注目した研究も展開している。

2. 本年度の研究成果

1) アレスト配列の多様性、特異性、センサーとの組み合わせの自由度に関する解析: 通常、類似の生化学的性質を共有するタンパク質同士はアミノ酸配列に類似性があるが、アレスト配列は極めて多様である。試験管内での無細胞タンパク質合成反応を駆使した実験により、アレスト配列が生物種毎に

異なる個別性の高い方式でリボソームに働きかけることを明らかにした。また、MifM のセンサー部位を改変することにより、膜挿入反応によって制御される翻訳アレストを分泌反応によって制御されるように転換させることに成功した。これらの結果から、アレスト配列とセンサー部位は独立のユニットとして働き得るものであることを示した。元来は異なる調節系由来のセンサーとブレーキを組み合わせても遺伝子発現調節が可能であることがわかり、それぞれの生物種は、固有の機能単位として働くこれらのアミノ酸配列を組み合わせ、様々な生理活性をモニターする「合成途上で働く制御系」を進化させてきたことを示唆した。

2) 細胞に於ける polypeptidyl-tRNA を検出する方法の開発: 細胞内の polypeptidyl-tRNA を検出することは、「合成途上鎖の分子生物学」の基礎であるが、従来はこのような試みがなされていなかった。そこで、ペプチドと tRNA とを結合するエステル結合の安定性に関する詳しい調査を行い、それを利用した二次元電気泳動により細胞内 polypeptidyl-tRNA (“nascentome”) を検出・可視化する方法を開発中である。



3. Research projects and annual reports

We intend to develop a new area of research, which might be called “nascent chain biology” by addressing a concept that translation elongation speed is fine-tuned by intra-ribosomal part of amino acid sequences of the translation product as well as by dynamic behaviors of the extra-ribosomal part of the same nascent chain. We found that some of cellular factors that facilitate secretory protein

export and membrane protein insertion are controlled by regulatory nascent polypeptides that function in concert with this principle and are studying molecular mechanisms and physiological outcomes of the regulation. Also, we are developing experimental methods to visualize cellular polypeptidyl-tRNAs, essential but poorly studied intermediates in translation.

This year's accomplishments:

1. Regulatory nascent polypeptides encoding ribosome-stalling amino acid sequences provide a novel mechanism to regulate the expression of genetic information. Our previous studies have shown that two of these regulatory nascent chains, *B. subtilis* MifM and *E. coli* SecM, are unique in having two functional elements, with one region (the arrest module) stalling translation and the other (the sensor module) monitoring the cellular processes of membrane protein insertion (in the case of MifM) or protein export (in the case of SecM) by serving as co-translational substrates of the respective machineries and thereby controlling release of the translational arrest. We probed the species specificity and modularity of these two regulatory polypeptides, using in vitro and in vivo approaches. The results obtained demonstrate that the elongation arrest produced by these polypeptides is species-specific and therefore a result of specific interactions between the nascent chain and the ribosome. However, we can convert MifM into a monitor of protein secretion by replacing its native transmembrane domain with an export signal sequence. This highlights the modular nature of regulatory nascent chains and indicates that the translational arrest can be regulated by different co-translational events that use different cellular machineries.

2. Polypeptidyl-tRNAs are important components of translation, which occur as intermediates, but they have not been profiled in cellular contexts. We are developing experimental methods that visualize polypeptidyl-tRNAs of the cell, termed "nascentome", by SDS-PAGE in two dimensions, first in neutral pH, where peptidyl-tRNA ester bonds are preserved and subsequently after hydrolysis-enhancing incubation at high pH/temperature. To this end, we have characterized stabilities of ester bonds that bridge the different, last amino acids and tRNA and worked out conditions for the two-dimensional separation. By combining this method with pulse-chase schemes, we plan to follow the fates of cellular polypeptidyl-tRNAs to achieve deeper understanding of protein biogenesis and quality control pathways.

4. 発表論文

Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K. and Akiyama, Y.: Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press, 2011

Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K., and Nureki, O. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* in press, 2011

Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K.: Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press, 2011

White, R., Chiba, S., Pang, T., Dewey, J.S., Savva, C.G., Holzenburg, A., Pogliano, K. and Young, R.: Holin triggering in real time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press, 2011

5. 著書および総説

Ron, D. and Ito, K.: A translational pause to localize. *Science* in press, 2011

Ito, K., Chiba, S. and Pogliano, K.: Divergent stalling sequences sense and control cellular physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**: 1-5 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

Ito, K.: Structure, function and regulation of the Sec translocation system. International Symposium "Life of Proteins" in Honor of the 1st Retirement of Professor Kazuhiro Nagata, Kyoto (Japan) March 18, 2010.

Ito, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualizing dynamic nascentome of the cell. FASEB Summer Research Conference Protein Folding in the Cell. Saxtons River, Vermont (USA). July 25-30, 2010.

Ito, K.: From SecY to nascent chain biology. International Symposium on Protein Community. Nara (Japan), September 13-16, 2010.

7. 学会発表

鈴木守、稲葉謙次、前川憲一、秋山修志、伊藤維昭、秋山芳展: 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインの構造解析. 第 23 回日本放射光学会年会、姫路、2010. 1. 6-9

Tsukazaki, T., Mori, H., Ito, K., and Nureki, O.: Structural analysis of bacterial Sec translocon machinery. Gordon Research Conferences on Protein Transport Across Cell Membranes, Galveston (U.S.A), March 7-12, 2010

鈴木守、稲葉謙次、前川憲一、秋山修志、伊藤維昭、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の X 線結晶構造解析. 第 27 回 PF シンポジウム. つくば, 2010, 3, 9-10

森 博幸、塚崎智也、越前友香、濡木理、伊藤維昭：バクテリアのタンパク質膜透過装置の構造と機能. 日本細菌学会ワークショップ「細菌のタンパク質分泌系」、横浜. 2010. 3. 27-29

塚崎智也、森 博幸、越前由香、石谷隆一郎、深井周也、田中剛史、Perederina, A., Vassilyev, D. G., 河野俊之、伊藤維昭、濡木理：Sec トランスロコンと共に機能する SecDF 膜タンパク質の構造. 第 10 回蛋白質科学会年会、札幌. 2010. 6. 16-18.

千葉志信、金森崇、上田卓也、伊藤維昭：枯草菌翻訳アレスト因子 mifM の in vitro 翻訳系による解析. 平成22年度グラム陽性菌ゲノム会議. 南木曾, 2010. 9. 2-3

Ito, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualizing dynamic "nascentome" of the cell. International Symposium on Protein Community, Nara (Japan), September 13-16, 2010

Mori, H., Tsukazaki, T., Nureki, O., Ito, K. and Akiyama, Y.: A functionally important intramolecular interaction in SecA: involvement of hydrophobic amino acids in motif IV and anti-parallel beta sheet in translocase activation. International Symposium on Protein Community, Nara (Japan), September 13-16, 2010

Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T., Ito, K. and Nureki, O.: Crystal structure of SecDF, a Sec translocon-associated membrane protein. International Symposium on Protein Community, Nara (Japan), September 13-16, 2010

Yura, T., Lim, B., Gross, C., Ito, K., Mori, H. and Akiyama, Y.: SRP-dependent targeting of sigma 32 to the membrane: A critical step for the chaperone-mediated feedback control in bacteria heat shock response. International Symposium on Protein Community, Nara (Japan), September 13-16, 2010

Tamura, T., Kiyoto, A., Yoshida, T., Ito, K. and Inagaki, K.: Combinatorial mutation of the active-site dipeptide sequence revealed no correlation between the redox potentials and biological functionality of DsbA[CXXC]. International Symposium on Protein Community, Nara (Japan), September 13-16, 2010

斎藤 啓、千葉志信、松尾英一、西村 紀、伊藤維昭、秋山芳展：Fate of signal peptides in bacteria: post liberation cleavage by S2P protease. 第33回日本分子生物学会大会・第83会日本生化学会大会合同大会 ワークショップ「膜タンパク質の構造・機能から見るオルガネラの進化」、神戸. 2010. 12. 7-10

8. その他特記事項

1. 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(A)「Nascent Chain(合成途上鎖)の分子生物学」研究代表者：伊藤維昭

科学研究費補助金 特定領域研究「翻訳途上鎖のタンパク質社会における意義と役割」研究代表者：伊藤維昭

科学研究費補助金 若手研究(B)「枯草菌蛋白質膜組込をモニターする翻訳途上鎖」研究代表者：千葉志信

科学研究費補助金 特定領域研究「膜内切断 (RIP) プロテアーゼの細胞機能」研究代表者：千葉志信

2. 知財権等

なし

3. 学外活動

Member, Faculty of 1000 (<http://f1000.com/>) (論文評価システム) 伊藤維昭

4. 受賞等

なし

発生システム研究室

Laboratory of Developmental Systems

1. 研究概要

発生システム研究室では、脊椎動物の発生過程における、器官(臓器)の形成を分子生物学、細胞生物学、組織学などの方法を用いて研究している。主な研究対象は、ニワトリ胚の消化器官、心臓、および生殖細胞である。

(1) 消化器官に関する研究

消化器官は動物の生存に必須の器官系で、本来1本の管である消化管から、咽頭、食道、胃、小腸、大腸などが分化するとともに、肝臓や膵臓といった重要な器官も派生する。基本的な胚期の消化管は内側の内胚葉性上皮とそれを取り巻く中胚葉性の間充織からなり、われわれは消化器官の形成に当たっては上皮-間充織相互作用が重要であることを示してきた。そして間充織因子の少なくとも一つは、骨形成因子(BMP)2であることも示した。また、上皮から分泌されるソニックヘッジホッグ(Shh)は、間充織の成長や分化を制御することも明らかにしてきた。(図)2010年度には、これらの知見に基づいて、消化器官の発生・分化におけるBMPやShhの作用をより詳細に明らかにすることを試みた。

また、消化器官上皮の幹細胞が発生過程でどのように生じるか、発生過程でいかなる機能をもつかは明らかにするために、哺乳類の小腸幹細胞に特異的に発現するといわれるLgr5遺伝子をクローニングし、ニワトリ胚での発現パターンを解析することにした。

(2) 心臓の発生に関する研究

心臓は発生過程でもっとも早くから機能する器官であるが、初期の心臓は、心筋と心内膜とからなるごく単純な一本の管にすぎない。心筋に血液を供給する冠動脈は、心臓が拍動しはじめたのちに、心外膜原基(proepicardium)とよばれる心臓の外から移動してくる中胚葉性の細胞群が新たに付け加わることによって生じる。近年、心外膜原基およびその子孫細胞が、冠動脈だけでなく、心筋を含む心臓のさまざまな細胞種に分化しうることが示され、その性質やふるまいは、再生医学の観点からも注目されつつある。私たちは、心外膜原基の誘導、心臓への進入メカニズム、冠動脈形成における役割、再生医療への応用の可能性について、実験発生学に適した鳥類胚を用いて研究をおこなっている。

(3) 胚性生殖細胞に関する研究

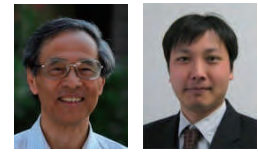
鳥類では、哺乳類のES細胞に相当する細胞が確立していない。一方、始原生殖細胞を適切な条件下で培養すると、多分化能をもった幹細胞(胚性生殖細胞、EG細胞)へと分化することが知られている。将来的に、EG細胞を用いて消化器官

教授 八杉 貞雄

Professor Sadao Yasugi, Ph.D

助教 石井 泰雄

Assistant Professor Yasuo Ishii, Ph.D



の上皮細胞、あるいは間充織(結合組織や筋肉)細胞を分化させることによって、消化器官の種々の細胞分化の機構を明らかにするために、まずEG細胞を作成する方法の確立と、始原生殖細胞のマーカー遺伝子であるCVH遺伝子のクローニングを試みた。

2. 本年度の研究成果

(1) 消化器官に関する研究

BMPの腺形成に対する効果をさらに検証するために、BMPの下流で細胞内シグナル伝達に関与するリン酸化Smadの消長を特異的抗体を用いて検出することを試みた。Smad(Smad1/5/8)はリン酸化されると核に移行し、転写因子として作用するので、リン酸化Smadは一般に核で検出される。しかし、免疫染色の条件が難しく、2010度は検出に成功せず、来年度に持ち越しとなった。Shhの作用については、とくに小腸の分化に対する影響を調べるべく、Shhのシグナル伝達を阻害する植物性アルカロイドであるサイクロパミンを、6日胚小腸の培養系に添加して6日間培養した。小腸上皮で発現するShh、IFABP、スクラーゼなどを指標として小腸上皮の分化を検討した。サイクロパミンの濃度やin situ hybridizationの条件を決定して、実験を行った結果、サイクロパミン存在下で培養した方が、小腸の絨毛形成が促進される、というデータを得ている。現在例数を増やすなどして、結果の確認を行っている。

Lgr5は、小腸上皮幹細胞で特異的に発現する遺伝子であるといわれる。ニワトリのLgr5をPCRを用いてクローニングし、プローブを作成して、胚期およびヒヨコ小腸についてin situ hybridizationを行った。併せて、発現細胞が幹細胞であることを確認するために、BrdUの取り込みを調べた。ヒヨコではLgr5は分裂能をもった陰窩の幹細胞に局限した発現を示すが、15日胚小腸では上皮全体がポジティブであり、幹細胞が陰窩に限定されるのは発生の後期であることをうかがわせている。胚小腸上皮におけるLgr5の発現はこれまで報告がなく、また幹細胞の発生における動態もほとんど解析されていないので、本研究は今後大きく発展する可能性をもっている。

(2) 心臓の発生に関する研究

心外膜原基は、心臓の房室接合部に向かって成長し、その部位への接着を介して心臓へと進入する。しかし心外膜原基の成長の方向を制御するしくみはよくわかっていない。私たちは、in vitroとin vivoの両方の系において、心外膜原基が房室接合部に向かって成長することを明らかにした。この

房室接合部の誘引作用は、BMP に対する拮抗阻害タンパク質 Noggin によって阻害され、房室接合部に高レベルで発現する BMP2 タンパク質によって再現された。これらの結果は、心臓由来の分泌性シグナル分子が、心外膜原基を心臓の特定の部位へと誘引するというモデルを支持している。

(3) 胚性生殖細胞に関する研究

胚性生殖細胞(EG 細胞)はニワトリ胚生殖腺から始原生殖細胞(PGC)を分離して培養することで得られる。そのためには、PGC の表面抗原を用いて、MACS で分離することを試み、条件決定を行った。合わせて、PGC の特異的マーカー遺伝子である CVH をクローニングして、今後の研究に用いることにした。

3. Research projects and annual reports

In our laboratory, the laboratory of Developmental Systems, the molecular biological, cell biological and histological aspects of organogenesis are being studied. The main targets of the study are digestive organs, heart and germinal cells.

(1) Digestive organs

Digestive organs are necessary for the survival of animals. In the vertebrates, the esophagus, stomach, small and large intestines are formed from the simple tube, together with liver and pancreas. The embryonic gut is consisted of endodermal epithelium and mesodermal mesenchyme. It has been repeatedly shown that the interactions between two tissues are required for the development of normal. For example, in the chicken embryo, the epithelia of glandular stomach and muscular stomach differentiate according to the inductive influence of the mesenchyme. We have identified several factors such as BMP2 and sonic hedgehog working in the interactions. In the year 2010, we analyzed more precisely the action of these factors.

We are interested in the differentiation of stem cells in the digestive organs. Stem cells exist in the epithelium of adult digestive organs. However, the derivation and localization of these cells during the development are not exactly known. We then aimed to clone Lgr5 genes which is a specific marker gene of intestinal stem cells and to analyze expression patterns during the intestinal development.

(2) Heart

The heart is the first organ to function in vertebrate embryos. The heart, however, initially lacks coronary vessels, which later supply oxygen to the heart muscle and are crucial for the heart function in an adult. Precursors of coronary vessels and the epicardium originate from extracardiac mesodermal protrusions called the proepicardium (PE). Recent

studies suggest that the PE and its derivatives are potential sources of stem cells useful for regenerative therapies for cardiovascular disease. We investigate mechanisms of PE induction, fusion of the PE to the heart, roles of PE cells in coronary development, and potential for PE cells for medical applications, using the chick embryo as a model system.

(3) Embryonic germ cells

No ES cells and iPS cells are established using avian cells. On the other hand, the primordial germ (PG) cells can be induced to differentiate into pluripotent stem cells, embryonic germ (EG) cells. We tried to concentrate PG cells with using MACS and characterize cells with several markers such as SSEA-1 and CVH.

Results

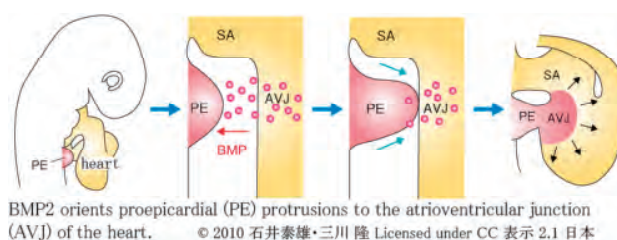
(1) Digestive organs

To examine the signaling pathway of BMP, we detected phosphorylated SMAD with specific antibody. However the clear results were not obtained, partly because of the small amount of the antigen. As for the action of the sonic hedgehog, we cultivated small intestine in the presence of inhibitor, cyclopamine. The formation of villi seemed to be stimulated by the addition of cyclopamine.

The intestinal stem cells were detected during the development with expression of Lgr5 and incorporation of BrdU. The in situ hybridization with Lgr5 probe gave no clear results. However cells incorporating BrdU were restricted to the crypt region rather rapidly at the latest period of incubation.

(2) Heart

The proepicardium (PE) protrudes toward and attaches to the atrioventricular junction (AVJ) of the looping heart tube. However, mechanisms underlying this directional PE protrusion remained unclear. We demonstrated that the PE preferentially protrudes toward the AVJ myocardium both in vitro and in vivo. This preference was suppressed by a BMP antagonist Noggin and mimicked by BMP2, which is abundant in the AVJ myocardium. These results support a model in which a heart-derived soluble factor(s) guides PE protrusions to a specific region of the heart (see the figure below).



(3) Embryonic germ cells

We examined the conditions to isolate PG cells from the gonad of young chicken embryos. Also, CVH gene was cloned to identify germ cells. These studies will be continued.

4. 発表論文

W. Kimura, C. Alev, G. Cheng, M. Jakt, S. Yasugi and K. Fukuda:

Identification of region-specific genes in the early chicken endoderm. *Gene Expression Patterns* in press

I. Oda-Ishii, Y. Ishii and T. Mikawa: Eph regulates dorsoventral asymmetry of the notochord plate and convergent

extension-mediated notochord formation. *PLoS One* 5 (10):e13689 (2010)

R. J. Garriock, C. Czeisler, Y. Ishii, A. M. Navetta and T. Mikawa:

An anteroposterior wave of vascular inhibitor downregulation signals aortic fusion along the embryonic midline axis.

Development 137 (21): 3697-3709 (2010)

Y. Ishii, R. J. Garriock, A. M. Navetta, L. E. Coughlin and T.

Mikawa: BMP signals promote proepicardial protrusion necessary for recruitment of coronary vessel and epicardial progenitors to the heart. *Dev. Cell* 19: 307-319 (2010)

5. 著書および総説

八杉貞雄: 器官形成のモデル動物としてのニワトリ胚. 関西実験動物研究会会報, 32: 65-78 (2010)

八杉貞雄: 内胚葉の分化. 石原勝敏・末光隆志編「生物の辞典」(朝倉書店)(2010)

石井泰雄, 三川隆: 冠動脈および心外膜前駆細胞の心臓への進入過程におけるBMPシグナルの役割. ライフサイエンス新着論文レビューFirst Author's (文部科学省委託研究開発事業「総合データベースプロジェクト」), 2010年9月17日オンライン掲載 (<http://first.lifesciencedb.jp/archives/856>)

6. 招待講演、シンポジウム等

八杉貞雄 器官形成のモデル動物としてのニワトリ胚. 関西実験動物研究会. 京都市, 2010.3.19.

八杉貞雄 (2010) ニワトリ胚消化器形成の分子メカニズム. 京都府立医科大学特別講義. 京都市, 2010.4.23.

八杉貞雄 (2010) ニワトリ胚の観察とNewの培養. 東京都生物教育研究会. 東京都, 2010.8.23.

八杉貞雄 (2010) 消化器形成の鍵遺伝子を求めて. 日本動物学会第81回大会シンポジウム. 東京都, 2010.9.22-25.

八杉貞雄 (2010) ニワトリ胚を用いた発生研究. 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 発生生物学リカレント講座. 神戸市, 2010.10.2.

石井泰雄: 冠動脈/心外膜前駆細胞の誘導・移動. 第二講座勉強会・発生プログラム研究室勉強会. 京都市, 2010.6.19

石井泰雄: 冠動脈/心外膜前駆細胞の心臓への移動メカニズム. 大阪府立千母子保健総合医療センター研究所セミナー. 和泉市, 2010.7.30

7. 学会発表

Okayama, Y., Kimura, W., Yasugi, S. and Fukuda, K. Sizzled in the foregut restricts liver region into anterior intestinal portal in the chicken embryo. 日本動物学会第81回大会. 東京都, 2010.9.22-25.

石井泰雄: 心臓由来の分泌性因子が鳥類胚冠動脈前駆細胞の心臓への移動を制御する. 日仏生物学会第172回例会. 東京, 2010.5.29

石井泰雄, 八杉貞雄, 三川隆: ニワトリ胚網膜原基のパターン形成におけるSoxBI遺伝子の役割. 日仏生物学会第173回例会. 京都市, 2010.12.4

8. その他特記事項

(1) 外部資金

石井泰雄: 研究活動スタート支援「冠動脈前駆細胞の誘導・移動メカニズム」

(3) 学外活動

八杉貞雄 日本科学技術振興財団 国際生物学オリンピック日本委員会委員.

八杉貞雄 日本学術振興会「最先端・次世代研究開発プログラム」審査委員会委員

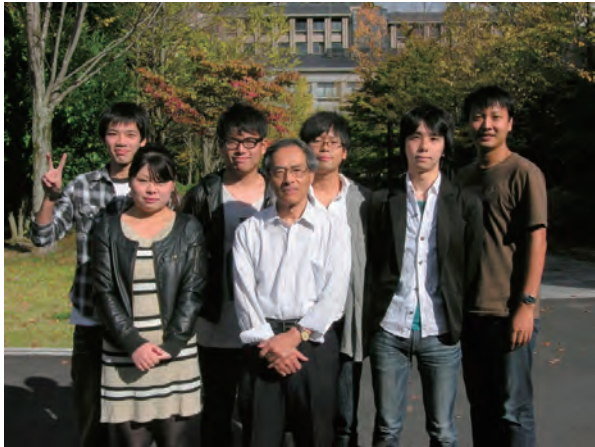
八杉貞雄 京都産業大学教養講座「生物進化とヒトの本質」 2010.6.26, 7.3.

八杉貞雄, 石井泰雄 「高校生物教職員研究会 発生生物学リカレント講座」(日本発生生物学会, 理研発生・再生科学総合研究センター共催) 講師, 2010.10.12-13

(5) その他

石井泰雄: 「冠動脈形成の仕組み解明 京産大など 再生医療に期待」, 読売新聞朝刊記事掲載, 2010.9.26

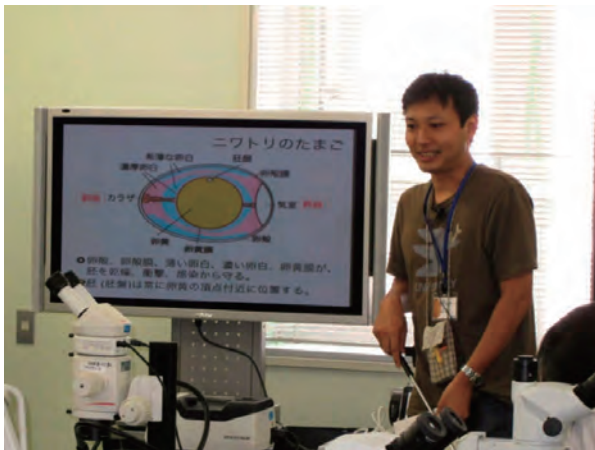
石井泰雄: 「冠動脈形成の仕組み一部解明 京産大助教ら米紙に発表」, 京都新聞朝刊記事掲載, 2010.9.21



集合写真



高校生物教職員研究会 発生物学リカレント講座(1)



高校生物教職員研究会 発生物学リカレント講座(2)

タンパク質機能研究室

Laboratory of Protein Function

教授 吉田 賢右

Prof. Masasuke Yoshida, Ph.D

助教 元島 史尋

Assit. Prof. Fumihito Motojima, Ph.D



1. 研究概要

本研究室では「分子シャペロン」と「ATP 合成酵素」について研究している。

分子シャペロン

現代社会は、それぞれの個人は自分の責任で自由に行動を選択できるように見えながら全体としては高度に管理された安定な組織である。細胞の中のタンパク質の社会も同様である。個々のタンパク質はそれぞれ個性的であり、その誕生から消滅まで多様な運命をたどるにもかかわらず、細胞は統一的な機能を維持している。さらに、環境が変化すればそれに応じてタンパク質の社会を再編成できる。タンパク質の個性は立体構造で規定されており、立体構造の遷移を制御する分子シャペロンは、タンパク質社会の統御に重要な役割を果たしている。本研究分野では具体的に次の諸点について研究を展開している。

1) 大腸菌 GroEL の作用機構

GroEL は、作用機構がよくわかった分子シャペロンとしてほとんどの生化学教科書に紹介されている。GroEL に GroES が結合すると、ポリペプチドは分子内部の空洞に完全に隔離収容されて、そこでフォールディングする、というモデルである。しかし、本研究室では、教科書モデルでは理解できない実験結果を得ている。新しい作用機構を解明する。

2) ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の構造と機能

ある特定のタンパク質を特定の条件下でだけ分解するのは ATP 依存性プロテアーゼである。FtsH は膜タンパク質やある種のタンパク質だけを分解する。本研究室では、数年前に FtsH の立体構造を決定したが、その機能、とくにポリペプチドを分子内部にあるプロテアーゼ活性部位まで送り込む通り道と送り込みの機構について解明を進めている。

ATP 合成酵素

ATP は全生物のエネルギー通貨であり、ATP 合成酵素が ATP 合成の大部分を請けおっている。ATP 合成酵素は、2 つの回転モータの複合したものである。つまり、ATP 加水分解で駆動される F_1 モータと、プロトン（つまり水素イオン）で駆動される F_0 モータである。そして両者は、共通のシャフト（回転軸）で連結されている。 F_0 モータがプロトンで回転すれば、 F_1 モータは逆回転を強いられて、その結果、ATP が合成される。 F_1 モータの回転は顕微鏡で直視できるので、1 分子観察による機能解

析ができる。また、このモータには制御装置が必要である。本研究分野では具体的に次の点について研究を展開している。

1) $\beta\gamma\epsilon$ からなる新しい複合体

F_1 は、 $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ のサブユニット組成を持つ。しかし、 $\beta+\gamma+\epsilon$ からなる新しい複合体が存在するらしい。この正体を見きわめる。

2) IF1 ノックアウトマウスの性質

真核細胞のミトコンドリア ATP 合成酵素には、特異的な阻害ペプチド IF1 が存在する。細胞がエネルギー不足になると、ATP 合成に必要なミトコンドリアの呼吸系が働かなくなり、ATP 合成酵素は逆反応である ATP 加水分解を始める。IF1 は、これを阻止して ATP の無駄な分解を防ぐと考えられている。この IF1 をまったく欠いたマウスを作成し、その性質を調べる。

2. 本年度の研究成果

分子シャペロン

1) 大腸菌 GroEL の作用機構

空洞内の変性タンパク質は native 構造を形成する直前まで GroEL と相互作用していることを明らかにした。空洞内の変性タンパク質の多くは空洞内でフォールディングを完了したが、一部は空洞外にも出て行くことが可能であることが判明した。この空洞内への閉じ込め効率の上昇には変性タンパク質と空洞との疎水相互作用が重要な役割をしていることがわかった。

2) ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の構造と機能

ポリペプチドを FtsH 内部に引き込むトンネルを想定しているが、そのトンネルの一部である lid helix および β ヘアピンに変位を導入したところ、たしかに、ATP 依存性プロテアーゼ活性は低下した。一方、新しい結晶がとれたので構造解析を進めている。

ATP 合成酵素

1) $\beta\gamma\epsilon$ からなる新しい複合体

ほかのサブユニットの混入を防ぐために $\beta\gamma\epsilon$ だけを含むプラスミッドを大腸菌に導入したところ、たしかに $\beta\gamma\epsilon$ を含む複合体らしきものが検出された。しかし、その見かけの分子量は、期待した $\beta_6\gamma\epsilon$ よりずっと小さく、また、ATP 加水分解活性もなさそうである。さらに詳しく調べている。

2) IF1 ノックアウトマウスの性質

胎生致死という可能性も考えられたが、ロックアウトマウスは見たところ正常に生まれてきた。ストレスや虚血にどう反応するか、調べている。

3. Research projects and annual reports

We are studying two independent projects; molecular chaperones and ATP synthase.

Molecular chaperones

Bacterial chaperonin, GroEL and its co-chaperone GroES, is best understood molecular chaperone, in which, according a textbook model, unfolded polypeptide is captured and enclosed internal cavity of GroEL/GroES complex where it folds without risk of aggregation. However, using ATPase-deficient GroEL mutants that keep GroES bound, we found that, in the rate-limiting intermediate of a chaperonin reaction, the unfolded polypeptide in the cage partly protrudes through a narrow space near the GroEL/GroES interface. Then, the entire polypeptide is released either into the cage or to the outside medium. The former adopts a native structure very rapidly and the latter undergoes spontaneous folding. Partition of the in-cage folding and the escape varies among substrate proteins and is affected by hydrophobic interaction between the polypeptide and GroEL cavity wall. The ATPase-active GroEL with decreased in-cage folding produced less of a native model substrate protein in *Escherichia coli* cells. Thus, the polypeptide in the critical GroEL-GroES complex is neither free nor completely confined in the cage, but it is interacting with GroEL's apical region, partly protruding to outside.

ATP synthase

F₀F₁-ATP synthase (F₀F₁) is ubiquitously found in membranes of bacteria, chloroplast, and mitochondria, and synthesizes ATP by the energy of proton flow driven by the proton motive force. F₀F₁ is also able to catalyze the reverse reaction, ATP hydrolysis-driven proton pumping, which actually occurs in some cases and conditions. F₀F₁ is a motor enzyme composed of two rotary motors, membrane integral F₀ which converts the proton motive force into rotation, and water-soluble F₁ which converts the rotation into synthesis of ATP. F₁ has a subunit composition of $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ and acts as ATPase when isolated. It has been known for the typical bacterial enzymes from thermophilic *Bacillus* PS3 (TF₀F₁) and *Escherichia coli*, that the smallest subunits of F₁, ϵ acts as an endogenous inhibitor of ATPase activity under some conditions. ϵ exists in eukaryotic mitochondrial ATP synthase, but it no longer has inhibitory function. Instead, a small protein, called IF1,

specifically inhibits ATP hydrolysis activity of ATP synthase. We have made IF1-knockout mouse and found that, to our surprise, KO-mice grow normally. Growth and physiological response under the stress conditions are now being tested.

4. 発表論文

Feniouk BA, Kato-Yamada Y, Yoshida M, Suzuki T. Conformational transitions of subunit epsilon in ATP synthase from thermophilic *Bacillus* PS3. *Bioophys J.* **98**(3):434-42 (2010)

Hossain MD, Furuike S, Onoue Y, Adachi K, Yoshida M, Kinoshita K Jr. Stimulation of F(1)-ATPase activity by sodium dodecyl sulfate. *Biochim Biophys Acta.* **1797**(4):435-42 (2010)

Shimo-Kon R, Muneyuki E, Sakai H, Adachi K, Yoshida M, Kinoshita K Jr. Chemo-mechanical coupling in F(1)-ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis. *Bioophys J.* **98**(7):1227-36 (2010)

Saita E, Iino R, Suzuki T, Feniouk BA, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Activation and stiffness of the inhibited states of F1-ATPase probed by single-molecule manipulation. *J Biol Chem.* **285**(15):11411-7 (2010)

Kobayashi M, Akutsu H, Suzuki T, Yoshida M, Yagi H. Analysis of the open and closed conformations of the beta subunits in thermophilic F1-ATPase by solution NMR. *J Mol Biol.* **398**(2):189-99 (2010)

Mitome N, Ono S, Sato H, Suzuki T, Sone N, Yoshida M. Essential arginine residue of the F(o)-a subunit in F(o)F(1)-ATP synthase has a role to prevent the proton shortcut without c-ring rotation in the F(o) proton channel. *Biochem J.* **430**(1):171-7 (2010).

Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M, Motojima F. Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **400**(2):241-5 (2010).

Fujikawa M, Yoshida M. A sensitive, simple assay of mitochondrial ATP synthesis of cultured mammalian cells suitable for high-throughput analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* **401**:538-43 (2010).

Motojima F, Yoshida M. Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside. *EMBO J.* **29**:4008-19 (2010).

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

Motojima F, Yoshida M: Fold or escape; fates of substrate polypeptide in the critical GroEL/GroES intermediate. Cold Spring Harbor Meeting, New York, USA, 2010. 5. 4

Yoshida M: Mechanism and Regulation of rotary motor enzyme, ATP synthase. Sanford-Burnham Medical Research Institute, San Diego, USA 2010. 5. 10

Motojima F, Yoshida M: Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, 2010. 9. 14

7. 学会発表

藤川 誠、森 薫子、吉田 賢右 Functional analyses of the minor subunits in FoF1 complex with a novel assay for mammal FoF1-ATP synthase. 日本細胞生物学会 第 62 回 年会 2010.5

Suzuki T, Wakabayashi C, Saita E, Tanaka K, Furuike S, Kinoshita K, Yoshida M: Biochemical and single-molecule analyses of human F1-ATPase. 16th European Bioenergetics Conference 2010. 2010.7
Hiroki Sata, Noriyo Mitome, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida. Aqueous access channels in subunit a of sodium transporting FoF1-ATP synthase. 16th European Bioenergetics Conference 2010 2010.7

Naoki Soga, Kazuhiko Kinoshita Jr, Masasuke Yoshida, Toshiharu Suzuki. Kinetic equivalence of membrane potential and pH difference across membrane in ATP synthesis by Bacillus PS3 FoF1-ATP synthase. 16th European Bioenergetics Conference 2010 2010.7

Fumitaka Kadoya, Shigeyuki Kato, Kei Watanabe, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida, Yasuyuki Kato-Yamada. ATP binding to the epsilon subunit of thermophilic ATP synthase is essential for coupling ATPase and H⁺-pumping. 16th European Bioenergetics Conference 2010 2010.7

Fenyuk B.、鈴木 俊治、吉田 賢右 What is the mechanism of Mg ADP-inhibition in FoF1-ATP synthase? 16th European Bioenergetics Conference 2010 2010.7

藤川 誠、森 薫子、吉田 賢右 IF1 influences on energy metabolism not only under energy restricted condition but also under normal condition. 16th European Bioenergetics Conference 2010 2010.7

税田 英一郎、鈴木 俊治、吉田 賢右 Torque generated by one or two β subunits in F1-ATPase. 第 4 8 回日本生物物理学会年会 2010.9

Kuruma Yutetsu, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida, Takuya Ueda. セルフリー蛋白質合成による機能性生体膜の構築 第 4 8 回日本生物物理学会年会 2010.9

Toshiharu Suzuki, Chiaki Wakabayashi, Ei-ichiro Saita, Kazumi Tanaka, Shou Furuike(†), Kazuhiko Kinoshita, Masasuke Yoshida. ヒト F1-ATPase の回転一分子解析 第 4 8 回日本生物物理学会年会 2010.9

Naoki Soga, Kazuhiko Kinoshita, Masasuke Yoshida, Toshiharu Suzuki. 好熱菌由来 FoF1-ATP 合成酵素の ATP 合成における ΔpH と $\Delta\Psi$ の寄与. 第 4 8 回日本生物物理学会年会 2010.9

鈴木俊治、若林千晃、田中一巳、税田英一郎、古池 晶、木下一彦、吉田賢右. 人の ATP 合成酵素はどのようなものか? 組換えヒト由来 F1-ATPase の生化学的分析と回転一分子解析. 第 36 回日本生体エネルギー研究会 2010.11

藤川 誠、大坂谷 茂徳、森 薫子、吉田 賢右 Global analyses of human mitochondrial ATP synthesis regulation mechanism by MASC assay. 第 36 回日本生体エネルギー研究会 2010.11

Toshiharu Suzuki, Chiaki Wakabayashi, Ei-ichiro Saita, Kazumi Tanaka, Shou Furuike, Kazuhiko Kinoshita, Masasuke Yoshida. ヒト F1-ATPase の一分子回転解析. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同学会 2010.11

藤川 誠、森 薫子、吉田 賢右 IF1 influences on energy metabolism not only under energy restricted condition but also under normal condition. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同学会 2010.11

Boris A Fenyuk, Chiaki Wakabayashi, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida. Abolishing the MgADP-inhibition in FoF1-ATP synthase from Bacillus PS3. 第 36 回日本生体エネルギー研究会 2010.11

Yuko Motojima-Miyazaki, Fumihiko Motojima and Masasuke Yoshida. *E. coli* HtpG specifically associates with ribosomal protein L2 and DnaK to form a ternary complex. 第 36 回日本生体エネルギー研究会 2010.11

Fumihiko Motojima and Masasuke Yoshida, The intermediate folding state formed in the chaperonin cage is different from that in the bulk medium. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同学会 2010.11

8. その他特記事項

1. 外部資金； 文部科学省科学研究費 基盤研究（S）、文部科学省科学研究費 特定領域研究、文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム、日本科学技術振興機構 国際共同研究（ICORP）

2. 知財権等；

国内特許：3 件

出願人：（独） 科学技術振興機構 発明者：藤川 誠、吉田賢右 名称：ミトコンドリアの代謝活性測定法

出願人：（独） 科学技術振興機構 発明者：大坂谷 茂徳、吉田 賢右、藤川 誠 名称：ヒト DAPIT を免疫原として得られたポリクローナル抗体

出願人：（独） 科学技術振興機構 発明者：大坂谷 茂徳、吉田 賢右、藤川 誠 名称：ヒト MLQ を免疫原として得られたポリクローナル抗体

3. 学外活動：

東京大学医学部非常勤講師、(学振)科学研究費 審査・評価第一部会

植物育種学研究室

Laboratory of Plant Breeding

教授 山岸 博

Prof. Hiroshi Yamagishi, Dr. Agr



1. 研究概要

植物の育種においては、近年、高い生産性と均一性を具備したF₁品種育種の重要性が急速に増大している。たとえば20世紀後半の世界的な「緑の革命」を推進した原動力の1つは、トウモロコシにおけるF₁品種の急速な普及であった。このような高い育種効果を有するF₁育種においては、確実かつ効率的にF₁種子を採種することが極めて重要な意味を持つ。効率的なF₁採種を可能にする植物の遺伝的特性として細胞質雄性不稔性があり、実際にこの特性が多くくの作物のF₁育種で利用されている。細胞質雄性不稔性はミトコンドリアゲノム上の遺伝子によって誘起される。その一方で、多くの場合核内にこの雄性不稔に対する稔性回復遺伝子が存在し、雄性不稔が表現型として最終的に発現するかどうかは、ミトコンドリアの遺伝子と核の稔性回復遺伝子の相互作用によって決定される。

このため、細胞質雄性不稔性を植物のF₁育種に実際に適用するためには、ミトコンドリアゲノムおよび核ゲノムの遺伝子の機能を正しく把握する必要がある。それと同時に、この雄性不稔-稔性回復の系は、植物における核とミトコンドリアのクロストークの進化を科学的に解明するための優れた舞台となる。このような視点から、雄性不稔-稔性回復系における両ゲノムの遺伝子の分化と進化、細胞質置換および細胞融合による新しい雄性不稔性の実用的開発の両面で研究を進めている。具体的には、以下の諸課題について研究している。

1) ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の分化

我々の一連の研究によって、アブラナ科作物の育種において高い実用性を持つオグラ型雄性不稔遺伝子の、起源と分化が明らかにされた。一方、これに対する稔性回復遺伝子も、野生、栽培ダイコンにおいて多様に分化していることが示されつつある。現在、それら稔性回復遺伝子の単離と相互関係の解明を進めている。

2) シロイヌナズナを用いた細胞融合による新しい細胞質雄性不稔の開発

上記オグラ型雄性不稔は高い実用性を持つため、アブラナ科作物の育種においてはこの遺伝子に利用が集中している。このような遺伝的脆弱性を打破するためには、新しい雄性不稔を開発することが急務である。そこで、シロイヌナズナとキャベツとの間で体細胞雑種を作出し、タイプの異なる雄性不稔系統を2系統得た。これらを用いてキャベツ類の実用的な雄性不稔系統の開発を進める

とともに、体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構造を解析することにより、雄性不稔のメカニズムを明らかにしようとしている。

3) 細胞質置換によるダイコンおよびナスの雄性不稔の開発

宇都宮大学、佐賀大学および野菜茶業研究所との共同プロジェクトにおいて、ダイコンとアブラナ科野生種との属間雑種並びにナスと各種のナス属野生植物との種間雑種に由来する雄性不稔系統について、細胞質置換による雄性不稔化のメカニズムを解明している。それぞれの雄性不稔個体で特異的に発現するミトコンドリア遺伝子を明らかにし、表現型との対応を調査することにより、雄性不稔の原因遺伝子を特定しようとしている。

2. 本年度の研究成果

1) 現在までに単離されているオグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子以外に、野生のハマダイコンおよびロシア原産の‘クロダイコン’に稔性回復遺伝子があることを見出した。このうち、‘クロダイコン’の稔性回復遺伝子は、雄性不稔の原因遺伝子である *orf138* の発現を翻訳レベルで抑制することが明らかになった。一方、最近京都府舞鶴市においてかつての主要在来品種であった‘佐波賀’ダイコンの栽培を復活させようという運動が展開されている。我々は、これまでの研究で‘佐波賀’ダイコンが稔性回復遺伝子をもつことから、ハマダイコンが栽培化されたものであることを明らかにしたが、現在舞鶴市で使用されている品種は、これと栽培品種の交雑後代であることが推定された。

2) シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種から、キャベツへの戻し交雑第1世代が得られた。これらはいずれも安定した雄性不稔性を示した。それらを母本にしてさらに戻し交雑第2世代が得られた。これら雄性不稔系統とミトコンドリアゲノムの構造を比較するために、キャベツのミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した。

3) ダイコンにおける細胞質置換系統(1系統)、ナスにおける細胞質置換系統(6系統)のいずれにおいても、ミトコンドリアの既存遺伝子の上流に、特有の *orf* が存在することを発見した。これらの *orf* と花粉稔性の有無との間に明確な対応が観察された。

3. Research projects and annual reports

In the field of plant breeding, F₁ hybrids have many genetic advantages, and contribute to the increase of worldwide crop

production. For the efficient and stable F₁ hybrid production, cytoplasmic male sterility (CMS) is the most useful genetic characteristic. Besides the practical importance of the CMS, it is useful to study the interactions between nuclear genes and mitochondrial one from scientific view points, especially for molecular and evolutionary genetics. Thus, we have been studying the CMS of various plants both in order to know the evolutionary processes and to exploit new breeding materials.

1) The most important CMS in Cruciferous plants is that of Ogura found in Japanese radish. We are investigating the presence and differentiations of the fertility restorer genes of the Ogura CMS. In addition to the genes isolated so far, we have found new one in a radish variety, 'Kurodaikon', and determined the sequences of it.

2) In order to exploit new CMS for cabbage, we produced two CMS plants by cell fusions between *Arabidopsis thaliana* and cabbages. From one of them we obtained progenies that constantly show the pollen sterility. We are now determining all the DNA sequences of the mitochondria genomes of those CMS hybrids.

3) CMS of crop plants have been established mainly by the cytoplasm substitutions after interspecific or intergeneric hybridizations between a cultivated plant and wild relative species. Under the collaborative projects with other institutions, we found novel *orfs* in mitochondrial genomes of alloplasmic radish and eggplant stains. The correspondence of the expressions of the *orfs* newly found and the phenotypic variations of pollen fertility suggests that they are causal genes of CMS in radish and eggplants.

4. 発表論文

5. 著書および総説

山岸博：栽培ダイコンの起源と日本産ダイコンのルーツを探る（『だいこんの魅力にせまる「だいこんサミット六年間をふりかえって」』）。宇都宮大学農学部だいこんサミット実行委員会編 3-11（2010）

6. 招待講演、シンポジウム等

山岸博：京野菜における遺伝的多様性の減衰と維持。地球研生存知イニシアティブ・花博記念協会共催シンポジウムもうひとつの生物多様性-食と農の遺伝的多様性-、京都市、2011.3.15

7. 学会発表

安本景太、筒井康太、房相佑、寺地徹、山岸博：異質細胞質ダイコン系統にみられる雄性不稔性とミトコンドリア mRNA の発

現パターンとの関係について。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010. 9. 24-25

吉見麻衣子、齊藤猛雄、一色司郎、寺地徹、山岸博：CMS を示すナス細胞質置換系統における *atpI* 遺伝子周辺領域の構造解析。

日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010. 9. 24-25

山岸博、津田瑞江、児島慶子、安本景太：シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代における雄性不稔性。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010. 9. 24-25

村上亮太、重野麻子、寺地徹、山岸博：ナスと葉緑体形質転換タバコの非対称細胞融合。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010. 9. 24-25

堤厚善、森悠太、安本景太、山岸博：ハマダイコンが有する稔性回復遺伝子の発現の安定性。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010. 9. 24-25

田中義行、安本景太、山岸博、寺地徹：ダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子 *orf138* を発現する葉緑体形質転換ベクターの作製とそれを用いた稔性回復遺伝子作用アッセイ系の構築。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010. 9. 24-25

吉見麻衣子、齊藤猛雄、一色司郎、寺地徹、山岸博：CMS を示すナス細胞質置換系統における新規 *orf* の発現解析。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011. 3. 29-30

山岸博、牟田部天平、田中俊光、吉見麻衣子、一色司郎、齊藤猛雄：ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の DNA マーカー日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2010. 3. 29-30

安本景太、津田瑞江、児島慶子、山岸博：シロイヌナズナとキャベツの細胞融合により雑種化した雄性不稔ミトコンドリアゲノムの解析。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011. 3. 29-30

森悠太、安本景太、張麗、山岸博：オグラ型雄性不稔に対する黒ダイコンの稔性回復遺伝子の解析。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2010. 3. 29-30

田中義行、津田瑞江、安本景太、山岸博、寺地徹：次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 I. ナタネミトコンドリアゲノムとの比較。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011.3.29-30

8. その他特記事項

1. 園芸学会年間優秀論文賞（2010 年 3 月）山岸博、山下陽子：細胞質雄性不稔-稔性回復系の遺伝子を用いた京都府在来ダイコン '佐波賀' の起源の解明、園芸学研究 8

2. 副学長（2010 年 10 月）

動物遺伝育種学研究室

Laboratory of Animal Genetics and Breeding

教授 野村 哲郎

Prof. Tetsuro Nomura, Ph.D



1. 研究概要

生物集団内に保有される遺伝的多様性は、進化や動植物の品種改良(育種)にとって不可欠な素材である。たとえば、生物種が様々な環境に適応し進化していくためには、それぞれの環境に適した多様な遺伝子が集団内に存在する必要がある。また、動植物の育種においても、育種家が改良しようとする集団内に保有される遺伝的多様性に働きかけ、望ましい遺伝子を人為選択によって集積することが基本となる。

動物遺伝育種学研究室では、動物集団の遺伝的多様性の維持と利用について、保全遺伝学および育種学の観点から研究を進めている。具体的には、つぎのような研究テーマで研究を展開している。

1) 動物集団の遺伝的多様性の評価方法の開発

野生動物や家畜について血統記録や DNA 情報を用いて集団内の遺伝的多様性を評価するための方法について、理論的研究を行っている。

2) 絶滅が危惧される野生動物の維持集団および家畜希少系統における遺伝的多様性の維持方法の確立

動物園や自然公園などで動物を維持するときに、どのような個体を親として残し、どのような交配を採用すれば遺伝的多様性が効率的に維持できるかについて研究を進めている。

3) 動物および昆虫集団における遺伝的多様性の調査

日本で普通に見られるナミテントウやその近縁種の鞘翅斑紋を支配する遺伝子の地理的分布に関する調査、和牛やサラブレッドの血統記録を用いた遺伝的多様性の調査を行っている。



二紋型 四紋型 斑型 紅型

ナミテントウに見られる4つの斑紋型

Four types of elytral patterns in *Harmonia Axyridis*

These patterns are controlled by four alleles on an autosomal locus.

2. 本年度の研究成果

1) 動物集団の遺伝的多様性の評価方法の開発

血統記録が利用できる集団において、遺伝子頻度を推定するためのサンプリング方法を開発し、その有効性をコンピュ

ータシミュレーションによって評価した。また、得られた方法を和牛集団のマイクロサテライトデータに適用し、従来のサンプリング方法よりも偏りの小さい遺伝子頻度の推定値が得られることを実証した。

2) 動物および昆虫集団における遺伝的多様性の調査

血統情報を用いてサラブレッド種集団の遺伝的多様性を評価し、これまでに調査してきた黒毛和種(和牛)の結果と比較した。その結果、人工授精により優れた種雄を集中的に繁殖に用いている黒毛和種集団の遺伝的多様性の低下量は、遺伝的多様性の低下が懸念されているサラブレッド種集団よりもはるかに大きいことが明らかになった。今年度は、ミツバチ集団の系統維持において遺伝的多様性の低下を防ぐための交配様式や集団の有効な大きさの推定方法についても、理論的な研究を行った。

ナミテントウの鞘翅斑紋遺伝子の地理的分布について、今年度も継続して調査を行った。その結果、本種の鞘翅斑紋遺伝子の頻度には、日本列島では緯度に沿った明瞭な地理的勾配が認められた。また、過去に行われた調査結果と比較すると、各地で二紋型遺伝子の増加、紅型遺伝子の減少が起こっていることが明らかになった。このような変化を生じた原因を究明することが今後の課題である。ナミテントウの同胞種クリサキテントウの鞘翅斑紋多型に関する基礎研究として、今年度は鞘翅斑紋多型の遺伝様式の交配実験による解明、地理的分布の予備調査、マイクロサテライトマーカーによる集団構造の解明に関する予備実験も行った。

3. Research projects and annual reports

Genetic diversity retained in populations is an essential material for adaptive evolution and breeding of plants and animals; species can adapt through natural selection to changing environment, if they have sufficient genetic diversity. Breeders of domesticated plants and animals can genetically improve their materials by artificial selection on genetic variability. Our laboratory is researching the methodology for evaluation, maintenance and utilization of genetic diversity in wild and domesticated animal populations. Our main research projects and the annual reports are as following:

1: Development of methods for estimating genetic diversity in animal populations

We are developing methods for estimating genetic diversity and related population genetic parameters using molecular genetic markers. We have developed a novel sampling method for estimating neutral allele frequencies in

pedigreed populations. The efficiency was evaluated using Monte Carlo simulation. The obtained method was also applied to microsatellite data of Japanese Black cattle population.

2: Survey and monitor of genetic diversity in animal and insect populations

A common ladybird in Japan, *Harmonia axyridis*, shows polymorphism in elytral pattern, which is determined by four alleles on an autosomal locus. We are surveying the geographical distribution of the allele frequencies, and investigating the evolutionary significance of the polymorphism. We are also evaluating and monitoring the genetic diversity of cattle and Thoroughbred population using their pedigree records.

In the last year, we have continued our survey of geographical distribution of the frequencies of elytral pattern alleles in *H. axyridis*, and showed a clear latitudinal cline in the frequency distribution. It was also shown that a directional change has occurred in the allele frequencies during the past five decades. Clarification of mechanism of this change is a future problem to be solved. A sibling species, *Harmonia edonensis*, shows a similar elytral pattern to *H. axyridis*. We investigated the inheritance mode of the elytral pattern, and the geographical distribution of the allele frequencies in several locations. Furthermore, as a preliminary study, the possibility of the use of microsatellite markers for the study of population structure of this species was preliminarily examined.

As another study, we have evaluated the genetic diversity in the Japanese Thoroughbred population by pedigree analysis, and compared the results with those of the Japanese Black cattle population. It was shown that the decreasing rate of genetic diversity in the Japanese Black cattle population is much larger than in the Thoroughbred population, because of the intensive use of a limited number of sires thorough artificial insemination in the former breed. A study for establishing a mating design to minimize the loss of genetic diversity in a strain of honeybees was also initiated.

4. 発表論文

J. Yamashita, H. Oki, T. Hasegawa, T. Honda and T. Nomura. (2010) Demographic analysis of breeding structure in Japanese Thoroughbred population. *J. Equine Sci.* **21**:11-16.

J. Yamashita, H. Oki, T. Hasegawa, T. Honda and T. Nomura. (2010) Gene dropping analysis of ancestral contributions and allele survival in Japanese Thoroughbred population. *J. Equine Sci.* **21**:39-45.

5. 著書および総説

基礎生物学テキストシリーズ9「生物統計学」向井文雄編著 (2章、3章、5章、10章、14章2、2、3執筆)

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

T. Honda, S. Sasazaki, K. Oyama, T. Nomura and F. Mukai. (2010) Sampling method for estimating neutral allele frequency in a pedigreed population. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig, Germany. August 1-6, 2010.

土山 悠、高橋純一、野村哲郎 (2010) マイクロサテライトを用いたクリサキテントウの集団構造解析に関する研究. 日本動物行動学会第29回大会

土山 悠、高橋純一、野村哲郎 (2010) ナミテントウとクリサキテントウの集団遺伝構造解析. 日本昆虫学会近畿支部2010年度大会

8. その他特記事項

外部資金

科学研究費、基盤研究(C)「ナミテントウにおける鞘翅斑紋遺伝子の地理的勾配の年代変化に対する地球温暖化の影響」、研究代表者

学外活動

食料・農業・農村政策審議会委員

農林水産省独立行政法人評価委員会委員

神戸大学農学部非常勤講師 (「動物集団遺伝学」担当)

宮崎大学農学部非常勤講師 (「集団遺伝学」担当)

タンパク質構造生物学研究室

Laboratory of Protein Structural Biology

教授 津下 英明

Prof. Hideaki Tsuge, Ph.D

助教 鶴村 俊治

Assit. Prof. Toshiharu Tsurumura



1. 研究概要

タンパク質の複合体の構造生物学:すなわちタンパク質とタンパク質がいかにか結びつくかに興味を持ち、研究を行っている。特に感染症に関わる因子の構造生物学を進めている。

タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要な不可欠なものとなりつつある。ビジュアルに分子構造を示す事で今までわからなかった事象に光を当てる事が可能になる。特に X線結晶構造解析は、その分解能と分子量に限界がない事は他の方法にない大きな利点である。

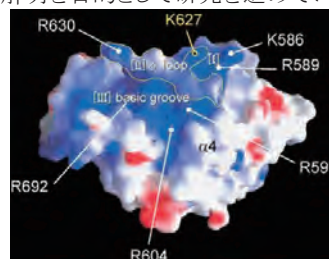
我々はこの方法を用いて、タンパク質複合体、特に感染症因子と宿主であるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治療する新たな創薬の可能性が生まれる。

現在の以下の4つの研究テーマを柱として研究を進めている。

(1)ADP リボシル化毒素とそのヒト標的分子複合体の構造生物学:様々な病原微生物は ADP リボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。アクチン特異的 ADPRT (*C.perfringens* の iota 毒素 Ia や *C.botulinum* の C2I)はアクチンの Arg177 を ADP リボシル化し、その重合を妨げて、細胞骨格形成を阻害する。我々の Ia の結晶構造解析 (Tsuge et al. JMB, 2003) を含めて多くのグループが、それぞれの毒素の構造を明らかにしてきたが、そのアクチンとの複合体の構造は全くわかっていなかった。我々は 2008 年に Ia-bTAD-アクチン複合体構造を明らかにした (Tsuge et al. PNAS 2008)。これにより ADP リボシル化反応を理解する分子基盤が得られた。この研究をさらに発展させて、異なる基質 small GTPase である RhoA

を認識して ADP リボシル化する、*C.botulinum* の C3 毒素の研究を進める。

(2)インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造生物学:インフルエンザ A ウィルスによる 1918 年に発生したスペインかぜは世界的流行(パンデミック)を引き起こし、1000 万以上の死者を出した。鳥で感染したウィルスが変異をしてヒトへの感染が起これと考えられる。この強毒性の獲得にインフルエンザの持つ RNA ポリメラーゼのいくつかのアミノ酸の変異が重要である事がわかってきた。特に有名な変異は RNA ポリメラーゼ複合体の PB2 サブユニットにおける E627K の変異である。2009 年我々は、K627 部位を含む PB2 サブユニットの構造を明らかにして、強毒性獲得の分子基盤を明らかにした (Kuzuhara et al., JBC 2009)。さらに三種のサブユニットからなる RNA ポリメラーゼ複合体 (PB2、PB1、PA)の全体構造の解明を目的として研究を進めている。

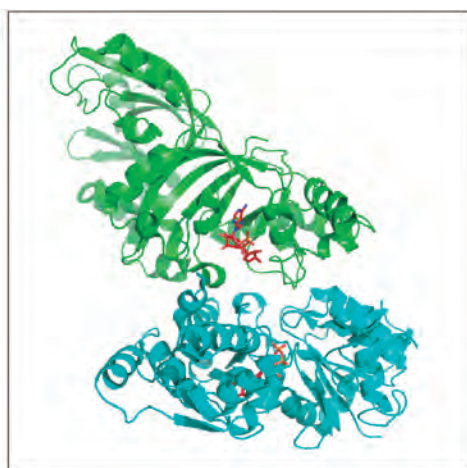


(3)新規の感染症因子の結晶構造解析とその機能の解析: *Helicobacter pylori* の新しい病原性因子 TNF α inducing protein の構造を明らかにし (Tsuge et al. BBRC 2009)、そのヒト受容体として nucleolin を同定した [発表論文 1]。

(4)ビタミン、コファクター機能理解のための酵素の構造解析:古細菌や高度好熱菌由来の酵素の結晶構造と機能解析を行っている。

2. 本年度の研究成果

(1)IaとC2IはアクチンのADPリボシル化の特異性が異なる。Iaは α 、 β アクチンともにADPリボシル化をするが、C2Iは β アクチンのみADPリボシル化する。大腸菌でアクチンの発現は難しく、この特異性の理解のためにアクチンの粘菌での発現系を検討した。(2)この過程で粘菌アクチンのADPリボシル化を行い、アクチンの特異性について重要な知見を得た。(3)Ia-アクチン複合体でADPを用いて結晶化に成功し、新たなリガンド複合体でのX線回折データを収集した。(4)サルモネラ菌のマクロファージへの感染に重要と考えられるアクチ



ン ADP リボシル化毒素 SpvB の発現系の構築を行った。(5) RhoA-C3 毒素の複合体の構造解析を目的として、RhoA の安定した高発現系の構築および発現を行った。その結果 RhoA179F25N で安定した RhoA を得られ、ADP リボシル化が起こる事を確認した。(6) RNA ポリメラーゼ複合体 (PB2、PB1、PA) の全体構造解明を目指して、それぞれのサブユニットの発現系構築の検討をした。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complex and we would like to reveal the interaction between the carcinogenic factor and human protein. Currently we are continuing the next four projects.

(1) Structural biology of the complex between ADP-ribosylating Toxin and human protein: ADP-ribosylation is one of the important enzyme modification after the protein translation. ADP-ribosylating toxin (ADPRT) adds ADP-ribosyl group of NAD to target and lead to disorganization of the cell. It is thought that some pathogenic bacteria use the ADPRT to infect into the host cell. ADPRT can be classified into four groups as the target difference. Actin ADPRT such as iota toxin from *C.perfringens* ADP-ribosylates Arg-177 of α -Actin, inhibits actin polymerization and induce cell rounding. It finally causes diarrhea against human and domestic animals. Up to now, many actin ADPRT's structures are available including Ia (catalytic subunit of iota toxin) by us (Tsuge et al. JMB 2003), however, there was no information how toxin binds to actin and how proceeds the ADP-ribosylation reaction. Recently, we reported the first crystal structure of Ia-Actin complex with β -TAD, which is nonhydrolyzable NAD analog, as its ligand (Tsuge et al. PNAS 2008). In this study, we gained the structural basis of actin ADP-ribosylation and proceed to next step study to understand the ADPRT's specificity.

(2) Structural biology of RNA polymerase from influenza A virus: In 1918, a pandemic of influenza A virus resulted in ten millions of deaths worldwide. Currently, highly pathogenic H5N1 avian strains are serious concern because of the ability to infect humans with 60% mortality. It is of great importance to understand the molecular mechanism of avian to human host adaptation for high virulence. K627 in PB2 is known to be important for avian influenza virus adaptation to mammals.

Recently we revealed the structure of K627 domain of PB2 and the mechanism of the pathogenicity (Tsuge et al. JBC 2009). RNA polymerase consists of three different subunits; PB2, PB1, and PA. The structure of the whole complex of RNA polymerase has not been known yet, so this is a very interesting target for structural biology. Our purpose is to reveal the whole structure of the RNA polymerase complex in the future.

(3) Structural and functional studies of novel carcinogenic factors: Stomach cancer is strongly associated with infection by *Helicobacter pylori*. In 2005, a new *H. pylori* gene encoding a TNF- α inducing protein (Tip α) that acts as a carcinogenic factor were found by our colleague Suganuma. Tip α is secreted from *H. pylori* as a homodimer whose subunits are linked by disulfide bonds. Using blast search, there is no similar sequence with Tip α , thus it is a unique carcinogenic factor protein. We also characterized a Tip α deletion mutant (del-Tip α) that lacks the N-terminal six amino acid residues (LQACTC), including two cysteines (C5 and C7) that form disulfide bonds, but nonetheless shows a weak ability to induce TNF- α expression. In 2009, we revealed the crystal structure of del-Tip α at 2.47Å resolution (Tsuge et al. BBRC 2009). We are continuing the structural study of Tip α to understand the TNF- α inducing mechanism.

(4) Structural biology of the enzyme to understand the vitamin and co-factor function

In this year, we started next experiments; (1) We gained the novel information of the ADPRT specificity using *D. discoideum* actin. (2) We collected the new diffraction data of the Ia-actin with ADP as a novel ligand. (3) We are continuing to express actin mutant to reveal the specificity of actin ADPRT. (4) We constructed the actin specific ADPRT SpvB expression system, which is required for the macrophage infection of *S.enterica*. (5) For the RhoA-C3 complex structure determination, we constructed the expression system of RhoA and purified the large amount of RhoA179F25N. We also checked the ADP-ribosylation by C3. (6) We are continuing to construct the expression system of each subunit of RNA-polymerase.

4. 発表論文

Watanabe T, Tsuge H, Imagawa T, Kise D, Hirano K, Beppu M, Takahashi A, Yamaguchi K, Fujiki H, Suganuma M.: Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-alpha inducing protein: a carcinogenic factor of Helicobacter pylori. *J Cancer Res Clin Oncol*. **136**(6):911-21. (2010)

Takahashi S, Tsurumura T, Aritake K, Furubayashi N, Sato M, Yamanaka M, Hirota E, Sano S, Kobayashi T, Tanaka T, Inaka K, Tanaka H, Urade Y.: High-quality crystals of human haematopoietic prostaglandin D synthase with novel inhibitors. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. **66**:846-50. (2010)

Hideaki Tsuge: Structural Biology in Infectious Disease, Visiting Program for Kyoto Sangyo University (KSU), Japan : Chulabhorn Research Institute, Bangkok 2010, 3.2

Hideaki Tsuge: Structural Biology in Infectious Disease, Visiting Program for Kyoto Sangyo University (KSU), Japan : Faculty of Veterinary Science, Mahidol University (MUSC), Bangkok 2010,3.3

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

津下英明:細菌およびウイルス感染症の構造生物学
第4回学術フロンティアシンポジウム「X線結晶構造解析と質量分析による生理活性蛋白質の構造機能相関の研究」
徳島文理大学、2010.1.30

津下英明:モノ ADP リボシル化毒素とその標的タンパク質アクチンとの複合体の X 線結晶構造解析:国立がんセンター研究所、2010,2.22

7. 学会発表

今川貴仁、津下英明:高度好熱菌 HB8 由来のフラビン還元酵素の構造機能解析 ビタミン B 研究委員会 第 422 回研究協議会 京都市、2010.11.27

8. その他特記事項

1. 外部資金
基盤研究(C)モノ ADP リボシル化毒素と基質蛋白質複合体の結晶構造および反応機構の解析
2. 知的権等
なし
3. 学外活動
徳島文理大学 健康科学研究所 客員教授
理化学研究所 播磨研究所 構造生物物理 客員研究員
理化学研究所 播磨研究所 放射光システム生物学研究グループ 客員研究員
4. 受賞等
なし
5. その他

Hideaki Tsuge: Structural Biology in Infectious Disease, Visiting Program for Kyoto Sangyo University (KSU), Japan : Faculty of Science, Mahidol University , Bangkok 2010,3.1

植物分子遺伝学研究室

Laboratory Plant Molecular Genetics

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr

助教 高橋 亮

Assist. prof. Kiyoshi Takahashi, Dr. Sci



1. 研究概要

植物分子遺伝学研究室では、「高等植物のオルガネラゲノム」に興味を持ち、変異や進化機構の解明といった基礎的研究から、遺伝子組換えによる有用植物の作出などの応用的な研究にいたるまで、広範な研究に取り組んでいる。その中で現在は、主に以下の3つのプロジェクトが進行中である。

- 1) オルガネラゲノムの研究成果を基盤とする有用植物の育成
- 2) ダイコンの雄性不稔・稔性回復システムの分子機構とその多様性形成メカニズムの解明
- 3) 細胞質置換コムギをモデルとした核とミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究

最初の1)のプロジェクトは、植物オルガネラゲノムの改変により、人類に有用な植物を育成することを究極の目的とする。高等植物の細胞質が遺伝情報を持つことは、メンデルの法則の再発見者の一人として有名なC. Corrensの時代から知られている。また細胞質遺伝を司るオルガネラゲノム、すなわち葉緑体とミトコンドリアのDNAの全塩基配列は、それぞれ25年前、14年前に初めて明らかにされている。しかしこれらのゲノムを改変し、真に有用な植物を作出する可能性が芽生えたのは、葉緑体の遺伝子組換え技術が確立した今世紀に入ってからのものである(ミトコンドリアの遺伝子については、未だ組換えは達成されていない)。その中で我々は、a)タバコを用いたストレス耐性植物の育成、b)タバコをモデルにした薬物野菜の機能性向上に関する研究、c)パンコムギへの葉緑体組換え技術の適用、d)葉緑体の遺伝子組換えによる有用物質生産系の確立、の4課題に取り組んでいる。

具体的にa)では、植物が強光や乾燥などの非生物的なストレスを受けた際に生じる有害な活性酸素分子種(ROS)を効率的に消去することで、ストレスに強い植物を作出できないか検討している。実験では葉緑体のアスコルベート/グルタチオンサイクルを構成するAPX,MDARなど5つの酵素に着目し、これらの酵素をコードする核の遺伝子を単独、あるいはオペロンとしてタバコの葉緑体ゲノムに導入した。組換え体ではこれらの酵素が強発現し(例えばAPXの活性は数十倍になった)、その結果、ROSが効率良く消去され、強光などへのストレス耐性が高まることが示された。またb)では、世界の代表的な栄養障害のひとつである鉄不足解消の一助として、葉緑体の遺伝子組換えにより薬物野菜の鉄含量を高める方策を探っている。ダイズのリチン遺伝子をタバコの葉緑体で強発現させた結果、葉に含まれる鉄分を約3倍に増加させること

ができた。しかし最初の組換え系統では、ROSの発生が原因と思われる葉の壊死が観察されたので、この現象を押さえるべく導入遺伝子をファインチューニングしている。c)では、モデル植物(タバコ)で培った葉緑体の形質転換技術を、作物であるパンコムギへ適用できないか検討している。タバコと違いコムギはカルスからの再分化能力がとても低い。再分化個体を得るためには、特別な品種を栽培し、開花後2週間目の未熟胚からカルスを誘導する必要がある。新たに構築した葉緑体形質転換ベクターを用いて組換え体の作出を試みているが、未だ実験は成功していない。最後にd)では、葉緑体で発現させた有用タンパク質の単離及び安定化に、カイコの多核体タンパク質を利用することを検討している。多核体タンパク質には、特異的なシグナルを持つ別のタンパク質を内部に固定する性質があり、そのタンパク質を熱や乾燥から保護する。現在、多核体を発現する葉緑体の組換えタバコが作出されており、この実験系をレタスに移植しようとしている。

上記2)のプロジェクトは、ダイコンの雄性不稔と稔性回復システムの分子機構ならびにその多様性形成に関するメカニズムを明らかにすることを目的とする。雄性不稔とは、植物は正常に生育するが、機能を持った花粉が形成されない現象で、多くの高等植物に見出されている。この性質はF1品種育成に用いられるばかりではなく、雄性不稔の原因遺伝子がミトコンドリアに、またその働きを抑える遺伝子が核に見つかることから、植物におけるミトコンドリアと核の相互作用のモデルとして興味を持たれている。現在当研究室では、日本各地のハマダイコンを採集し、ミトコンドリアゲノムの変異を調査するとともに、既知及び未知の稔性回復遺伝子(*Rf* 遺伝子)について、遺伝学及び分子生物学の両面から実験を進めている。具体的に、既知の*Rf* 遺伝子(*orf687=PPR* 遺伝子のひとつ)については、多様性が産み出される原因を塩基配列レベルで明らかにしつつある。また未知の*Rf* 遺伝子については、適切な交配実験による遺伝的特徴付けを行うとともに、遺伝子単離にむけた植物材料の育成を行っている。

最後の3)のプロジェクトでは、細胞質置換コムギという希少な材料を用いて、コムギの近縁種であるエギロブス属植物のミトコンドリアゲノムの構成を次世代シーケンサーのデータをもとに解析している。これによりパンコムギの表現型に影響を与える原因遺伝子を特定しようと考えている。

2. 本年度の研究成果

1) a)の課題では、図 1 に示した回路を構成する酵素のうち、APX/SOD をオペロンとして葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出に成功した。この組換え体の後代を特徴付けしたところ、予想どおり非組換え体と比べて ROS を発生させる薬剤であるメチルピオロゲンや強光に対する耐性が上昇していることがわかった。また APX/MDAR、APX/SOD/MDAR オペロンを持つ組換えタバコの作出にも初めて成功した。b)の課題では、岡山大学との共同研究により、ICP-MS を用いて、フェリチンタバコの葉の鉄含量を正確に定量することができた。また壊死の原因が ROS の発生によることも示された。c)の課題では、農水省生物資源研究所との共同研究を実施し、パンコムギの未熟胚カルスからの再分化効率を高めることに成功した。なお d)の課題は、客員研究員との共同研究であるが、今年度は組換え体の世代更新のみを行った。

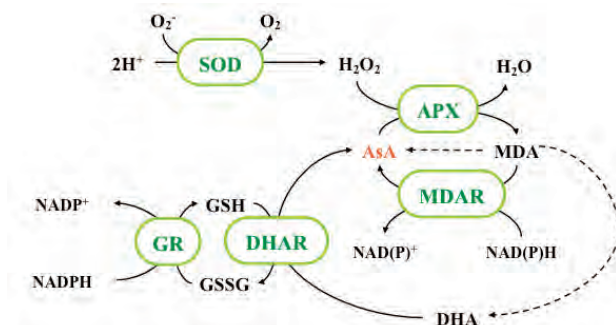


図 1. グルタチオン/アスコルベート回路

2)平成 22 年 5 月に山口県、6 月に福島県、平成 23 年 3 月に福岡県の現地調査を行い、それぞれ 7 個体、12 個体、4 個体の雄性不稔を示すハマダイコンを採集した。現在、これらの中に新規のミトコンドリアゲノムを持つものがあるか調査中である。また正常型とオグラ型のミトコンドリアゲノムの構造を比較するため、次世代シーケンサーによる mtDNA の配列データを得た(詳細は解析中)。

3)*Ae. mutica* の細胞質を持つ置換コムギの 2 系統について、ミトコンドリア DNA を精製した。両者間及びパンコムギとのゲノム構造を比較するため、次世代シーケンサーにより mtDNA の配列データを得た(詳細は解析中)。

3. Research projects and annual reports

We have performed the following three major research projects relating to the organellar genomes in higher plants:

- 1: Production of transplastomic plants that are useful for human beings.
- 2: Comprehensive studies on the molecular mechanism of the male-sterility/fertility restoration system in radish.
- 3: Comparative mitochondrial genome analysis of *Aegilops mutica* using alloplasmic lines of common wheat.

The first project aims at producing various transplastomic plants that will be useful for human beings. Currently several transplastomic lines (containing genes like *apx*, ferritin, etc...) have been produced using tobacco as a model plant and experiments producing transplastomic crops such as wheat and lettuce have been conducted. The second project tries to reveal interaction between mitochondrial and nuclear genomes using a male-sterility and fertility restoration system found in radish. Genetic variations in both mitochondrial *orf138* and nuclear *Rf* genes have been examined to reveal evolutionary aspect of the system. The third project concerns the mitochondrial genome of *Ae. mutica*. It is known that the mitochondrial genome of this species influences on the phenotype of alloplasmic lines of common wheat. To clarify the difference between mitochondrial genomes of *Ae. mutica* and common wheat, complete nucleotide sequence has been determined by the second-generation sequencer.

4. 発表論文

今年度は無し

5. 著書および総説

今年度は無し

6. 招待講演、シンポジウム等

高橋亮:シストランス相互作用と転写制御の進化、岡山大学異分野融合先端研究コア、平成 22 年度第 5 回研究セミナー、岡山市、2011.1.21

高野敏行、高橋亮:遺伝子発現を調節する細胞内環境とシス調節領域の共進化、日本遺伝学会、第 82 回大会ワークショップ「ショウバエ進化研究のこれからーポスト 12 ゲノムの新展開ー」、札幌市、2010.9.22

寺地徹:遺伝子流動制御技術の開発ーコムギ葉緑体への遺伝子導入技術の開発、農林水産省、第4回「新農業展開ゲノムプロジェクト」シンポジウム、東京都、2010.11.30

7. 学会発表

安本景太、筒井康太、房相佑、寺地徹、山岸博:異質細胞質ダイコン系統にみられる雄性不稔性とミトコンドリア mRNA の発現パターンとの関係について。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010.9.24-25

吉見麻衣子、齊藤猛雄、一色司郎、寺地徹、山岸博:CMS を示すナス細胞質置換系統における *atp1* 遺伝子周辺領域の構造解析。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010.9.24-25

山本裕範、森田重人、寺地徹: 活性酸素消去オペロンを葉緑体に持つ組換えタバコのストレス耐性評価。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010.9.24-25

辻村朋彦、植村香織、山本裕範、寺地徹: ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた葉緑体形質転換体の作出。日本育種学会第118回講演会、秋田市、2010.9.24-25

村上亮太、重野麻子、寺地徹、山岸博: ナスと葉緑体形質転換タバコの非対称細胞融合。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010.9.24-25

植村香織、郭長虹、寺地徹: フェリチンを葉緑体で強発現する3種類の組換えタバコの比較研究。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010.9.24-25

田中義行、安本景太、山岸博、寺地徹: ダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子 *orf138* を発現する葉緑体形質転換ベクターの作製とそれを用いた稔性回復遺伝子作用 アッセイ系の構築。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、2010.9.24-25

辻村真衣、富岡関子、森直樹、寺地徹: 倍数性コムギの進化に新しい知見をもたらすミトコンドリアゲノムの構造変異。日本育種学会第118回講演会、秋田市、2010.9.24-25

片山将一、杉山康憲、末吉紀行、寺地徹、亀下勇: 植物 Ndr キナーゼの自己チロシンリン酸化活性。第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

久野恵三、小林健人、小林啓子、安本景太、寺地徹、肥塚信也、松岡健、中村崇裕: コセナ型細胞質ダイコンの稔性回復因子として働く PPR 蛋白質の RNA 結合能に関する解析。第 52 回日本植物生理学会年会、仙台市、2011.3.20-22

森田重人、加藤真人、林清音、生澤彰大、鈴木健吾、山本裕範、増村威宏、佐藤茂、寺地徹: アスコルビン酸ペルオキシダーゼを過剰発現する葉緑体形質転換タバコの解析。第 52 回日本植物生理学会年会、仙台市、2011.3.20-22

辻村真衣、森直樹、寺地徹: 倍数性コムギのミトコンドリアゲノムに見られる構造変異とその分布。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011.3.29-30

須頭知世、植村香織、西塚順子、寺地徹: γ -グルタミルシステイン合成酵素遺伝子 (GSH1) を葉緑体ゲノムに持つタバコ形質転換体の作出。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011.3.29-30

山本裕範、辻村朋彦、林清音、森田重人、寺地徹: 異なる活性酸素消去系酵素の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの比較。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011.3.29-30

辻村朋彦、植村香織、山本裕範、寺地徹: ベンサミアナタバコの葉緑体ゲノムへの *apx* 及び *gsh1* 遺伝子の導入。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011.3.29-30

吉見麻衣子、齊藤猛雄、一色司郎、寺地徹、山岸博: CMS を示すナス細胞質置換系統における新規 *orf* の発現解析。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011.3.29-30

田中義行、津田瑞江、安本景太、山岸博、寺地徹: 次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 I. ナタネミトコンドリアゲノムとの比較。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011.3.29-30

8. その他特記事項

「1. 外部資金」

寺地 徹:

文科省科研費

基盤研究 (B) 「ダイコンの雄性不稔・稔性回復システムの分子機構とその多様性形成メカニズムの解明」(代表)

基盤研究 (C) 「ダイコンにおける花粉稔性回復遺伝子の単離」(分担)

基盤研究 (C) 「神経発生とアポトーシスに関わる脳特異的ムチン型糖鎖合成酵素の機能解析」(分担)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「オルガネラゲノムの研究成果を基盤とする有用植物の育成」(代表)

独立行政法人農業生物資源研究所受託研究

「遺伝子流動防御技術の開発・葉緑体への遺伝子導入技術の開発」

岡山大学資源植物科学研究所共同研究

「葉緑体の遺伝子組換え技術を利用したストレス耐性植物の育成」
高橋亮:

文科省科研費

「挑戦的萌芽研究 群集動態を左右する集団遺伝的 な要因を探る」(代表)

基盤研究 (B) 「ダイコンの雄性不稔・稔性回復システムの分子機構とその多様性形成メカニズムの解明」(分担)

「2. 知財権等」

特願2008-192157「ベクター、組換え植物、並びに、タンパク質の製造方法」

「3. 学外活動」

寺地 徹:

日本学術振興会「特別研究員等審査会専門委員」

生研センター「イノベーション創出のための基礎研究推進事業 平成22年度競争的資金に係る専門委員」

Gene & Genetic Systems editor

Breeding Science editor

高橋亮:

Gene & Genetic Systems editor

筑波大学生命環境学群生物学類「理論集団遺伝学特講」

「4. 受賞等 」なし

「5. その他 」なし

植物集団生物学研究室

Laboratory of Plant Population Biology

教授 米澤 勝衛

Prof. Katsuei Yonezawa, Ph.D



1. 研究概要

以下の2つのテーマの下で、数理モデルに基づく理論的な研究を進めている。

1) 植物育種のための選抜方法の最適化

植物の新しい品種は、通常、人工交配などの方法で作った変異集団に対して選抜（特性の優れた個体あるいは系統を集団の中から選ぶ操作のこと）を何世代かにわたって繰り返すことによって得られる。選抜の結果、新品種にふさわしい優れた特性を持った個体あるいは系統が得られるかどうかは、毎世代の集団の大きさ、選抜の強さ弱さ、特性の善し悪しの判定方法、選抜を繰り返す回数などに大きく依存する。限られた時間と労力の下でこれらの事項をどのように定めるのが最善かを理論的な視点から検討している。目下は、DNAマーカーを利用した選抜方法の効率評価と最適化に関する研究に取り組んでいる。

2) 植物の遺伝的多様性の維持方法

植物の遺伝的多様性を維持することは、地球環境の重要な構成要因である生態系や生物の多様性を守るという面と、将来の品種改良に役立つ有用な遺伝資源を維持するという面から、欠かせない要件である。遺伝的多様性を確保するための効率的な集団管理方法（集団の大きさ、交配様式、個体当たり子数、各個体の生息年数、集団間移住パターンなどの管理）について理論的研究を進めている。

2. 今年度の研究成果

今年度は上記の2つのテーマのうち、1)に関する研究を行い以下の結果を得た。

1) 量的形質の選抜に役立つQTLの識別方法

QTL解析で検出されるQTLには生物的機能が異なるものが多数混在する。これら多くのQTLを機能の違いで分類することは、量的形質の選抜に使える有用なマーカーを決める上で不可欠である。本研究では特に、広く使われている近赤外光透過法などの方法で計測された穀粒化学成分含有率のQTL解析で検出されるQTLの中に、当該化学成分の合成や蓄積に全く関与しない単なる見かけ上の、したがって、高含有率系統の選抜マーカーとして役に立たないQTLが多く含まれることをコンピュータシミュレーションで示し、これらの無益なQTLから有用なQTLを識別するための簡便な方法につい

て検討した。結論として、従来の方法で計測された穀粒化学成分含有率のQTL解析で得られるLODスコアの分布パターンと、この含有率に粒重を乗じた値のQTL解析で得られるLODスコアの分布パターンを比較することによって、識別できることを示した。

2) DNAマーカーを利用した選抜方法の有用性

DNAマーカーを利用した3つの選抜方法、すなわち、MR法：最初の世代で重回帰法の変数選択により有意なマーカーを選択し、以降はこれらのマーカーを重回帰係数で重みづけして求めたマーカースコアに基づいて選抜を行う方法、GW法：最初の世代でリッジ回帰法により全マーカーの重みづけ値を求め、以降はこれらすべてのマーカーを重みづけして計算したマーカースコアに基づいて選抜を行う方法、IM法：最初の世代に Inclusive Composite Interval Mapping (ICIM) 法でマーカーを検出し、以降は検出したマーカーを各QTLの遺伝効果値で重みづけして求めたマーカースコアで選抜を行う方法、の有用性をコンピュータシミュレーションで検討し、以下の結論を得た。他殖植物においては、i) 開花期以後にしか表現型の計測ができない形質については、3つのいずれの方法も従来の表現型選抜よりもはるかに有利である。ii) 開花期以前に表現型の計測が可能な形質については、短期間（少選抜回数）の選抜効果で見た場合は、いずれの方法も表現型選抜よりも有利であるが、長期間での選抜効果で見た場合は、表現型選抜の方が最終的には高い効果を与える。iii) 3つのマーカー選抜のなかでは、GWが他の方法よりもはるかに有利であるが、マーカー密度が低くなるとその有利さは大幅に減少する。自殖植物においては、i) 表現型選抜に対するマーカー選抜の有利性は他殖性作物の場合に比べて小さいが、短期間の選抜効果で見た場合は、GW法が表現型選抜より有利である。ii) GW法の有用性は、選抜個体間の交配という操作を取り入れることにより、大きく上昇する。iii) 他殖植物の場合と同様、GW法の有利さはマーカー密度が低い場合は大幅に減少する。

3. Research projects and annual reports

Our research works major on the two themes mentioned below:

1) Optimization of selection procedures for plant breeding: New breeds of plant are normally obtained by repeated

selection over several generations from a variant population produced by methods such as artificial mating. The probability that outstanding individuals or lines appropriate to the new breed are obtained as a result of such selection depends greatly on the size of the population in each generation, the intensity of selection, the method of evaluating genetic potential of plants, and the number of times selection is repeated. We are investigating how to determine these conditions in an optimum manner from a theoretical standpoint, given limited labor resources and time. Currently, we are carrying out researches on the optimization of selection methods using DNA markers.

2) Methods for the maintenance of genetic diversity of plants: Maintaining genetic diversity within and between plant populations is an indispensable prerequisite, both from the perspective of conserving ecological and biological diversity in the natural world, and from the viewpoint of protecting valuable genetic resources that will be useful for breed improvement in future. We are carrying out theoretical researches on the effective methods of population management for maintaining the genetic diversity (management of factors including population size, mating system, number of offspring per individual, lifespan of individuals, and pattern of migration between populations). In this academic year, we have been devoted to the following two research subjects.

1: Methods for discriminating QTLs useful for quantitative trait selection. Quantitative trait loci (QTL) with different biofunctional roles may occur simultaneously in QTL analysis. Categorizing these QTL by their functional roles is imperative for choosing markers suitable for marker-assisted selection and gene searching. The feasibility of the QTL categorization was discussed in the context of QTL analysis for chemical concentration in seed grains. Our simulated QTL analysis under simple, hypothetical histo-developmental and genetic models showed that, based on the concentration scores taken by conventional methods such as near-infrared transmittance spectroscopy (called score C), a gene can be detected as a QTL even though it has no role in the synthesis or storage of the objective chemical. Such QTL, called nominal QTL, will not be useful as a target of marker-assisted selection for a high chemical harvest. When QTL patterns obtained with score C are compared with those obtained with a modified score, score $C \times \text{grain weight}$ (called score D), nominal and useless QTL can be distinguished out and useful QTL can be categorized into two groups of functional categories, that is, QTL that

control the size of tissues and QTL that control the rate of chemical synthesis. When QTL patterns are obtained and compared across multiple chemicals, QTL in each group can be distinguished by their functional charges.

2: Usefulness of selection methods using DNA markers. The effectiveness of three marker-based selection methods, called MR (selection is based on the score that was calculated using a multiple regression function of statistically significant markers), GW (selection is based on the score calculated using all available markers weighted by the ridge regression), and IM (selection is based on the score calculated using markers detected by the inclusive composite interval mapping), was discussed on the strength of computer simulations, leading to the following conclusions. In outcrossing plants, i) For traits whose phenotypic value cannot be evaluated before flowering, all of the three marker-based selection methods are much more effective than the traditional phenotypic selection method, ii) For traits that can be evaluated phenotypically before flowering, the marker-based methods are superior in a short-term selection program, but not in a long-term selection program, and iii) Of the three marker-based selection methods, GW is by far the most effective, although its superiority is much reduced unless sufficiently many DNA markers (a sufficiently high density of markers) are available. In self-pollinating plants, i) Although the advantage of the three marker-based selection methods against phenotypic selection method is not as high as in outcrossing plants, GW is substantially superior in a short-term selection program, ii) The effectiveness of GW is markedly improved when using intercrossing between plants selected at each selection cycle, iii) As is the case in outcrossing plants, the advantage of GW diminishes with a low density of available markers.

4. 発表論文

Ishii, T., T. Hayashi, and K. Yonezawa: Categorization of Quantitative trait loci by their functional roles: QTL analysis for chemical concentration in seed grains. *Crop Sci.*50:784-793 (2010).

5. 学会発表

石井卓朗、矢野健太郎、林武司、岩田洋佳、米澤勝衛：未検証の DNA マーカーを用いた量的形質選抜の有用性について：他殖作物における集団改良の場合。日本育種学会第 117 回講演会、京都市、2010. 3. 26-27

矢野健太郎・石井卓朗・米澤勝衛：量的形質の選抜方法の最適化に関する研究：選抜の到達点を決める最も重要な要因につ

いて。日本育種学会第 117 回講演会、京都市、2010. 3.
26-27

石井卓朗、矢野健太郎、林武司、岩田洋佳、米澤勝衛：未検証の
DNA マーカーを用いた量的形質選抜の有用性について：自殖性
作物の改良の場合。日本育種学会第 118 回講演会、秋田市、
2010. 9. 24-25

6. その他特記事項

なし

ゲノム生物学研究室

Laboratory of Genomics

准教授 金子 貴一

Assoc. Prof. Takakazu Kaneko, Ph.D



1. 研究概要

植物には、細胞内や細胞間隙に共生微生物が存在する。そのような微生物の多くは、通常、宿主となる植物に害をもたらすようなダメージを与えることがないことが知られている。これまでに、そのような特徴を持つエンドファイトや根粒菌が、多様な植物から分離されており、そのいくつかの菌株においては、植物の生育向上、病害や環境ストレスへの抵抗性向上させることが報告されてきた(図1)。そのような特徴を持つ微生物の一部は、農業生産にも有用であることから、特に研究が進められている。我々は、環境指標となる微生物、特に植物の生育に有効な効果を示す共生微生物のゲノム解読にこれまで取り組み、微生物の生活環や共生成立に関わる遺伝子情報とその多様性を報告してきた(図2)。しかしながら、微生物と植物の相互作用特性は微生物系統に依存せず、近縁系統でもさまざまであり、要因となる遺伝因子は未解明の部分も多い。また、環境ゲノム解析によると、未報告の共生微生物が、ある環境における微生物集団の多数を占めるケースもある。このような背景から、植物と相互作用する共生微生物のゲノム解読に取り組み、比較ゲノム研究を進め、その結果を基盤として共生システムについて調査することにより、宿主植物の機能をより高めるしくみを見つけることを目標に研究をすすめている。

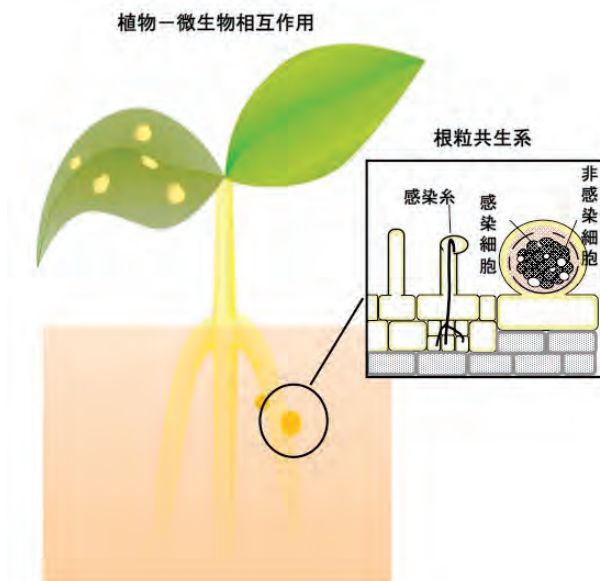


図1 最も研究が進められている植物-微生物の共生様式であるマメ科植物と根粒菌の共生系の略図

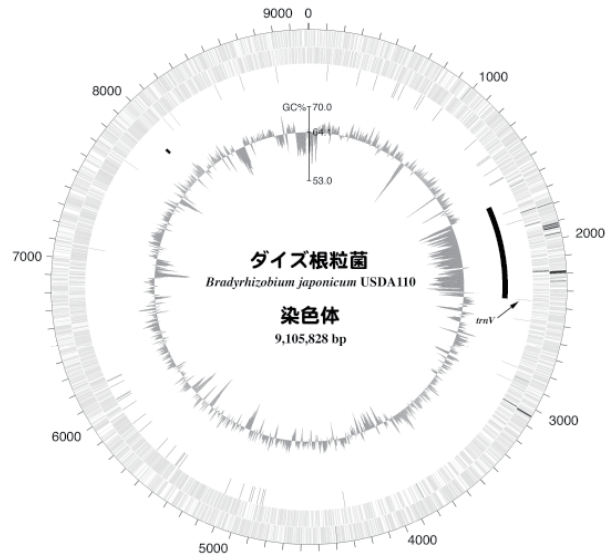


図2 全ゲノム構造を決定したダイズ根粒菌ゲノム地図
黒太線は外来性因子である共生アイランドのゲノムへの挿入を示す。

2. 本年度の研究成果

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 株の全ゲノム塩基配列を解読した。USDA6 のゲノムサイズは 9207 kb、GC 含量は 63.7% であり、既知ゲノムの *B. japonicum* USDA110 と似た構成である。USDA6 と USDA110 の共生アイランドを比較すると、InDel は存在するものの、塩基配列レベルではほぼ同一であることがわかった。この塩基一致率は、両者のゲノムの基幹部分が 90% 程度であることに比べて極めて高い。つまり、これは近い共通祖先の共生アイランドが系統の異なる *Bradyrhizobium* 属細菌へ水平伝播した痕跡であり、その導入が両者の高い共生窒素固定能の背景となったことを示している。

3. Research projects and annual reports

Diversified microorganisms are able to colonize the intercellular, and sometimes also intracellular, spaces of plant tissues, without causing apparent damage to the host plant. Bacterial endophytes and rhizobia have been isolated from several tissues in numerous plant species. Many bacterial strains have beneficial effects on plant growth and health.

Some beneficial strains of them are studied in terms of the molecular mechanisms of establishment inside plants and their functions well. We reported the full genome sequences of such bacteria, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, and *Azospirillum* sp. B510. The genomic information provided valuable insights into the life of the bacteria, including information about interactions with host plants. We examine the nucleotide sequences of the other related endophytic bacterial strains genomes and deduce the symbiotic functional gene repertoire in their genomes. Comparative genomics of naturally occurring plant-associated bacteria have a potential for providing information that can be used to develop enhanced plant-microbe interaction.

The nucleotide sequence of a soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 was determined. The chromosomally integrated elements were predicted by comparing with *B. japonicum* USDA110 genome. One of them was identified as a symbiosis island with a length of 693 kb. The island is flanked by a valine-tRNA gene as is the case in the USDA110 genome. The islands from two strains, USDA6 and USDA110, share approximately 600 kb of DNA regions in which the nucleotide level identity is significantly higher compare to the identity in the genomic backbone. The closely related nucleotide sequences show that the symbiosis islands of two soybean symbionts would be acquired recently by lateral transfer process.

4. 発表論文

なし

5. 著書および総説

Ikeda S, Okubo T, Anda M, Nakashita H, Yasuda M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Eda S, Momiyama A, Terasawa K, Mitsui H, Minamisawa K: Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 2010 Sep;51(9):1398-1410.

6. 招待講演、シンポジウム等

金子貴一: 微生物ゲノム解析の黎明期と現在. 日本水産学会シンポジウム「微生物ゲノムが拓く水産の新たな潮流」京都市 2010.9.25

7. 学会発表

津久井隆裕、金子貴一、佐藤修正、山田学、板倉学、三井久幸、江田志磨、南澤究: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 株と USDA110 株のゲノム比較: USDA122 株特

異的遺伝子の探索 日本土壤微生物学会 2010 年度大会、文京区、2010.5.21-22

津久井隆裕、金子貴一、佐藤修正、山田学、板倉学、山下明史、三井久幸、江田志磨、南澤究: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 株と USDA110 株のゲノム比較 環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、仙台市、2010.6.21-22

Ikeda S, Okubo T, Kaneko T, Inaba S, Sasaki K, Anda M, Eda S, Sato S, Tabata S, Sato T, Mitsui H and Minamisawa K.: Community shifts of soybean-associated microbes by host nodulation phenotypes and nitrogen applications. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24

Sato S, Kaneko T, Shimoda Y, Nakatshkasa H, Nakamura Y, Kato T. and Tabata S: Information and material resources derived from the genome projects of *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti*. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24

Kaneko T, Minamisawa K, Watanabe A, Kawashima K, Minami C, Katoh M, Nakazaki N, Yamada M, and Sato S: Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24

Shigeyama T, Sasaki M, Suriyagoda L, Tominaga A, Hireaesuka Y, Uchiumi T, Abe M, Hashiguchi M, Akashi R, Sakai T, Inada S, Jikumaru Y, Kamiya Y, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Agarie S, Arima S and Suzuki A: Root nodule formation controlled by light quality in *Lotus japonicus*. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24

Okubo T, Ikeda S, Sasaki K, Oshima K, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Sato T, Eda S, Mitsui H, Hattori M and Minamisawa K: Metagenomic survey for characteristics of plant-associated bacteria. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24

Takeshima K, Wei M, Yokoyama T, Minamisawa K, Mitsui H, Itakura M, Kaneko T, Tabata S, Saeki K, Oomori H, Tajima S, Uchiumi T, Abe M., Ishii S and Ohwada T: Temperature-dependent expression of type III secretion system genes and its regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24

S Kuno, T Yoshida, T Kaneko and Y Sako: Analysis On CRISPR Sequences Of Toxic Bloom-forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. 国際有害有毒プランクトン会議, ギリシャ, 2010.11.2-5

眞板寛子、平川英樹、中村保一、金子貴一、佐伯和彦、田畑哲之、佐藤修正: 根粒菌 *Mesorhizobium loti* の共生アイランドにおける比

較解析、第33回 日本分子生物学会年会、神戸市、2010.12.7-10

S Sato, H Hirakawa, E Fukai, T Kaneko, Y Nakamura, E Asamizu, T Kato, S Tabata : Updated genome information of *Lotus japonicus* and status of legume comparative genomics. 第33回 日本分子生物学会年会、神戸市、2010.12.7-10

岡本忍, 中尾光輝, 藤澤貴智, 佐藤修正, 金子貴一, 吉村英尚, 中平有香, 阿久津智子, 鐘ヶ江弘美, 笠井真, 山本純子, 作田千代子, 鹿島裕子, 中村保一: かずさアノテーションスイート:多様なゲノムアノテーションのための協働作業手法とツールの開発、第33回日本分子生物学会年会、神戸市、2010.12.7-10

藤澤貴智, 岡本忍, 中尾光輝, 金子貴一, 田畑哲之, 中村保一: 文献情報に基づくゲノムアノテーション 第33回日本分子生物学会年会、神戸市、2010.12.7-10

津久井隆裕, 金子貴一, 佐藤修正, 山田学, 板倉学, 山下明史, 三井久幸, 江田志磨, 南澤究: 宿主遺伝子特異的な共生不和合性をもつダイズ根粒菌のゲノム解析、第5回日本ゲノム微生物学会年会、仙台市、2011.3.14-16

大久保卓, 佐々木和浩, 金子貴一, 山下明史, 大島健志朗, 佐藤修正, 江田志磨, 三井久幸, 佐藤雅志, 田畑哲之, 服部正平, 池田成志, 南澤究: イネ地上部細菌群集のメタゲノム解析、第5回日本ゲノム微生物学会年会、仙台市、2011.3.14-16

金子貴一, 内池伸和, 南澤究, 渡辺安希子, 田学, 佐藤修正: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6 のゲノム構造解析 第5回日本ゲノム微生物学会年会、仙台市、2011.3.14-16

眞板寛子, 平川英樹, 中村保一, 金子貴一, 佐伯和彦, 田畑哲之, 佐藤修正: ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* における共生アイランドの比較解析、第5回日本ゲノム微生物学会年会、仙台市、2011.3.14-16

8. その他特記事項

1. 外部資金

科学研究費 基盤研究(B)「ダイズ共生窒素固定系に関わる遺伝因子解明に向けた根粒菌多様性の比較ゲノム研究」研究代表者: 2009-2012年

2. 知的財産等

なし

3. 学外活動

財団法人 かずさ DNA 研究所 特別客員研究員の兼務 (2009'7-)

4. 受賞等

なし

5. その他

なし

集団遺伝学研究室

Laboratory of Population Genetics

准教授 河邊 昭

Assoc. Prof. Akira KAWABE Ph.D



1. 研究概要

集団遺伝学分野では、植物を材料として DNA 変異の維持機構の解明を大きな課題として研究をおこなっている。DNA 変異がどのように出現し、世代を経て集団中での頻度をどのように変化させていくのかを明らかにすることは集団遺伝学の主要な目的であり、過去に起こった出来事を推測することで現在進行中の進化や将来的にどのように進化が起こるのかを予測することができる。

本研究分野では特に染色体構造の違いやそれをもたらす機構がどのように DNA 変異に影響を与えるかという点に焦点を絞って研究をおこなっている。ゲノムには多くの遺伝子が存在し、それぞれが自然選択の対象となって生物の進化の要因となっている。しかし全ての遺伝子は同様に自然選択の影響を受けるわけではなく、周辺の領域の染色体構造の違いによって自然選択の働く度合いは異なってくる。単純なものでは、組み換え率の違いが連鎖の強さを異なることになり、自然選択の効果が領域によって大きく異なることになる。染色体を構成する要素である動原体やテロメアなど、またヘテロクロマチンを構成する転移因子など、エピジェネティックなクロマチン構造の変化など、は周辺領域の進化パターンを決定する上で非常に重要なものである。単に表現形の変化をもとに自然選択の検出や適応進化の予想をするのではなく、そもそも自然選択の影響がどのような要因によって変化するかを明らかにすることは、近年のゲノム情報をもとにした生物学の発展を踏まえて多様性研究をするうえでは欠かせないものになってくると思われる。

本研究分野では具体的に次の3点について研究を進めている。

1) 動原体領域の進化機構

動原体は細胞分裂の際に染色体を正確に娘細胞に分配するために必須のものであり、遺伝情報の正確な伝達には不可欠のものである。しかし、その重要性にもよらず動原体配列はゲノム中で最も早く進化すると言われている。シロイヌナズナの近縁種を用いて動原体配列がどのように置換しているのか、動原体配列の違いが実際に染色体の分離に影響を与えるのかを解析している。

2) 転移因子の進化パターンの解析

転移因子は多くの生物でゲノムの大部分を占めるなど染色体の構造を考える上で非常に重要な要素である。転移因子が生存上重要な遺伝子に挿入することで生物に有害な効果をもたらすことも有り、多くの生物で転移因子を不活化する機構が進化している。どのように転移因子がそのコピー数を増やしているのかやその不活化の機構はいまだ解明されていないことも多い。シロイヌナズナで最近明らかになった転移活性を持つ転移因子について、アブラナ科の中での進化パターンを解析することでどのようにコピー数を増やし不活化をまわがれているのかなどについて明らかにしようとしている。

3) エピジェネティックな制御機構の進化に与える影響の解明

エピジェネティックな制御機構により遺伝子発現やクロマチン構造の変化が起こることが知られている。エピジェネティックな制御は配列の違いによらず表現形に差異をもたらすことが可能であるが、クロマチン構造の変化により進化パターンに影響を与えると思われる。様々なエピジェネティック制御機構のうち特にゲノムインプリンティングに注目して研究を進めている。インプリンティング制御パターンの変化やインプリンティングを受けることによる進化への影響などを調査している。

2. 本年度の研究成果

本年度は植物材料の取得・育成を進めるとともに特にシロイヌナズナで転移活性のあることが明らかになった転移因子の近縁種での挿入位置の特異性の解析を進めた。シロイヌナズナで活性が初めて報告された Copia93 ファミリーが近縁種の *Arabidopsis lyrata* で非常に強い動原体への挿入特異性を示すことを明らかにした。動原体周辺領域は転移因子の密度が高い領域として知られているが、動原体の機能領域に特異的に挿入特異性を持つ転移因子はこれまでは知られていない。今後、その挿入特異性機構の解明やさらなる近縁種における挿入パターンの解析をおこなうことにより、いつどのようにこの特殊な転移様式を獲得したのかについて明らかにしていく。

3. Research projects and annual reports

We focused on the maintenance mechanisms of DNA variation in Plant species. We are interested in the following three topics.

1) Evolutionary process of Centromere regions

Centromere is an important area for accurate chromosome segregation but is also one of the fastest evolving regions in the genome. By using Arabidopsis relatives, we are analyzing replacement pattern of centromere sequences and effect of different centromeric sequences on the segregation ratio.

2) Patterns of Transposable Element Evolution

In Arabidopsis thaliana, several transposable element families were identified to have active transposability. We are analyzing differences of sequences and integration patterns of these transposon families in Arabidopsis and related taxa.

3) Effect of Epigenetic regulation on Evolution

Epigenetic regulation can affect evolution patterns through change of chromatin structure. We focused on imprinting genes to analyse divergence patterns. The differences between epigenetically regulated and non-epigenetically regulated loci will be studied.

4. 発表論文

なし

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

河邊昭：シロイヌナズナ近縁種の動原体およびその周辺領域の進化的解析。京都産業大学総合生命科学部第7回バイオフォーラム、京都市、2010.11.10

7. 学会発表

A. Kawabe, A. Forrest, and D. Charlesworth : ANALYSES OF DNA VARIATION IN THE PHERES GENES OF ARABIDOPSIS SPECIES. the 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010), Yokohama (Japan), 2010.6.6-10

S. Tsukahara, A. Kobayashi, A. Kawabe, O. Mathiu, A. Miura, and T. Kakutani: BUSRTS OF RETROTRANSPOSITION REPRODUCED IN ARABIDOPSIS. the 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010), Yokohama (Japan), 2010.6.6-10

河邊昭、塚原小百合、角谷徹仁：Arabidopsis 属における Copia93/20 ファミリーの分布と挿入位置特異性。第82回日本遺伝学会大会、札幌、2010.9.20-22

塚原小百合、小林啓恵、河邊昭、角谷徹仁：Arabidopsis lyrata における COPIA93 レトロトランスポゾンのセントロメア特異的分布の形成機構。第82回日本遺伝学会大会、札幌、2010.9.20-22

8. その他特記事項

学外活動 Genetica, Associate Editor (2010.5-)

植物分子発生生物学研究室

Laboratory of Plant Developmental Biology

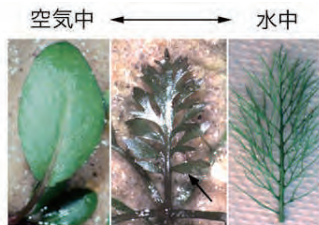
准教授 木村 成介

Associate Prof. Seisuke Kimura, Ph. D



1. 研究概要

生物が周囲の環境に応じてその表現型を変化させることを表現型可塑性といい、生物の環境への適応に重要な役割を果たしている。アブラナ科に属する水生植物のニューベキア (*Neobeckia aquatica*)は、生育する環境に依存して葉の形態を変化させ、空気中では楕円形の単葉を発生する一方、水中では針状の小葉からなる羽状複葉(一枚の葉が複数の小葉に分かれた葉)を発生する。このような葉の形態の変化(表現型可塑性)は、光条件や水の抵抗などの環境に適応するために役に立っていると考えられているが、どのような仕組みで葉の形を変化させているのかについてはほとんどわかっていない。私達は、ニューベキアが環境にどのように応答して葉の形を変化させているかを明らかにすることを目指して研究を進めている。



ニューベキアの葉の形態の表現型可塑性

2. 本年度の研究成果

アブラナ科に属する半水生植物のニューベキア(Lake cress, *Neobeckia aquatica*)は、生育環境に応じて葉の形態を様々に変化させる表現型可塑性を示す(Fig. 1)。ニューベキアは北米の湖畔などの湿地帯に生育しており、葉の形態の変化は水没などの環境変化に適応するために役に立っていると考えられる。ニューベキアは葉の断片から再生して増殖し、完全なクローンが簡単に得られるため表現型可塑性の研究をするのに都合が良い。そこで本研究では、ニューベキアを用いて植物の葉の形態の表現型可塑性についての研究を進めた。

まず、ニューベキアの系統関係を明らかにするため、*rbcl* 配列に基づく分子系統解析を行った。ニューベキアはタネツケバナ属(*Cardamine*)、オランダガラシ属(*Nasturtium*)、イヌガラシ属(*Rorippa*)などと比較的近縁で、アブラナ科のタネツケバナ連(Tribe *Cardamineae*)に属することがわかった。

これまでニューベキアが水没により葉の形態を大きく変化させることが知られていたが、生育温度によっても葉の形態が大きく変化し、25℃では単葉を発生するのに対して、20℃では複葉を発生することがわかった。さらに低温の7℃で生育させると葉身が水中葉の様に針状になることから、低温条件が水没条件をなんらかの形で模していると考えられる。また、このような葉の形

態の変化は、茎頂および葉原基の形態観察から葉の形態は発生の早い時期で決定されていた。

複葉を持つ多くの植物では、ホメオボックス遺伝子であるKNOX遺伝子が葉原基で強発現していることが知られている。組織免疫染色によりニューベキアのKNOX遺伝子の発現パターンを調べた所、複葉を発生する条件においては、小葉原基などで強い発現が観察された。KNOX遺伝子はGA20ox遺伝子などの発現を抑制する事で、ジベレリン合成量を低下させることが知られている。そこでジベレリンがニューベキアの葉の形態に与える影響について調べた所、ジベレリンの添加により低温条件であっても単葉が発生し、逆にジベレリンの生合成阻害剤であるウニコダゾールの添加により高温条件においても複葉が発生した。このことから、ニューベキアの葉の形態形成においてもKNOX遺伝子経路が重要な働きをしていると考えられた。

ニューベキアの表現型可塑性の発現は、葉の発生やメリステムの維持に関与する遺伝子の発現部位や量が環境に応じて変化することでおこると考えられる。今後は、シロイヌナズナのゲノムをリファレンスとして次世代シーケンシングによる網羅的遺伝子発現解析を行なうことで、ニューベキアの示す葉の形態の表現型可塑性のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目指していく。

3. Research projects and annual reports

Plant can alter their development, physiology and life history depending on environmental conditions. This fundamental property is called phenotypic plasticity. The North American lake cress, *Neobeckia aquatica* is an herbaceous perennial aquatic mustard. Typical habitat of lake cress is at shores of ponds, slow-moving streams and other quiet waters in North America. The lake cress shows heterophylly, phenotypic plasticity on leaf shape. In nature, the leaf shape of this plant depends on whether the plant is submerged in or emergent from water. Submerged leaves are usually deeply dissected and has needle-like blade, whereas emergent leaves are generally entire with serrated or smooth margins. This phenotypic plasticity on leaf shape is thought to be adaptive response to submergence and increase the fitness in water's edge environment where most of lake cress populations are found. Despite the significance of this plant to study fundamental mechanisms of phenotypic plasticity and environmental responses in plants, the underlying mechanism

hasn't been investigated. We investigate the mechanism of the heterophylly of *Neobeckia aquatica*.

To determine the phylogenetic position of lake cress in Brassicaceae, a phylogenetic tree was constructed based on the nucleotide sequence of the chloroplast gene *rbcL* by UPGMA method. The molecular data indicated that *Neobeckia* is closely related to *Rorippa* and *Cardamine*, and belonged to tribe Cardamineae.

The leaves of lake cress are extremely variable. It is known that the heterophyllous transition of *Neobeckia aquatica* occurs in response to changes in water level. We investigated that the effect of various environmental conditions on leaf shape and found that lake cress altered leaf shape according to the ambient temperature. Lake cress produced entire leaf with smooth margin when they were grown at 25 °C. By contrast, in 20 °C, they produced dissected leaf. At lower temperature, 7 °C, they developed highly dissected needle-like leaves which resembled the submerged leaves. These results suggested that lake cress can sense the growing temperature and response to it.

The leaves of seeds plants can be classified as being either simple or compound according to their degree of leaf complexity. Simple leaf, which is similar to aerial leaf form of lake cress, is composed of a single blade and a petiole, while compound leaf, which is similar to submerged leaf form, has multiple blade units, termed leaflets, attached to a rachis. Leaf shapes are highly correlated with expression patterns of *KNOX1* genes in leaf primordia. *KNOX1* genes are downregulated in the incipient leaf primordia in both compound and simple leafed species. However, *KNOX1* gene expression is re-established later in the developing primordia of most plants with compound leaves. In addition, overexpression of *KNOX1* genes leads to excessive leaf compounding. Therefore, *KNOX1* is thought to be involved in controlling leaf form. We examined spatial distribution of KNOX1 protein in shoot apex by immunohistochemistry. Expression of KNOX1 protein in leaf primordia was found in lake cress developing submerged-type leaves, but not found in leaf primordia of aerial-type leaves. These results indicated the correlation of KNOX1 and leaf shape of lake cress.

One of the downstream targets of KNOX1 is GA20-ox, gibberellin (GA) biosynthesis gene. KNOX1 suppresses the expression of GA20-ox by binding to the first intron of the gene. Thus gibberellin is involved in determination of leaf shape. To test whether GA is also involved in leaf development in lake cress, we performed application experiments. Lake cress were shown to develop aerial type leaves when they were applied with

GA. In contrast, they produced submerged type leaf when they were applied with uniconazole which is GA biosynthesis inhibitor. These results imply that GA has an important roles in determination of leaf identity in lake cress.

This study would give a new insights into the adaptive nature of phenotypic plasticity, its underlying mechanisms and its role in the ecological distribution and evolutionary diversification of plants.

4. 発表論文

なし

5. 著書および総説

N. Uchida, S. Kimura, D. Koenig and N. Sinha: Coordination of leaf development via regulation of *KNOX1* genes. *J. Plant Res.* **123**: 7-14 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

S. Kimura: Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel *KNOX* gene. Japanese San Francisco Bay Area Seminar Annual Meeting, Davis, CA, USA, 2010.3.18

木村成介: ガラパゴス諸島に固有の野生トマトに観察される葉形態の自然変異の発生機構. 京都産業大学総合生命科学部バイオフォーラム、京都市、2010.11.10

7. 学会発表

木村成介: 環境に応じて葉の形を変化させる植物ニューベキアを用いた植物の表現型可塑性の研究. 第33回日本分子生物学会年会、神戸市、2010.12.7-10

8. その他特記事項

1. 外部資金 平成 22 年度科学技術研究費補助金研究活動スタート支援

動物分子生態学研究室

Laboratory of Animal Molecular Ecology

准教授 高橋 純一

Associate Prof. Jun-ichi Takahashi, Ph.D



1. 研究概要

社会性昆虫であるミツバチ、マルハナバチ、スズメバチなどを研究材料として、動物社会における社会性がどのように進化し維持されてきたのか、そのメカニズムの解明を目的に遺伝子工学的手法を用いた分子生態学的研究を行っている。特にミツバチの高度な集団行動に着目し、多様な社会行動に関与する行動制御遺伝子の単離と機能解析を試みている。ミツバチの全ゲノムは、2006年に解読されているが、遺伝子発現を制御する方法は完全に確立されていないため、遺伝子組換えミツバチの作成手法の開発を試みている。

ミツバチはまた農業や環境保全分野にとっても重要な生物資源である。養蜂種として利用されているセイヨウミツバチは、近年世界各地で病原性微生物の多重寄生・感染が主原因と思われるミツバチ群崩壊症候群 (CCD) による減少が報告されている。日本でも花粉交配や蜂蜜生産用のミツバチ不足が大きな問題となっている。そこでセイヨウミツバチの病原性微生物に対する抵抗性 (免疫および衛生・防衛行動) に関与する形質の量的遺伝子解析を行うため、現在遺伝マーカーの開発と並行して DNA 育種法による選抜育種を進めている。ミツバチでは精子の凍結保存技術が開発されていないため、その方法を開発し、凍結保存精子による人工授精を進めている。近い将来のうちに、ミツバチの新品種作製のための DNA 育種法を世界に先駆けて確立し、病原性微生物に対する抵抗性系統の品種作製を試みている (写真 1)。

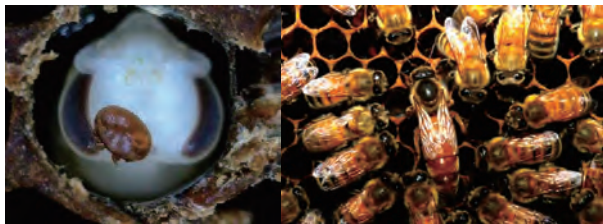


写真1. ミツバチヘギイタダニ (左) と DNA マーカー育種法により開発中のダニ抵抗性ミツバチ (右)

また現在絶滅が危惧されている昆虫・動物類の保護を目的とした保全遺伝学的研究を行っている。ノサップマルハナバチは北海道の根室・知床半島にのみ分布する希少種である。近年の環境開発や温暖化による生態系構造の変化や近縁外来種の帰化による競合、種間交雑、病原性微生物の増加などにより、現在ではその個体数や生息地が急激に減少しているため絶滅の危険性が高

い種である。本種の保全是緊急を要するにもかかわらず、基礎的な生活史や生態などはほとんどわかっていなかったため、野外調査と分子生態学的研究により、生活史、繁殖生態、遺伝的多様度などの調査研究を行っている。我々の調査により、本種は近親交配、未交尾個体、不妊化個体が高い確率で発生していることが明らかになり、生息数も 200 個体前後にまで激減しているため、早急な保護対策を取る必要があるため保全計画の策定を進めている。



写真 2. ハンゴンソウ (左) とツリガネニンジン (右) を訪花する希少種ノサップマルハナバチ (根室半島)

2. 本年度の研究成果

日本には在来種のニホンミツバチと養蜂品種で外来種であるセイヨウミツバチの 2 種のミツバチが生息している。近年外来種による帰化により在来種と交雑による雑種化や遺伝子汚染などの繁殖干渉が問題になっている。そこでセイヨウミツバチが在来種のニホンミツバチとの間で繁殖干渉を起こしている可能性があるため、野外および室内実験によりその検証を行った。人工授精法を用いてセイヨウミツバチとニホンミツバチの女王蜂にそれぞれ異種の精子を受精させたところ、一部の胚で発生が進んで働き蜂が産出された。そこでこれらの個体の形態形質および遺伝子型解析を行ったところ、雑種個体ではなく雌性単為生殖により産出されていることが示された。そこで野外で採集した個体を使って、繁殖構造をマイクロサテライト DNA 解析により調査したところ、外来種セイヨウミツバチとの種間交雑が野生集団でも高頻度で起きていることが明らかになったが、室内での実験と同様に雑種個体は産出されなかった。ミツバチでは交雑を起こすと女王蜂の繁殖様式が通常の有性生殖から雌性単為生殖へと変化することを明らかにした。さらに日本各地のニホンミツバチ集団からミトコンドリア DNA の塩基配列を解析したところ、集団内・間での遺伝的多様度が極端に低いことが明らかになった。ニホンミツバチで外来種との繁殖干渉による単

為生殖様式の変化による影響が今回はじめて示唆された(本研究は平成 21-22 年度科学研究費補助金若手研究 B 課題番号 21770021 による研究助成を受けた)。

3. Research projects and annual reports

I am driven to understand how evolutionary processes affect social systems and how sociality, in turn, affects the course of evolution. My ultimate goal is to understand the underlying principles that govern the social evolution in the animal kingdom at all scales from insects to humans. In addition, I am fascinated by the ecological, genetic and evolutionary consequences of sociality on the life history strategies of social insects. To achieve these aims my present research focuses on understanding the social structure, mating biology and social behaviour of social insects (social bees, social wasps and ants). I combine the disciplines of behavioural ecology, population genetics and socio-genomics using both the field research, DNA genotyping, control of gene expression by the germ-line transformation and RNAi in molecular-biological techniques. I am currently developing transgenic social insects using honeybee-derived DNA viruses and studying the reverse genetic functional analysis of genes concerning sociality in social insect by gene suppression control techniques. I have developed a method for transient expression of exogenous genes in the honeybee and ant embryos using a virus vector. In addition, I have succeeded in target gene suppression by RNAi in honeybees, bumblebees and ants. The suppression effect was sufficient to observe the phenotype, so it may be applicable to the functional analysis of not only behavior genes but also other genes, such as expression genes in a host of various tissues.

4. 発表論文

- Kiyoshi, T., Takahashi, J., Yamanaka, T., Tanaka, K., Hamasaki, K., Tsuchida, K. and Tsubaki, Y.: Taxonomic uncertainty of a highly endangered brook damselfly, *Coperato kyotoensis* Asahina, 1948 (Odonata: Platycnemididae), revealed by the mitochondrial gene genealogy". **Conservation Genetics**. In press.
doi:10.1007/s10592-011-0189-x.
- Yamasaki K., Takahashi J., Ono M., Tsuchida K.: Reproductivity of early males of the temperate paper wasp *Polistes rothneyi iwatai*. **Entomological Science**. In press.

井之口文菜、山崎和久、土田浩治、高橋純一:霧多布湿原周辺および霧多布岬におけるセイヨウオオマルハナバチ (*Bombus terrestris* L.)の侵入初記録。**保全生態学研究**。印刷中。

Takahashi J., Martin SJ., Ono M., Shimizu I.: Male production by non-natal workers in the bumblebee, *Bombus deuteronymus* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Ethology**. 34:43-49 (2010)

高橋純一、山崎和久、光畑雅宏、Martin SJ., 小野正人、椿宜高:根室半島のマルハナバチ相:特に北海道の希少種ノサブマルハナバチに対する外来種セイヨウオオマルハナバチの影響について。**保全生態学研究**. 15:101-110 (2010)

山崎和久、高橋純一、岡部貴美子、牧野俊一、土田浩治:コアシナガバチに便乗するドロバチヤドリコナダニ類の一種 *Sphexicozela* sp.の初記録。**昆虫**. 13:126-128 (2010)

5. 著書および総説

木村澄、高橋純一:養蜂マニュアル。60pp (財)日本養蜂はちみつ協会 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

- 高橋純一:ミツバチの繁殖生態と寄生性ダニ類の管理。京都府養蜂組合総会、綾部市、2011.2.9.
- 高橋純一:セイヨウミツバチの選抜育種による抵抗性品種の作成。みつばち協議会・日本養蜂組合東海地区総会、名古屋市、2010.12.8.

7. 学会発表

- 吉田忠晴、塩原香織、高橋純一:ニホンミツバチ女王蜂と雄蜂の交尾行動—観察塔での交尾の確認—。日本応用動物昆虫学会第55回大会、福岡市、2011.3.22.
- 大庭信也、高橋純一、奥田昇:Microsatellite DNA マーカーを用いたコオイムシ科昆虫における父系解析。日本応用動物昆虫学会第55回大会、福岡市、2011.3.22.
- 内海俊介、安東義乃、Roininen H.、高橋純一、大串隆之:間接相互作用網における「種多様性・生態的機能・形質進化」のつながり。日本生態学会第58回大会、札幌市、2011.3.10.
- 高橋純一、井之口文菜:道東におけるノサブマルハナバチとセイヨウオオマルハナバチの生息状況について。日本昆虫学会近畿支部 2010 年度大会、三田市、2010.12.11.
- 土山悠、高橋純一、野村哲郎:ナミテントウとクリサキテントウの集団遺伝構造解析。日本昆虫学会近畿支部 2010 年度大会、三田市、2010.12.11.

土山悠、高橋純一、野村哲郎：マイクロサテライトを用いたクリサキテントウの集団構造解析に関する検討。日本動物行動学会第 29 回大会、那覇市、2010.11.20.

8. その他特記事項

社会活動：みつばち協議会養蜂マニュアル作成委員、平成 22 年度スーパーサイエンスハイスクール高大連携講座講師、京都府養蜂組合顧問

植物生理学研究室

Laboratory of Plant Physiology

准教授 本橋 健

Assoc. Prof. Ken Motohashi, Ph. D

助教 桶川 友季

Assist. Prof. Yuki Okegawa, Ph. D



1. 研究概要

植物生理学分野では、植物葉緑体における機能制御に興味を持ち、大きなテーマ設定を行っている。

植物の大きな特徴のひとつに光合成がある。高等植物の光合成は葉緑体と呼ばれる複数の膜系からなる形態的にも複雑なオルガネラで進行し、CO₂ 固定が行われている。植物にとって光合成は非常に重要な機能であるため、様々な制御機構を備えている。私たちはこの中でも高等植物葉緑体におけるレドックス制御機構について、その生理機能と分子メカニズムの解明を目指し、研究を行っている。

葉緑体のレドックス制御機構では、チオレドキシソリンと呼ばれるタンパク質がその制御に中心的な役割を果たす。本研究分野では、チオレドキシソリンファミリータンパク質を中心として、以下の具体的な研究項目を設定し、研究を進めている。

1) 葉緑体ストロマにおけるチオレドキシソリンファミリータンパク質の機能制御機構の解明

葉緑体ストロマでは、光合成の行われる昼と夜とで大きくレドックス状態が変化する。光合成の行われる昼には、光合成電子伝達経路から生じる電子でNADPHを産生するため還元的な状態にある。昼の還元状態のときに葉緑体ストロマに局在するチオレドキシソリンは、カルビンサイクルなどの酵素を還元し活性化し、ペルオキシレドキシソリンをはじめとする活性酸素種消去系酵素へ反応に必要な電子を供給する、チラコイド内腔への還元力供給経路へ電子を渡す、などさまざまな場面において機能している。これらの構造の異なる多くの標的タンパク質をどのように見分け、葉緑体内で混乱することなく、相手タンパク質を認識し、必要な還元力を供給しているのか明らかにする。

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

葉緑体は、外包膜、内包膜という二枚の膜に加えて、チラコイド膜を持っており、形態上も複雑なオルガネラである。昼と夜とで大きくレドックス環境が変化する葉緑体ストロマ画分とは対照的に、チラコイド膜を隔てたチラコイドの内側(チラコイド内腔)のレドックス状態変化はほとんど知られていない。私たちは、チラコイド内腔にもチオレドキシソリン様タンパク質が局在することを証明し、これがチラコイド内腔で機能していることも明らかにした。還元力の蓄積のないチラコイド内腔で、チオレドキシソリンのような酸化還元タンパク質が機能するためには還元力の供給が必要である。内腔で必

要となる還元力をストロマから伝達する分子メカニズム、およびその生理学的な意義を明らかにする。

2. 本年度の研究成果

1) 葉緑体ストロマにおけるチオレドキシソリンファミリータンパク質の機能制御機構の解明

高等植物のモデル植物である*Arabidopsis thaliana*では、5グループ 10種類におよぶチオレドキシソリンアイソフォームの存在が明らかとなっている。これら多くのアイソフォームの機能分担が、葉緑体内での各種経路への還元力供給の使い分けを可能にしていると考えた。現在、10種のアイソフォームの役割分担を明らかにするための研究を開始した。

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

還元力の蓄積のないチラコイド内腔に還元力を供給するシステムの存在が示唆されている。そこで、*Arabidopsis* に存在する候補因子 CcdA について、葉緑体内での局在、およびストロマからチラコイド内腔側への還元力伝達能力を生化学的手法を用いて検討した。具体的には、単離チラコイド膜を用いた *in vitro* 実験系で研究を行った。その結果として、チラコイド内腔のチオレドキシソリン様タンパク質が還元される条件と同じ条件で、チラコイド膜タンパク質 CcdA は還元されることがわかった。このことから、チラコイド内腔に局在するチオレドキシソリン様タンパク質とチラコイド膜タンパク質 CcdA が、同一経路上で機能することが考えられる。

3. Research projects and annual reports

We have been setting our research theme on the functional regulation of higher plant chloroplast.

Plants have photosynthetic ability to convert carbon dioxide into organic compounds, especially sugars, as unique feature. The photosynthesis in higher plants occurs in chloroplasts which are comprised of multilayered membranes, and pushes forward carbon dioxide fixation. Chloroplasts have various regulation mechanisms of photosynthesis that is an important function for plants. Particularly, we focus on redox regulation in modulation system of higher plant chloroplast, and have major two research projects as follows:

1: Functional analysis of stromal thioredoxin family proteins in redox regulation system.

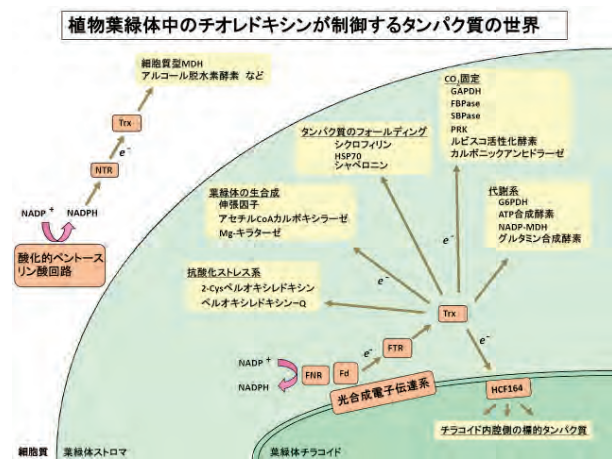
The redox state of higher plant chloroplasts fluctuates widely under light and dark conditions. In the light, reducing equivalents are produced from photosystem and used to produce the reductant NADPH. NADPH is further used for the reduction of CO₂ in the chloroplast stroma. A portion of the reducing equivalents is also utilized for reduction of stroma thioredoxins. Thioredoxins transfer reducing equivalents to regulation of thiol-enzymes, scavenging for reactive oxygen species, or reducing equivalents transfer system across thylakoid membranes. How stroma thioredoxins recognize various target proteins in stroma, without being confused?

Arabidopsis thaliana have five groups of stromal thioredoxins. We made specific antibodies for 5 groups of stromal thioredoxins, and have started the research project to clarify the role of stromal thioredoxins.

2: Physiological role and molecular mechanism of reducing equivalent transfer system on thylakoid membranes in chloroplasts.

In contrast to redox state control in stroma side, knowledge pertaining to redox regulation on the luminal side of the thylakoid membrane remains very limited. We previously demonstrated that a thioredoxin-like protein is located in the thylakoid lumen and can function as a reducing equivalent carrier to protein targets located in the lumen. In order to function as a carrier of reducing equivalents in the thylakoid lumen, a thioredoxin-like protein in thylakoid lumen side in turn must receive reducing equivalents. These results suggest that higher plant chloroplasts possess a reducing equivalent transfer system which operates across the thylakoid membrane from the stroma to the luminal side. We analyze the physiological role and molecular mechanism of the reducing equivalent transfer system across the membrane.

CcdA, which is a candidate for this system, was examined a contribution for reducing equivalent transfer assay *in vitro*, using isolated thylakoid membranes. If both a luminal thioredoxin-like protein and CcdA protein function in the same reducing equivalent transfer pathway, reduction of a disulfide bond in the CcdA molecule should be promoted by stromal thioredoxin. As expected, CcdA could be reduced, in which a luminal thioredoxin-like protein was reduced.



4. 発表論文

K. Motohashi and T. Hisabori: CcdA is a thylakoid membrane protein required for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast. *Antioxid. Redox Signal.* **13**: 1169-1176 (2010)

Y. Okegawa, Y. Kobayashi and T. Shikanai: Physiological links among alternative electron transport pathways reducing and oxidizing plastoquinone in Arabidopsis. *Plant J.* **63**: 458-468 (2010)

H.S. Jung, Y. Okegawa, P.M. Shih, E. Kellogg, S.E. Abdel-Ghany, M. Pilon, K. Sjölander, T. Shikanai and K.K. Niyogi: Arabidopsis thaliana PGR7 encodes a conserved chloroplast protein that is necessary for efficient photosynthetic electron transport. *PLoS ONE* **5**(7): e11688 (2010)

5. 著書および総説

本橋健: 高等植物葉緑体におけるレドックス制御～チラコイド内腔におけるレドックス調節機構について～. 光合成研究 20 巻 4-8 (2010)

6. 招待講演、シンポジウム等

本橋健: 高等植物葉緑体のレドックス制御機構. 植物バイテク談話会特別セミナー、京都市、2010.7.13

7. 学会発表

桶川友季, 鹿内利治: 光化学系 I サイクリック電子伝達と PTOX の複雑な相互作用、第 51 回日本植物生理学会、熊本市、2010.3.18-22

杉本和彦, 桶川友季, Terri A. Long, Sarah F. Covert, 久堀徹, 鹿内利治: PGR5 の 1 アミノ酸置換は PSI サイクリック電子伝達のアンチマイシン A 耐性を付与する、第 51 回日本植物生理学会、熊本市、2010.3.18-22

桶川友季, 鹿内利治: PTOX と光化学系 I サイクリック電子伝達、第 1 回日本光合成学会、東京、2010.6.4-5

本橋健, 久堀徹: 葉緑体ストロマチオレドキシニンによるチラコイド膜を介した還元力伝達機構。第 1 回日本光合成学会公開シンポジウム、目黒区、2010.6.4-5

K. Sugimoto, Y. Okegawa, T.A. Long, A.F. Covert, T. Hisabori and T. Shikanai : A mutation in PGR5 proteins confers antimycin A resistance in PSI cyclic electron transport, 15th International Congress of Photosynthesis, Beijing (China), 2010. 8. 22-27

吉田啓亮, 本橋健, 久堀徹: ミトコンドリアのチオレドキシニン標的タンパク質の探索、日本植物学会第 74 回大会、春日井市、2010.9.9-11

K. Motohashi and T. Hisabori : CcdA is a thylakoid membrane protein

for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast. The 3rd International Symposium on Protein Community、Nara(Japan)、2010.9.13-16

K. Motohashi and T. Hisabori : CcdA is a thylakoid membrane protein for the transfer of reducing equivalents across the thylakoid membrane in the higher plant chloroplast. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同年会、神戸市、2010.12.7-10

吉田啓亮、野口航、本橋健、久堀徹:プロテオミクスを用いたミトコンドリアのチオレドキシソニ標的タンパク質の探索。第52回日本植物生理学会年会、仙台市、2011.3.20-22

本橋健、久堀徹:葉緑体チラコイド膜局在タンパク質 CcdA の還元力伝達機構。第52回日本植物生理学会年会、仙台市、2011.3.20-22

8. その他特記事項

1. 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究 C

科学研究費補助金 特定領域研究

家畜衛生学研究室

Laboratory of Animal Hygiene

教授 大槻 公一

Prof. Koichi Otsuki, Ph.D



1 及び 2. 研究概要及び本年度の研究成果

鳥類の感染性疾患を引き起こす病原体には様々なものがある。たとえば、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫などである。鳥類のウイルス性疾患のほとんどは、鳥類に限定している。しかし、例外もある。たとえば、鳥インフルエンザのように、病原体の鳥インフルエンザウイルスはヒトを含むほ乳類に感染して臨床症状を発現する。すなわち、人獣共通感染症である。

ところで、鳥インフルエンザとはインフルエンザウイルスが感染することにより引き起こされる家きん類を含む鳥類の疾患の総称である。病勢から本病は2型に大別される。まず、かつて家きんペストと呼ばれた高病原性鳥インフルエンザである。ニワトリを含む多くの鳥類に激しい臨床症状を伴い、非常に高い死亡率をもたらす甚急性の疾患である。家畜伝染病予防法では法定伝染病に指定されている。もう一方は、死亡率の低い、臨床症状も高病原性鳥インフルエンザに比較すると、はるかに軽微な、多彩な病性を示す疾患である。ウイルスに感染しても、ニワトリは明らかな臨床症状を示さず、不顕性感染に終始する場合も少なくない。本病は家畜伝染病予防法では届出伝染病に指定されている。

1980年頃まで、インフルエンザは、鳥類を除けば、人、あるいはブタ、ウマのような一部のほ乳類のみが感染する疾患であると考えられていたが、現在では、様々な種類のほ乳類、たとえばネコ科の動物、イヌも罹患するが、アザラシ等の海獣類、クジラ、あるいはフェレット、ミンク等の北方系の肉食哺乳類なども、本ウイルスに感染して発病することが分っている。一方、高病原性鳥インフルエンザの病原体がA型インフルエンザウイルスであることが1955年に判明して以来、ニワトリ以外の外見上健康な各種鳥類が、さまざまな種類のインフルエンザウイルスを、その体内にニューカッスル病(ND)ウイルスを含む各種パラミクソウイルス同様、保有していることが知られるようになった。現在、H5N1亜型鳥インフルエンザウイルスがユーラシア大陸、アフリカ大陸に広く分布して猛威を振るっているが、鳥類、特に水鳥が保有している大部分のインフルエンザウイルスは、鳥類に対して激しい病原性を示さない。1970年代から山陰地方に飛来する冬型の渡り鳥の鳥インフルエンザウイルス状況ならびに分離鳥インフルエンザウイルスの各種性状を調査してきたが、それらの研究成果を基礎に、さらに発展す

べく研究を進展している。

1) 西日本に飛来して越冬している渡り鳥の鳥インフルエンザウイルス保有状況の調査

野生動物感染症学分野の高桑弘樹准教授、本学鳥インフルエンザ研究センター所属の常國良太研究員、藪田淑子氏らと共同研究を実施している。現在のところ、調査を琵琶湖東岸の的を絞って行なっている。おおむね11月から4月まで毎月2回程度採材を行なってきたが、2010年11月以降各地で鳥インフルエンザが多発したため毎週採材を実施した。また、冬型の渡り鳥の多くが越冬する島根県安来市郊外の能義平野においても、コハクチョウの糞を採材している。

2) ベトナム北部を汚染している鳥インフルエンザウイルスの生態調査

本研究は、鳥取大学に在籍していた時から始まった、文科省の新興再興感染症に係る海外研究拠点形成プロジェクトの一環として、2005年度から継続して実施しているものである。本研究は、高桑弘樹准教授の他、学術交流協定を結んでいる鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センターの伊藤壽啓教授、山口剛士教授、村瀬敏之教授、伊藤啓史准教授、笛吹達史講師、尾崎弘一助教その他九州大学医学部実験動物学教室の小野悦郎教授、長崎大学熱帯医学研究所森田公一教授、山城哲教授と協力しながら実施している。これまでの研究から、ベトナムは日本と異なり、家きん産業界において常に鳥インフルエンザウイルス侵入の危険にさらされており、鳥インフルエンザ撲滅まで長期間必要であることが明らかになってきた。成果の一部は専門雑誌に順次公表している。しかし、東南アジアで信頼できるデータを出すのは困難性が高い。忍耐強い地道な努力が要求される。今後も本研究は継続される予定である。

3) 企業が開発した抗インフルエンザウイルス素材の評価

高桑准教授、本学鳥インフルエンザ研究センター所属の井上瑞江主任研究員、常國良太研究員、藪田淑子特定研究員らと共同研究を実施している。企業から提供される様々な種類の素材の抗ウイルス作用について検討を実施している。研究成果の一部は、すでに専門雑誌に公表した。また、企業と共同で特許出願も行なった。動物生命医科学科及び鳥インフルエンザ研究センターは、教育および研究の両面において社会との結びつきが極めて強く、常に成果の社会還元が求められる

る特徴を有する。したがって、この方面の研究をさらに発展させてゆく必要がある。

4) インフルエンザウイルス感染に係わる生体側の要因の解明

本研究は、インフルエンザウイルス感染及び発病に関するほ乳類と鳥類の違いを究明する鳥インフルエンザ研究の根源的な要素を含んでいる。そのため、生体側のウイルスに対するレセプターを化学的に追求する研究を長年実施してきた本学鳥インフルエンザ研究センター所属の井上瑞江主任研究員と密接な協力体制を組みながら研究を進展させている。成果の一部は、2011年度に公表できるところまで来ている。

3. Research projects and annual reports

Our research is focussed mainly epizootiology on avian influenza (AI). We are analysing some properties of AI viruses isolated from a few kinds of migratory waterfowls flying from Siberia or northern China and staying in the Kansai region, particularly Lake Biwa during winter to clarify these isolates from an ecological point of view.

We are also collaborating with few companies to develop anti-viral activity-having useful products, that is, we evaluate materials those were experimentally produced by them, analyse mechanisms of this activity and search their applications.

We are also collaborating with the Avian Zoonoses Research Centre, Faculty of Agriculture, Tottori University to investigate AI incidence in Viet Nam. We are collecting many faeces and throat swabs from few species of domestic fowls reared in that country to isolate AI viruses, and serum samples from them to calculate antibody titre to these viruses. We expect to get some useful datum about not only contaminating situation of AI virus in Vietnamese poultry industry but also threatening level of human infection with this virus. Our research base is the overseas research station "Friendship Laboratory" opened by Nagasaki University in the National Institute of Hygiene and Epidemiology in Ha Noi.

4. 発表論文

Takakuwa, H., Maruoka, T., Hata, T., Miyazawa, M., Hata, T., Toshimori, T., and Otsuki, K. Development of a new disinfectant with very strong anti-influenza-viral activity - a preliminary report. *Environ. Health Prev. Med.*, **15**, 121-123. 2010.

Takakuwa, H., Yamashiro, T., Le, Q. M., Phuong, L. S.,

Ozaki, H., Tsunekuni, R., Usui, T., Ito, H., Yamaguchi, T., Ito, T., Murase, T.,

Ono, E., Otsuki, K. Possible circulation of H5N1 avian influenza viruses in healthy ducks on farms in northern Vietnam.

Microbiol. Immunol., **54**, 58-62, 2010.

Tsunekuni, R., Ito, H., Otsuki, K., Kida, H., Ito, T. Genetic comparisons between lentogenic Newcastle disease virus isolated from waterfowl and velogenic variants. *Virus Genes*, **40**, 252-255, 2010.

Tsunekuni, R., Ito, H., Kida, H., Otsuki, K., and Ito, T. Increase in the neuraminidase activity of a nonpathogenic Newcastle disease virus isolate during passaging in chickens. *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 453-457, 2010.

Shivakoti, S., Itoh H., Otsuki, K., and Ito, T. Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a mountain hawk eagle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 459-463, 2010.

Shivakoti, S., Itoh H., Murase, T., Ono, E., Takakuwa, H., Yamashiro, T., Otsuki, K., and Ito, T. Development of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in the field specimens. *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 519-523, 2010.

Murata, H., and Otsuki, K. Swine influenza and cytokines: less of a storm, more of a breeze. *Vet. J.*, **187**, 16-17, 2010.

Fujimoto, Y., Ito, H., Shivakoti, S., Nakamori, J., Tsunekuni, R., Otsuki, K., and Ito, T. Avian influenza virus and paramyxovirus isolation from migratory waterfowl and shorebirds in San-in district of western Japan from 2001 and 2008. *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 963-967, 2010.

5. 著書および総説

大槻公一. インフルエンザの最新知識Q&A 2010 : 3. プラインフルエンザの歴史とは? 4. パンデミックと鳥インフルエンザの今後の推移は?の2項目を執筆、鈴木宏、松本慶三編、医薬ジャーナル社、大阪、2010.

大槻公一. これでわかる インフルエンザ診療のポイント—診断・治療・予防がすっきりわかる—. コラム トリインフルエンザの項目を執筆、藤田次郎編、南江堂、東京、2010

大槻公一. 地球環境学事典. 新型インフルエンザと鳥インフルエンザの項目を執筆、立本成文、日高敏隆監修、弘文堂、東京、2010.

大槻公一. 鳥インフルエンザウイルス—アジアにおけるH5N1 亜型ウイルスの生態—. *臨床と微生物*, **37**, 99-104, 2010.

大槻公一. 鳥インフルエンザと新型ウイルスの世界的流行 (パンデミック). *防菌防黴*, **38**, 297-307, 2010.

大槻公一、高桑弘樹、常國良太、井上瑞江、藪田淑子、中村保紀、松下美紀、山名英明. インフルエンザ対策、

特に高機能付加マスクの有用性. **京都産業大学先端科学技術研究所報**, No. 9, 103-117, 2010.

大槻公一. 特集インフルエンザ. プタ・トリインフルエンザの現状. **小児内科**, **42**, 1536-1540, 2010.

大槻公一, 高桑弘樹, 常國良太, 井上瑞江, 藪田淑予. 特集/新型インフルエンザ AH1N1 の流行を振り返って. トリインフルエンザの流行状況. **臨床と研究**, **87**, 1718-1723, 2010

大槻公一, 高病原性鳥インフルエンザの現況とこれからの備え. **農業と経済**, **77**, 79-88, 2011.

大槻公一, 暮らしと微生物 5 マスク. **防菌防黴**, 39, 175-183, 2011.

6. 招待講演、シンポジウム等

Takakuwa, H., Yamashiro, T., Le, M. Q., Phuong, L. S., Tsunekuni, T., Usui, T., Ozaki, H., Itoh, H., Yamaguchi, T., Ito, T., Otsuki, K., Murase, T., and Ono, E. Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy poultry bred in farms in northern Vietnam. 4th Annual Meeting EPIZONE, St Malo, France, 7th-10th June 2010

Takakuwa, H., Ito, T., Murase, M., Yamashiro, T., Ono E., and Otsuki, K. Molecular epidemiology of avian influenza in northern Vietnam. Workshop on the Influenza Research of J-GRID: The Inaugural Meeting of the Influenza Consortium, Tokyo, Japan, 16th July 2010

Otsuki, K. Avian influenza occurred in Japan. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections 2010, Busan, Republic of Korea, 31st July - 3rd August 2010

Takakuwa, H., Yamashiro, T., Le, M. Q., Phuong, L. S., Ono, E., Usui, T., Tsunekuni, R., Itoh, H., Ozaki, H., Yamaguchi, T., Ito, T., Otsuki, K., and Murase, M. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010, Hanoi, Vietnam, 11th-12th November 2010

7. 学会発表

井上瑞江, 高桑弘樹, 常國良太, 藪田淑予, 伊藤壽啓, 大槻公一, 中田 博: ニワトリ気道上の鳥インフルエンザウイルス結合蛋白の検索. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島市, 2010.11.7-9

堀田こずえ, 高桑弘樹, 村瀬敏之, 小野悦郎, 伊藤壽啓, 大槻公一, 山城 哲: ハノイ市郊外で飼育されるアヒルおよびブタより分離されたA型インフルエンザウイルスの遺伝子解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島市, 2010.11.7-9

8. その他特記事項

社会貢献 (講演)

大槻公一: 新型インフルエンザウイルスと鳥インフ

ルエンザウイルス. 日立アプライアンス主催『日立「西日本特約・販売店様」販売会議セミナー』 大阪市 2010年5月7日

大槻公一: 新型インフルエンザ(2009)の総括と今年のインフルエンザ予防対策. (株)ウイズ主催医療介護関係者のための冬の健康管理とインフルエンザ勉強会 大阪市 2010年10月15日

大槻公一: 新型インフルエンザウイルスと鳥インフルエンザ. 山口大学農学部主催 山口大学農学部獣医学科特別セミナー 山口市 2010年10月29日

大槻公一: 鳥インフルエンザ、口蹄疫ってどういう病気. 京都府農林水産部畜産課主催知って得とり・たまごの集い 京都府綾部市 2010年10月30日

大槻公一: 最近の鳥インフルエンザの現状. 社団法人大阪府畜産会主催 自衛防疫研修会 大阪市 2010年11月5日

大槻公一: 鳥インフルエンザ、口蹄疫ってどういう病気. 京都府農林水産部畜産課主催知って得とり・たまごの集い 京都市 2010年11月6日

大槻公一: 中海で越冬する渡り鳥と鳥インフルエンザウイルス. 鳥取大学産学・地域連携推進機構社会貢献室主催 大山・日野川・中海学協会セミナー 米子市 2010年11月20日

大槻公一: 鳥根県での発生状況など鳥インフルエンザについて. 京都府危機管理・防災課主催府民への緊急情報伝達研究会(特別編) 京都市 2010年12月21日

大槻公一: 「高病原性鳥インフルエンザ」の出現予測や流行予測、国内侵入経路の解明」及び「高病原性鳥インフルエンザの国内外での防疫体制」(社)群馬県畜産協会主催 高病原性鳥インフルエンザ防疫研修会群馬県前橋市 2011年2月1日

大槻公一: 鳥インフルエンザの流行状況. (社)日本しろあり対策協会関西支部主催 第43回(平成23年度)支部通常総会 大阪市 2011年2月10日

社会貢献 (報道関係記事等)

○新聞記事

2010年5月28日 朝日新聞 口蹄疫関連コメント

2010年6月1日 京都新聞 口蹄疫対策会議コメント

2010年6月11日 朝日新聞 口蹄疫関連コメント

2010年6月18日 毎日新聞夕刊 口蹄疫関連コメント

2010年10月18日 京都新聞 鶏卵PRイベント

2010年10月23日 リビング京都 鶏卵PRイベント

2010年11月30日 毎日新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年11月30日 読売新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年11月30日 日本経済新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月1日 朝日新聞 鳥インフルエンザ研究センターP3開設及び鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月1日 京都新聞 鳥インフルエンザ研究センターP3開設及び鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月1日 読売新聞 鳥インフルエンザ研究センターP3開設

2010年12月1日 日本経済新聞 鳥インフルエンザ研究センターP3開設

2010年12月1日 毎日新聞 鳥インフルエンザ研究センターP3開設

2010年12月3日 山陰中央新報 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月6日 新潟日報 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月9日 山陰中央新報 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月18日 読売新聞(北陸版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月19日 読売新聞(北陸版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月22日 読売新聞(福岡版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月22日 朝日新聞(福岡版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2010年12月23日 朝日新聞(福岡版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月22日 西日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月24日 南日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月24日 京都新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月25日 京都新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月25日 南日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月25日 西日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月25日 日本経済新聞(沖縄版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月26日 南日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月26日 京都新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月27日 読売新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月27日 産経新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月27日 中日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月27日 東京新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月27日 日本経済新聞夕刊(名古屋版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月27日 読売新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月27日 京都新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月28日 朝日新聞(名古屋版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月29日 中日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月29日 日本経済新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月30日 中日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年1月30日 南日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月2日 中日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月4日 西日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月6日 西日本新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月9日 京都新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月14日 中日新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月15日 毎日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月15日 毎日新聞(中部版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月15日 中日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月15日 日本経済新聞夕刊(名古屋版) 鳥インフルエンザ関連コメント

2011年2月16日 毎日新聞夕刊 鳥インフルエンザ関連コメント
2011年2月17日 中日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント
2011年2月18日 朝日新聞 鳥インフルエンザ関連コメント
2011年2月18日 日本経済新聞 鳥インフルエンザ関連コメント
2011年2月23日 読売新聞(和歌山版) 鳥インフルエンザ関連コメント

○テレビ・WEB番組

2010年11月30日 KBS京都「京プラス」
鳥インフルエンザ研究センターP3公開
2010年11月30日 NHK京都「ニュース610 京いちにち」 鳥インフルエンザ研究センターP3公開
2010年11月30日 テレビ東京「news FINE」
鳥インフルエンザ関連コメント
2010年12月16日 NHK京都「ニュース610 京いちにち」 日韓インフルエンザセミナー
2010年12月21日 NHK「ニュースウオッチ9」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月24日 WEB「science news」
特集 鳥インフルエンザ研究センターについて
2011年1月25日 関西テレビ「とくダネ！」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月25日 フジテレビ「知りたがり！」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月26日 読売テレビ「かんさい情報ネットten！」鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月26日 NHK京都「ニュース610 京いちにち」 鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月26日 NHK「NHKニュース7」
鳥インフルエンザ関連コメント
2010年1月26日 NHK「ニュースウオッチ9」

鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月26日 フジテレビ「めざましテレビ」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月27日 関西テレビ「とくダネ！」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月27日 毎日放送「ちちんぷいぷい」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月27日 関西テレビ「スーパーニュースアンカー」 鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月27日 日本テレビ「スッキリ！」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月27日 フジテレビ「知りたがり！」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月28日 日本テレビ「News every」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年1月31日 NHK京都「ニュース610 京いちにち」 鳥インフルエンザ関連コメント
2011年2月16日 NHK「NHKニュース7」
鳥インフルエンザ関連コメント
2011年2月17日 NHK京都「ニュース610 京いちにち」 鳥インフルエンザ関連コメント

○ ラジオ

2010年12月21日 NHK「私も一言！夕方ニュース」 鳥インフルエンザ関連解説
2011年1月25日 NHK「私も一言！夕方ニュース」 鳥インフルエンザ関連解説
2011年1月27日 NHK「RSニュース、鳥インフルエンザ韓国で拡大懸念」 解説
2011年1月29日 RKB毎日「安藤豊どんどこサタデー」 鳥インフルエンザ関連コメント

○ 雑誌

2010年5月号「日経メディカル」
パンデミック2009H1N1特集

免疫病理学研究室

Laboratory of Immunopathology

1. 研究の概要

環境分野で重要な問題として取り上げられているタバコ喫煙に着目し、喫煙の免疫、癌増殖・転移、DNA 損傷への影響について、マウスを用いて研究している。喫煙と免疫と癌は、それぞれ密接に関係しており、これらの関係を解明することは大変意義がある。そこで、私の研究室では、これらの関係を組織、細胞、遺伝子のレベルで解明し、「喫煙と免疫と癌と天然成分を科学」している。

これまでの研究で、タバコ喫煙により肺胞マクロ

ファージの貪食能、抗原提示能、細胞表面抗原、サイトカイン mRNA 発現などの免疫機能は抑制されているが、逆に活性酸素の産生能は増加する。そこで現在は、喫煙により増加した活性酸素により、肺胞マクロファージおよび肺組織の DNA 損傷が誘導され、その結果異常 DNA が形成され、肺癌の発生にこれらの要因と低下した免疫機構が関係している可能性について研究している。また抑制された免疫機能を回復するために、天然成分(アガリクス茸、蜂蜜)の免疫増強作用についても研究し、新薬の開発を目指している。

本研究室では以下の研究テーマについて研究を進めている。

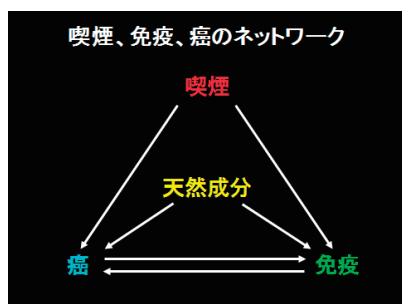
1) タバコ煙による肺胞マクロファージへの影響と遺伝子損傷について

タバコ喫煙により、タバコ煙は直接肺に吸入されるため、肺に存在する免疫細胞や肺組織への影響があると考えられる。特に肺の免疫系で中心的な役割を担っている肺胞マクロファージの機能に対するタバコ喫煙の影響を調べる



ことは、肺の免疫系、ひいては生体防御を考える上で重要である。そこで、自動喫煙装置を用いて、マウスに一定量、一定期間、均一にタバコ煙を喫煙させた後、気管支肺胞洗浄により肺胞マクロファージを採取し、肺胞マクロファージの免疫機能と遺伝

2) LPS およびスギ花粉の初期免疫応答について



教授 竹内 実



Prof. Minoru Takeuchi, Ph.D, D.V.M, M.Sci. D

グラム陰性菌由来の Lipopolysaccharide(LPS)はタバコ煙や環境中に含まれており、これらを肺に吸入することによる肺免疫細胞への影響について研究している。また、アレルギーを発症させることで知られているスギ花粉の吸入による肺の初期免疫応答反応についても研究をしている。

3) 天然成分の免疫作用とその応用について

① 蜂蜜

ジャングルハニーは、アフリカ・ナイジェリアの Enugu 州 Nsukka 地域の熱帯雨林に生息する野生の蜂が長期にわたり樹木や花から集めてきた蜂蜜である。ナイジェリアでは、この蜂蜜が呪術師であるシャーマンにより風邪、皮膚炎、火傷の治療薬、疾患予防薬として伝統的な医療に利用されてきた。食用ではなく、むしろ治療薬として使用されていることから、生体への作用、特に免疫作用に対する効果が考えられる。そこで、ジャングルハニーの免疫機能への影響とその作用機構、抗腫瘍作用について研究をしている。



② アガリクス茸

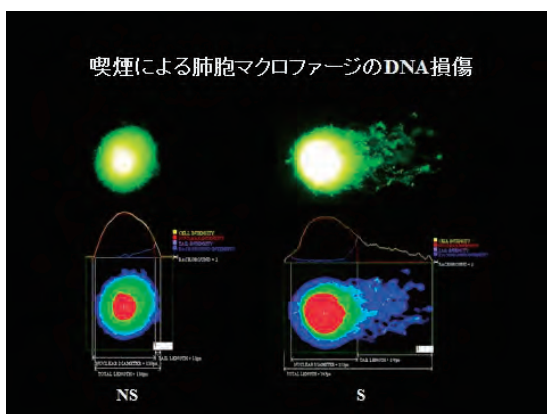
アガリクス(Agaricus blazei Murill)は食用キノコで、ブラジル、サンパウロ郊外のピエダーテ地方と呼ばれる高地に唯一自生している。ピエダーテ地方の住民には生活習慣病の患者が少なく長寿者が多いことから研究が進められ、アガリクスには免疫力を高め、抗腫瘍活性や NK 細胞、T 細胞などの免疫活性が知られている。しかし、これらの作用機構については十分に解明されていないため、その免疫作用のメカニズムについて研究している。



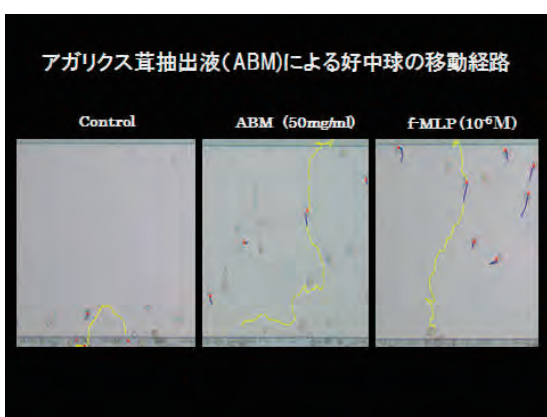
2. 本年度の研究成果

喫煙の肺免疫系への影響については、肺胞マクロファージを介した抗原特異的、非特異的なリンパ球反応に対して、タバコ主流煙により肺胞マクロファージの抑制が認められ、特に未熟な B 細胞の増殖反応が抑制されることが解明された。また、その抑制機構には、喫煙により肺胞マクロファージから産生される過剰な活性酸素種(ROS)により抑制されることが、活性酸素除去剤を用いた実験により証明された。また、喫煙により肺胞マクロファージが ROS により DNA 損傷を受けていることも確認された。

天然成分に関しては、ナイジェリアで伝統的な治療として



使用されている蜂蜜の一つであるジャングルハニーに好中球に対する移動性・走化活性が新しく認められ、移動方向性、移動速度ともに増強することが解明された。



3. Research projects and annual reports

We are focusing on cigarette smoke, which is currently attracting attentions as an environmental problem, hence are investigating to elucidate the effect of smoking on the relationship between smoke and pulmonary immune cells, particularly alveolar macrophages, and pulmonary epithelial cells. Smoking has been shown to increase production of active oxygen by alveolar macrophages, which induce DNA damage in these cells, and it has also been demonstrated that their immune functions such as antigen presentation and cytokine production are impaired. It has been suggested that these inhibitions in immune functions are related to the incidence of smoking-related pulmonary epithelial cancer and tumor cell proliferation, and we are investigating this relationship and “making a science for smoking.” Since the fact that immune functions are suppressed by smoking and tumor growth, we are also investigating the mechanisms whereby immunoenhancing substances may act to restore suppressed immune functions.

1: Study for tobacco smoke

Cigarette smoke is a major risk factor for pulmonary diseases. Alveolar macrophages (AM) phagocytize microorganisms, produce reactive oxygen species (ROS) and play an important role in immunological surveillance for the lung. In previous studies, we demonstrated tobacco smoking inhibits immune functions in AM. However, the mechanism of inhibition of immune function in AM is not well defined. In the aim of our study, we are investigating the suppressive mechanism of immune functions in AM associated with DNA damage by cigarette smoke exposure.

2: Study for Natural products

(1) Jungle honey

Jungle honey (JH) is collected from timber and blossom by wild honey bees that live in the tropical forest of Nigeria. This is used as traditional medicine for cold, skin inflammation and burn wound but not only health care. However, the effect of Jungle honey on immunomodulatory activity is not yet found clearly. We have previously reported the effect of natural components on immune system. Therefore, we are investigating the effect of jungle honey on immune system and anti-tumor activity using mice.

(2) Agaricus Blazei Murill

Agaricus blazei Murill (ABM) has been traditionally used as medicine in Brazil. ABM has been reported for anti-tumor activity and immune activity. It is unclear how ABM extract activates the immune system and anti-tumor activity. We have demonstrated that extract of Agaricus blazei Murill (ABM) activated immune functions in mice. However, the mechanism of the activity of immune functions and anti-tumor activity by ABM is not well defined. Therefore, we are focusing on immune cells functions associated with anti-tumor activity by ABM hot water extract and its characterization of effective component.

4. 発表論文

Miyahara, Emiko; Nishie, Makiko; Takumi, Shota; Miyano-hara, Hiroaki; Nishi, Junichiro; Yoshiie, Kiyotaka; Oda, Hiroshi; Takeuchi, Minoru; Komatsu, Masaharu; Aoyama, Kohji; Horiuchi, Masahisa; Takeuchi, Toru: Environmental mutagens may be implicated in emergence of drug-resistant microbes. *FEMS Microbiology Letters*. in press.

Koichiro Yoshimoto, Tsunao Kishida, Hiroshi Nakano, Masahiro Matsui, Masaharu Shin-Ya, Taketoshi Shimada, Shigeru Nakai, Jiro Imanishi, Minoru Takeuchi, Yasuo Hisa and Osamu Mazda: Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Immunotherapy*. in press

Fukuda M, Kobayashi K, Hirono Y, Miyagawa M, Ishida T, Ejiogu EC, Sawai M, Pinkerton KE, Takeuchi M.: Jungle honey enhances immune function and antitumor activity. *Evid Based Complement Alternat Med*. in press

廣野由里子 竹内実: タバコ主流煙による肺胞マクロファージのDNA損傷の誘導とアポトーシスの抑制 *京都産業大学論集* 自然科学系列 第39号, 63-93 (2010)

Mayuko Miyagawa, Miki Fukuda, Yuriko Hirono, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Masaaki Sakura, Toru Takeuchi, Osamu Mazda, Kent E. Pinkerton and Minoru Takeuchi: Effect of Jungle honey on chemotactic activity of neutrophils. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2(4):149-154 (2010)

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

Minoru TAKEUCHI: Effects of jungle honey on immune functions and anti-tumor activity. 2nd ICMUH, Kota Bharu (Malaysia), 2010.1.14

7. 学会発表

Yuriko Hirono, Shinichi Inoue, Mayuko Miyagawa, Takahiro Ishida, Masaaki Sakura, Sumire Inaga, Osamu Mazda, Sonoko Nagai, Toru Takeuchi, K.E. Pinkerton and Minoru Takeuchi: Cigarette Smoke Induces DNA Damage but not Apoptosis in Alveolar Macrophages. .ATS 2010 International Conference. New Orleans(U.S.A.) 2010.5.14-19

Mayuko Miyagawa, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyosi, Yuriko Hirono, Sakura Masaaki ,Toru Takeuchi, K.E. Pinkerton and Minoru Takeuchi: Hot water extract of *Agaricus blazei* Murill (ABM) prevents the ageing process by activation of neutrophil functions. The 1st International Congress on Controversies in Longevity,

Health and Aging, Barcelona(Spain), 2010.6.24-27

Mayuko Miyagawa , Ayaka Kawazoe , Eri Shigeyosi , Yuriko Hirono, Sakura Masaaki ,Toru Takeuchi , K.E. Pinkerton and Minoru Takeuchi: Induction of neutrophils in LL/2 tumor bearing mice. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, 2010.9.22-24

重吉瑛里、川添彩香、廣野由里子、宮川真由子、佐倉正明、竹内実: 蜂蜜による抗体産生機能への影響。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2010.11.25-27

廣野由里子、宮川真由子、佐倉正明、川添彩香、重吉瑛里、稲賀すみれ、松田修、長井苑子、竹内亨、Pinkerton Kent、竹内実: タバコ主流煙による肺胞マクロファージのDNA損傷とその修復。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2010.11.25-27

川添彩香、重吉瑛里、佐倉正明、廣野由里子、宮川真由子、竹内実: LPS 経鼻投与による肺炎の誘導と好中球機能について。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2010.11.25-27

宮川真由子、川添彩香、重吉瑛里、廣野由里子、佐倉正明、竹内亨、Pinkerton Kent、竹内実: アガリクス茸熱水抽出液による好中球の走化活性とその有効成分。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2010.11.25-27

8. その他特記事項

1. 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(C)
戦略的研究基盤形成支援事業

2. 知財権等

なし

3. 学外活動

京都府獣医師会支部役員、JED レーリー、
京都高等教育研究センター副所長など

4. 受賞等

2nd ICMUH 招待講演学会賞

5. その他

竹内研究室プロデュース

ジャングルハニーハンドクリーム

京都産業大学で好評発売中!



お待ちしております！ 竹内研究室一同

動物神経解剖学研究室

Laboratory of Animal Anatomy and Neurobiology

教授 加藤 啓子

Prof. Keiko Kato, D.V.M. Ph.D



1. 研究概要

「神経の可塑的变化」とは、持続的な刺激により、神経回路をつなぐ神経突起（軸索や樹状突起）の分岐や肥大、さらには新たな接続が生じることで、神経伝達物質の質及び量が変化する。またグリア細胞の活性化等も知られている。しかしながら、いまだ分子レベルの裏付けに基づくメカニズムの全容を知るための研究課題は山積であり、現在の研究レベルはスタート地点から少し前に進んだ状況である。我々は、海馬一扁桃体を中心とする情動記憶がどのように生じるのかを中心に、辺縁系における神経可塑性の獲得過程を知ることが目的に研究を進めている。さらには、メカニズムの解明をもとに、てんかん～うつ病・不安障害に至る神経精神疾患の診断法や治療薬の開発につなげていくことを目指している。

本研究分野では具体的に次の諸点について研究を展開している。

1) 難治てんかん発症機構の解明

難治てんかんの 50%を占める側頭葉てんかんのモデルマウスである扁桃体キンリングマウスを用いることで、2つのてんかん原因分子を見つけた。その一つである成長ホルモンは、下垂体で発現した後全身に運ばれ、成長促進作用に加えて、たんぱく質、脂質、糖、水電解質の代謝作用があることが知られているが、脳内での直接的な作用は知られていなかった。我々は、この成長ホルモンがてんかん発症の閾値を決定することを発見した。この成長ホルモンを介した脳内シグナル機構の全貌を解明する。

2) シアル酸修飾が制御する情動系神経回路の応答機構の解明

もうひとつのてんかん原因分子であるシアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) を欠損したマウスを作出したところ、このマウスは、うつ・不安障害、環境適応不全、睡眠障害、さらには、ホルモン恒常性障害 (成長阻害や性行動不全) を発症するストレス性情動系障害モデルであった。シアル酸修飾を受ける基質を探索し、シアル酸化がどのようにてんかんやストレス性情動系障害に関わるのかについて研究を進める。

3) ストレス性情動系障害への飼料摂取効果の検討

シアル酸修飾酵素遺伝子欠損による、ストレス性情動系障害モデルは、成長阻害を示す。ストレス性情動系障害への食品摂取効果を検討する研究を開始した。食品摂取が与える脳代謝への影響を解明する。

4) ボツリヌス毒素によるてんかん発作抑制機構の解明

ボツリヌス毒素による難治てんかんの治療効果を検討したところ、てんかん発作を示すマウスの 50%が大発作を完全に消失した。ボツリヌス毒素がもたらす、異常な神経可塑性の抑制がどのようなメカニズムで生じるのかを明らかにし、さらにはヒト難治てんかん治療につながることのできる有力な治療薬であることの証明につなげる。

2. 本年度の研究成果

1) 難治てんかん発症機構の解明

成長ホルモンと受容体拮抗薬を海馬に投与することで、新たな遺伝子発現変動に伴うそう様・うつ様症状を誘導することがわかった。この知見は、これまで知られていた末梢系での作用に加え、成長ホルモンは脳内においても発現し成長ホルモンシグナル系を発動し、てんかん・躁状態とストレス性情動系障害のバランスを制御していることを示すものである。現在論文をまとめている。

2) シアル酸修飾が制御する情動系神経回路の応答機構の解明

シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) を欠損したマウス脳から、ストレス性情動系障害に関わる、シアル酸修飾を受ける基質を探索してきた。脳内におけるナトリウムチャンネルの量と質の変化を観察した。

3) ストレス性情動系障害への飼料摂取効果の検討

平成 22 年度 A step シーズ顕在化:「油脂飼料摂取によるストレス性情動系障害への効果」の採択を得た。研究を開始するために、動物実験ブースを設置後一連の動物実験を実践し、立ち上げを完了した。

4) ボツリヌス毒素によるてんかん発作抑制機構の解明

毒素成分のみからなる A2NTX を海馬注入することで、てんかん発作を示すマウスの 50%が、完全に発作を消失することを、平成 21 年度に明らかにした。そこで平成 22 年度は、無毒成分を含む Botox (A1NTX と無毒成分混合、市販製剤) のてんかん発作抑制効果を比較検討した。その結果、無毒成分が混入すると、てんかん抑制効果が著しく減弱することがわかった。

3. Research projects and annual reports

We investigate the mechanisms of developing emotional memory in the hippocampus-amygdala connections and the acquisition of neural plasticity in the limbic system. Furthermore, we aim to develop of diagnostic methods and therapeutic drugs for the relief of

epilepsy, anxiety, and mood disorders based on the clarification of the mechanism.

Epileptic model mice and stress-sensitive model mice showing anxiety, sleep disorder, and hormonal homeostatic change were used. Our approach was to check the symptoms of the models by behavioral and physiological analyses and to clarify causal molecules by histological and biochemical analyses. The topics of research and the content were as follows.

1: Clarification of mechanism of epilepsy progression.

Amygdala-kindling model mice is analogous to secondarily generalized complex partial seizures and a model of temporal lobe epilepsy in humans, showing abnormal neural plasticity. Using kindled mice, we have found two molecules responsible for epileptogenesis, a growth hormone and a sialyltransferase. We found there is also a growth hormone signal system in the brain, and this signal system is deeply related to the development of neuropsychiatric disorders other than epilepsy. We aim to clarify the whole mechanism of growth hormone signaling in the brain.

2: Clarification of the neural network function based on emotions that sialylation controls.

We made a model mouse deficient in alpha 2, 3-sialyltransferase, which is the other molecule responsible for epilepsy progression. The alpha 2,3-sialyltransferase gene-deficient mice showed emotional symptoms including an anxiety disorder, an environmental adjustment disorder, sleep disturbance, and hormonal homeostatic disorder. We aim to find the acceptor substrate of alpha 2,3-sialyltransferase and to investigate the effects of sialylation on the development of epileptogenesis and emotional symptoms.

3: Effect of food intake on stress-sensitive model mice.

The stress-sensitive model mice showed growth inhibition according with decreases of growth hormone and IGF1 within the plasma. We started research to examine the effect of food intake on the behavior of mice in November, 2010.

4: Clarification of inhibitory mechanism of epileptic seizures with botulinum neurotoxin.

We investigated the delivery of botulinum neurotoxins directly into the seizure focus of the brain to prevent epileptic seizures using a model of temporal lobe epilepsy. As a result, administration of the neurotoxin into the hippocampus make seizures disappear in 50% of mice with kindled seizures. We aim to investigate the mechanisms about how the neurotoxin abolishes the abnormal neural plasticity of epilepsy.

4. 発表論文

Okada T., Omoto-Kitao M., Mukamoto M., Nakamura J., Mino M., Kondo T., Takeshita A., Kusakabe K T., Kato K. Compensatory Renal Growth in Uninephrectomized Immature Rats: Proliferative Activity and Epidermal Growth Factor. *J Vet Med Sci.* 72:975-80 (2010)

Kusakabe K T., Abe H., Kondo T., Kato K., Okada T., Otsuki Y. DNA microarray analysis in a mouse model for endometriosis and validation of candidate factors with human tissues. *J Reproductive Immunol.* 85:149-60 (2010)

5. 著書および総説

Kato K. (2011) Introduction of a novel molecular mechanism on epilepsy progression: roles of growth hormone signaling in a mouse model of temporal lobe epilepsy. InTech - Epilepsy / Book (in press)

6. 招待講演、シンポジウム等

加藤啓子 第24回特定非営利活動法人 近畿バイオインダストリー振興会議 技術シーズ公開会「モデルマウスを利用した治療薬スクリーニング」(財)大阪科学技術センター 2010.8.27

Kato K., Koda T., Kozaki K Application of A2NTX in the treatment of refractory epilepsy. 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Iwate Prefecture Citizen's Cultural Exchange Center, 2010. 5. 20

7. 学会発表

加藤啓子「京都発未来創造型産業創出連携拠点」大学シーズ説明発表会 ストレス障害を緩和する食品・治療薬の開発 京都リサーチパーク 2011.2.23

加藤啓子 シアル酸転移酵素遺伝子欠損に基づくストレス性情動系障害モデルマウスの確立 第108回関西実験動物研究会 京都市勧業館「みやこめっせ」2010.12.10

Keiko Kato, Kanno Hiroki, Yoshio Hirabayashi. Progression of epilepsy and anxiety via brain growth hormone signaling.(てんかんおよび不安障害誘導への脳成長ホルモンシグナル系の関与) Neuro2010 神戸コンベンションセンター 2010.9.4

K. Kato, Y. Kobayashi, S. Okuma, Y. Hirabayashi. Perinatal abnormality of alpha 2,3-sialyltransferase (ST3Gal IV) gene-deficient mice 第25回国際糖質シンポジウム 幕張メッセ 2010.8.5

加藤啓子, 菅野 拓, 平林義雄 側頭葉てんかんモデル(扁桃体キンドリング) マウスと成長ホルモン・海馬注入マウスにおける遺伝子発現比較と行動学的解析 第57回日本実験動物学会総会 京都テルサ 2010.5.13

8. その他特記事項

1. 外部資金

A step 研究成果最適展開支援事業フイージビリティスタ
ディ可能性発掘タイプ シーズ顕在化 AS2211285E
ストレス障害を解消する油脂食品の開発

2. 知材権等

国際特許出願：PCT/JP2010/051707 「Composition for
screening of therapeutic drug for preventing of
epilepsy with signaling system of growth hormone (て
んかん治療薬のスクリーニング方法)」2010. 2. 5

3. 学外活動

日本糖質学会・日本神経化学会評議員

4. 受賞等

なし。

5. その他

嶋本伸雄、中村暢宏、津下英明、加藤啓子、大学院間協
定のための第一次訪タイ団: Faculty of Science, Mahidol
University, Chulabhorn Research Institute, Faculty of
Veterinary Science, Mahidol University, Faculty of Science,
Kasesart University Faculty of Science, 2011, 2.28-3.5

動物生理学研究室

Laboratory of Animal Physiology and Neurobiology

教授 齋藤 敏之

Prof. Toshiyuki Saito, DVM, Ph.D



1. 研究概要

動物生体機能学分野・生理学では、ストレスが脳に与える影響と障害を受けた脳の神経機能回復に焦点をあてた研究を展開している。

人や動物が嫌な刺激を受けた時には、脳からの指令によっていわゆるストレス反応が生じる。この時、体内では交感神経系の活動が活発になるとともに、副腎からグルココルチコイド、カテコールアミン等のホルモン分泌が増加する。ストレス反応自体は体を守る反応であるが、長期にわたりストレス反応が続くと、脳の扁桃体が大きくなる一方で、前頭前野や海馬が小さくなることや神経細胞が変性する等の変化が生じる。これらの知見は、長期のストレス反応は体の機能を統御する上で重要な脳に障害を与えることを示唆している。研究の中では、ストレスを受け続けている脳の中で生じる神経変性の原因を明らかにするため、脳の血流調節、モノアミン神経系の機能変化および副腎皮質ホルモンの脳に与える影響等を解析することを柱としている。また、これらの研究で得られた成果をもとに、ストレスで障害を受けた脳神経系の再生と機能回復法を開発したいと考えている。

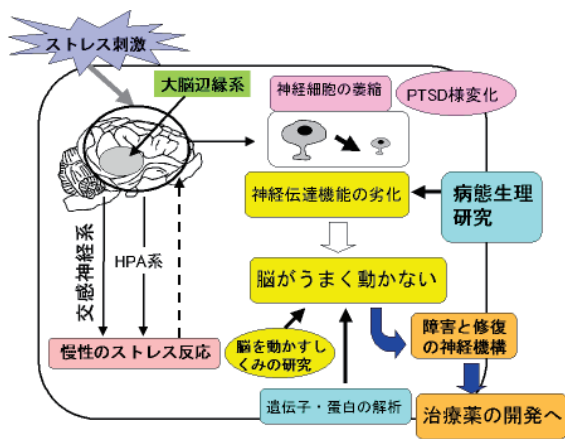


図 1. 本研究の概略

本分野では主に以下に述べる研究を行っている。

- 1) ストレス反応に伴う脳神経機能変化の計測・評価法の開発

個体レベルでの脳の機能変化を評価するためには、非拘束でできるだけ非侵襲の測定系が望ましい。このために必要な測定・評価系の開発を進めている。

従来から自由行動下での神経活動変化を計測する技術を開発してきたが、これらの基盤技術をもとに汎用性の高い新たな測定系を構築することを目指している。

- 2) 脳内のストレス反応に関与する新たな情報伝達物質の探索と解析

脳がストレスを受けている時の血流調節、モノアミン系を中心とする情報伝達系の活動調節、あるいはそれらの障害をもたらす生理活性物質がまだわかっていない。現在、その候補となる脳内生理活性物質の探索と脳内分布、受容体のアミノ酸配列等の解析を進めている。

2. 本年度の研究成果

- 1) 非拘束状態で脳の神経機能変化を計測するために、無線を用いた計測系の開発とその評価を行った。これまでのところ、FM (frequency modulation) を用いた神経活動計測系の信頼性が確認された。また、脳内神経核における特定の神経伝達物質の変化を捉えるため、数百 MHz の送信周波数を利用した安価で汎用性の高いトランスミッターの仕様を固め、その雛型を試作した。一方、ブタの脳を用いたモデル研究を立ち上げるため、形態学的、神経生理学的な基盤データの整備、これに基づく計測デバイスの開発に着手した。

- 2) 扁桃体の神経活動や脳内ストレス反応を大きく左右する候補因子として、脳に豊富に存在するアラキドン酸誘導体に注目した。この誘導体に対する受容体の局在を明らかにすべく、受容体の細胞外ドメインのアミノ酸配列とその塩基配列を特定する作業を行った。いくつかの異なるプライマーを作成した後、ブタの脳からの RNA 抽出、cDNA を鋳型とした PCR、電気泳動等を通して、目的とするたんぱく質を

確認した。現在、十分な量の抗原を得るための方法について検討を進めている。

3. Research projects and annual reports

Background and purpose of research:

The physiological reaction to stressors involves activation of the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system. Chronic activation of both systems may increase a risk for anxiety and stress disorders. Dysregulation of functional coupling especially between the amygdala and other brain regions is considered to underlie the production of pathological states of anxiety and stress disorders. In the laboratory, the neural signaling which is sensitive to acute and chronic stress has been surveyed in the central nuclei, and how damaged neurons by stress can be regenerated using experimental animals.

Research topics:

- 1) Development of the wireless system for measuring neural signals from the brain in freely moving animals,
- 2) Neuromodulators to dysregulate neural communication by exposure to stressors, and to promote regeneration of the damaged neurons in the brain.

Annual reports:

1) Feasibility of telemetry system

The best way is to record from fully intact, freely moving animals to understand the neural basis of behavior. We have recently developed the telemetry system for detecting neural signals from the freely moving animals. To demonstrate the fidelity of the telemetry system, we compared local field potentials by simultaneous recording with a cabled system in the hippocampus. By analysis of recorded data, the high square of the correlation values were obtained, and more than 95% of amplitude difference were within 95% of confidence intervals between the calculated telemetered

with scale factors and the cabled data. Reproducibility of the measurements was found between two measurements.

2) Amino acid and nucleotide sequences of the receptor for arachidonic acid derivatives in the pig brain

To investigate regulatory roles of arachidonic acid derivatives in the stress response of the pig brain, we analyzed amino acid and nucleotide sequences of those receptors. After total RNA was extracted, a polymerase chain reaction was performed. The final PCR product was, then, electrophoresed. Targeted protein was finally identified.

4. 発表論文

- T. Saito, S-E. Fujiwara, K. Hisakura, N. Ohkohchi, T. Akema, S. Sasamori, K. Konno, E. Kobayashi and T. Yamaguchi: Telemetry system for recording neural activities in pigs – comparison with cable system. *Brain Res. Bull.* in press
- K. Hisakura, S. Murata, K. Fukunaga, A. Myronovych, S. Tadano, T. Kawasaki, K. Kohno, O. Ikeda, Y. Shibasaki, S. Paku, N. Ikeda, Y. Nakano, R. Matsuo, K. Konno, E. Kobayashi, T. Saito, H. Yasue, M. Tsutsui, T. Takeshita and N. Ohkohchi: Platelets prevent acute liver damage after extended hepatectomy in pigs. *J. Hepatobiliary- Pancreat. Sci.* **17**: 855-864 (2010)

5. 学会発表

- 齋藤敏之、大熊健司、久倉勝治、大河内信弘: Timm 染色によるブタ・海馬の亜鉛含有神経の解析。第 149 回日本獣医学会学術集会、日本獣医生命科学大学、武蔵野市、2010.3.26-28
- 伊藤公一、相馬香季、小島由紀子、齋藤敏之、桑原正貴、局博一: ブタ心室筋における遅延整流性カリウムチャンネルサブユニットの分布。第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広畜産大学、帯広市、2010.9.16-18

6. その他の特記事項

- 3) 学外活動 自治医科大学・非常勤講師

環境衛生学研究室

Laboratory of Environmental Hygiene

教授 前田 秋彦

Prof. Akihiko Maeda, D.V.M., Ph.D.



1. 研究の概要

私たちの身の周りには、数え切れない程の様々な微生物が存在する。その中には、いろいろな動植物やヒトに感染して病気を引き起こすものもあれば、そうでないものもある。また、腸内細菌のように動物の腸内で食物の消化を助けるものや、恐らくは動植物の進化の過程で重要な役割を担っているであろうものまで存在する。この様に、私たちの周りに存在する微生物は動物や植物と相互に影響し合って、マイクロコスモスやマクロコスモスを形成している。

本研究分野では、微生物の中でも特に「動物からヒト」あるいは「ヒトから動物」に感染する人獣共通感染症（人畜共通感染症、動物由来感染症または Zoonosis）を引き起こす病原微生物について、病原性の発現メカニズムの解明や自然環境中での存在様式の解明、公衆衛生上の対策のための基礎的研究を行っている。本研究分野の現在の具体的な研究対象は、「蚊」が媒介する動物とヒトの共通感染症、特にフラビウイルス感染症（日本脳炎やウエストナイル熱、デング熱等）である。近年の地球温暖化による媒介蚊の生息範囲の拡大と、それに伴うフラビウイルス感染症の流行域の拡大が危惧されている。日本においても、これらのウイルスの侵入と流行への対策の確立が急務である。そこで、フラビウイルスのリバースジェネティクス（ウイルスの核酸からウイルスを作製する）を確立し、これを用いて安全で有効な検査法を開発するとともに、安全で効果的なワクチン候補株の作製を目指している。

2. 今年度の進展・成果

本年度は、(1)フラビウイルスのウイルス様粒子 (VLP) 作製の簡便法を開発するとともに、(2)VLP を用いたフラビウイルスの鑑別診断法を開発した。

(1)フラビウイルスのウイルス様粒子 (VLP) 作製の簡便法の開発

VLP とは、ウイルスのゲノム RNA からウイルスの殻（構造蛋白質）をつくる遺伝子配列を除去した RNA（レプリコン）をウイルスの殻で包んだ粒子である。通常の VLP 作製法は、*in vitro* で転写したレプリコンを、これを別に作製した構造蛋白質発現ベクターと細胞に共発現する 2 つのステップで VLP を作製する。今年度は、簡易化する目的で予めレプリコン持続複製細胞

(RprBHK2G2 細胞)を樹立し、本細胞に構造蛋白質発現ベクターを導入する 1 ステップ法(図 1)を開発した。

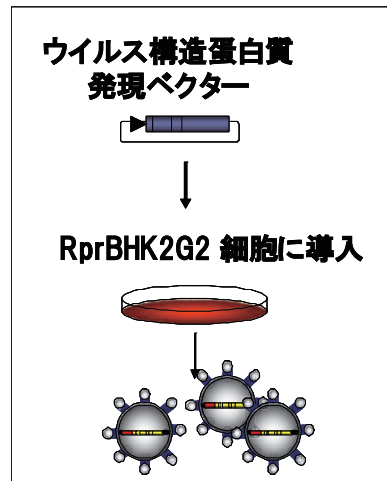


図 1 (Fig. 1). フラビウイルスの VLP 作製の簡易法

(2)VLP を用いたフラビウイルスの診断法の開発

フラビウイルスの診断に VLP を使用する利点は、生ウイルスを使用する場合の煩雑さや感染事故の発生を考慮しなくても良いことである。各種のフラビウイルスの感染鑑別法では生ウイルスの感染中和法がゴールドスタンダード法である。そこで、今回は生ウイルスの代替として VLP 中和法による感染診断法を開発した。図 2 にはウエストナイルウイルス(WNV, 図 2A)と日本脳炎ウイルス(JEV, 図 2B)の生ウイルスと VLP の中和試験の相関を解析した結果を示す。この結果より、今回作製した VLP 中和試験の有効性が示された。

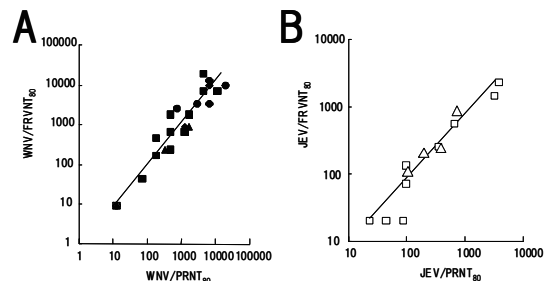


図 2 (Fig.2).ウイルス中和試験法と VLP 中和試験法の比較 WNV(A)と JEV(B)、それぞれの生ウイルスを用いたウイルス中和試験法(横軸、PRNT₈₀)と VLP 中和試験法(縦軸、FPRNT₈₀)を示す。

3. Research projects and annual reports

Many micro-organisms are surrounding of our living environment. Some of them infect with plants and animals including human, and cause their unique diseases to their host, but the others do not. Some microbes live in animal intestine and help host food-digestion. Some have a role for host plants or animals evolution. As these aspects, microbes surrounding our environment interact with their host plants and animals, and make micro- and macro-cosmos in nature.

I am studying the pathology, ecology, and other basic researches on zoonoses. I, especially, focus on mosquito-borne flaviviral diseases; Japanese hepatitis, West Nile fever, and dengue. Recently, mosquito vectors are spreading their living places due to global warming. And these are becoming great threat on public health of all over the world. In Japan, it is urgent to establish the detection and prevention system for the diseases. To do these, I established a reverse-genetic system of flaviviruses to develop safe and effective diagnostic protocols, vaccine candidates, and control and prevention strategies for mosquito-borne flaviviral diseases.

(1) Development of simple protocol for making flavivirus Virus-Like Particle (VLP): VLP is a particle, which is consisted of viral envelope proteins as particle shell and viral replicon within the particle shell. Because replicon is defect of viral structural protein genes within its genome RNA, therefore VLP can infect with its susceptible cells, but not produce new virus particles and/or new VLPs. As a standard protocol for making VLPs, we should prepare *in vitro*-transcribed replicons at first, and then, co-transfect with replicons and the expression vectors of viral structural proteins (2-step protocol). Here, I developed more simple protocol for making VLPs (called as 1-step protocol). Briefly, at first, I established the replicon-replicating cell line (RprBHK 2G2 cells). To make VLPs, we just transfect the expression vectors of viral structural proteins into RprBHK 2G2 cells (Fig. 1).

(2) Development of a differential sero-diagnosis for flavivirus infections: The advantages of diagnosis using VLPs as test materials, not live-viruses, are safety and easiness to do that. As a gold-standard of

differential sero-diagnosis for flavivirus infections, is a virus-neutralizing test. I developed new protocol, a VLP-neutralizing test, and compared the efficiency on sero-differentiation to a virus-neutralization test using sera obtained from West Nile virus- and Japanese encephalitis virus-infected animals as test samples (Fig. 2). My results clearly showed the usefulness of a VLP-neutralizing test as similar to a standard virus-neutralizing test. Therefore, my new diagnostic protocol can be use for a differential sero-diagnosis for flavivirus infections as alternative of a standard virus-neutralizing test.

4. 発表論文

Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Sakai, A., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T., and Takashima, I. Glycosylation of West Nile virus envelope protein increases In vivo and In vitro viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **82**: 696-704 (2010)

Hasebe, R., Suzuki, T., Makinno, Y., Igarashi, M., Yamanouchi, S., Maeda, A., Horiuchi, M., Sawa, H., and Kimura, T. Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.*, **10**: 165-164. (2010)

Moritoh, K., Maeda, A., Sasaki, N., and Agui, T. Deveropement and application of West Nile virus subgenomic replicon RNA expressing secreted alkaline phosphatase. *J.Vet. Med. Sci.*, in press

5. 著書および総説

Ma, H., Ke, C.-W, Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., and Maeda, A. Epidemiological study of flaviviruses, in Guangdong province, China, 2005-2007. In “*Animal viruses*” Ed. Maeda, A., pp. 89-102. Trans Research Network, Kerala, India (2010)

Maeda, A., Maeda, J., Murata, R., Akiyama, M., Kariwa, H., Takashima, I., and Kurane, I. Differential sero-diagnosis of flaviviruses using subviral particles and virus-like particles. In “*Animal viruses*” Ed. Maeda, A., pp. 103-116. Trans Research Network, Kerala, India (2010)

前田秋彦. 人獣共通感染症の診断およびその意義、診断の手法、pp93-94. “**獣医公衆衛生学実習**” 獣医公衆衛生学教育研修協議会編 (2010)

5) その他

京都産業大学オープン・キャンパス
大阪府立大学との大学間協定
鳥取大学、岐阜大学との大学間協定
京都市環境衛生研究所との共同研究協定

6. 招待講演、シンポジウム等

Maeda, A., and Ke, Chang-Wen. Epidemiological study of mosquito-borne diseases in Guangdong province, China. The Workshop of Network Laboratories on Emergency Response and Surveillance of Infectious Diseases in Pan Pearl River Delta Region (Guangzhou, China), 2010.12.12

7. 学会発表

森藤可南子、前田秋彦、佐々木宣哉、安居院高志. マウス Oas1b によるフラビウイルスゲノム複製の抑制. 第 150 回日本獣医学界 (帯広), 2010.9.17

前田秋彦、染谷梓、西野佳以、村田英雄、倉根一郎. ウエストナイルウイルス・レプリコンの持続的複製細胞株の樹立. トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (東京), 2010.12.10

8. その他

1) 外部資金

文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(B)「中国広東省における蚊媒介性フラビウイルス感染症の疫学調査」

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究」

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業-外国への研究委託事業 「地球温暖化に伴いアジアでの感染拡大が危惧されるフラビウイルス感染症の疫学的解析に関する研究—特に中国・広東省を中心に」

2) 知財権等

特になし。

3) 学外活動

Journal の reviewer

4) 受賞歴

特になし。

実験医科遺伝学研究室

Laboratory of . Genetics in Experimental Medicine

教授 松本 耕三

Prof. Kozo Matsumoto, DVM, Ph.D

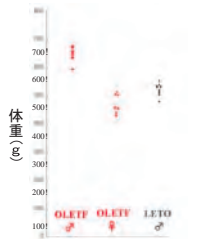


1. 研究概要

近年、肥満の増大に伴い2型糖尿病もほぼ比例して増大している。我国で約1千万人近い糖尿病患者がいると推定されており、社会上非常に大きな問題となっている。肥満を防げればよいが、現代社会は逆に肥満を生む社会構造となっており、肥満増大を押さえるのはかなり困難な状況にある。そのような状況に鑑み、なぜ肥満が2型糖尿病を誘発するかを明らかにし、肥満になっても2型糖尿病を防げるような予防薬、治療薬の開発がより必要な状況にあると考えられる。然るに肥満に伴いなぜ2型糖尿病を発症するのか、その発症メカニズムに関してはほとんど分かっていない。創薬のためにはその肥満に伴い2型糖尿病を発症せしめる、真の原因遺伝子の特定が必須である。

しかしヒトは遺伝的に大なるヘテロ集団であり、環境要因も様々で、兄弟といえども成人後の生活習慣は全く異なっ

肥満は2型糖尿病を誘発する、その発症機構は？



運動やダイエットで肥満を抑えるとOLETFラットは糖尿病を発症しない。発症した場合でも体重を抑えることにより改善する。！
一方、コントロールのLETOに過剰食を与え、OLETFと同じ体重に増量させても糖尿病は発症しない。！

ることが多い。従って、ヒトでの直接的な遺伝解析が望ましいのであるが、今回のテーマのような、肥満に伴う2型糖尿病の発症機構という、遺伝と環境の複雑に入り交じった研究を行うには、より単純化した実験系、遺伝的に均一な集団を持った実験動物を利用するしか方策がない。また、実験動物であれば、環境条件も相当な程度、均一とすることが可能となり、まさに遺伝と環境要因の複雑系を解析するにはうってつけなのである。また肥満に伴い2型糖尿病を発症する OLETF ラットが開発されて、その研究が可能となった。

しかし、OLETF ラットのような、たとえ均一な遺伝子背景を持つ実験動物を利用しても、ことはそう単純では無いのである。なぜならこれまでの遺伝解析の結果、OLETF ラットの血糖値を上昇させる糖尿病原因遺伝子座は実に 14 カ所も染色体上にマップされたのである。従って、どの遺伝子座が肥

満と関係しているのか、まずその点からの説明を始めねばならないのである。そのため 14 カ所の遺伝子領域の一つ一つを個別に、正常ラットである F344 へ導入した系統(このような系統をコンジェニック系統と呼ぶ)を作成する必要がある。同時に F344 ラットも肥満ベースの F344 ラットとするため、肥満遺伝子を導入したコンジェニック系統を作成する。これで準備は整ったことになる。

本研究においては、糖尿病コンジェニック系統と肥満コンジェニック系統とを交配したダブルコンジェニック系統を作成する。それにより、個々の糖尿病原因遺伝子の肥満下における動作を研究することが初めて可能となるからである。

2. 本年度の研究成果

ダブルコンジェニック系統の開発

今年度はNidd2, Nidd4, Nidd6の各糖尿病原因遺伝子座導入コンジェニック系統と肥満コンジェニック系統とのF1を作成した。次いでF1同志を交配してF2を作成途上である。生まれてくる子供はすべて糖尿病遺伝子領域の遺伝子マーカー、ならびに肥満遺伝子マーカーを利用して、遺伝子型を決定し、その遺伝子座領域内での組換えの生じていないことを確認した。実際に作成、利用するダブルコンジェニック系統は予定の糖尿病遺伝子座全領域が入っており、かつ肥満遺伝子が劣性ホモになっている必要がある。そのようなラットは理論的に1/4しか生まれてこないのと、実際に利用するのは雄のみなので、実際は生まれた子供の1/8匹しか利用出来ない。そのため、動物の開発、作成に時間が必要である。

3. Research projects and annual reports

Diabetes mellitus is considered one of the main threats to human health in both developed and developing world. Common diseases such as type 2 diabetes mellitus result from complex interplay among multiple genes, signaling pathways and environmental factors. Numerous diabetes animal models have been developed using gene knockout techniques, which have revealed the critical molecular events involved in glucose metabolism and the development of complications. However, it is believed that in common diseases complete deficiency of a given gene activity is unlikely the causative mutation, but rather the effect of each allele induces small changes of gene activity. There are genetic analyses in human on genes extrapolated from the functional studies *in vitro* or in rodents in order to confirm

the significance in the development of human diseases. Yet causative polymorphisms were still largely elusive. An alternative to the gene knockout model is the use of spontaneous animal models. The OLETF rat is such a model of obesity-based type 2 diabetes. Subsequently produced congenic strains showed that most of the loci examined were shown to contribute to the increased glucose levels in 30 week-old males. Interestingly, the phenotypic features observed in single congenic strain, low fat weight and low leptin levels for *Nidd1/of* and high fat weight for *Nidd2/of*, were masked in the double congenic, yet hyperglycemia were further aggravated than either single congenic strain. In order to investigate an affect of obesity to these loci, we have also generated a congenic strain introgressed obesity gene (*lpr* deficiency). We could produce a double congenic line with a hyperglycemic gene (*Nidd4*, and *Nidd6*) under obesity condition by crossing both strains, so that it would be possible to define a gene specifically affecting hyperglycemia under obesity condition.

4. 発表論文(2010 年度分)

無し

5. 著書および総説(2010 年度分)

無し

6. 招待講演、シンポジウム等(2010 年度分)

無し

7. 学会発表(2010年度分)

小瀬博之、高木互、高田梨佳、岡部正隆、松本耕三、広海健:転写因子 Svp による精原細胞増殖・分化プログラム切り替え機構の可能性、第 62 回日本動物学会関東支部大会、つくば市、2010.3.13

小瀬博之、落合和彦、山田宣永、松本耕三:多因子性疾患遺伝解析における「2次疾患モデル動物」としてのショウジョウバエの可能性、第 57 回日本実験動物学会、京都市、2010.5.15

8. その他特記事項

無し

栄養衛生学研究室

Laboratory of Nutrition-related Hygiene

1. 研究概要

安全な食物(動物では飼料)を得られる生活環境が、健康を維持するための最低限不可欠な要素であることは人も動物も同じである。そこで、動物医科学の立場から、飼料の内容や与え方、すなわち栄養管理が如何に動物たちの健康を守り、また命を守る(すなわち衛生)仕組みに対してどのように影響するかについて、生体調節機構(代謝や免疫)の動きを目印として科学的に裏付けることを研究目的とする。

上記の一環として、我々は、過去数年間に亘り、飼料に混入するカビ毒の影響や除去法について研究し、成果を論文等で適宜公開してきた。現在はその研究方向を発展させ、新たに食・飼料中のメラミン汚染の影響について研究を進めている。具体的には、近年、乳製品やペットフードへの混入汚染によって大きな社会的影響や不安を与えたメラミン類を対象にして、次の諸点について研究を展開する。

1) メラミン障害作用の仕組みの解明

実験動物を通して、メラミン給与あるいは投与による肝腎機能を主対象にした機能障害機序を解明する。

2) 簡単/安価/迅速なメラミンスクリーニング法の確立

生産・流通あるいは消費現場でも簡単・安価かつ素早く行えるスクリーニング検出法の確立を目指す。

2. 本年度の研究成果

1) メラミン障害作用の仕組み

メラミンが、類似構造体の一つであるシアヌル酸と反応して腎臓で結石化し、腎障害をもたらすことが既に報告されている。本年度、その反応生成物メラミンシアヌレートには針状と顆粒状の2種類が存在することを確認し、さらに、顆粒状物の生成には血漿タンパク質が関与することを見出した。その役割は不明だが、報告されている腎結石は顆粒状の形状を示すので、結石形成の機序を解明する上で興味深い知見と考える。

2) メラミンスクリーニング法

試料として、既知濃度のメラミンを含む牛乳を用い、光学顕微鏡あるいは分光光度計によるメラミンシアヌレート生成物を定性検出する簡易法を試作した。この方法では牛乳 1ml 当たり 5 μ g 程度のメラミンの混入を検出できた。これは、200ml (現在の日本の最少市販単位)の牛乳中に含まれる 1mg のメラミンの存在(体重 5kg の人の許容一日摂取量, WHO 2008)を把握できることになる。

3. Research projects and annual reports

As well as humans, all human-associated animals, including livestock, companion and experimental animals, have the

教授 村田 英雄

Prof. Hideo Murata, D.V.M., Ph.D



same right to acquire safe aliment to maintain their healthy conditions, thereby contributing to humans. As researchers in veterinary medical science, we have been interested in detecting and reducing feed contaminants that could harm animal health. Our present research purpose is to (1) elucidate the adverse effects of melamine, a toxic chemical that could cause kidney stones and kidney failure when ingested, in experimental animals, and (2) establish a rapid, easy and cheap melamine screening method.

The results obtained this year are summarized as follows:

1: The possible mechanism of melamine cyanurate formation

We confirmed two different forms, i.e. the needle-shaped and granular-shaped, of melamine cyanurate, a causative substance of the kidney failure. We also found that the latter form is produced under the presence of serum proteins. The detailed mechanism is yet to be clarified but the present findings seem an important clue to understand the pathogenesis of the melamine-induced urolithiasis.

2: Development of a melamine screening method

We developed a tentative melamine screening method in artificially tainted milk. The method, making use of melamine cyanurate formation, can detect the contaminant at a level as low as 5 μ g/ml, thus indicating the presence of 1mg of melamine in 200ml of milk (equivalent to a tolerable daily melamine intake (WHO 2008) for a child weighing 5 kg).

4. 発表論文

H. Murata, D. Yamaguchi, A. Nagai and N. Shimada: Reduction of deoxynivalenol contaminating corn silage by short-term ultraviolet irradiation: A pilot study. *J. Vet. Med. Sci.*, in press, 2011

O. Mikami, M. Kubo, H. Murata, Y. Muneta, Y. Nakajima, S. Miyazaki, N. Tanimura and K. Katsuda.: The effects of acute exposure to deoxynivalenol on some inflammatory parameters in miniature pigs: *J. Vet. Med. Sci.*, in press, 2011

O. Mikami, H. Yamaguchi, H. Murata, Y. Nakajima and S. Miyazaki.: Induction of apoptotic lesions in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets. *J. Vet. Sci.* 11:107-113 (2010)

5. 著書および総説

H. Murata and K. Otsuki : Swine influenza and cytokines: Less of a storm, more of a breeze. *Vet. J.*, in press, 2011

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

なし

8. その他特記事項

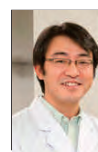
3.学外活動 農業資材審議会専門委員

感染症学研究室

Laboratory of Infectious Disease

准教授 高桑 弘樹

Assoc. Prof. Hiroki Takakuwa, Ph.D



1. 研究概要

現在、世界中で鳥インフルエンザウイルスなどの新興・再興感染症の発生が多数報告されており、動物とヒトに被害をもたらしており、感染症をコントロールすることは重要な課題である。

- 1) 自然界における鳥インフルエンザウイルスなどの病原体の進化と伝播機構を解明する。
- 2) 宿主と病原体の相互作用を解析し、病原体の宿主域を決定する因子、病原性の発現機構、宿主の免疫応答の解明を行う。
- 3) 感染症の診断、予防と治療法の開発を行い、動物とヒトの感染症を予防・制圧する。

2. 本年度の研究成果

高病原性鳥インフルエンザの発生地域であるベトナムにおいて、流行が報告されていない時期に、健康な家鴨においてウイルス分離、および血清調査を行った。その結果、調査した家鴨からH5N1亜型ウイルスが分離され、またウイルス陰性の個体においてもH5N1亜型およびNSに対する抗体が検出された。このことは、流行発生がない時期においても、H5N1亜型ウイルスが家鴨に感染し、ウイルスが循環し、次の流行を引き起こした可能性が高いことを示している。

3. Research projects and annual reports

Currently, outbreaks of highly pathogenic avian influenza and other emerging and re-emerging diseases have caused serious economical and social disturbances worldwide. To control these infections is the most important. Our research is focused on:

- 1: *The evolution and spread mechanism of pathogens such as avian influenza virus in nature.*
- 2: *Studies on the host range determinant in pathogens, mechanisms of pathogenesis and immune response of the hosts through in vivo and in vitro analyses of the host-parasite interactions.*
- 3: *Development of strategies for the prevention and control of the infections.*

4. 発表論文

H. Takakuwa, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, H. Ozaki, R. Tsunekuni, T. Usui, H. Ito, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, E. Ono, and K. Otsuki: Possible circulation of H5N1 avian influenza viruses

in healthy ducks on farms in northern Vietnam. *Microbiol Immunol* **54**(1):58-62 (2010)

Y. Fujimoto, H. Ito, K. Shinya, T. Yamaguchi, T. Usui, T. Murase, H. Ozaki, E. Ono, H. Takakuwa, K. Otsuki, and T. Ito: Susceptibility of two species of wild terrestrial birds to infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype. *Avian Pathol* **39**(2):95-98 (2010)

S. Shivakoti, H. Ito, T. Murase, E. Ono, H. Takakuwa, T. Yamashiro, K. Otsuki, and T. Ito: Development of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in field specimens. *J Vet Med Sci* **72**(4):519-523 (2010)

H. Takakuwa, T. Maruoka, T. Hata, M. Miyazawa, H. Toshimori, and K. Otsuki: Development of a new disinfectant with very strong anti-influenza viral activity: a preliminary report. *Environ Health Prev Med* **15**(2):121-123 (2010)

Y. Sakoda, S. Sugar, D. Batchluun, T. O. Erdene-Ochir, M. Okamoto, N. Isoda, K. Soda, H. Takakuwa, Y. Tsuda, N. Yamamoto, N. Kishida, K. Matsuno, E. Nakayama, M. Kajihara, A. Yokoyama, A. Takada, R. Sodnomdarjaa, and H. Kida: Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology* **406**(1):88-94 (2010)

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

H. Takakuwa, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, R. Tsunekuni, T. Usui, H. Ozaki, H. Ito, T. Yamaguchi, T. Ito, K. Otsuki, T. Murase, and E. Ono: Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy poultry bred in farms in northern Vietnam. 4th Annual Meeting EPIZONE, St Malo (France), 2010.6.7-10

H. Takakuwa, T. Ito, T. Murase, T. Yamashiro, E. Ono and K. Otsuki: Molecular epidemiology of avian influenza in northern Vietnam. Workshop on the Influenza Research of J-GRID. The Inaugural Meeting of the Influenza Consortium, Tokyo (Japan), 2010.7.16

H. Takakuwa, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, E. Ono, T. Usui,
R. Tsunekuni, H. Ito, H. Ozaki, T. Yamaguchi, T. Ito, K. Otsuki,
and T. Murase: Molecular epidemiology of avian influenza viruses
in wild birds in northern Vietnam. Asian-African Research Forum
on Emerging and Reemerging Infections 2010, Hanoi (Vietnam)
2010.11.11-12

8. その他特記事項

なし

病原微生物学研究室

Laboratory of Virology

1. 研究概要

私達は多くの微生物に囲まれて生きている。ウイルスは微生物の一員であるが、自己複製のために必要な最小限度の遺伝子しか持たないため、動物や植物に寄生し、宿主細胞内の小器官を拝借して増殖する。その結果、寄生した細胞の破壊、細胞機能の障害といった直接的な障害、あるいはウイルス抗原を発現した感染細胞が宿主免疫応答から「異物」と認識されて排除されサイトカイン等の液性因子の産生が誘導されるといった間接的な障害を引き起こす。このような感染個体における様々な影響、いわゆる病気を起こすのである。私達の研究室では、動物あるいは人獣共通のウイルス感染症、特に神経ウイルス症に興味がある。なぜなら、中枢神経系を好むウイルスは免疫応答を誘導しにくく、また血液脳関門の存在により他の臓器に比べ効果的な化学療法剤に限られることから治療法が困難な場合が多く、社会的にその解決が望まれているからである。

私達は、これまでに「ウイルス性神経・精神神経疾患に関する研究」を行うために、ボルナ病ウイルス(BDV)感染により引き起こされるボルナ病に焦点を絞って研究を行ってきた。ボルナ病はウマやヒツジに持続的に感染し、時に致死的な神経疾患を引き起こす病気として100年以上前から知られていた。最近では、ネコ、イヌ、アライグマ、鳥類、ニホンザル、さらにヒトを含む幅広い温血動物に感染が認められる新興感染症として認識されている。しかしながら、いまだ病気の発症メカニズムは十分に解明されておらず、ヒトにおける伝播経路や病原性もブラックボックスの中にある。私達は、BDVの持続感染性と病原性を多角的に調べる目的で、ラットやマウス等の感染モデル動物における病態(運動障害と行動異常)の解析を中心に以下のような点について研究を行っている。

- 1) ウイルスゲノムにおける病原性関連遺伝子の同定と、ラットおよびマウスにおける病態のウイルス学的、病理学的、行動学的解析
- 2) 脳における TGF- β 関連遺伝子の発現とウイルス病原性との関連性について
- 3) ウイルスが宿主動物に馴化する際のウイルスゲノムの変異機構について
- 4) ボルナ病発症における宿主因子の関与について
- 5) ウイルス蛋白質の細胞内局在機構と病原性との関連性について

2. 本年度の研究成果

ボルナ病ウイルス感染ヌードラットの解析

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino, DVM, Ph.D



T細胞欠損ヌードラットにBDVを感染し、実際にT細胞性免疫応答がボルナ病の発症を誘導しているのかについて調べた。また、ウイルス株による病原性の違いについても調べた。さらに採材した脳を大脳皮質部、脳幹部および小脳に三分割し、脳の各部位におけるウイルス力価を調べた。

その結果、8週間の観察期間においてBDV-CRP3株感染群では軽度の症状、BDV-CRNP5株感染群では感染4週目前後で致死的な重度神経症状を示した。感染2、4および8週目の脳内ウイルス力価を解析した。両感染群において、全体を通して大脳皮質部および脳幹部のウイルス力価は小脳より有意に高かった。CRP3株感染群の感染2および8週目、あるいはCRNP5株感染群の感染2週目において、大脳皮質部と脳幹部の間のウイルス力価に有意差はなかったが、感染4週目では、CRP3株感染群のウイルス力価は大脳皮質部が脳幹部より有意に高かったのに対し、CRNP5株感染群は脳幹部が大脳皮質部より有意に高かった。

次に、部位毎の経時的なウイルス力価の変化では、両群とも感染2から4週目にかけて、ウイルス力価が脳の部位全てで増加したが、感染4から8週目にかけてはあきらかなウイルス力価の増加は認められなかった(CRP3株感染群)。

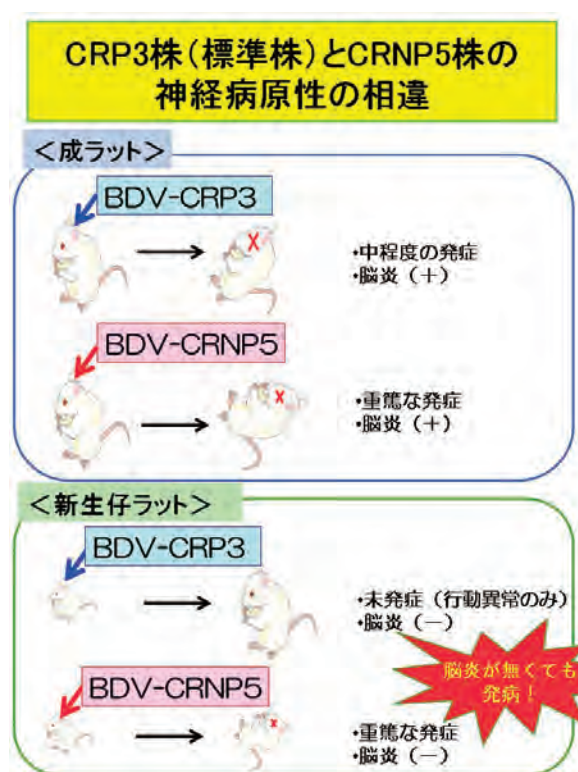
さらに、両群間のウイルス力価の比較をすると、感染2および4週目の大脳皮質部および小脳で両ウイルス群の間に有意差がないのに対し、脳幹部はCRNP5株感染群の方がCRP3株感染群より有意に高かった。

病理組織学的には、いずれのラットも脳炎は呈さなかった。重度発症を起こしたCRNP5株感染ラットはCRP3株感染ラットに比べ脳組織の石灰化、神経細胞の消失や障害、グリオーシス、大脳皮質のひ薄化が顕著に認められ、病理学的に水頭症と診断された。

本研究において、CRP3株およびCRNP5株を感染したヌードラットは、高い脳内ウイルス力価を示し、ウイルス株によってはボルナ病も発症した。このことから、BDV感染によるボルナ病の発症にはT細胞性免疫応答による脳炎(炎症性反応)の関与しない機序が存在することが明らかになった。また、病原性の高いCRNP5株感染群はCRP3株感染群に比較して、大脳皮質部よりも脳幹部のウイルス力価が高かったことから、ウイルスの組織指向性の違いが病原性の違いになっている可能性が示唆された。

CRP3株とCRNP5株には、わずか4つの塩基配列の違いしか認められていないが、その差異が病原性の大きな違いを引き出すこと、さらに正常な免疫応答を示すLewisラット、F344ラットと同様にヌードラットでも明らかに発病性の差異が

認められたことは、免疫応答依存性疾患と考えられてきたボルナ病を根底から考えなおす結果であり、極めて興味深い。



3. Research projects and annual reports

We are surrounded by a lot of microbes. Virus is one of microbes and causes disease on animal and plant. Our laboratory is focused to veterinary and zoonotic viral disease, especially neurovirology. We are interested in Borna disease virus (BDV) that is etiological agent of Borna disease. Borna disease has been known over 100 years as a fatal neurological disease of horses and sheep. At present, it is recognized as an emerging disease in cats, dog, birds, and a broad host range in warm-blooded animals, including humans. However, the definite mechanism underlying disease outcome is not fully clarified yet. To study disturbances of movement and behavior in BDV-infected animals, we examined the following points: 1) comparing pathogenesis in rats infected with two viral strains, 2) contribution of gene expression of TGF- β family and viral pathogenesis, and 3) mechanism of changes in virus genome with adaptation to host.

4. 発表論文

- K. Sugiyama, R. Ooishi, Y. Nishino, M. Funaba, and M. Murakami: Nucleotide sequence of canine Smad3. *Biochem. Genet.* **48**: 202-207 (2010)
- M. Murakami, M. Suzuki, Y. Nishino, and M. Funaba: Regulatory expression of genes related to metastasis by TGF- β and activin A in B16 murine melanoma cells. *Mol. Biol. Rep.* **37**: 1279-1286 (2010)

5. 著書および総説

西野佳以(共著)「動物の感染症 第3版(II. 各論 馬, 13. ボルナ病ウイルス感染症)」近代出版、(印刷中、2011)

6. 招待講演、シンポジウム等

西野佳以: 実験動物におけるボルナ病. 第4回日本ボルナウイルス研究会公開シンポジウム、帯広市、2010 .9. 18

7. 学会発表

- 西野佳以、岡山智史、村上 賢、井上真紀、斑目広郎、舟場正幸: 麻布大学におけるボルナ病ウイルス(BDV)研究の総括と今後の展望. 第3回日本ボルナウイルス研究会、東京、2010.1.22
- 二宮晃郎、藤野寛、小島さや、福原裕司、亀岡章一郎、笹川琴子、斑目広郎、西野佳以: BDV感染スードラットの中枢神経系におけるウイルスRNAの定量. 第150回日本獣医学会、帯広市、2010. 9.16-18.
- 前田秋彦、染谷梓、西野佳以、村田英雄、倉根一郎: ウエストナイルウイルス・レプリコンの持続的複製細胞株の樹立. 第17回ガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京、2010.12.10.

8. その他特記事項

- 8-1 外部資金
なし
- 8-2 知財権等
なし
- 8-3. 学外活動
麻布大学附置生物科学総合研究所 協力研究員
日本ボルナウイルス研究会 副会長
- 8-4 受賞等
なし
- 8-5 その他
京都産業大学 DAY 2010 in 山口(山口市、2010.11.6.)において、「ウイルス感染症と口蹄疫」について講演。

実験動物医学研究室

Laboratory of Laboratory Animal Medical Science

1. 研究概要

本研究室は本学部設立と共に立ち上がったため、現在、在籍者は助教である今野兼次郎(こののけんじろう)ひとりです。

私は実験動物学を専門とする獣医師であり、日本実験動物医学専門医(Diplomate of the Japanese College of Laboratory Animal Medicine)です。最近10年以上、医学部においてブタ、特に実験動物としてのミニブタを用いた探索医療(Translational Research: TR)に携わってきました。TRとは、基礎研究の成果を臨床応用する事を目的とした研究で、私は医師や理工学・薬学系の研究者や企業と共に、ミニブタを用いた疾患モデルの作製や臓器移植、再生医療、医療デバイスの開発を行ってきました。

また、学生時代は感染症の研究に携わっており、博士号の研究テーマは寄生虫学でした。

今後は、実験動物学を研究の軸として展開していきたいと考えていますが、寄生虫を通して京都を見てみたいとも考えています。

2. 本年度の研究成果



今年度は、本学へ移籍した事もあり、残念ながら、大きな成果は挙げられませんでした。しかしながら、学内外で新たな共同研究を立ち上げる事が出来、徐々に研究基盤整備が整いつつあります。



助教 今野 兼次郎

Assistant Professor Kenjiro Konno, D.V.M., Ph.D., DJCLAM

研究概要でも述べた通り、私は最近10年間以上、実験動物としてのミニブタを用いたTRに携わってきました。その中でも特に、脈管系の研究に携わってきました。ミニブタ脳梗塞モデルを軸に展開した研究では脳血管に、臓器移植や再生医療の研究では、それぞれの移植臓器の血管に、そして、血管内ステントの開発ではそれらを留置する心臓や脚の動脈に注目してきました。その流れを汲み、学外においては、国立循環器病研究センター研究所において、CTやMRIなどの医療用イメージング機器とミニブタを用いた研究に参加しています。

また、学内においては、ヒアルロン酸の専門家で脈管系の研究を展開している板野直樹教授にご指導頂き、遺伝子改変マウスを用いた脈管系の研究にも携わり始めました。

以上の通り、今後の研究を展開するために重要な研究基盤の整備を整える事が出来た。来年以降はこれらの研究環境を活かして成果を挙げていきたいと考えています。

3. Research projects and annual reports

In this year, I transferred to this university, and spent much time to start up new environments for research and education so I was not able to leave a lot of research results.

However, new joint researches can be started up in the inside and outside of the university, and the research infrastructures are gradually being set.

4. 発表論文

S. Hishikawa, M. Kawano, H. Tanaka, K. Konno, Y.

Yasuda, R. Kawano, E. Kobayashi, A. T Lefor :

Mannequin simulation improves the confidence of medical students performing tube thoracostomy: a prospective, controlled trial. *Am. Surg.* 76(1):73-78 (2010)

- K. Hisakura, S. Murata, K. Fukunaga, A. Myronovych, S. Tadano, T. Kawasaki, K. Kohno, O. Ikeda, S. Pak, N. Ikeda, Y. Nakano, R. Matsuo, K. Konno, E. Kobayashi, T. Saito, H. Yasue, N. Ookochi : Platelets prevent acute liver damage after extended hepatectomy in pigs. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* 17(6):855-864 (2010)
- T. Saito, S. Fujiwara, K. Hisakura, N. Ohkochi, T. Akema, S. Sasamori, K. Konno, E. Kobayashi, T. Yamaguchi : Telemetry system for recording neural activities in pigs-comparison with cable system. *Brain. Res. Bull.* 84(1):103-109 (2010)

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

今野兼次郎:再生医療に貢献するミニブタの応用と課題、平成22年度第3回日本大学動物医科学研究センターセミナー、神奈川県藤沢市、2010.6.8

今野兼次郎:ミニブタを用いた前臨床研究、イノベーション・ジャパン 2010 ～大学見本市～、東京国際フォーラム、2010.9.29～10.1

7. 学会発表

平尾温司、河原崎達雄、今野兼次郎、小林英司、野田泰子:GFPトランスジェニックブタの脳におけるGFP陽性細胞発現部位とBrdUとの共発現について、日本解剖学会総会、盛岡市、2010.3.28-30

8. その他特記事項

なし

細菌学研究室

Laboratory of Bacteriology

1. 研究概要

微生物はあらゆるところに存在しており、時に動物や人の健康を脅かすこともある。なかでも動物と人の双方に感染する微生物は、人と動物との関わり方が多様化する現代社会において、人獣共通感染症や食品衛生上の問題を引き起こす可能性があるため、大きな注目を集めている。同じ病原体が引き起こす疾病であっても、人と動物ではその症状が異なることがある。本研究室では宿主による病原性の相違に注目し、サルモネラ、大腸菌、バルトネラ、リケッチアなどの細菌の感染および病原性の発現に関与する因子の解明に取り組んでいる。

2. 本年度の研究成果

Rickettsia felis は、人における新興感染症である Flea-borne spotted fever(ノミ媒介性紅斑熱)の病原体である。ネコノミが重要な感染源と考えられていることから、ネコをはじめとする伴侶動物が宿主となる可能性が示唆されるが、感染経路や病原性において不明の点が多く残されている(図1)。近年、ドイツにおいて、ハリネズミに寄生するノミ *Archaeopsylla erinacei* から高頻度に *R. felis* が検出された。そこで、ハリネズミが本菌の感染源となる可能性を明らかにするために、フランスのハリネズミの血液およびノミを代表とする外部寄生虫を採集した。これらの検体から DNA を抽出し、*Rickettsia* 属菌の *gltA* 遺伝子または 16sRNA 遺伝子を増幅するプライマーを用いて、これらの外部寄生虫の *Rickettsia* 属菌の保有状況を調査した。また、日本国内における *R. felis* の分布状況を調査するため、ネコをはじめとする伴侶動物から、同様に試料の採取を試みている。一方、*Bartonella henselae* は細胞内寄生性細菌で、猫ひっかき病などの人獣共通感染症の原因菌である。*Bartonella* についても同様に、ネコなどの伴侶動物の本菌の保有状況を確認している。

3. Research projects and annual reports

The microorganism exists in all places, and might threaten health of humans and animals at time. Zoonotic and food poisoning microorganism which can infect both animals and humans is greatly paid to attention in the contemporary society where relationships between humans and animals are various. These pathogens do not always cause same symptoms in animals and humans.

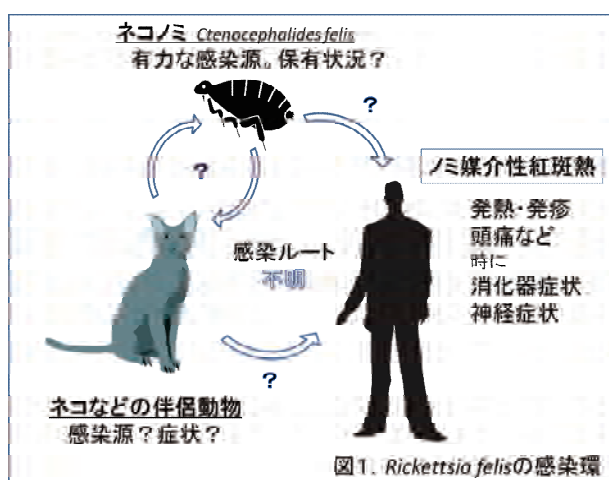
Rickettsia felis is an emerging pathogen which causes flea-borne spotted fever in human. Recently, high prevalence rate of *R. felis*-related stains have been reported in hedgehog fleas,

助教 染谷 梓

Assist. Prof. Azusa Someya, Ph. D



Archaeopsylla erinacei, in Germany. Therefore, the possibility of the hedgehogs as a reservoir for *R. felis* or closely related stains was investigated using molecular techniques. Blood samples, fleas and ticks were collected on 34 hedgehogs from region of Iles de France and Picardie in France. These Samples were investigated for the presence of the rickettsial *gltA*, *ompB*, and 16S rRNA genes using PCR method. Most hedgehog fleas were infected by *R. felis*-like organisms although their host animals were not appeared PCR positive for rickettsial DNA.



4. 発表論文

H. Ozaki, H. Esaki, K. Takemoto, A. Ikeda, Y. Nakatani, A. Someya, N. Hirayama and T. Murase. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet. Microbiol.* in press.

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

染谷梓: *Rickettsia felis*のハリネズミにおける分布状況. メリアルジャパン、東京、2010.6.1

7. 学会発表

前田秋彦、染谷梓、西野佳以、村田英雄、倉根一郎: ウエストナイルウイルス・レプリコンの持続的複製細胞株の樹立. トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会、東京、2010.12.10

8. その他特記事項

なし

薬理学研究室

Laboratory of Pharmacology

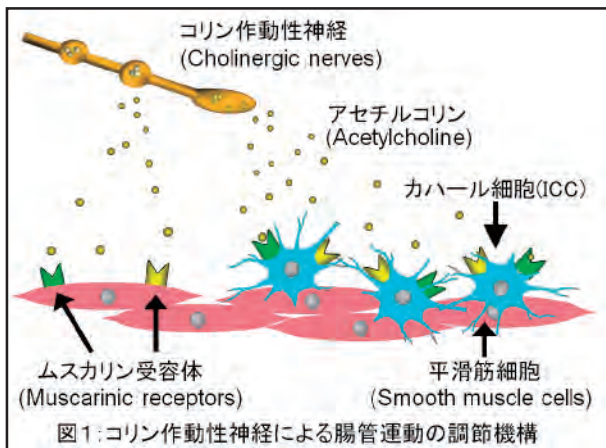
助教 棚橋 靖行

Assist. Prof. Yasuyuki Tanahashi, Ph.D



1. 研究概要

腸管の運動はコリン作動性神経から放出されるアセチルコリンとその受容体であるムスカリン受容体によって興奮性に調節されている。ムスカリン受容体には、これまでにM₁からM₅までの5つのサブタイプが同定されており、このうち、腸管平滑筋細胞にはM₂とM₃サブタイプが存在している。コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンがこれらのムスカリン受容体を刺激すると、平滑筋細胞内のCa²⁺濃度が増加し、最終的に筋は収縮する。また、近年、腸管の神経叢に存在するカハール細胞(ICC)と呼ばれる間質細胞にもムスカリン受容体が存在しており、腸管の運動調節に重要な役割を果たして



いることが示唆されている(図1)。しかし、コリン作動性神経による腸管の運動調節において、M₂、M₃サブタイプやカハール細胞がそれぞれどのような役割を果たしているか等の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで、本研究では、近年開発されたM₂またはM₃サブタイプを欠損したマウスやカハール細胞を欠損したマウス(図2)を用いて、上記の未解決問題に取り組んでいる。

近年、ヒトや伴侶動物において、腸管の運動が異常になることによって起こる過敏性腸症候群(IBS)とよばれる病気が問題となっ

てきている(図3)。患者は腹痛、下痢または便秘などの症状を呈する。しかし、この病気の原因は未だに明らかにされて

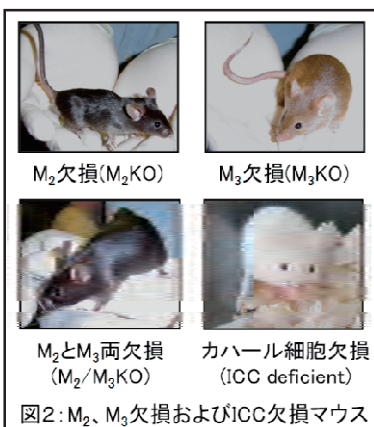
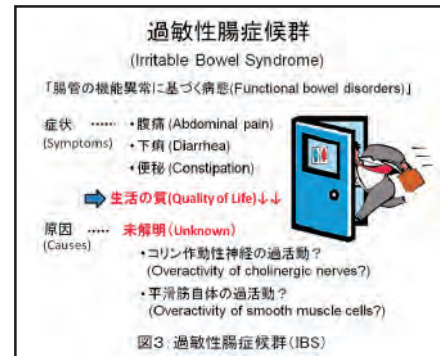


図2: M₂、M₃欠損およびICC欠損マウス

おらず、可能性の一つとして、コリン作動性神経や平滑筋の過活動が提唱されている。本研究により、腸管の運動調節機構の全容が明らかとなれば、この病気の病態解明や治療薬の開発において多くの基礎情報を提供することができる。



2. 本年度の研究成果

今年度は、ムスカリン受容体を介した小腸縦走筋の収縮調節におけるカハール細胞の役割に焦点をあてて研究を行った。実験には、カハール細胞欠損マウスから作製した小腸縦走筋標本を用い、電気刺激によりコリン作動性神経を刺激したときに生ずる縦走筋の収縮張力を測定し、正常マウスのものと比較・解析した。その結果、正常マウスの標本では、電気刺激によりムスカリン作動性収縮が発生したが、カハール細胞欠損マウスの標本では、ほとんど検出されなかった。この結果から、カハール細胞がムスカリン受容体を介した縦走筋の収縮調節に重要な役割を果たしていることが新たに明らかとなった。以上の研究成果については、第150回日本獣医学会において発表し、専門誌への投稿を準備している。また、岐阜大学獣医薬理学研究室との共同研究である腸管平滑筋におけるムスカリン作動性陽イオンチャネル活性化機構については第150回日本獣医学会に、ムスカリン作動性Ca²⁺感受性増大機構については1編の学術論文としてそれぞれ公表した。

3. Research projects and annual reports

It is well known that the motility of gastrointestinal tract is regulated by acetylcholine (ACh) released from cholinergic nerves, which act on the muscarinic receptors. The receptors have been classified into five subtypes including M₁, M₂, M₃, M₄ and M₅. In gastrointestinal smooth muscles, two subtypes of muscarinic receptor, M₂ and M₃, are found with no measurable quantities of other subtypes. As shown in Figure 1, stimulation of M₂ and M₃ receptors by ACh increases in the intracellular concentration of Ca²⁺, resulting in the smooth muscle contractions. Recently, it has been suggested that interstitial cells of Cajal (ICC), which exist in the myenteric

and submucosal plexus and express muscarinic receptors, are involved in the regulation of gut motility. However, roles of M₂ and M₃ receptors and ICC in regulating the contractions by ACh remain to be elucidated in detail. Therefore, we are addressing the above issue using the M₂ and/or M₃ muscarinic receptor knockout (KO) mice and ICC deficient mice (Figure 2).

Recently, patients of functional gastrointestinal disorders, including irritable bowel syndrome (IBS) are increasing in Japan. IBS causes the patients abdominal pain, diarrhea and constipation (Figure 3). Yet, the causes of IBS have not been identified, but it has been suggested that IBS may be caused by overactivity of cholinergic nerves and/or gastrointestinal smooth muscle cells. Thus, our studies may provide useful information to elucidate the pathophysiological conditions of IBS, leading to development of a novel effective medicine for the disease.

In 2010, we focused on roles of ICC in the muscarinic regulation of longitudinal smooth muscle contractions in small intestine. Contractile responses to stimulation of cholinergic nerves due to transmural electrical (TE) stimulation were studied in longitudinal smooth muscle from ICC deficient mice and its control mice. TE stimulation induced muscarinic contractions in preparations from the control mice, but not in ICC deficient ones. These results suggest that ICC play a crucial role in regulating muscarinic contractions of longitudinal smooth muscles. We presented these findings in the 150th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science and are preparing to submit a paper. In addition, we collaborated in studies about mechanisms of muscarinic activation of cationic channels and muscarinic Ca²⁺ sensitization in small intestine with Laboratory of Veterinary pharmacology in Gifu University. The former studies were presented in the 150th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science and the 84th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. The latter ones were published in the Journal of Veterinary Medical Sciences.

4. 発表論文

Suguro M, Matsuyama H, Tanahashi Y, Unno T, Kitazawa T, Yamada M, Komori S (2010). Muscarinic Receptor Subtypes Mediating Ca²⁺ Sensitization of Intestinal Smooth Muscle Contraction: Studies with Receptor Knockout Mice. *J. Vet. Med. Sci.* 72(4): 443-451

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

棚橋靖行: 小腸平滑筋細胞におけるムスカリン受容体刺激による電位依存性 Ca²⁺チャネルの抑制機構に関する研究. 大阪府立大学・京都産業大学教育連携セミナー(第1回)、泉佐野市、2010.8.4

棚橋靖行: 副交感神経による腸管の収縮調節メカニズム. 京都産学公連携フォーラム 2010—京都発。新産業・新技術の創出をめざして—、京都市、2010.11.2

7. 学会発表

海野年弘、稲崎倫子、松山勇人、棚橋靖行、北澤多喜雄、山田真久、Jurgen Wess、小森成一: マウス回腸平滑筋細胞のムスカリン作動性陽イオンチャネルの活性化における M₃ 受容体サブタイプに関連した情報伝達分子の役割、第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広市、2010.9.16-18

棚橋靖行、松山勇人、市村嘉郎、木村佳織、海野年弘、飯野哲、小森成一: マウス小腸縦走筋のコリン作動性神経—平滑筋間の情報伝達におけるカハール細胞の役割、第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広市、2010.9.16-18

8. その他特記事項

1. 外部資金:

日本科学技術振興会 H22 年度基盤研究 B(研究分担者)

2. 知財権等: なし

3. 学外活動: なし

4. 受賞等: なし

5. その他: なし

年報発刊にあたって～総合生命科学部事務室から～

総合生命科学部長補佐 井上 朋 広

本学で9番目となる総合生命科学部は、平成元年4月に開設した工学部生物工学科を改組し、平成22年4月に開設いたしました。「生命システム学科」「生命資源環境学科」「動物生命医科学科」からなる総合生命科学部は、自然と人間が調和し発展することを目指した科学と技術を創造する教育研究環境のもとで、高度な専門知識と技術、応用力を備えた人材を育て、社会に貢献することを目的としています。

大学設置基準の大綱化、18歳人口の減少や国公立大学の法人化等、これまでの成長基調の中で経験のない経営を取り巻く基盤の変化に対応するために、多くの私学が、短期大学から大学への転換、学部・学科の増設・再編を主とするいわゆる“改革”に取り組んでいることは、改めて説明する必要はないでしょう。

また、時代の要請である事前規制から事後チェックへの変遷に呼応すべく、情報公開、自己点検・評価、大学認証評価等によって、教育機関として、公共的な機関として、大学の質の保証を担保する方策を講じることも義務化されています。

私学は、入学した学生が卒業までの4年間、安心して学べる環境をまずは提供しなければなりません。端的に表現すると「安定した経営の持続」となるでしょう。

しかし、「安定」は安心を生み出す一方で、「不安定」を生み出す改革や改善を拒絶する一因にもなりえます。先に述べた改革や質保証に真に対応するには、まずは「安定」しているという幻想から脱却することが必須となります。

総合生命科学部は、開設間もない新しい学部であり、その運営は「安定」していません。「不安定」である現状にこそ、「安定」を目指すに必要な方策を積極的に取り組むことができるものと確信しております。また、総合生命科学部の「不安定」を、本学の「安定」に取り込むことができれば、更に強固で持続する「安定」が実現できるものとも考えております。

実験が主体となる総合生命科学部運営の事務的な側面では、事務処理量の増加のみならず、実験等を適正に実施するための法令等への対応等、新たな業務への対応や事務処理の効率化や専門化等、これまでの業務処理方法を見直し、改善する契機となっています。

これは、「不安定」を打破し「安定」を目指す絶好の機会であり、総合生命科学部における教育・研究活動の充実・発展が、本学の充実・発展に寄与するものと確信しております。

平成22年 総合生命科学部事務室の主な取り組み

研究費予算の執行方法の変更

教育・研究活動に要する消耗品の購入手続きを、学校法人京都産業大学固定資産及び物品調達規程に基づき、管財部から委託を受けて処理を開始する。

物品調達にかかる事務処理業務の大幅な軽減、効率化を図ることが可能となった。

実験動物1級技術者認定試験受験特例認定校として認定

動物生命医科学科が、平成22年10月1日付けで、実験動物1級技術者認定試験受験特例認定校として認定を受ける。

使用施設の改修・補修工事の実施

総合生命科学部が使用する第1実験室棟、9号館、15号館を、使用実態に合わせて、改修・補修工事を実施し、教育・研究活動の環境整備を行う。

総合生命科学部事務室スタッフ

後列(左から) 井上 鈴木 仲村
前列(左から) 向井 加藤 平元



総合生命科学部主催シンポジウム等一覧

【開設記念シンポジウム】

日 時：平成23年 3月10日（木）13:00～17:00

場 所：神山ホール第1セミナー室

講師・演題：伊 藤 維 昭 教授（総合生命科学部生命システム学科）

「タンパク質誕生の初期における出来事」

吉 田 賢 右 教授（総合生命科学部生命システム学科）

「タンパク質の構造の移り変わりを支配するタンパク質：分子シャペロン」

三 原 勝 芳 博士（九州大学医学研究院名誉教授）

「ミトコンドリア融合・分裂の分子機構と生理的意義」

藤 木 幸 夫 教授（九州大学大学院理学研究院生物科学部門）

「ペルオキシソームの形成制御・高次生命機能とその障害」

田 中 啓 二 博士（東京都臨床医学総合研究所・所長代行）

「ユビキチン・プロテアソームシステムによるタンパク質分解」

大 隅 良 典 博士（東京工業大学特任教授）

「酵母から見てきたオートファジーの世界」

世 話 人：永田教授

【国際ワークショップ】

日 時：平成22年 7月7日（水）15:00～17:30

場 所：15号館15102セミナー室

講 師：Jung-Hye Roe 教授（ソウル大学生命科学部）

Mayuree Fuangthong 博士（チュラボーン研究所研究員・チュラボーン大学院大学教官）

永 田 和 宏 教授（総合生命科学部生命システム学科）

嶋 本 伸 雄 教授（総合生命科学部生命システム学科）

テーマ：「大学院をアジアに向かって開くには？」

“Exposure of our graduate schools to Asian countries”

世話人：嶋本教授

【バイオフィォォラム2010】

回数	開催概要
第1回	<p>日時：平成22年 5月14日（金）16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：Matthias Roegner 教授（ルール大学 植物教室）</p> <p>演題：Basics of cyanobacterial photosynthesis for future hydrogen production from water</p> <p>世話人：瀬尾教授・吉田教授</p>
第2回	<p>日時：平成22年 7月 5日（月）16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：永田和宏 教授（総合生命科学部生命システム学科）</p> <p>演題：細胞内タンパク質品質管理機構</p> <p>世話人：瀬尾教授</p>
第3回	<p>日時：平成22年 7月15日（木）16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：小森成一 教授（岐阜大学応用生物科学部応用生物科学科獣医薬理学分野）</p> <p>演題：ムスカリン性アセチルコリン受容体の消化管運動調節～ノックアウトマウスを武器とした追求～</p> <p>世話人：高桑准教授・棚橋助教</p>
第4回	<p>日時：平成22年 7月16日（金）16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：近藤 滋 教授（大阪大学大学院生命機能研究科パターン形成研究室）</p> <p>演題：シマウマはなぜ縞を持っているのか？</p> <p>世話人：津下教授・河邊准教授</p>
第5回	<p>日時：平成22年10月13日（水）13:30～14:30</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：若菜茂晴 氏（理化学研究所バイオリソースセンターマウス表現型解析開発チームチームリーダー）</p> <p>演題：マウス表現型解析標準化と日本マウスクリニック</p> <p>世話人：齋藤教授・高桑准教授</p>
第6回	<p>日時：平成22年10月27日（水）16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：泉井 桂 氏 （近畿大学先端技術総合研究所客員教授・京都大学名誉教授・理化学研究所客員主管研究員）</p> <p>演題：遺伝子導入による植物の代謝工学</p> <p>世話人：河邊准教授</p>
第7回	<p>日時：平成22年11月10日（水）16:00～17:30</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：河邊 昭 准教授（総合生命科学部生命資源環境学科） 木村成介 准教授（総合生命科学部生命資源環境学科）</p> <p>演題：シロイヌナズナ近縁種の動原体およびその周辺領域の進化的解析 ガラパゴス諸島に固有の野生トマトに観察される葉形態の自然変異の発生機構</p> <p>世話人：河邊准教授</p>

回数	開催概要
第8回	<p>日時：平成22年11月24日(水) 16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：嶋本伸雄教授(総合生命科学部生命システム学科)</p> <p>演題：転写のナノバイオロジー</p> <p>世話人：瀬尾教授</p>
特別	<p>日時：平成22年12月15日(水) 17:30～18:30</p> <p>場所：図書館図書館ホール</p> <p>講師：Ada E. Yonath 博士(イスラエル ワイツマン研究所)</p> <p>演題：The voyage of nascent proteins through the ribosome (リボソームにおける新生タンパク質の旅)</p> <p>世話人：伊藤教授</p>
第9回	<p>日時：平成22年12月17日(金) 16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：高島成二准教授(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学分子心血管医学)</p> <p>演題：AMPKによる細胞極性形成の分子機構</p> <p>世話人：瀬尾教授</p>
第10回	<p>日時：平成22年12月21日(火) 16:00～17:00</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：浜千尋教授(総合生命科学部生命システム学科)</p> <p>演題：ショウジョウバエ嗅覚神経回路の形成機構</p> <p>世話人：瀬尾教授</p>
第11回	<p>日時：平成23年1月7日(金) 16:45～17:45</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：原田英美子准教授(滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科)</p> <p>演題：重金属集積植物の機構解明と応用</p> <p>世話人：河邊准教授</p>
第12回	<p>日時：平成23年1月12日(水) 16:00～17:30</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：松田修教授(京都府立医科大学大学院医学研究科免疫・微生物学)</p> <p>演題：サイトカインによるin vivo免疫応答制御</p> <p>世話人：竹内教授・河邊准教授</p>
第13回	<p>日時：平成23年1月14日(金) 16:45～17:45</p> <p>場所：15号館15102セミナー室</p> <p>講師：原田彰宏教授(大阪大学医学系研究科細胞生物学講座)</p> <p>演題：モデルマウスを用いた、細胞の極性の形成維持を司る遺伝子の機能解析</p> <p>世話人：中村教授・河邊准教授</p>

【私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】

開 催 概 要	
日 時：平成22年 6月 1日(火)15:00~16:00	
場 所：9号館902大学院講義室	
講 師：諸 橋 賢 吾 博士（オハイオ州立大学）	
演 題：シロイヌナズナトライコーム形成に関わる転写制御ネットワークの解析	
世話人：寺地教授・木村准教授	
日 時：平成22年12月10日(金)16:00~17:00	
場 所：16号館2階会議室	
講 師：有 村 慎 一 准教授（東京大学大学院農学生命科学研究科植物分子遺伝学研究室）	
演 題：ライブイメージングを用いた植物ミトコンドリアの分裂・融合・維持機構の解析	
世話人：寺地教授	
日 時：平成23年 2月21日(月)16:00~16:45	
場 所：16号館2階会議室	
講 師：中 山 北 斗 博士（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻）	
演 題：非モデル植物アスパラガスを用いた、葉のような茎、「擬葉」の進化発生学	
世話人：寺地教授・木村准教授	
日 時：平成23年 2月21日(月)16:45~17:30	
場 所：16号館2階会議室	
講 師：吉 田 貴 徳 博士（九州大学システム生命科学府システム生命科学専攻）	
演 題：典型的パイオニア種カラスザンショウの分子集団遺伝学的研究	
世話人：寺地教授・河邊准教授	
日 時：平成23年 2月23日(水)16:00~17:00	
場 所：16号館2階会議室	
講 師：安 部 淳 博士（静岡大学農学部共生バイオサイエンス学科応用昆虫学研究室）	
演 題：寄生バチにおける極端に雌に偏った性比の進化	
世話人：寺地教授・河邊准教授	

冠動脈形成の仕組み 一部解明

心臓の冠動脈が決まった場所に形成されるメカニズムの一端を、京都産業大総合生命科学部の石井泰雄助教と米カリフォルニア大サンフランシスコ校のグループが解明した。心臓の再生医療につながる成果といい、米科学誌「デベロップメント・セル」で21日までに発表した。

京産大助教ら米誌に発表

哺乳類や魚類など多くの脊椎動物では、心臓は初期に発生する心筋などの骨格構造に、心臓の外から移動してくる別の細胞がくっつき、心筋に血液を送る冠動脈や心臓を覆う袋の心外膜が作られる。ただ、決まった場所に冠動脈が作られる仕組みは、よく分かっていなかった。

特定タンパク質が誘導

石井助教は「心臓の決まった位置に細胞を誘導することで、冠動脈の走る方向などを正しく制御しているらしい。細胞から冠動脈が作られるメカニズムも調べたい」と話している。

(松尾浩道)

冠動脈形成の仕組み解明

京産大など 再生医療に期待

心臓の筋肉細胞に血液を供給する冠動脈が、受精卵で正常に形成される仕組みを、京都産業大の石井泰雄助教らが動物実験で突き止めた。米科学誌に発表した。心疾患患者の冠動脈を再生させる医療につながる期待される。

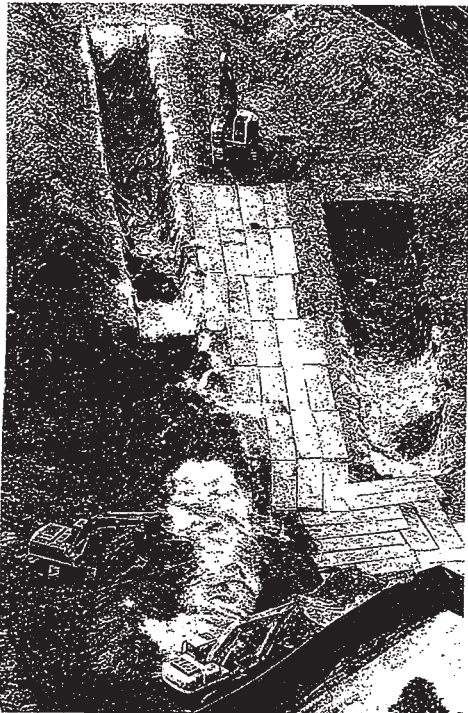
ニワトリの受精卵は、産

石井助教らは、心臓と突起の断片をシャーレの中で培養して、詳しく分析。心臓の一部から「BMP2」という骨形成たんぱく質が分泌され、突起を決まった場所へ導いていることがわかった。

石井助教は「人間も同様の仕組みがあると考えられる。IPS細胞(新型万能細胞)などから突起の細胞を作り、BMP2で正しい位置に血管を再生させる治療につながる」と話す。

口蹄疫 驚異の感染力

風に乗って250キロ 黄砂にも付着?



宮崎県川南町では、殺処分された家畜の埋却作業が続く＝21日、本社ヘリから、藤協正真撮影

10年ぶりに国内で確認された口蹄疫。感染が拡大した宮崎県内では、約15万頭の牛や豚などが殺処分の対象となった。さらなる拡大を食い止めるため、国は初めてワクチン接種に踏み切った。ここまで警戒するのは、口蹄疫のウイルスの感染力が強く、複数の感染ルートが考えられることが背景にある。

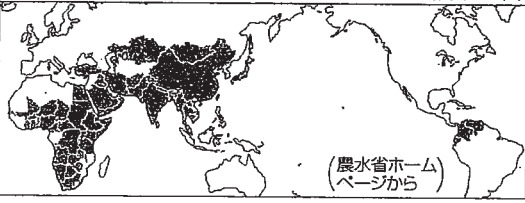
60カ国以上で発生

白い消石灰が地面にまかれた牛や豚の畜舎。近くを通る車には消毒液がかけられる。白い防護服を来た獣医師らが農場に入り、ワクチンを打ってまわる。口蹄疫が発生した宮崎県内では、物々しい光景が広がる。「口蹄疫ウイルスは感染力が強い上、すぐ変異して耐性ができる。最も恐れられている家畜伝染病の一つだ」（京都産業大の大槻公一鳥インフルエンザ研究センター長）

主に牛や豚、羊、ヤギ、鹿

などの「偶蹄類」に感染する。家畜の致死率は1〜5%で、若い牛や豚では2割程度。しかし、口やひづめなどに水泡ができ、えさが食われなくなり、肉質が落ち、出荷が難しくなってしまう。2008〜10年に国際獣疫事務局(OIE)に発生を報告した国・地域は60以上。アジアでは今年1月に韓国や中国(北京市、新疆ウイグル自治区)を皮切りに、2月以降に香港と台湾、中国(広東省など7地域)でも確認され

最近の世界の口蹄疫の発生状況 OIEに発生を報告した国



(農水省ホームページから)

た。ウイルスはA型やC型など7種類に分けられる。ただ、変異しやすいため、さらに細かく「インドネシア1」など地域ごと分類される。宮崎のウイルスは、遺伝子検査でO型と判明。中国や韓国で発生したO型のウイルスの遺伝子と約99%一致した。今回、国は初めてワクチン接種に踏み切った。死んだウイルスを使った不活化ワクチンで、欧州からすべて輸入した。感染力が強く、高性能の排気設備が完備された特殊な施設でない、ウイルスは扱えない。こうした施設がない日本では製造できない。

えさ・くつ…経路不明
やっかいなことに、感染する動物も多い。米農務省の報告によると、牛や豚、羊、ヤギなどの家畜に加え、シカ、カモシカ、インシシなど99種の生物が感染源になりうるという。そのうち、カンガルーやハリネズミなど40種で発症が確認されている。イエバエやタニモそれぞれ10週、15〜20週にわたりウイルスを運んだというデータもある。心配される感染ルートは複数ある。気象条件が適していれば、風に乗って陸上で60キロ、海上で250キロも移動するといわれる。欧州では海を越えて、フランスから英国に、デンマークからスウェーデンに飛んだ記録もある。

他の病気でもみられる。しかも、水泡は表面が薄い膜のため、よくやぶれ、気付きにくいという。
帝京科学大の村上洋介教授(ウイルス学)は「症状が似た病気も非常に珍しく、獣医師の診断経験が乏しい。水泡があったからといって正確に口蹄疫と診断するのは、ベテランの獣医師でも難しい」と話す。

もつと長距離を移動する可能性を示す調査結果もある。筑波大や九州大、琉球大などのグループは09年、茨城県と福岡県、沖縄県で採取した黄

家畜のえさやワラ、人の往来がかかわっている疑いが濃い。こう指摘するのは、向本雅郁大阪府立大准教授(獣医感染学)だ。ウイルスは服や靴に付着した状態で夏でも9週間、人のごみでも2週間は生存できるという。
向本准教授は「空港にマットを置いて靴底を消毒するのは、おとほしな対策はすべにできるはず。おとほしな発生国でむやみに牛や豚にふれないよう、出入国者に呼びかけていくしかない」と話している。

「アスパラクラブ」(<http://aspara.asahi.com>)の「aサロン・科学面によるこそ」にもトップ記事を掲載しています。

口蹄疫「早期発見を」



口蹄疫の府内発生に備え準備状況を検証する
専門家や府職員ら（京都市上京区・府庁）

府専門家会議 予防へ状況報告

宮崎県で口蹄（こうてい）疫が広がっている問題を受け、京都府は府内発生に備えた準備状況を検証する専門家会議を31日、京都市上京区の府庁で開いた。府内では異常のある家畜の報告例はない

が、準備に不備がないか確認するために開き、家畜伝染病の専門家や府獣医師会長らが出席した。対策を説明した府担当者は「早期発見が大切。これがなければすべての対策が崩れる」と強調した。その上で立ち入り調査の方法や初日の防疫手順、殺処分や埋却の留意点などを具体的に説明した。

京都産業大の大槻公一教授は「鳥インフルエンザの経験が生かされており、非常に細かく考えて備えをしている」と評価した上で、今後万全な対策を講じるよう要望した。
(目黒重幸)

宮崎県の口蹄疫(こうていえき)問題を受け、甲子園の常連校でもある松山市の私立済美(さいび)高校のすべての運動部が、感染防止を目的に九州の高校との対外試合を自粛していることが分かった。同校が「防疫に努

める県に協力したい」と独自に判断した。事態が沈静化するまでとしているが、突然のキャンセルに対戦相手の変更を強いられるなどで混乱も起きている。

【西嶋正法】

九州勢との試合自粛

口蹄疫 部活に波及

愛媛の高校「県の防疫に協力」

福岡と佐賀 野球部の遠征解約

同校によると、宮崎県内で口蹄疫の感染が続いていることを受け、5月中旬から運動部の九州遠征や、九州の高校を迎える試合開催を控えているという。同校の井上幸二教頭は「フェリーで入ってくる車の消毒など、県全体で感染防止に取り組む中、協力することにした」と言い、事態が終息するまで当面続ける考えだ。

これに対し、愛媛県教委は「対外試合の自粛などは指示しておらず、その予定もない」としている。同県宇和島市は闘牛が盛んで、市営闘牛場で年5回、定期闘牛大会を開いている。

一方、突然のキャン

セルに戸惑う高校も。07年の夏の甲子園で初優勝を果たした佐賀市の県立佐賀北高校は5月末に済美との練習試合を予定していた。約1年前からスケジュールを組み、宿泊先なども手配。保護者も参加する予定だったため済美の仲介で対戦相手を岡山県内の高校や社会人チームに変更した。佐賀北の吉富寿泰部長は「『宮崎イコール

九州』との考えかもしれないが、いささか過剰ではないか」と首をひねる。また、今春センバツ出場を果たした北九州市八幡西区の私立自由ヶ丘高校も県大会を控え、練習試合を重要視。済美と5月末対戦予定だったが、予定の2日前にキャンセルの連絡があり、松山市内の別の高校と同校グラウンドで対戦した。自由ヶ丘の末次秀樹監督は

「済美と対戦したかったが仕方ない。愛媛は闘牛も有名だし、細心の注意を払ってのことだろう」と氣遣った。尊重するしかない

大槻公一・京都産業大鳥インフルエンザ研究センター長(獣医微生物学)の話 九州の方には気の毒に思う。人権の問題も出てくるが、ウイルスが目に見えない以上、人的交流を避けるのは仕方ない面もある。愛媛県は闘牛が有名でもあり、緊急事態であることを考えると、済美高校の判断はいい悪いではなく、尊重するしかない。

2010. 10. 18

京都新聞(朝刊・22面)

府内産卵、鶏肉
安全性をPR
来月、中京で催し

鳥インフルエンザの
知識や京都府産の卵、
鶏肉の安全性を伝える
催し「知って得、とり
・たまごの集い」が11
月6日午後1時半か
ら、京都市中京区の京

都商工会議所で開かれ
る。
府や府養鶏協会など
が、府内で高病原性鳥
インフルエンザが発生
した2007年から毎
年開催している。
当日は鳥インフルエ
ンザに詳しい大槻公一
京都産業大教授が講演
し、鳥インフルエンザ
のほか、官崎県で猛威
をふるった家畜伝染病
の口蹄疫についても解
説する。また、府内の
養鶏農家が安全で安心
な卵や鶏肉を出荷する
ための取り組みをピデ
オなどで紹介する。
参加無料。定員は先
着300人。問い合
わせは府畜産課 ☎0
75(414)498
5。

2010. 10. 23

リビング京都中央 5面

楽しく知ろう、鶏と卵
「知って得 とり・たまごの集い」
11月6日(土) たまご10個プレゼントも
京都府

〈日時〉11月6日(土)午後1時30分～3時30分
〈会場〉京都商工会議所3階講堂(地下鉄「丸太町」駅6番
出口直結)
●講演「鳥インフルエンザ、口蹄疫ってどういう病気」
(京都産業大学総合生命科学部教授大槻公一さん) ●府
内農家における取り組み紹介 ●「たまご、鶏肉〇×クイ
ズ」全問正解者20人に景品あり ●「たまごつかみゲー
ム」※子ども対象。「あたり」のピンポン玉をつかんだ
ら、景品をプレゼント
※参加費無料 ※定員先着300人、要事前申し込み
(主催)京都府、京都府養鶏協会、京都府養鶏生産者協会、
京都府畜産技術連盟

京都府では、府内で養
鶏業を営む人々と共同
で、イベント「知って得
とり・たまごの集い」を
開催。参加者には、京都
府産の卵1パック(10個)
がプレゼントされます
よ！
催しの詳細は表参照。
〈申し込み方法〉必要事
項は①氏名②〒・住所③
電話番号④職業(いずれ
も参加者全員分)⑤鶏
肉・卵に関する疑問(あ
れば、申し込みは電話
・ファクス・メール・はが
きのいずれかで。11月1
日(月)までに「フアク
ス・メール」はがきは同
日必着)。参加者には、
入場券を送付
せ。京都府畜産課 ☎2
18070 上京区下立売
通新町西入ル、☎075
(414)4984、FAX
075(414)4980
chikusan@pref.kyoto.
lg.jp

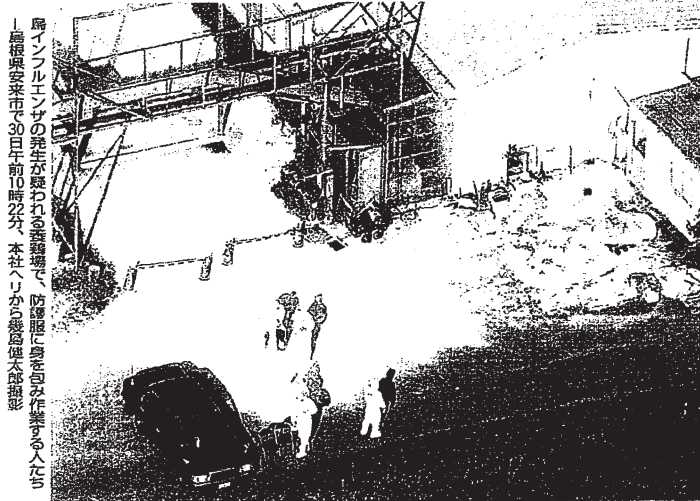
島根・鳥インフル疑い

2万3000羽殺処分 確定前、初のケース

島根県は30日、高病原性鳥インフルエンザへの感染が疑われる鶏が見つかった同県安来市の養鶏場で飼育している約2万3000羽について、同日午後にも殺処分を始めることを明らかにした。処分が終わるまで2、3日かかる見通し。高病原性鳥インフルエンザとの最終的な確定を待たずに殺処分するのは初めてという。また隣の鳥取県境港、米子両市を含め、この農家から半径10キロ以内にある養鶏場の鶏卵や鶏肉などを移動制限する。



島根県は同日午前9時すぎから危機管理対策本部会議を開き、この養鶏場ではこれまで13羽の鶏が死んでいるが、県内の他の養鶏場家では異常は確認されていないという。



鳥インフルエンザの発生が疑われる養鶏場で、防護服に身を包み作業する人々。島根県安来市で30日午前10時22分、本社へから島根県本部が

鳥インフルエンザは、鶏や野鳥が感染するインフルエンザで、ウイルス表面のたんぱく質がH5型とH7型、H5N1型とH7N1型、強毒性と弱毒性がある。H5型はウイルスに突然変異が起り人間と人間の間に流行する能力を持つことがあるため、警戒されている。感染した鳥と濃厚に接触したり、粉末

空気感染せず 渡り鳥運ぶ

鳥インフルエンザは、鶏や野鳥が感染するインフルエンザで、ウイルス表面のたんぱく質がH5型とH7型、H5N1型とH7N1型、強毒性と弱毒性がある。H5型はウイルスに突然変異が起り人間と人間の間に流行する能力を持つことがあるため、警戒されている。感染した鳥と濃厚に接触したり、粉末

は、鶏では07年1月に宮崎、岡山両県で見つかった以来となる。京都産業大馬インフルエンザ研究センターの大槻公一教授(獣)「運んだのではないかと指摘する。鳥インフルエンザウイルスは口蹄疫のように、10月に北海道稚内市でカモのふんから検出された強毒性の鳥インフルエンザウイルス。」詳しく調べてみてみたいと断定

【遠藤孝晴、根本毅】

は、鶏では07年1月に宮崎、岡山両県で見つかった以来となる。京都産業大馬インフルエンザ研究センターの大槻公一教授(獣)「運んだのではないかと指摘する。鳥インフルエンザウイルスは口蹄疫のように、10月に北海道稚内市でカモのふんから検出された強毒性の鳥インフルエンザウイルス。」詳しく調べてみてみたいと断定

【遠藤孝晴、根本毅】

は、鶏では07年1月に宮崎、岡山両県で見つかった以来となる。京都産業大馬インフルエンザ研究センターの大槻公一教授(獣)「運んだのではないかと指摘する。鳥インフルエンザウイルスは口蹄疫のように、10月に北海道稚内市でカモのふんから検出された強毒性の鳥インフルエンザウイルス。」詳しく調べてみてみたいと断定

【遠藤孝晴、根本毅】

- ◇国内で確認された鳥インフルエンザの主な感染例◇
- <04年>
 - 1月 山口県阿東町(現山口市)の養鶏場で鶏の感染確認。強毒性のH5N1型
 - 2月 大分県九重町の民家のチャボに感染確認。京都府丹波町(現丹波町)の養鶏場でも鶏が大量死と府が発表。いずれもH5N1型
- <05年>
 - 6月 茨城県水海道市(現常総市)の養鶏場の鶏に弱毒性のH5N2型の感染確認。後に埼玉県の養鶏場でも鶏に抗体陽性反応
- <07年>
 - 1月 宮崎県の清武町、日向市、新宮町と、岡山県高梁市の養鶏場の鶏にH5型の感染確認。後にH5N1型と判明
 - 3月 熊本県相良町で見つかったクマタカにH5N1型の感染を確認、と環境省が発表
- <08年>
 - 4月 秋田県・十和田湖畔で見つかったハクチョウの死骸からウイルスを検出。5月には北海道・野付半島などでも、いずれもH5N1型
- <09年>
 - 2月 愛知県豊橋市の農場でウズラに弱毒性のH7型の感染確認
- <10年>
 - 10月 北海道稚内市の大沼で、野生のカモのふんからH5N1型のウイルスが検出されたと環境省が発表

エンザの感染が疑われる鶏が見つかったことを受け、全閣僚で構成する「鳥インフルエンザ対策本部」を設置し、野田通産相が防疫指針の美施状況などを報告した。菅直人首相は宮崎県で高病原性鳥インフル

感染、11月中旬以降か

島根・鳥インフル 定期検査で「陰性」

高病原性鳥インフル
エンザの感染が疑われ
る鶏が見つかった島根
県安来市の養鶏場が、
感染の有無を調べる定
期の抗体検査を11月16
日に受け、松江畜保
健康生所の分析で陰性
の結果が出ていたこと
が30日、県などへの取
りまとめで明らかになった。

全国で警戒必要

京都産業大鳥インフ
ルエンザ研究センター
長の大槻公一教授(獣
医微生物学)の話 10
月に北海道稚内市で方
モのふんから強毒性の
鳥インフルエンザウイ
ルス(H5N1型)が
検出されたが、その方
モに接触した渡り鳥が
本州に飛来し、ウイル
スを運んだ可能性は十
分にある。島根県だけ
でなく、京都府内をは
じめ日本全国で警戒が
必要だ。ニワトリへの
感染の防止には防鳥ネ
ットの設置や消毒など
の対策をあらためて徹
底する必要がある。

強毒性の鳥インフルエンザの感染実験ができる特別実験室
(京都市北区・京都産業大)



材で分かった。
(22面に関連記事)
県は、5羽の鶏が死
んだことが確認され
た。29日までの約2週間に
感染した可能性がある
とみて、経緯や原因を
探っている。疑い例が
出た養鶏場では、飼育
した約2万3千羽の殺
処分作業が30日午後か
ら本格化し、3000
羽を処分した。
島根県は30日、疑い
例があつた養鶏場以外
の県内47業者を対象
に、目視や聞き取りで
調査した結果、異常な
鶏は見つからなかつ
たと発表。隣接する鳥
取県でも同様の調査
で、県内88カ所の養鶏
農家で異常はなかつ
た。

鳥取県はさらに、疑
い例があつた養鶏場か
ら半径10キロ以内にある
3カ所について、一部
の鶏でウイルスの遺伝
子を調べるPCR検査
をしたが、いずれも陰
性と判明した。
松江畜保健康生所
によると、抗体検査は
生きた鶏を抽出して実
施。一定数以上の鶏を
飼育する業者は月1回
の抗体検査を受けるよ
う指針で定めている。
11月16日の検査の際、
症状のある鶏は目視で
も確認できなかった。
殺処分した鶏は焼却
され、完了次第、養鶏
場の洗浄と消毒作業に
入る。全作業を終える
のに5、6日を要する
見通し。県は安来市内
の幹線道路など9カ所
に消毒ポイントを設
け、関連車両の洗浄作
業も開始した。

京産大に研究拠点完成

鳥インフルエンザに
ワトリなどを使った強
毒性の鳥インフルエン
ザウイルスの感染実験
が可能の実験室が近畿
都市北区)に新施設が
完成し、30日、報道関
係者に公開された。二
年10月に京産大のキャ
ンパスに開設された。
今回、キャンパス内に
新設された理工系学部
の校舎地下にセンター
を移し強毒性鳥インフ
ルエンザウイルスが扱
える特別実験室を、国
事と協議した松木政務
官は「国としてできる
限りのことをやる。し
っかり連携を取りた
い」と呼び掛けた。

業も開始した。
松木謙公農林水産政
務官は30日島根県入り
した。現場視察に先立
ち溝口善兵衛島根県知
事と協議した松木政務
官は「国としてできる
限りのことをやる。し
っかり連携を取りた
い」と呼び掛けた。

内では北海道大、東京
大鳥取大に次いで、私
大で初めて設置した。
約30平方メートルの特
別実験室は室内の気圧を低
くして空気が外部に流
出しない仕組みで、ウ
イルスのような細かな
粒子もとらえる特殊な
フィルターで空気をろ
過する。ウイルスの室
内への流出を防ぐ工夫
を施した作業台やニワ
トリやアヒルを飼育す
るケージを設置してい
る。

特別実験室では渡り
鳥のふんなどから強毒
性の鳥インフルエンザ
ウイルスを分離した
り、ニワトリなどに感
染させて病原性を確か
めたりする実験を行
う。
大槻公一センター長
は「新たな施設を活用
し、ほかの大学や自治
体と共同研究し、鳥イ
ンフルエンザの防疫体
制の確立を目指した
い」と話している。
(松尾浩道)

特別実験室では渡り
鳥のふんなどから強毒
性の鳥インフルエンザ
ウイルスを分離した
り、ニワトリなどに感
染させて病原性を確か
めたりする実験を行
う。
大槻公一センター長
は「新たな施設を活用
し、ほかの大学や自治
体と共同研究し、鳥イ
ンフルエンザの防疫体
制の確立を目指した
い」と話している。
(松尾浩道)

写真提供

拡散防止のため畜産関係車両の消毒をする鳥取県職員(30日午前、鳥取県米子市)

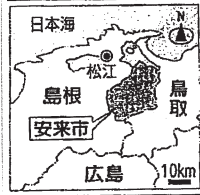


鳥根・鳥取の養鶏場調査

鳥インフル疑い 国道で車両消毒

鳥根県安来市の養鶏場で高病原性鳥インフルエンスへの感染が疑われる鶏が見つかったことを受

け、鳥根、鳥取両県の国道沿いでは30日、感染拡大防止のため車両の消毒が始まった。両県はすべ



ての養鶏場を対象に感染の有無を調査。農林水産省も獣医の資格を持つ専門家を現地へ派遣した。菅直人首相は同日午前

に開かれた「鳥インフルエンス対策本部」(本部長・菅直人)で各府省が連携して感染拡大を防止するよう指示。「なんとしても、抑え込まなければいけない。国内の危機管理に全力を挙げて対応してほしい」と強調した。一方鳥根県は鳥インフ

ルエンスの疑い例が出た養鶏場で飼育される約2万羽について家畜伝染病予防法に基づき30日午後から殺処分することを明らかにした。終了までに2、3日かかる見込み。農林水産省と鳥根県によると、鳥インフルエンスで、ウィルスの型を特定する前に鶏を殺処分するのは全国で初めて。

鳥根県も危機管理対策本部会議を開催。溝口善兵衛知事は「各部署が協力して万全の体制を築き、影響が広がらないようにしたい」と指示した。両県の調査では養鶏場を対象に飼っている鶏の死や異常の有無を聞き取る。対象となる養鶏場は

鳥根県で約4カ所、安来市と隣接する鳥取県で約90カ所。計約400万羽が飼育されている。安来市の養鶏場の感染が確定すれば半径10キロ以内の鶏などの移動が制限。対象となる5カ所のうち3カ所は鳥根県、3

つ野鳥や渡り鳥が感染源の可能性が高く、人への感染はほとんどないが、ウィルスを含んだほこりを吸い込むなどして、感染するケースもあり、海外では死亡例もある。大槻公一・京都産業大

鳥インフルエンス研究センター長は「鳥根県安来市から養鶏場にウィルスが入

2010.12.1

鳥インフル研究 京産大に実験室 鳥インフルエンスの侵入経路の調査やウィルスの解析などを行う京都産業大(北区)の研究施設「鳥インフルエンス研究センター」(センター長・大槻公一・総合生命科学部教授)内に、関西では初めて、強毒性の鳥インフルエンスウイルスの感染実験ができる「特別実験室」が完成し、30日、報道陣に公開された。実験室(約30平方メートル)では国が4段階で設定したウィルスの危険度のうち、最上位を除いた3段階までの病原体を使つての実験ができる。実験室には、外部にウィルスを出さずに安全に作業できるキャビネット(箱形装置)が備わっており、その中で人為的にウィルス感染を起こし、突然変異が起き

る過程を研究する。鳥根県安来市で鳥インフルエンスに感染した疑い事例が報告されているが、大槻センター長は「渡り鳥の移動ルートに当たる地域なら、どこでも発生する可能性はある」と話していた。

2010.12.1

京都産業大が 感染実験施設 京都産業大は、高病原性鳥インフルエンスの感染実験ができる施設を設置し、30日に報道陣に公開した。国内の大学では北海道大、東京大、鳥取大に次ぎ4番目。関西では初という。扱える病原体の危険度で4段階に分けた指標で2番目に高いバイオセーフティーレベル(BSL)3。鶏に感染させて病原性を調べたり、強毒ウィルスを分離したりすることが可能。実験室は、病原体が漏れないように空気の流れを厳しく制御。防護服を着て箱形の作業台に手を入れて実験する。作業台内の空気もフィルターを通して排気する。感染した鶏などを飼う箱が備わり、それも病原体が漏れない構造になっている。(瀬川茂子)

渡り鳥から 感染の可能性

鳥インフルエンスはA型インフルエンスウイルスが鳥に感染して引き起こされる。ウィルスを持つ野鳥や渡り鳥が感染源

の可能性が高く、人への感染はほとんどないが、ウィルスを含んだほこりを吸い込むなどして、感染するケースもあり、海外では死亡例もある。大槻公一・京都産業大

鳥インフルエンス研究センター長は「鳥根県安来市から養鶏場にウィルスが入

強毒性の鳥インフルエンザの感染実験ができる特別実験室
(京都市北区・京都産業大)



鳥インフルの
実験施設公開
京産大、関西初
京都産業大学は30日、
強毒性の鳥インフルエン
ザウイルスを扱える実験

施設「BSL3」を報道陣に公開した。ニフトリやアヒルなどに感染させる実験ができる施設は関西地方では初めて。自治体に働き掛けて家畜の疾病対策にも協力する。
同大学鳥インフルエン

ザ研究センター内に設けた。広さは約30平方メートル。高性能フィルターでの排気処理や気圧の調節などでウイルスを漏らさない設計とした。早ければ年内にも稼働する。
野鳥などから採取した試料(サンプル)を運び込み、ウイルスをニフトリなどに感染させる実験をして病原性などを調べ

鳥インフルエンザに特化した研究拠点の京都産業大鳥インフルエンザ研究センター(京都市北区)に新施設が完成し、30日、報道関係者に公開された。二

京産大に研究拠点完成

ワトリなどを使った強毒性の鳥インフルエンザウイルスの感染実験が可能な実験室が近畿で初めて設置された。センターは2006年10月に京産大のキャンパスに開設された。今回、キャンパス内に新設された理工系学部の校舎地下にセンターを移し強毒性鳥インフルエンザウイルスが扱える特別実験室を、国

京都産業大が 感染実験施設

京都産業大は、高病原性鳥インフルエンザの感染実験ができる施設を設置し、30日に報道陣に公開した。国内の大学では北海道大、東京大、鳥取大に次ぎ4番目。関西では初という。扱える病原体の危険度で4段階に分けた指標で2番目に高いバイオセーフティレベル(BSL)3。

鶏に感染させて病原性を調べたり、強毒ウイルスを分離したりすることができる。実験室は、病原体が漏れないように空気の流れを厳しく制御。防護服を着て箱状の作業台に手を入れて実験する。作業台内の空気もフィルターを通して排気する。感染した鶏などを飼う箱が備わり、それも病原体が漏れない構造になっている。
(瀬川茂子)

強毒性実験可能
京産大が新施設
京都産業大(京都市北区)の「鳥インフルエンザ研究センター」の新施設が完成し、30日、報道関係者に公開された。近畿の大学では初めて、鶏などに強毒性ウイルスを感染させて行う実験が可能になった。

理工系学部棟地下1階(440平方メートル)に実験室や図書室、教員室を備える新施設を造った。
実験室は外気を完全にシャットアウトしたエアロック室や洗浄室などを含め約56平方メートルの広さ。特殊フィルターを通して排気したり、気圧を室外より低くしてウイルスの飛散を防止。強毒性ウイルスを鶏やアヒルに接種する実験などに取り組む。
【広瀬登】

内では北海道大、東京大、鳥取大に次いで、私大で初めて設置した。約30平方メートルの特別実験室は室内の気圧を低くして空気が外部に流れ出さない仕組みで、ウイルスのような細かな粒子もとらえる特殊なフィルターで空気をろ過する。ウイルスの室内への流出を防ぐ工夫を施した作業台やニフトリやアヒルを飼育するケージを設置してい

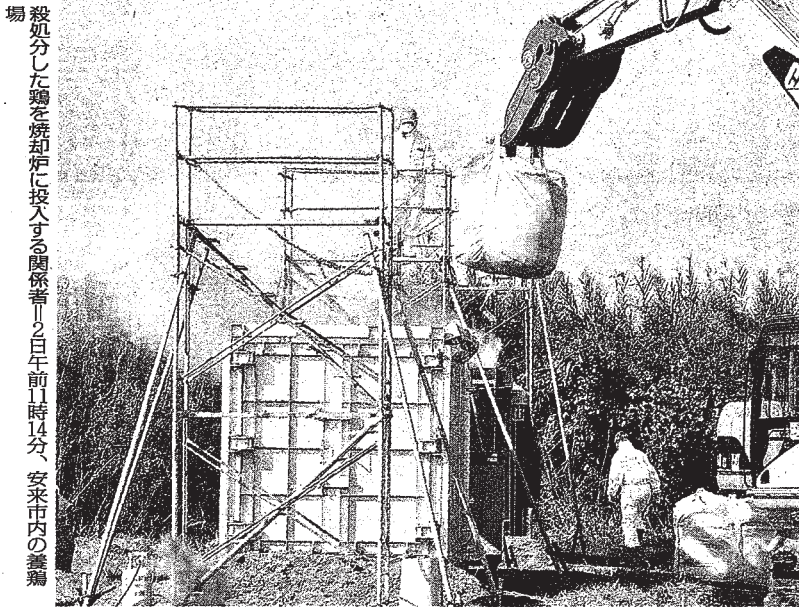
特別実験室では渡り鳥のふんなどから強毒性の鳥インフルエンザウイルスを分離したり、ニフトリなどに感染させて病原性を確かめたりする実験を行う。
大槻公一センター長は「新たな施設を活用し、ほかの大学や自治体と共同研究し、鳥インフルエンザの防疫体制の確立を目指したい」と話している。
(松尾浩道)

袋詰め鶏焼却炉へ

2万羽「やむを得ぬ」

安来・養鶏場

強毒タイプの高病原性鳥インフルエンザに感染した鶏が発生し、大掛かりな殺処分が実施された安来市内の養鶏場。2日は、搬入された移動式焼却炉が場内に設置され、約2万1500羽の焼却が始まった。黙々と作業をこなす防護服姿の関係者。袋詰めされた鶏が次々と炉に投入されると、赤い炎が噴き出す。夕方から雨にたれた現場周辺には焼却臭が漂い、異様な雰囲気包まれた。



殺処分した鶏を焼却炉に投入する関係者。2日午前11時14分、安来市内の養鶏場

午前9時40分、この日早朝まで続いた殺処分の鶏の投入が始まる。現場は焼却用の廃材や丸太が次々と運ばれ、山積みだ。徹夜で設置された焼却炉は2基。重機2台がエンジン音をこらして、梱包（こんぼう）した鶏の死骸を炉内に入れるたびに、炎がパツと舞い上がった。

焼却作業は夕闇が迫っても継続。午後5時には投光器が投入され、現場を照らす。折から降り始めた雨で中断すると、高熱の炉から白い水蒸気がわき上がった。

鶏が一羽もいなくなった鶏舎では、防護服にマスク、ゴーグルを着けた作業員が、ひな鶏舎1棟と親鳥の鶏舎2棟の清掃に追われた。

業には、鳥根県と有事の際の防疫対策で協定を結んだ県建設業協会も参画。要請を受けた地元運送業者は焼却炉設置の整地作業や作業用の土台作り、機材搬入車両のための道路補強工事などを担当した。渡部義三・安来支部長は「一日も早い終息宣言を願っている」と祈るように話した。

1〜2日にかけて養鶏場内で一連の作業に当たった作業員は、国、県、市町村、JAなど各種団体から派遣された延べ305人の上った。焼却作業は4日まで続く予定。

一方、現場には午後2時ごろ、農林水産省の疫学調査チームの一行8人が到着。調査後、報道陣が到着。調査後、報道陣の取材に応じた代表の伊藤寿啓・鳥取大農学部教員は「一連の殺処分や焼却作業には、鳥根県と有事の際の防疫対策で協定を結んだ県建設業協会も参画。要請を受けた地元運送業者は焼却炉設置の整地作業や作業用の土台作り、機材搬入車両のための道路補強工事などを担当した。渡部義三・安来支部長は「一日も早い終息宣言を願っている」と祈るように話した。

殺処分に従事した県職員の一人名は「（最初は）かわいそう、という気持ちでやってた。感染を拡大しないためにはやむを得ない」と胸の内をぼつぼつと語った。顔には疲労の色がにじんでいた。

京都産業大研究センター 大槻所長インタビュー

発症力も強毒タイプか

安来市内の養鶏場で高病原性鳥インフルエンザの発生は、型が検出された。これらが、人への強い感染力を、2週間以内は消費。病源性鳥インフルエンザの違いははっきりしている。水鳥は本州に南下する。持っ型に異なる可能性がある。関係者以外や車両の立ち入り禁止、関係者も物の消毒を、いま一度徹底する必要がある。

「H5型」が発生した。一連の殺処分や焼却作業には、鳥根県と有事の際の防疫対策で協定を結んだ県建設業協会も参画。要請を受けた地元運送業者は焼却炉設置の整地作業や作業用の土台作り、機材搬入車両のための道路補強工事などを担当した。渡部義三・安来支部長は「一日も早い終息宣言を願っている」と祈るように話した。

フルエンザ研究センターの大槻公一（68）は「H5N1型ではない。感染力も強毒タイプか。野鳥の水鳥やスズメ、場合などまれにあるが、ハトは感染しても発症しない。北海道・稚内では10月、樺太経由で飛来した。本国内では、ないと言っている。ただH5N1型は、鶏舎内を消石灰など別の報告はなく、関係者はほっと胸をなでおろした。県観光振興課にも「風評被害の報告は入っていない」という。

一方、防疫対策として県内随一の約35万羽を飼育する雲南市は2日、市内10の全養鶏業者に消石灰と消毒薬剤2〜3週間分を配布することを決めた。鳥取県雲南市も同日、町内全22戸の養鶏農家に消石灰計515袋（1袋20kg）を無償で配布した。支援の輪は広がっており、連合鳥根に所属する大和紡績労働組合益田支部（益田市須子町）は同日、鳥根県養鶏協会にグループ客など、理由はいずれも鳥インフルエンザだったという。鳥根県でも影響が懸念されていたが、同県旅館ホテル生活衛生同業組合を寄贈。同協会が会員や県内の飼料メーカーなどに配布する予定だ。

殺処分前倒し 奏功か

島根・鳥インフル「飛び火」なし

施設の不備 感染原因か 業者「改善は困難」

発生1週間

島根県安来市の養鶏場
で強毒性の高病原性鳥イ
ンフルエンザが発生して
から6日で1週間。同県
は5日、同養鶏場で消毒
などの防疫措置が完了し
たと発表した。ほかに
飛び火したとの報告はな
く、感染確定前に約2万
羽の殺処分に着手する異
例のスピード対応が効果
を上げているようにも見
える。鶏舎の不備が感染
原因との見方が浮上する
一方、養鶏家からは「経
営的に施設整備は困難」

経験生かす

「今回は失敗が許され
ない」。感染疑いの一報
を受け、苦い経験の数々
を農林水産省幹部の脳裏
をよぎった。これまでの
鳥インフルエンザの発生
では拡大を思うように防
げず、強毒タイプでは2

004年に山口、大分、
京都で約24万羽、07年に
は宮崎、岡山で約17万羽
の感染を許した。
島根県が、安来市の感
染疑い例を公表したのは
11月29日夜。各地の前例
に照らし、動物衛生研究
所による詳細検査で感染
が確定すれば、殺処分に
踏み切ると説明した。

だが農水省はその日
のうちに前倒しを要請。
県は慌てて人員や機材
確保に奔走し、30日午
後からの作業開始にこ

ぎ着け、12月5日には防
疫措置をすべて完了し
た。

現場の半径10キロ圏内の
4業者が飼育する鶏の検
査結果はいずれも「陰
性」。当面の封じ込め成
功を示す結果で、農水
省幹部は「今後のモデル
になる」「やっとな学習効
果を発揮できた」と一
様にほっとした表情を見
せた。

対処が重要

感染が判明した養鶏場

では、鶏舎の防鳥ネット
の網目が広がるなど問題
が見つかつた。野鳥の侵
入が複数回、目撃されて
いたことも分かり、感染
との関連が検討されてい
る。一方で、経営者が死骸
を見つけた時点で県に速
報したため、拡大が抑え
られたとの評価もある。
防疫措置の前倒しがク
ローズアップされる中、
養鶏の現場からは切実な
声も漏れてくる。

島根県内のある業者は
「今回は飼育数が2万羽
と少なかったことが、殺
処分に踏み切れた要因。
もっと大規模だったり感
染が急拡大したりした場
合はどうするのか」と指
摘。さらに鳥インフルエ
ンザは近年になって騒が
れ、多くは、対応した施

設になつていない。経営
が厳しい中での設備投資
は難しい」と、どこで発
生してもおかしくないと
の認識を示す。京都産業
大の大槻公一鳥インフル
エンザ研究センター長は
「どこの養鶏場でもワイ
ルスを完全に遮断するの
は不可能」と断言。発生
を前提にした対処方法の
構築こそ重要と説明す
る。

シベリア → 北海道 → 列島南下

感染新ルート 鳥インフル

来春まで警戒

研究者ら警言鐘

安来市内の養鶏場で高病原性鳥インフルエンザが発生した問題で、ウイルスの感染ルートが注目されている。専門家が有力視するのが、シベリアから飛来した渡り鳥が北海道から南下し、持ち込んだとする新ルートの存在。10月に稚内市でカモのふんから検出されたウイルス型が、今回の型と酷似しているため。研究者は「渡り鳥が繁殖地に戻る来春までは警戒が必要だ」と警鐘を鳴らす。

安道湖・中海で越冬する野鳥の宝庫で、10月から翌年3月に集中する。関心を示すが、発生農場の立地。養鶏場が水辺渡り鳥に詳しい東京大(約15万羽)。国内有数

<家きんの感染例>

時期	場所	農場数・処分羽数	ウイルス型
04年1月	山口県阿東町	1農場 鶏3万羽	H5N1型(強毒性)
04年2月	大分県九重町	1農場 鶏14羽	H5N1型
04年2月	京都府京丹波町	2農場 鶏24万羽	H5N1型
05年6月~06年1月	茨城県、埼玉県鴻巣市	41農場 鶏578万羽	H5N2型(弱毒性)
07年1月	宮崎県清武町、新富町、日向市	3農場 鶏16万羽	H5N1型
07年1月	岡山県高梁市	1農場 鶏1万羽	H5N1型
09年2月	愛知県豊橋市	7農場 うち約160万羽	H7N6型(弱毒性)
10年11月	安来市	1農場 鶏2万1500羽	H5N1型

<死亡した野鳥からの確認例>

時期	場所	野鳥の種類	ウイルス型
04年3月	京都府、大阪府	ハシブトガラス	H5N1型
07年3月	熊本県相良村	クマタカ	H5N1型
08年4、5月	十和田湖畔	オオハクチョウ	H5N1型
08年4、5月	北海道野付半島	オオハクチョウ	H5N1型
08年5月	北海道サロマ湖畔	オオハクチョウ	H5N1型

<その他>

時期	場所	検出対象	ウイルス型
10年10月	北海道稚内市	カモのふん	H5N1型

渡り鳥のルート



シベリア 新たなルート 稚内市 安来市 従来のルート

渡り鳥が周辺搬入濃厚

ウイルス経路で一致

国・疫学チーム

安来市内の養鶏場で発生した高病原性鳥インフルエンザの感染経路を調べている農林水産省の疫学調査チーム(チーム長・伊藤寿啓鳥取大教授、

6人が8日、東京・霞が関の同省で検討会の初会合を開いた。渡り鳥に

感染した可能性が強いとの見方で一致。引き続き、

鶏場の近くにある中海に多くの渡り鳥がいる一方、

感染ルートが見当たらないためウイルスは渡り鳥によって同養鶏場周辺に

持ち込まれたと考えるのが自然と分析。その上で、

野生物が進入できる構造であり、実際にネズミやハエを確認したことが理由に挙げられた。ただ、

渡り鳥が本州を南下する時季と重なる一点を挙げ、これまで未確認の新ルートに注目する。

「極東ロシア→サハリン→北海道→列島南下」などの北海道経由と、「ロシア中北部→中国→朝鮮半島→日本」などの日本海経由。

「新鶴の飄湖や山形の最上川河口など、野鳥の集積地で拡散する可能性が高い」とする。

同省は2007年、スズメなどの小鳥が通れない大きさとして、2羽以下が望ましいと都道府県に通知した。だが、2羽以上でも、罰則などがな

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

「極東ロシア→サハリン→北海道→列島南下」などの北海道経由と、「ロシア中北部→中国→朝鮮半島→日本」などの日本海経由。

「新鶴の飄湖や山形の最上川河口など、野鳥の集積地で拡散する可能性が高い」とする。

同省は2007年、スズメなどの小鳥が通れない大きさとして、2羽以下が望ましいと都道府県に通知した。だが、2羽以上でも、罰則などがな

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

「極東ロシア→サハリン→北海道→列島南下」などの北海道経由と、「ロシア中北部→中国→朝鮮半島→日本」などの日本海経由。

「新鶴の飄湖や山形の最上川河口など、野鳥の集積地で拡散する可能性が高い」とする。

同省は2007年、スズメなどの小鳥が通れない大きさとして、2羽以下が望ましいと都道府県に通知した。だが、2羽以上でも、罰則などがな

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

「極東ロシア→サハリン→北海道→列島南下」などの北海道経由と、「ロシア中北部→中国→朝鮮半島→日本」などの日本海経由。

「新鶴の飄湖や山形の最上川河口など、野鳥の集積地で拡散する可能性が高い」とする。

同省は2007年、スズメなどの小鳥が通れない大きさとして、2羽以下が望ましいと都道府県に通知した。だが、2羽以上でも、罰則などがな

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

「極東ロシア→サハリン→北海道→列島南下」などの北海道経由と、「ロシア中北部→中国→朝鮮半島→日本」などの日本海経由。

「新鶴の飄湖や山形の最上川河口など、野鳥の集積地で拡散する可能性が高い」とする。

同省は2007年、スズメなどの小鳥が通れない大きさとして、2羽以下が望ましいと都道府県に通知した。だが、2羽以上でも、罰則などがな

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

「極東ロシア→サハリン→北海道→列島南下」などの北海道経由と、「ロシア中北部→中国→朝鮮半島→日本」などの日本海経由。

「新鶴の飄湖や山形の最上川河口など、野鳥の集積地で拡散する可能性が高い」とする。

同省は2007年、スズメなどの小鳥が通れない大きさとして、2羽以下が望ましいと都道府県に通知した。だが、2羽以上でも、罰則などがな

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

安来市内の養鶏場での高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、鳥取県は8日、県内の88養鶏場に対して10、31日の間に消毒を実施するよう7日付で指示したと発表した。

主な高病原性鳥インフルエンザの感染例と対応

発生年月	都道府県	発生内容	対応
2005年6月24日	茨城県水海道市など	養鶏場などでH5N2亜型が検出	41農場約578万羽を殺処分
2007年1月11日	宮崎県清武町 岡山県高梁市など	養鶏場から相次いでH5N1亜型の感染確認	4農場で約17万羽を殺処分
2009年2月27日	愛知県豊橋市	ウズラ農場からH7N6亜型を検出	7農場で約160万羽を殺処分
2010年10月26日	北海道稚内市	沼地で採取したカモのフンからH5N1亜型が検出	まわりに養鶏場などがないため周囲の10キロの監視を強化
11月29日	島根県安来市	養鶏場からH5型に感染した鶏の死骸を発見	約2万1500羽を殺処分

鶏舎にネット

渡り鳥 感染源の可能性

高岡市で鳥インフルエンザ感染の疑いのあるコブハクチヨウの死骸が見つかったことについて、専門家は、今後、仮に高病原性と確認された場合、渡り鳥から感染した可能性が高いと指摘する。

高病原性鳥インフルエンザの最近の国内感染例を

みると、北海道稚内市で今年10月、野生のカモのふんから強毒性のH5N1亜型ウイルスが検出された。周囲に養鶏場がないことから、道は周囲10キロの監視を強化するにとどめた。

また、11月には島根県安来市の養鶏場で感染が発生し、同型のウイルスと確認。県は鶏約2万1500羽を焼却し、養鶏場から半径10キロ圏内の島根、鳥取両県の養鶏場で鶏や卵の移動制限を実施した。

京都産業大の大槻公一・鳥インフルエンザ研究センター長は、「簡易検査の結果では、まだ確定的なことを言うのは早い段階」と前置きした上で、「北海道ではカモのふんだけで、死骸は見つかっていないことから、感染したまま、ほかの土地へ渡った可能性がある。島根県でも渡り鳥を介して感染したと考えられる。今回も同じようなウイルスではないか」と推測する。お堀に飛来した渡り鳥のふんが感染源となった可

能性もあるという。周辺の養鶏場への感染拡大については、「野鳥の侵入を防ぐネットや消毒などの対策をきちんとしていれば、感染する可能性は少ない」という。だが、今回のように野鳥が自由に入り込める場所では感染を防ぐのは難しく、「感染の危険が高い時期には、鳥を隔離するしかない」と指摘する。

国内ではニワトリ以外に、2004年に京都府と大阪府でカラス、07年に熊本県でクマタカ、08年に北海道などでオオハクチヨウが高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した例がある。

読売新聞
北陸版

富山地域 28頁

「殺処分」苦渋の決断

お堀から次々捕獲

鳥インフル高病原性

暗闇の中、お堀のコブハクチョウが次々と捕獲され、殺処分の場所へ移送された。高岡市の市営高岡古城公園動物園のコブハクチョウ羽から高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5型)が検出された問題。市は感染拡大を防ぐため、同じ堀で飼っていた残りの鳥たちの処分を即断した。県内の動物愛護団体からは、「難しい問題だが、検査をしたうえで処分を決める方法もあったのでは」と複雑な声も漏れたが、高橋正樹市長は「人命を最優先するため、やむを得ない」ときっぱり言い切った。一方、感染が確定すれば県内初となる事態に、県は動物園周辺の監視区域設定、養鶏業者への立ち入り調査など対応を矢継ぎ早に決めた。

「だり衰弱したりしているハクチョウが見つかった場所」(7)



18日午後7時から開かれた高岡市の対策会議。職員から報告を受けている高橋市長に、石井知事から直接電話が入り、スピーカーホン機能で会議室内に声が響いた。

石井知事「H5型が確認された」

高橋市長「そうですか」

この後、高橋市長は「ハクチョウは市民に愛され、親しまれているが、古城公園は人家に近いこともあって、感染の拡大を防ぐために、お堀の下のり口など4か所にバリケードを設置することを決めた。動物園は引き続き閉園の措置が取られる。市による、県が監視区域を設定する期間に準じ、21日間とする」ことを想定している。

市と同じ時間帯に開かれた県の対策会議。動物園の半径10キロを1月7日まで監

高岡市長「人命優先 やむを得ぬ」



高病原性鳥インフルエンザと確認したことを報告する石井知事(右)(18日夜、県庁で)



コブハクチョウを捕らえに行く職員(18日午後8時23分、高岡古城公園で)

り、感染の拡大を防ぐために「やむを得ない」と語り、「人命最優先」として早急の殺処分を判断した。

コブハクチョウの死骸が見つかった同公園のお堀では午後8時15分頃から白い防護服、マスク姿の職員がコブハクチョウなどを捕獲した。約1時間には、ボートで移動しながら、羽ずつ手つかみで捕まえ、ケースに入れた。殺処分は午後10時20分に完了した。

また、市は、市民が近づけないように、お堀の下り口など4か所にバリケードを設置することを決めた。

行っほか、県内全28の養鶏農家などにも無償で消石灰を配布したり、注意喚起や立ち入り検査をしたりする

方針が示された。ハクチョウの飛来地を中心に状況確認やふん便の検査も行う。

石井知事は「伝染性の強い

「生かしてやるべき」悲しむ市民

お堀のコブハクチョウならどがすべて殺処分となったことに、同公園での散歩が日課という同市市川、無職福井修一さん(79)は「ハクチョウの姿にはいつも癒やされている。完全に隔離してでも生かしてやるべきで」と残念そう。同市あわ

「北日本動物福祉協会」の村田美南子代表(69)は「心情として、隔離して1羽1羽を調べてからでも遅くはないのではないかと思う」とした。

一方、富山市ファミリーパーク(富山市古沢)は、19日に園内の動物舎や池周辺に消毒液を散布することを決めた。感染の疑いが発表された17日から、飼育員の見回りを強化しているが、飼育する39種類の鳥類や、園内の池に飛来するカモなど野鳥に異常は見つか

と、カモの免疫力はハクチョウや鴨よりも強い。稚内、安来両市ではカモの死体は確認されておらず、北アジアから飛来したカモが、北海道から西日本に移動する間にウイルスを広げた可能性があるとされている。最近では韓国西海岸周辺でも、よく似たウイルスがマガモなどから検出されているといい、北アジア周辺で同じウイルスが拡大していることも考えられるという。

京都産業大学の太槻公一・鳥インフルエンザ研究センター長は、今回検出されたH5型ウイルスが、北海道稚内市のカモのふんから10月に検出され、島根県安来市の養鶏場でも11月に感染が確認されたH5N1型ウイルスに近いことに着目している。

大槻センター長による

約60坪の水田に毎年数百羽が飛来する富山市野中の「白鳥の里」。所有者で近くの農業、室田精真さん(74)によると、水田には18日現在、コブハクチョウ約150羽とカモ約300羽がいるが、異常がある鳥は見つかっていない。今後、県などと相談して餌やりの自粛を検討するという。

ウイルスなので蔓延しないように」と訴えた。動物園のコブハクチョウは家畜伝染病予防法の対象外で、感染拡大を防ぐ農林水産省のマニュアルはない。県は、県内のほかの動物園についても異常死がなければ、監視強化の徹底を呼びかけていくという。

処分に規定なし 危惧する識者も

京都産業大学の太槻公一・鳥インフルエンザ研究センター長は、今回検出されたH5型ウイルスが、北海道稚内市のカモのふんから10月に検出され、島根県安来市の養鶏場でも11月に感染が確認されたH5N1型ウイルスに近いことに着目している。

大槻センター長による

約60坪の水田に毎年数百羽が飛来する富山市野中の「白鳥の里」。所有者で近くの農業、室田精真さん(74)によると、水田には18日現在、コブハクチョウ約150羽とカモ約300羽がいるが、異常がある鳥は見つかっていない。今後、県などと相談して餌やりの自粛を検討するという。

鳥インフル ツルの聖地 衝撃

近隣 有数の養鶏地

国の特別天然記念物でもある「万羽鶴」の里に衝撃が広がった。例年1万羽を超えるツルが飛来する鹿児島県出水市の出水平野で、高病原性鳥インフルエンザに感染したナベヅルが見つかった。出水地方は、養鶏が盛んな同県内でも有数の生産地。観光資源と基幹の養鶏業をともに守るため関係者は対応に追われた。

＝1面参照

「一番警戒していた侵入ルートで感染が出た。この先を考えると、ソツとする」

県幹部は絶句した。

養鶏産出額日本一の鹿児島県。鳥インフルエンザへの警戒心はもともと強かった。11月に鳥根県で発生すると、養鶏業者らを集めた緊急会議で防疫の徹底を呼びかけた。

出水地方は有数の養鶏地帯だが、その一方で、干拓地で池も多く、ツルなど野鳥の飛来も多い。「ウイルスの侵入リスクは高い」と、県が最も警戒していた地域だった。

出水市と境を接する同県阿久根市の養鶏会社経営の男性も「ついに来たか、という感

観光施設閉鎖も

出水市は21日夕、緊急の対策会議を開催。農協や観光関係者らに前に、渋谷俊彦市長は「出水市は全国に名だたる養鶏産地。鶏に感染すると大変な事態になる。地域経済、市民生活に影響する」と語った。ツルは毎年10月にシベリア

から飛来し、翌年3月まで越冬する。11日の調査で1万3006羽を数え、1万羽以上の「万羽鶴」を14季連続で記録した。この時期は市の観光にとってかき入れ時だ。しかし、会議後の記者会見で渋谷市長は、人の靴や衣服を介したツルへの感染拡大を防ぐた



出水平野を舞うナベヅルの群れ

＝21日午後4時37分、鹿児島県出水市、溝脇正撮影

国内の主な鳥インフルエンザ確認例

2004年1月	山口県 (鶏)
2月	京都府 (鶏)
07年1月	宮崎県・岡山県 (鶏)
08年4月	秋田県 (オオハクチョウ)
5月	北海道・青森県 (オオハクチョウ)
10年10月	北海道 (カモ)
11月	鳥根県 (鶏)
12月	富山県 (コブハクチョウ)
	鳥取県 (コハクチョウ)

う、となると思っ」と暗い表情。隣の花屋を手伝う男性(79)は「大きな工場が相次いでなくなり、さらに養鶏などにも影響が出るとなると希望が持てない」と話した。

野鳥：対応苦慮

出水のツルとその渡来地は国の特別天然記念物。日本野鳥の会によると、ツルの越冬地は国内に10カ所ほどあるが、ほとんどの個体は出水平野に集中している。会では、ツルの一斉感染のリスクを減らすため、越冬地の分散に取り組んでいるが、エサの豊富さなどから出水以外への分散は進んでいない、という。

感染拡大防止の殺処分や移動制限など強制力のある対応は家畜伝染病予防法に基づき措置で、あくまでも家畜が対象。野生のツルは対象外だ。国の特別天然記念物は捕獲にも文化庁長官の許可が要る。ただ、緊急な場合や弱った個体の保護などは許可なくできると文化財保護法は定めており、「感染が確認されれば緊急といえる」(同庁)。

県自然保護課の曾宮和夫課長は「野生のツルを捕まえて殺処分したり、移動を制限したりすることは現実的、物理的に非常に困難。鶏を守るためには人や物の消毒を徹底し、小動物や野鳥が鶏舎に入

らないようにするしかない」と防疫の難しさを懸念した。それでは感染の広がりを防ぐ手立てはあるのか。大槻公一・京都産業大鳥インフルエンザ研究センター長は「弱った鳥や死んだ鳥をいち早く見つけ、ウイルスがまき散らされないように、きちんと隔離するしかない」と指摘する。

養鶏家 不安広がる



出水鳥インフル

「防疫徹底するしか」 観光に打撃懸念も

観光に打撃懸念も

「とうとうきたか」。ナベツルの鳥インフルエンザ感染が21日確認された国内最大の越冬地、鹿児島県・出水市野。ツルが来る、この地を飛び立つまで感染への「防壁」を固めるしか手だてはなく、地元には戸惑いが広がる。全国有数の養鶏業、そしてツルを自当てに足を運ぶ観光客らへの影響を心配する声も相次いだ。

〈本文記事一面〉

●養鶏場(後方の白い屋根の建物)の近くを飛びツル(21日午後、鹿児島県出水市で) ●ツルへの鳥インフルエンザの感染が確認されたと発表する出水市長(左から2人目、同日午後8時42分、出水市役所で)＝いずれも大原一郎撮影



「外部との接触を避け、消毒などの対策をきちんとする以外にない」。ツルの越冬地から東に約4キロ離れた出水市平和町で養鶏業を営むマリイ農協組合員末永祐一郎さん(41)は声を落とした。同農協では、約170人の組合員が約250万羽の採卵鶏などを飼育している。感染確認後、養鶏農家には他農場へ出入りしないよう呼びかけ、鶏の移動を制限するなど防疫強化を指示した。約40万羽を飼育する赤鷄農協(出水市野田町)も22日に発生地から10キロ圏

内に入る12農場の調査をする方針だ。しかし、感染が終息に向かうか不透明なだけに経営への不安は募る。出水市内で数万羽を育てている養鶏業男性は「深刻な事態。自分の鶏舎は自分で守るという意識で防疫に集中するしかない」と頭を抱えた。

観光

出水市のツル目的の観光客数は21万人前後とみられ、ダメージへの懸念が強い。市観光協会の浜田政信副会長(64)は「ツルは市の代表的な観光資源。とうとう来たかという思い」と顔をしかめた。ツルを間近で見られる市ツル観察センターの近くで40年前から食堂を経営する男性(59)も「休業しなければならぬかもしれない」と表情を曇らせる。

隣県危機感あらわ

鹿児島県出水市に飛来したナベツルの鳥インフルエンザ感染が確認された21日、各地に波紋が広がった。「いよいよ隣県にまで迫ってきた」。2007年に鳥インフルエンザの発生で計約20万羽の鶏が殺処分された宮崎県。この日午後5時から、東国原英夫知事や関係部局長らが顔をそろえた緊急対策会議の場で、高島俊一農政水産部長は危機感をあらわにした。

市役所

出水市の波谷俊彦市長はこの日午後8時40分から市役所で記者会見し、「何となくも鶏への感染を防がなければならぬ。万全の体制を敷く」と決意を語った。

他の鳥から拡大か

大槻公一・京都産業大鳥インフルエンザ研究センター長の話「カモなど他の鳥から感染が広がった可能性が高い。水鳥の腸で増えたウイルスはフンに含まれ、水中に広がる。それをほかの鳥が口や尻を通じて感染するとみられる。ツルを餌付けしている出水平野は多くの鳥が集まりやすいため、フンも大量に集まり、感染の危険性が高まる」

二次感染の防止を

後藤藤孝・宮崎大教授(動物感染症)の話「シベリアなどから日本にきている渡り鳥の相当数が感染している可能性がある。恐ろしいのは食用の鶏などへの二次感染。養鶏場などでは、野鳥の侵入を防ぐネットを張り、渡り鳥が空から落とすフンで感染しないよう消毒を徹底すべきだ。また、道ばたなどに落ちた渡り鳥のフンに触れた人間や、ネズミなどの小動物がウイルスを鶏舎に持ち込む恐れもある。注意してほしい」

各国協調で淘汰せよ

喜田宏・北海道大教授(ウイルス学)の話「H5型の高病原性鳥インフルエンザは1997年に香港で発生。それが鶏などのワクチン接種に頼りすぎて殺処分が徹底されなかった中国やベトナム、インドネシアなどで生き残り、渡り鳥がシベリアなどに持ち帰った。各国が協調して、淘汰に乗り出さない限り、ウイルスはなくなる」

鳥根県安来市での11月末の感染確認を受け、100羽以上の鶏を飼育する農場を対象に立ち入り調査を続けているが、22日に獣医師や養鶏関連団体、市町村の担当者らによる臨時会議を開くことを決めた。熊本県では、強毒性ウイルスが確認された場合、水俣市の養鶏農家1軒が国の防疫指針で定められた監視区域(半径10キロ圏内)に入る可能性があるため、この農家の鶏約60羽を緊急調査した。異常は確認されていないが、県内の全養鶏農家に職員を巡回させるなどして予防を呼びかけた。福岡県は、県内の養鶏農家など24軒に、野鳥との接触を防ぐ感染防止用ネットに破損がないか確認し、畜舎の消毒を徹底する

鳥インフル 給餌割れる判断 農作物保護か防疫か

ナベヅルの死骸から検出された高病原性鳥インフルエンザウイルスは強毒性だった。国内最大のツルの越冬地、鹿児島県出水市。「当初から最悪の事態を想定して動いていた」と出水市長は淡々と語った。一方で、野鳥の防疫対策で法令が整備されていない現状に問題提起をした。

【一面参照】「危機管理体制のあり方を考える契機にしたい」

22日、ウイルスが強毒性との報告を受けて記者会見した出水市長はそう強調した。この日、市は感染拡大防止のため、観光施設の閉鎖や交通規制に踏み切った。ただ、家畜伝染病予防法は野生生物を対

象としておらず、市の規制は「自主的にやっている状態」(出水市長)だ。

「法が整備されれば地域の皆さんに法律に基づいてお願いできる。今回の事案を契機としてぜひお願いしたい」

環境省を通じて依頼する鳥取大での検査についても、感染が広がれば追いつかなくなるとして、鹿児島大など、より近い施設で検査体制を整えることが必要だと指摘した。

出水市には1万羽を越すツルが飛来する。専門家の中には、ウイルスを持った野鳥が集まることで、給餌が感染リスクを高めるとの声もある。市は感染確認後も給餌を続

けている。県ツル保護会によると給餌を始めたのは1954年。農作物被害防止が一番の目的だった。その考え方を出水市長も尊重する。ツルを1カ所にとどめ、他地域への感染拡大を防ぐ狙いもある。

国内には鳥インフルの感染を防ぐため、渡り鳥への給餌をやめる動きがある。マナツルの飛来コースにあたる佐賀県伊万里市も22日、マナツルへの給餌中止を発表した。

大槻公一・京都産業大鳥インフルエンザ研究センター長は出水の場合、単純に給餌をやめればよいという状況はないと認めつつも、ウイルスの主な運び役とみられるカモとの接触を問題視する。「餌

付けをするとカモも必ず寄ってくる。カモに接触した鳥が感染する。餌やりで近づいた人にウイルスがくっついて運ばれる心配もある。鳥インフ

ル対策には自粛が望ましい」40年間、給餌を続けるツル監視員の時吉秀次さん(60)は「分散先の受け入れ態勢ができるかも疑問だ。専門家には



回収…ため息

鳥インフルエンザの発生で立ち入り規制区域となったツル観察センターの土産物店では、隣接する阿久根市特産の「ほんたん」を生産者が回収していた。22日、鹿児島県出水市、溝脇正撮影

なぜ、喫煙は体に悪いのか。人体に害があるといわれるたばこの煙だが、健康が悪化する科学的な理由は一般的に知られていない。たばこの煙が人の免疫に与える影響などを研究する京都産業大学総合生命科学部の竹内実教授(免疫学)が、立命館中学校(京都市伏見区)で行った「博士の出前授業」。中学2年の計34人は、顕微鏡を使った免疫細胞の観察などを通して、たばこの害を「科学」した。

授業のテーマは、「たばこの煙による肺への害や免疫機能の低下」。授業の冒頭で、竹内教授はたばこの煙に約6千種類の化学物質が含まれていることを提示。その中には、発がん物質や肺の細胞を傷つける物質などがあることを図で分かりやすく説明した。

次に、体外から肺に入る細菌などの異物を処理して感染を防ぐ哺乳類の免疫細胞「肺マクロファージ」を紹介。

京産大・竹内実教授

in 立命館中

博士の 出前授業

免疫細胞でたばこの害を「科学」

自動喫煙装置で10日間たばこを吸引させた実験用マウスの同免疫細胞を調べた実験の結果を示した。喫煙マウスと、非喫煙マウスの体内の写真と比較し、喫煙マウスの同免疫細胞が縮んでいることを説明。「異物を処理する機能が明らかに低下している。喫煙すると、肺マクロファージが弱まり感染が起こりやすくなる」と解説した。

同免疫細胞は、異物を死ぬまで攻撃し続ける特質も持つことにも言及。「吸引したたばこの化学物質は攻撃で消えることなく、同免疫細胞が「永遠に」働き続けなければならなくなる」と話した。結果、同免疫細胞のDNAが損傷され「肺や体全体の免疫機能の低下や、がん化にもつながる」とした。

その後、生徒は、マウスの同免疫細胞を顕微鏡で観察。



竹内教授(左)の指導を受けながら、肺マクロファージの観察に取り組む生徒
—立命館中学校

これまで見たことがない薄い青紫色をした「体の救世主」の姿に「こんな細胞が、人の体内にもあるんだ」と驚いた

様子だった。

授業後、生徒からは、たばこを吸わなくても喫煙者の煙を吸ってしまう「受動喫煙」の被害についての質問などが相次いだ。竹内教授は「受動喫煙の方が有害物質が入ってきやすい危険性がある。喫煙者は、周りの人に迷惑をかけるように分煙室で吸うなどのエチケットが必要」とした。そのうえで「これだけの害が科学的に証明されているので、たばこが体に悪いという事実だけは胸に留めておいてほしい」と訴えた。

授業を受けた池田智君(14)は「漠然と『健康に良くない』と聞いていたたばこが、具体的に何が悪いのか分かり、納得できた」。竹内教授は「難しい科学の用語が出てきたにもかかわらず、生徒が熱心に聞いてくれた。たばこの害には解明されていない多くの謎がある。授業をきっかけに、同じ分野を研究する学者が将来、生まれてくれればうれしい」と話した。

京都大胸部疾患研究所(現再生医学研究所)で、当時注目を集めていた免疫学の研究を始めた。もともと腫瘍学を専攻していたが、人にも対象を広げ、大気汚染などの有害物質を取り込んだ肺で何が起きているのかを探った。「肺は外界と直接接する。動物の生体防御システムの最も重要なメカニズムがある」と思った。



異物食べる働き低下

色しているものもある。同じ病気で、こんなに個人差があるのはおかしい。理由をあれこれ考え、気付いたのが「たばこ」だった。喫煙者の白血球は数が多くて黒く、「肺胞『真っ黒マクロファージ』」と呼ぶことにした。

肺胞マクロファージは、呼吸で肺の中に入った有害物質や細菌、ウイルスなどを食べて分解する。肺の免疫系の最前線で活躍する肺胞マクロファージの働きに、喫煙が影響するのではないかと考え、別荘に京都産業大で喫煙を科学する研究を始めた。マウスにたばこを吸わせると、最初は煙を嫌がるが、しばらくすると中毒性のニコチンの効果で、人と同じように吸うようになる。1日15分吸

肺胞マクロファージ黒く肥大

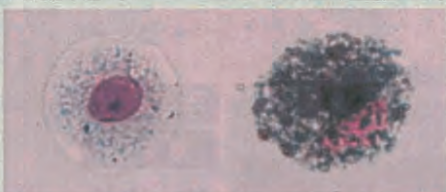
10月1日からの大幅な値上げを前にたばこをやるか、やめないか、悩む人が増えている。財布との相談をよそに、紫煙は肺の奥にまでたどり着き、人に備わった異物に対する防御システムに狂いを生じさせているという。京都産業大の竹内実教授は、肺で見つけた真っ黒な白血球から、たばこが引き起こす呼吸器疾患のメカニズムに迫っている。

竹内教授は、1979年に



たばこが起す呼吸器疾患

——竹内 実 京都産業大総合生命科学部教授



非喫煙者の肺胞マクロファージ(左)。毎日40本のたばこを30年(にわたって吸っている人のマクロファージ(右)は真っ黒に変化していた(竹内教授提供)

活性酸素増やし、がん

憂染帳

真っ黒マクロファージ

たばこ価格の一斉値上げをきっかけに、禁煙する人が増えたという。実家の父は数十年来の愛煙家。何度か禁煙を勧めたが一向に耳を貸さない。頑固な父を説得できる材料を探そうと、免疫学の観点から喫煙を科学する研究者を訪ねた。

京都産業大学総合生命科学部の竹内実教授(59)は約20年前、肺にいる免疫細胞の一種「肺胞マクロファージ」が、喫煙者で真っ黒になっていることを発見。これをマクロファージならぬ「真っ黒マクロファージ」と名付けた。

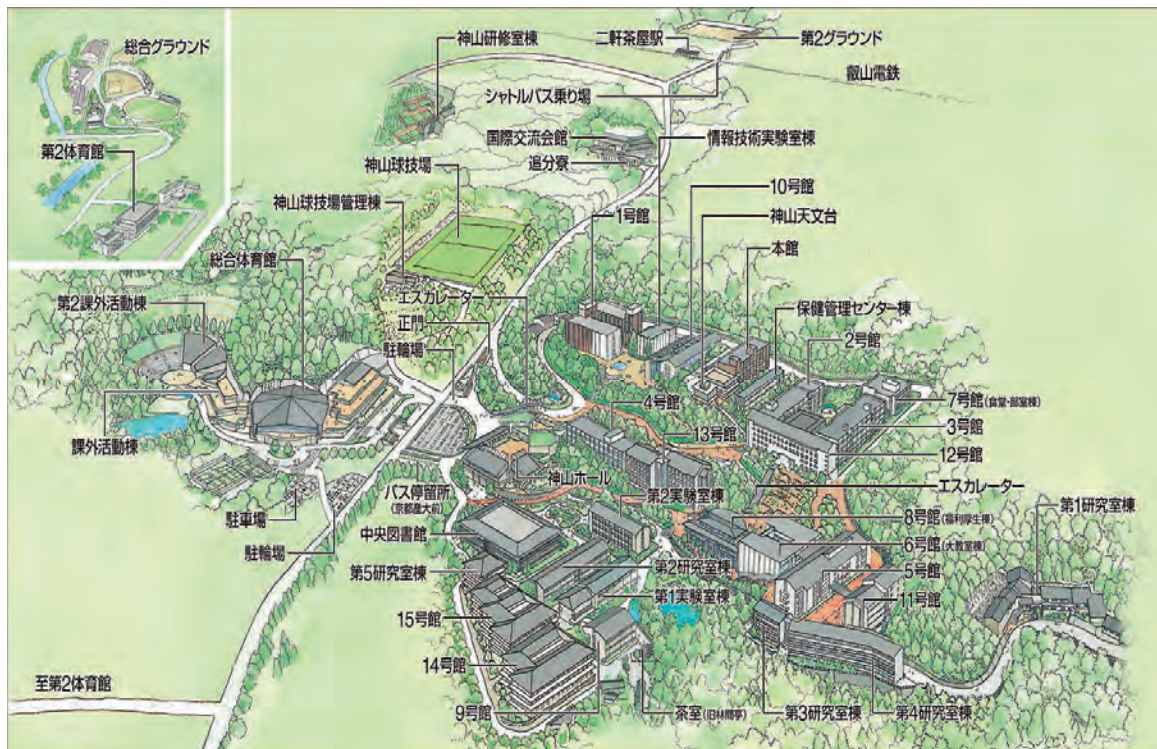
真っ黒になる原因は、たばこの煙に含まれる炭粉。マクロファージは肺に侵入したウイルスや細菌を食べて病気を防ぐが、炭粉を食べた後では細菌を食べられず感染症に対抗できない。竹内教授はまた、真っ黒マクロファージから過剰に分泌された活性酸素が、周囲の細胞のDNAを傷つけることも突き止めた。

喫煙を控えれば「真っ黒マクロファージ」は元通りきれいになる。「長年の研究で、たばこは『百善あって一利なし』だと証明できた」と竹内教授。今度実家に帰省した時には、「真っ黒マクロファージ」の写真を父に見せよう。

【菅沼舞】

2010. 11. 30

キャンパスマップ



総合生命科学部関連校舎等

名 称	配 置
第 1 実 験 室 棟	生命資源環境学科
1 6 号 館	総合生命科学部事務室（1F） 動物生命医科学科（B1F）
9 号 館	生命資源環境学科（2F・3F）
1 5 号 館	生命システム学科・動物生命医科学科

京都産業大学総合生命科学部 年報

第1号 2010（平成22年）

発 行 日 2011（平成23）年10月1日

発 行 者 京都産業大学総合生命科学部

〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

TEL 075-705-1466 FAX 075-705-1914

<http://www.kyoto-su.ac.jp/department/nls/>