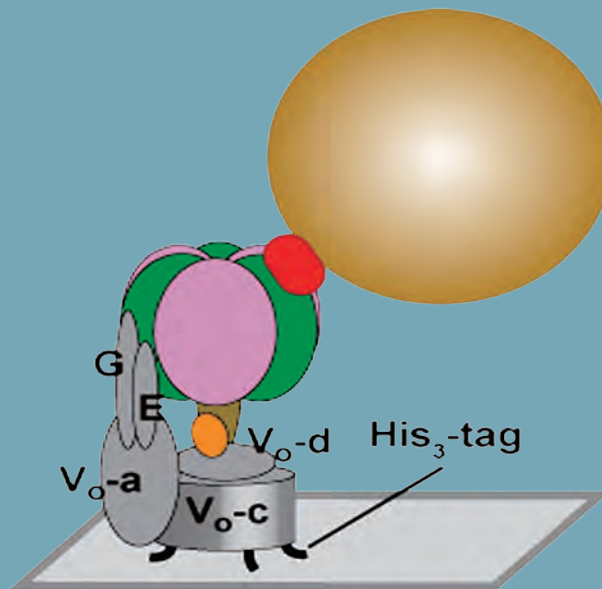


ISSN 2186-5507

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2号》

2011
平成23年

H(+)-ATPase/synthase ステップ回転の解析

---回転分子モーターVoV1 の30 度ステップ回転観察系---

VoV1 を膜内在性の回転リング (Vo-c)に導入したヒスチジンタグでガラス基板に固定し、外周固定子であるA サブユニット (緑で表示) に直径 40 nm の金粒子 (金色で表示) を結合させた。ATP 存在下で 金粒子の動きを観察した結果、プロトン移動と関連する可能性がある 30 度おきのステップ回転が初めて検出された。(横山謙ら: Nature Commun. 2011; 2: 233 より引用)

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	2
平成23年活動記録	
生命システム学科	
生命システム学科の構成	4
永田和宏教授(学部長)	6
嶋本伸雄教授(副学部長)	11
中田博教授(学科主任)	15
黒坂光教授(副学科主任)	19
板野直樹教授	23
佐藤賢一教授	26
瀬尾美鈴教授	29
中村暢宏教授	34
浜千尋教授	36
福井成行教授	39
横山謙教授	41
伊藤維昭客員教授	43
八杉貞雄客員教授	46
吉田賢右客員教授	50
生命資源環境学科	
寺地徹教授(学科主任)	53
野村哲郎教授(副学科主任)	57
津下英明教授	59
山岸博教授	62
米澤勝衛教授	65
金子貴一准教授	67
河邊昭准教授	69
木村成介准教授	71
高橋純一准教授	74
本橋健准教授	77
動物生命医科学科	
動物生命医科学科の教育研究活動	80
大槻公一客員教授(学科主任)	93
竹内実教授(副学科主任)	96
加藤啓子教授	100
齋藤敏之教授	103
前田秋彦教授	106
松本耕三教授	109
村田英雄教授	111
高桑弘樹准教授	113
西野佳以准教授	114
今野兼次郎助教	116
染谷梓助教	118
棚橋靖行助教	119
年報第2号発刊にあたって～総合生命科学部事務室から～	121
2011年総合生命科学部主催シンポジウム等一覧	122
新聞掲載記事	127

巻 頭 言

総合生命科学部長

永 田 和 宏

京都産業大学に総合生命科学部が創設されたのが、2010年4月。本年2011年は、2年目の年にあたる。本学部では、創設1年目から、毎年「京都産業大学総合生命科学部 年報」を出版し、教員の教育、研究活動に関して、自己評価を行うとともに、互いの研究活動に関して、情報交換のための資料とすることとした。

本学では、学部単位のこのような年報は初めてのことであったが、幸い他学部や他大学の方々からも、お読みくださって感想をいただいてもおり、おおむね好評であったと自負している。

私立大学においては、文系においても理系においても、教育に重心が置かれることは当然のことである。学生に優れた教育を保障することは、大学としての最重要の課題である。良質の教育を行い、学生の満足を得ることは、私立大学に勤めるものにとって必要条件である。しかしながら、それだけでは決して十分ではない。

大学という場における、本当の教育には、単なる知識の伝授以上に重要なことがあると考えている、優れた研究を現在進行形で行っている研究者が、サイエンスの最前線に身を置きながら、そこで何が問題になっているのかを肌で感じつつ、その興奮と興味をヴィヴィッドに学生に伝えること、それこそが大学における本来の教育ではないだろうか。

本学部では、創設以来、研究活動を十分に行いつつ、それが教育の場に生かされるということを理想として、学部におけるコンセンサスの形成を行ってきた。本年報に記された、本年の成果、業績などもその一端を反映している筈である。

本年報は、学部内の教員が共有することはもちろんであるが、その他にも大学院生、さらに学部学生のすべてに配布される。学生たち自身が、自分たちがどのような研究環境とアクティビティのなかで教育を受けているのかを、肌で感じて欲しいと願うからに他ならない。

本学部は3学科にわかれているが、生命科学のような学問は、一学科単独の知識や情報で十分カバーできるものでないことは言うまでもない。3学科のすべての教員がそれぞれ互いに協力しながら、学科横断的に学生たちに良質の教育環境を保障しなければならない。互いの研究内容を互いに知ることは、そのためにも必須のことであろう。

そのような点を反映させながら、年報としての価値を高められるよう、そして、教育、研究のいっそうの実があがるよう、教員一同努力を進めていくほかはない。

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 (平成23年7月末迄) 潮 田 亮 (平成23年10月から)	萩 原 誠 智 平 山 尚 志 郎 森 戸 大 介 Chu Xiaoping	新 木 和 孝 美 石 田 玉 美	真 砂 有 作	木 曾 和 美 子 福 田 泰 美
	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	柏 竹 雅 美 内 田 信 介 吉 田 信 介
	学科主任	教授	中 田 博	秋 石 田 薫 戸 田 有 希 子 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 清 水 昭 男	
		教授	福井成行					川 原 瑞 穂
		教授	佐藤賢一	ハツ AKM マジック				横 山 朋 子
		教授	板野直樹			飯 島 順 子	中 村 武 志	
		教授	中村暢宏		石 田 竜 一		田 名 邊 雅 子	
		教授	浜千尋	中 山 実				
		客員教授	伊藤維昭	千 葉 志 信	岸 川 淳 一 下 川 直 美		由 良 隆	中 西 温 子
		客員教授	八杉貞雄	石 井 泰 雄				藤 本 聖 恵 石 崎 陽 子 中 嶋 晶 子
	客員教授	吉田賢右	元 島 史 尋	寿 野 良 二 野 島 達 也	元 島 優 子	中 村 純 治		
生命資源環境	学科主任	教授	寺地徹	高 橋 亮 ギヤウリ ヤクノ プラット	辻 村 真 衣 吉 見 麻 衣 子	野 添 幹 雄 山 本 真 紀	富 岡 関 子 植 村 香 織	
	副学科主任	教授	野村哲郎			古 高 肇		
		教授	津下英明	鶴 村 俊 治			秋 浩 津 守 耶 良 村 田 裕 津 吉 澤 奈 津	
		教授	山岸博	高 安 橋 亮 本 景 太	田 中 義 行		山 下 陽 子	
		教授	米澤勝衛					
		准教授	金子貴一					
		准教授	河邊昭		吉 田 貴 徳	吉 田 初 佳		
		准教授	木村成介		中 山 北 斗		中 山 尚 内 益 朗 大 海 俊 介 清 庭 伸 也 竹 内 拓 哉 藤 本 卓 剛 矢	
	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			池 永 充 宏 伊 藤 大 西 隆 栗 田 野 知 修 近 野 江 由 明 杉 田 江 真 美 村 邊 輝 子 北 村 佳 史		
	副学科主任	教授	竹内実			佐 倉 正 明	廣 野 由 里 子	
		教授	松本耕三					
		教授	加藤啓子				小 山 田 晃 西 崎 大 貴 橋 口 麻 由 秋 本 吉 子 本 吉 信	
		教授	齋藤敏之					
		教授	前田秋彦			米 嶋 万 有 子		
		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						

総合生命科学部事務室スタッフ名簿

スタッフ等名簿	
大学院生	その他
小谷友理(M2) 浅野慶太(M1)	伊藤進也(大学院委託生) 川崎邦人(大学院委託生) 垣花太一(大学院委託生)
Sherubakowa Kisenia Paburofuna(D1)	
万木肇(D3) 岡本陽己(M2) 森勇伍(M2) 奥村蓉子(M1) 笹野昂太(M1) 和澤元(M1)	佐々木綾(大学院委託生) 村上憲(大学院委託生)
辻康宏(M2) 藤原浩喜(M2) 金田鋭一(M1) 川合多美子(M1) 和田あゆみ(M1)	
吉田亜佑美(M2)	
松本尚士(M2) 紀平成(M1) 吉田潤平(M1)	
	Theerawut Chanmee (外国人特別生)
高橋由樹(M1) 田中翔太(M1)	
藤井裕也(M2) 辻村朋彦(M1) 村田洋樹(M1)	
柴田幸平(M2) 土山悠(M2)	
津田瑞江(M2) 堤厚善(M2) 牟田部天平(M2) 羽瀨加菜子(M1) 森悠太(M1)	
廣谷潤(M1)	
森章博(M2) 山岡敏之(M2)	
川添彩香(M2) 重吉瑛里(M2) 野瀬雅仁(M1) 佐々木大樹(M1)	
Velado Fernandes Igor(D1)	
Sarawut Taksinoros(D1)	
庄司早希(M1) 堤直人(M1)	

役職名等	氏名
学長室 総合生命科学部長補佐	井上朋広
教学センター課長補佐(総合生命科学部担当)	鈴木伸男
教学センター課員(総合生命科学部担当)	仲村啓吾
教学センター契約職員(総合生命科学部担当)	加藤友香
教学センター契約職員(総合生命科学部担当)	平元美穂
教学センター契約職員(総合生命科学部担当)	向井真子
教学センター嘱託職員(実験補助員)	荒木佳奈子
教学センター嘱託職員(実験補助員)	岡本沙矢香
教学センター嘱託職員(実験補助員)	西村香里
教学センター嘱託職員(実験補助員)	福田美樹
教学センター嘱託職員(実験補助員)	久富利恵
教学センター嘱託職員(実験補助員)	宮川真由子
教学センター嘱託職員(実験補助員)	吉田哲治
教学センター特定職員(RI業務担当)	碓山葉子

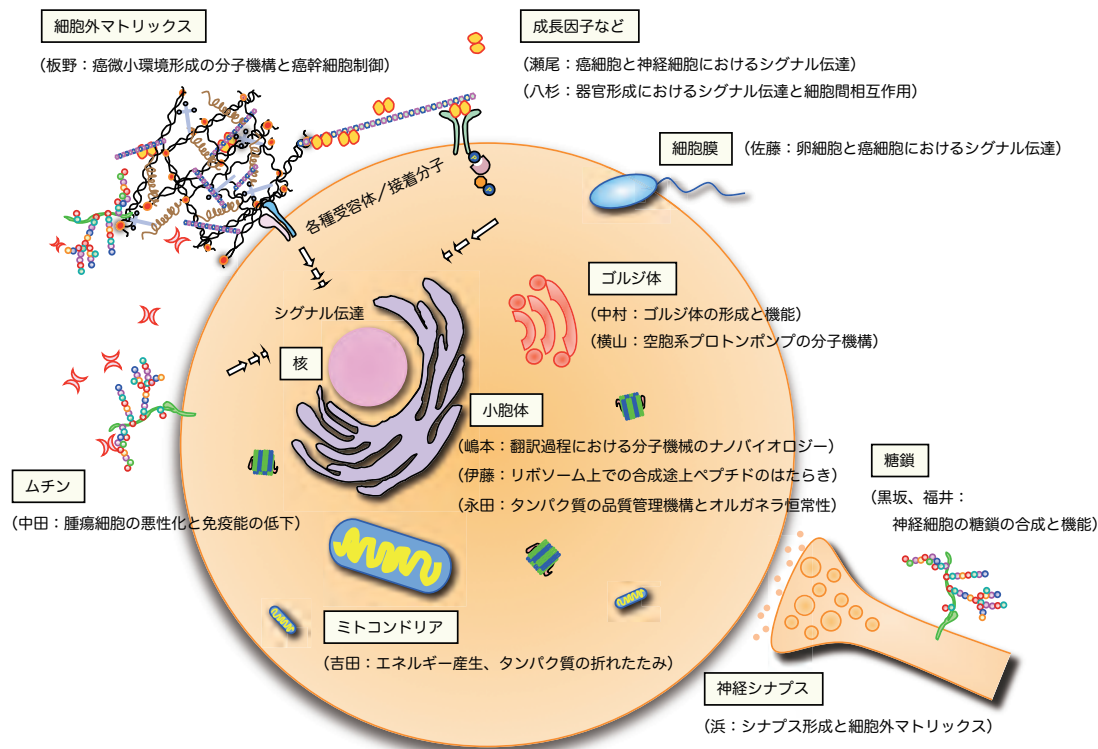
全学委員会等委員名簿

委員会等名称	委員氏名
全学共通カリキュラム委員会	永田和宏
全学共通カリキュラム推進委員会(総合生命科学部)	本橋健
人権センター運営委員会	前田秋彦
人権委員会	米澤勝衛
人権センター窓口相談員	西野佳実
リエゾンオフィス運営委員会	竹内実
交通対策委員会	高桑弘樹
省エネルギー推進委員会	金子貴一
自己点検・評価運営委員会(工学部)	佐藤賢一
自己点検・評価運営委員会(総合生命科学部)	中村暢宏
自己点検・評価運営委員会(工学研究科)	佐藤賢一
FD/SD推進ワーキンググループ(総合生命科学部)	嶋本伸雄
教務委員会(総合生命科学部)	本橋健
学生部委員会(兼・奨学生選考委員会)	前田秋彦
学生寮教育スタッフ	今野兼次郎
障がい学生支援委員	福井成行
入学試験委員会	横山謙
進路センター運営委員会	津下英明
図書館委員会	齋藤敏之
国際交流推進委員会	村田英雄
留学生アドバイザー	高橋純一
大学院委員会	佐藤賢一
教職課程講座センター運営委員会	八杉貞雄 浜千尋
キャリア教育研究開発センター運営委員会	山岸博
情報基盤運営委員会	板野直樹
ネットワークセキュリティ所属管理責任者 (ネットワークセキュリティ委員会)	棚橋靖行
論集編集委員会	吉田賢右

生命システム学科の構成

学科主任： 中田 博

[研究]



[教育]

科目名	担当教員
フレッシューズセミナー	伊藤、吉田、黒坂、福井、永田、瀬尾、佐藤、八杉、中田、嶋本、中村、浜、板野、横山
生物学通論A、B	八杉、嶋本
化学通論A、B	横山
生命システム概論	吉田、永田
分子生物学	伊藤、瀬尾
遺伝子工学	伊藤、嶋本
物質生物化学	黒坂、浜
代謝生物化学	吉田、中田
細胞生物学	福井、永田
発生生物学	佐藤、八杉
システム生物学	中村、板野
バイオ解析科学	中村、板野
タンパク質制御システム	吉田、永田
糖鎖生物学	福井、中田
細胞情報システム学	瀬尾
免疫学	中田
神経生物学	浜
構造生物学	横山
腫瘍生物学	佐藤
再生システム学	八杉
放射線生物学	黒坂
薬理学	板野
生命システム演習Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ	瀬尾、板野、横山、黒坂、中村
生命システム英語購読Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ	黒坂、嶋本、吉田、中田、伊藤、永田
生物学実験	福井、佐藤、中村、浜
生命システム実習Ⅰ、Ⅱ	伊藤、吉田、黒坂、福井、永田、瀬尾、佐藤、八杉、中田、嶋本、中村、浜、板野、横山
基礎特別研究	伊藤、吉田、黒坂、福井、永田、瀬尾、佐藤、八杉、中田、嶋本、中村、浜、板野、横山
応用特別研究	伊藤、吉田、黒坂、福井、永田、瀬尾、佐藤、八杉、中田、嶋本、中村、浜、板野、横山

(注：化学実験は非常勤講師によって行われている。)

生命システム学科は、生命現象をシステムとして統合的にとらえることを学科の教育・研究の基軸としている。バイオに関する情報量が飛躍的に増加し、生命現象を様々な視点より把握することが可能となった。情報量の増加は必然的に内容の細分化をもたらすことから、一方で、全体を俯瞰するスタンスも重要であり、生命現象をシステムとしてとらえる立場は、理に叶っている。

前ページの図は、生命システム学科構成員の研究レベルでの対象となる現象、物質、あるいは場所をとりあげて守備位置を示したものである。生命システムの基本単位は細胞であるが、細胞を舞台とした生命現象は、細胞の周囲との関わりの中でその恒常性が保たれている。細胞の内外における細分化された現象を、全体としては統合的にとらえる体制となっており、教育にも反映される。(なお、複数のテーマで研究を行っている教員もあり、詳細は各教員の項目を参照していただきたい。)

前ページの表は専門教育科目名と担当教員名(助教を除く)を示す。可能な限り研究内容に関連性の高い講義科目を担当している。“研究無くして教育もなし”とよく言われる。講義を単なる知識の伝達にするのではなく、個々の研究領域における研究を通じて得た経験、多くの研究者による発見の経緯や普遍的事実として確立するまでの背景などを調味料として講義に活かすことが肝要であるという意に解している。その意味で適材適所の布陣と考えている。

本学科は定員45名に対して14名の専任教員で教育・研究を担当し、少人数教育を実践している。特に教育科目の中でフレッシュャーズセミナーと次年度以降に開講される基礎特別研究及び応用特別研究は教員あたり3～4名の学生で実施される。前者は導入教育で成果をあげている。後者はいわゆるゼミで、研究課題の遂行過程における試行錯誤は、創造力のみならず、コミュニケーション能力を高めるなどトータルの教育に効果的である。また、ゼミは社会に踏み出す手前のプレ社会であり、もう1つのそうぞう力、すなわち、人を結ぶ想像力を涵養する場でもあるととらえている。

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、潮田亮

Assist. Prof. Jun Hoseki, Ryo Ushioda, Ph.D



1. 研究概要

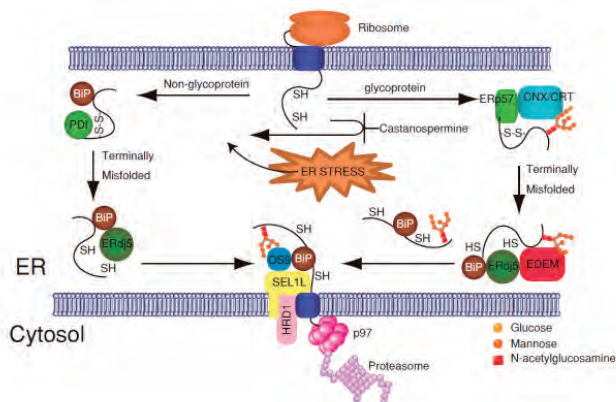
分子細胞生物学研究室では、「タンパク質の一生」を大きな研究の枠として設定し、その誕生から死までのメカニズムを中心に、中でも、特に「分子シャペロンによるフォールディングと細胞機能制御」および「タンパク質品質管理機構」に焦点をあてて研究を進めている。

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

昨年度来取り組んでいた Hsp47 コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの解析結果は、J. Cell Science 誌に発表した。

Hsp47 は臨床病態としては、線維化疾患と密接にかかわっており、肝硬変、肺線維症などの発症とともに、発現が劇的に上昇する(J. Clin. Invest., 1994)。Hsp47 の発現を抑えると、病状が改善が見られることをすでに報告しており(Lab. Invest., 1998)、他の研究室でも追試されている(Nature Biotech., 2008)。当研究室では、Hsp47 とプロコラーゲンとの相互作用を阻害する化合物を治療に使うことを目的として、その化合物の探索を、通産省の産総研と協力して行ってきた。その成果として、Hsp47 とともに、コラーゲンの分泌に必須のプロリン水酸化を担うP4H (prolyl 4-hydroxigenase)をも阻害する興味深い化合物を得ることができ、現在特許出願中である。

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

ミスフォールドタンパク質の糖鎖を認識して分解へまわす EDEM1、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に関して研究を進めている。昨年、X線結晶解析に成功し報告した。さらに非糖タンパク質の分解にも研究を展開し、糖タンパク質の分解経路が、カルネキシン(分子シャペロン) \Rightarrow EDEM1 \Rightarrow ERdj5 \Rightarrow BiP(分子シャペロン)であるのに対して、非糖タンパク質の場合は、BiP \Rightarrow ERdj5 \Rightarrow BiP という経路をとることを明らかにした(前ページ図参照)。

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種類を超えるオキシドレダクターゼ(酸化還元酵素)が存在する。酸化還元反応は、一連の電子伝達経路から成るが、プロテオミク解析(特に相互作用解析を主としたインターラクトーム解析)と酸素電極による酸化反応の解析、表面プラズモン(SPR)を用いた相互作用解析などを駆使して、小胞体における一連の酸化反応のカスケードを明らかにした。中でも Ero1a およびPDIという2つの酸化酵素がハブ複合体を作って、酸化反応の起点になっているという事実を見出し、そのメカニズムについて、構造的側面からの解析を進めた。本論文については、現在、改訂稿を送付、審査中である。

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、現在は、このシステムによって核外へ輸送されて分解される基質の探索を行っている。

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 four 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. We also found that a small compound named Col003 specifically inhibited the

interaction of Hsp47 with procollagen in the ER, which caused the down-regulation of collagen synthesis. This compound thus may be used for the therapeutic reagent for human fibrotic diseases such as liver cirrhosis because up-regulation of Hsp47 in these diseases causes the abnormal increase in collagen accumulation in the extracellular matrix.

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 at 2.5Å resolution, and revealed the ERAD pathway referring the structural information of ERdj5.

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 found that Ero1a and PDI make a functional and regulatory hub complex, and successively oxidize other ER-resident oxidoreductases. We also succeeded to analyze the mechanism of this synergistic oxidation by Ero1a-PDI complex using NMR analysis.

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

- T. Ono, T. Miyazaki, Y. Ishida, M. Uehata and K. Nagata : Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between Hsp47 protein and collagen triple helix. *J. Biol. Chem.* in press
- Y. Ishikawa, J. A. Vranka, S. P. Boudko, E. Pokidysheva, K. Mizuno, K. Zientek, D. R. Keene, A. M. Rashmir-Raven, K. Nagata, N. J. Winand and H. P. Bachinger: The mutation in cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in the American Quarter Horse does not affect peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity, but shows altered cyclophilin B-protein interactions and affects collagen folding. *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
- 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* 41(4):432-444(2011)
- K. Araki and K. Nagata : Functional in vitro analysis of ERO1 and protein-disulfide isomerase (PDI) pathway. *J. Biol. Chem.* 286(37):32705-32712(2011)
- 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* 6(7):e22542 (2011)
- 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.* 409:90-95(2011)
- 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 *J. Biol. Chem.* 286(19):16929-16939(2011)
- 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.* 404(2):599-604(2011)

5. 著書および総説

- D. Morito and K. Nagata : ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases. *Frontiers in Inflammation* in press
- M. Hagiwara and K. Nagata : Redox-dependent protein quality control in the ER : folding to degradation. *Antioxidants & Redox Signaling* in press
- T. Kakihana, K. Nagata and R. Sitia : Peroxides and peroxidases in the

- endoplasmic reticulum : integrating redox homeostasis and oxidative folding. *Antioxidants & Redox Signaling* in press
- K. Araki and K. Nagata : Protein Folding and Quality Control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* "Protein Homeostasis" pp.121-145(2011)
- R. Ushioda and K. Nagata : The Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Disulfide Reductase ERdj5. *Methods Enzymol.* 490:235-258(2011)
- Y. Ishida and K. Nagata : Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone. *Methods Enzymol.* 499:167-182(2011)
- H. Kubota, A. Kitamura and K. Nagata : Analyzing the aggregation of polyglutamine-expansion proteins and its modulation by molecular chaperones. *Methods* 53(3):267-274(2011)
- 萩原誠智、永田和宏、稲葉謙次 : 小胞体に内在するジスルフィド還元酵素 ERdj5 により促進される小胞体関連分解経路の構造的な基盤. *ライフサイエンス新着論文レビュー*, 3.25(2011)

6. 招待講演、シンポジウム等

- 永田和宏 : タンパク質品質管理機構、神戸大学院医学研究科 生化学セミナー、神戸市、2011.2.3
- Kazuhiro Nagata : Two distinct ERAD pathways for misfolded glycoproteins and non-glycoproteins. 6th APOCB "Challenges in Cell Biology: Health, Agriculture, Industry and Education.", Manila (Philippines), 2011.2.26
- Kazuhiro Nagata : Two distinct ERAD pathways contribute for maintaining the protein homeostasis in the ER. EMBO Conference "The biology of Molecular Chaperones", Grunlsee(Austria), 2011.5.22
- Kazuhiro Nagata : Protein quality control in the ER and the nucleus. Gordon Research Conference on Stress Proteins in Growth, Development & Disease, Lucca (Italy), 2011.7.19
- Kazuhiro Nagata : Non-glycoprotein ERAD pathway serves as a backup system under ER stresses. 5th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, Quebec(Canada), 2011.8.24
- Kazuhiro Nagata and Roberto Sitia : Regulation of redox homeostasis in the ER. Conference on Quality Control: Folding and Degradation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum , Ascona(Switzerland), 2011.9.15
- Kazuhiro Nagata : Two distinct ERAD pathways contribute for maintaining the protein homeostasis in the ER. 第84回日本生化学会シンポジウム、京都市、2011.9.23
- Kazuhiro Nagata : Protein quality control and proteostasis in the ER. Cold Spring Harbor Asia Conference, "Protein Homeostasis in Health & Disease", Suzhou(China), 2011.9.29

7. 学会発表

新木和孝、永田和宏：Functional *in vitro* analysis of ERO1 and PDI pathway. 第 63 回日本細胞生物学会大会、札幌市、2011.6.27-29

萩原誠智、前川憲一、鈴木守、潮田亮、新木和孝、松本悠史、
竇関淳、永田和宏、稲葉謙次：糖たんぱく質 ERAD における ERdj5 の役割/The role of ERdj5 in glycoprotein ERAD pathway. 第 63 回日本細胞生物学会大会、札幌市、2011.6.27-29 (口頭発表)

垣花太一、新木和孝、Stefano Vavassori、家村俊一郎、夏目徹、Roberto Sitia、永田和宏：Non-canonical retention of Ero1 and Prx4 maintains redox homeostasis. 第 63 回日本細胞生物学会大会、札幌市、2011.6.27-29

Masatoshi Hagiwara：ERdj5-mediated glycoprotein ERAD pathway Quality Control Folding and Degradation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum. “Quality Control Folding and Degradation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum”, Ascona(Switzerland), 2011.9.11-16 (口頭発表)

Taichi Kakihana, Kazutaka Araki, Stefano Vavassori, Margherita Cortini, Claudio Fagioli, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Roberto Sitia and Kazuhiro Nagata：Non-canonical retention of Ero1 and Prx4 maintains redox homeostasis. “Quality Control Folding and Degradation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum”, Ascona(Switzerland), 2011.9.11-16

Ryo Ushioda, Jun Hoseki and Kazuhiro Nagata：Non-glycoprotein ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, Suzhou(China), 2011.9.26-30

Daisuke Morito, Kouki Nishikawa, Wangyang Liu, Satoru Yamazaki, Toshiaki Hitomi, Hatasu Kobayashi, Norio Matsuura, Susumu Miyamoto, Seiji Takashima, Nobuo Hashimoto, Yoshinori Fujiyoshi, Akio Koizumi and Kazuhiro Nagata：Structure and function of novel AAA+/Ubiquitin ligase mysterin. Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, Suzhou(China), 2011.9.26-30 (口頭発表)

Shoshiro Hirayama, Daisuke Morito, Kazutaka Araki, Shunichiro Ienaga, Toru Nartsume and Kazuhiro Nagata:Novel UBIN/POST complex mediate nuclear export associated degradation(NEAD). Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, Suzhou(China), 2011.9.26-30

Xiaoqing Chu, Shoshiro Hirayama, Aya Yamatani, Hiroshi Kubota, Takashi Kanamori and Kazuhiro Nagata:Substrate Recognition Mechanism by cytosolic chaperonin containing t-complex polypeptide 1(CCT). Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, Suzhou(China), 2011.9.26-30

Kazutaka Araki and Kazuhiro Nagata：Functional *in vitro* analysis of ER01 and protein-disulfide isomerase (PDI) pathway. Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, Suzhou(China), 2011.9.26-30

Shinya Ito, Koji Ogawa, Motoki Takagi, Takatsugu Hirokawa, Takayuki Doi, Naoki Goshima, Tohru Natsume, Kazuhiro Nagata：Characterization of a small molecule compound that inhibits interaction of collagen-specific molecular chaperone Hsp47 with procollagen. Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, Suzhou(China), 2011.9.26-30

Taichi Kakihana, Kazutaka Araki, Stefano Vavassori, Margherita Cortini, Claudio Fagioli, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Roberto Sitia and Kazuhiro Nagata：Non-canonical retention of Ero1 and Prx4 maintains redox homeostasis. Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, Suzhou(China), 2011.9.26-30 (口頭発表)

萩原誠智：小胞体に局在する新規 TMX ファミリータンパク質の機能解析. 臨床ストレス応答学会大会、名古屋市、2011.11.4-5 (口頭発表)

Daisuke Morito, Kouki Nishikawa, Wangyang Liu, Satoru Yamazaki, Toshiaki Hitomi, Hatasu Kobayashi, Norio Matsuura, Susumu Miyamoto, Seiji Takashima, Nobuo Hashimoto, Yoshinori Fujiyoshi, Akio Koizumi and Kazuhiro Nagata:Structure and function of novel AAA+/Ubiquitin ligase mysterin. 9th International Conference on AAA Proteins, 熊本市、2011.11.6-10(口頭発表)

垣花太一、新木和孝、Stefano Vavassori、家村俊一郎、夏目徹、Roberto Sitia、永田和宏：Ero1 と Prx4 のダイナミックな局在制御による小胞体酸化還元バランスの維持機構. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011.12.13-16 (口頭発表)

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Pdj2 の機能解析

研究代表者：永田和宏、取得年度：H21-23 年(3 年)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業研究

課題名：タンパク質の生成と管理

研究分担者：永田和宏、取得年度：H23-27年(5年)

Human Frontier Science Program (HFSP)

課題名：Cell Stress and Proteostasis Dysfunction in Aging and Disease、研究分担者：永田和宏、取得年度：H23-25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：齋関淳、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：還元酵素を必要とする小胞体関連分解の解明

研究代表者：潮田亮、取得年度：H22-23年(2年)

科学研究費補助金・若手B

課題名：家族性モヤモヤ病に関与する新規巨大ユビキチンリガーゼ/A TPアーゼの研究

研究代表者：森戸大介、取得年度：H22-23年(2年)

科学研究費補助金・新学術領域「血管—神経ワイヤリングにおける相互依存性の成立機構」

課題名：新規巨大タンパク質ミスチリンによる血管・神経形成の制御、研究代表者：森戸大介、取得年度：H23-24年(2年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：分子シャペロン Hsp47 のアディポネクチン合成への役割の解明とその機能制御

研究代表者：伊藤進也、取得年度：H23-24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：日本学術会議(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：慶應医学賞 専門委員

永田和宏：安田記念医学財団 理事

永田和宏：King Faisal International Prize(Saudi Arabia), Referee

永田和宏：Coyote Pharmaceuticals, Inc. 学術顧問

永田和宏：Cell Stress & Chaperones, Asia-Australian Regional Editor

永田和宏：Genes to Cells, Associate Editor

永田和宏：Cell Structure and Function, Associate Editor

永田和宏：DNA and Cell Biology, Editor

永田和宏：日本細胞生物学会 運営委員

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

永田和宏：神戸常盤大学 非常勤講師

永田和宏：方丈記800年委員会 委員

永田和宏：京都学問所 設立委員, 副所長

4) 受賞等

永田和宏：2011年度京都市文化功労者 受賞

萩原誠智：第63回日本細胞生物学会大会若手優秀発表賞 受賞

平山尚志郎：Cold Spring Harbor Asia Conference, "Protein

Homeostasis in Health & Disease" Best Poster Award 受賞

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。この機械の大きさは、1-100nm であり、その作用機構を、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だ。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のナノバイオロジーを研究している。

1) シアノバクテリアと大腸菌の比較転写論

Mⁿ²⁺ イオンは、転写ミス誘発することが知られている。しかしシアノバクテリアでは、光合成のために mM 程度の Mⁿ²⁺ イオンが存在する。シアノバクテリアの転写系を大腸菌のものと比較するために、シアノバクテリアの転写系を精製し、再構成された転写系を構築し、発見した共通のプロモーターを用いて両者の転写系を比較した。

2) リプレッサー・インデューサー・オペレーター複合体の存在

教科書にあるオペロン説によれば、インデューサーは、リプレッサーに結合して、オペレーターから解離させるので、リプレッサー・インデューサー・オペレーター複合体は存在しない。我々は、この例外をバクテリア *P. putida* の *cam* レプレッサー CamR に見出し、生理的意義と進化的意義を明らかにした。

3) 大腸菌の増殖期 ECM と微小細胞

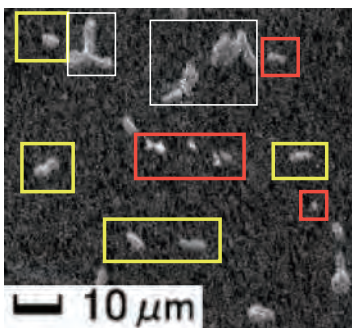


図1 野生株 W3110 に見られる、標準的な大きさの大腸菌(黄枠)とそれより小さい小胞(赤枠)、cell cluster(白枠)

大腸菌は、性質が均一な独立細胞として増殖し、定常期のみ biofilm という Extracellular Matrix(ECM)内で生存するとされていた。しかし、我々は最も低温で真空中蒸着が可能な Os を用いた SEM 観察で、この構造は、ECM というより cell cluster であること、死菌かもしれない微小細胞が増殖期から定常期まで存在することを発見した(2010 年報)。

つまり、大腸菌の定常期は、活動が停止した stationary ではなく、生細胞が動的平衡を保つ steady であり、酵母の定常期と類似して居ることが判明した。この構造体の役割の謎の解明を行っている。

4) 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、真核のユビキチンとオートファジーに対応する重要機能をもつ分子である。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。この矛盾を解決し、tmRNA の新機能の発見をめざしている。

2. 本年度の研究成果

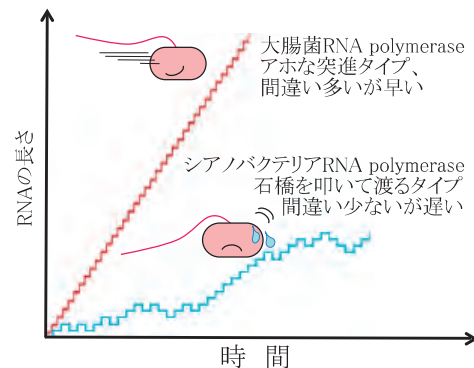


図2. あほな大腸菌、慎重なシアノバクテリアの酵素。競争の激しい腸内細菌と、貧栄養下で生きる細菌との差が RNA polymerase 分子の差として見えている。

1) シアノバクテリアと大腸菌の比較転写論:シアノと大腸菌との比較転写学により、シアノの RNA polymerase は、abortive 転写をほとんど行わず、ミス転写は少なく、よく pause して転写速度は一桁遅く、 M^{n2+} 存在下でも fidelity の高い酵素であることが明らかになった。この結果、大腸菌に存在して、 M^{n2+} 耐性を与え、転写の fidelity を高くする *gre* 遺伝子がなぜシアノに存在しないか説明ができた(Genetics Res. Internat. 2011)。

2) CamR の樟脳結合における負の協同性: *P. putida* は *cam* オペロンにコードされている P450 系の分解酵素群を用いて、植物が出す抗菌物質樟脳に耐性であるだけでなく、C 源として用いることが出来る特徴をもつ。CamR は典型的な Tet family の *cam* オペロンのリプレッサーで、抗菌物質センサーとして働いている。

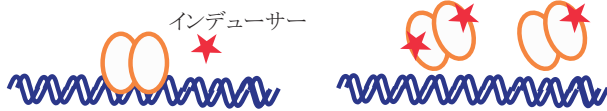
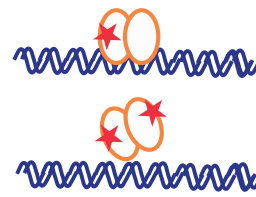


図 3 バクテリアリプレッサーはホモ二量体で 2 つのインデューサー分子が結合可能。解離定数は $pM-100\ nM$ と低く負の協同性は未発見だった。

Tet family を含むバクテリアレプレッサーは、ホモ二量体であり、インデューサー結合部位を2つ有している。一般に2つのインデューサー結合は、独立か、正の協同性を示し、第一結合でオペレーターから解離して、 $pM-100\ nM$ のインデューサーを検出する高感度を保証している。負の協同性の明確な報告はない。

ところが CamR は、樟脳の検出感度は、 $50\ \mu M$ 程度と異常に低く、C 源として樟脳を用いるためのスイッチとして都合が良くなっている。そこで、蛍光 titration, immuno-precipitation, 樟脳存在下の EMSA で、樟脳と operator DNA との結合を調べてみると、樟脳は $64\ nM$ と $14\ \mu M$ という 200 倍以上隔たった濃度で、負の協同性を持って CamR に結合し、第二結合が operator からの解離を誘導する最初の例を発見した。負の協同性と第二結合に解離機能を移したことによって、抗菌物質

検出から、C 源利用へと進化させた可能性が明らかとなった (Genes Cells, 2011)。



CamRはインデューサーの第一結合ではオペレーターに結合したまま。[インデューサー] $<10\ \mu M$

[インデューサー] $>50\ \mu M$ で、第二結合が起こり、オペレーターから解離する。始めて見つけた負の協同的結合により、栄養としてインデューサー (樟脳) を取り入れるのにふさわしい濃度でスイッチが入る。

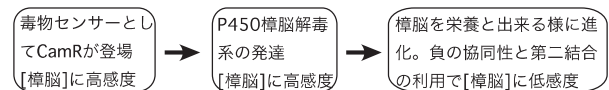


図 4 CamR の抗菌物質検出センサーから、栄養源完治センサーへの進化の道筋

3) 大腸菌の増殖期 ECM と微小細胞:大腸菌の cell cluster の形態遺伝学をおこなった。表面構造体と思われる 50 の代表的遺伝子の欠損株を選び、増殖期と定常期で構造体形成が異常をもつ株を SEM 画像を画像処理することにより選択した。

4) tmRNA の新機能の発見: tmRNA の欠損 ($\Delta ssrA$) と共存すると生存できない遺伝子を分離した。いずれもシャペロン、ペプチダーゼ系の遺伝子であった。tmRNA が関わる過程で、通常条件でペプチダーゼが生存に必須で、改善条件では必須でないことは、大腸菌が germ line とそれに栄養を供給する cell とに分化することの可能性を示している。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

1) A repressor composed of homodimeric subunits, as is often found in bacteria, possesses two effector-binding sites per molecule, enabling sophisticated regulation by the cooperative binding of two effector molecules. Positive cooperativity generates a narrower region of effector concentration for switching, but little is known about the role of negative cooperativity. D-camphor, an inducer for *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam hydroxylase

operon (camDCAB), binds to the homodimeric cam repressor (CamR). Here, we report solid evidence that the complex of CamR and an operator DNA is not dissociated by the first binding of D-camphor but, at a higher concentration, is dissociated by the second binding. D-camphor thus binds to the CamR in two steps with negative cooperativity, yielding two distinct dissociation constants of $K_{d1} = 0.064 \pm 0.030$ and $K_{d2} = 14 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{M}$, as well as the Hill coefficient of $0.56 \pm 0.05 (<1)$. The first binding guarantees the high specificity of the inducer by the high affinity, although the second binding turns on the gene expression at a 200-fold higher concentration, a more suitable switching point for the catabolism of D-camphor (Genes Cells, 2011).

2) If Mg^{2+} ion is replaced by Mn^{2+} ion, RNA polymerase tends to misincorporate noncognate nucleotide, which is thought to be one of the reasons for the toxicity of Mn^{2+} ion. Therefore, most cells have Mn^{2+} ion at low intracellular concentrations, but cyanobacteria need the ion at a millimolar concentration to maintain photosynthetic machinery. To analyse the mechanism for resistance against the abundant Mn^{2+} ion, we compared the properties of cyanobacterial and *E. coli* RNA polymerases. The cyanobacterial enzyme showed a lower level of abortive transcription and less misincorporation than the *E. coli* enzyme. Moreover, the cyanobacterial enzyme showed a slower rate of the whole elongation by an order of magnitude, paused more frequently, and cleaved its transcript faster in the absence of NTPs. In conclusion, cyanobacterial RNA polymerase maintains the fidelity of transcription against Mn^{2+} ion by deliberate incorporation of a nucleotide at the cost of the elongation rate. The cyanobacterial and the *E. coli* enzymes showed different sensitivities to Mg^{2+} ion, and the physiological role of the difference is also discussed (Genetics Res. Internat. 2011).

3) 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 to 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 dissociates 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 with 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 (ΔtmRNA) 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 techniques, we found distinct phenotypes of ΔtmRNA . 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.* **2011**, Article ID 572689 (2011)

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.* **2**, e00034-11 (2011)

Aramaki H., Kabata H., Takeda S, Itou H, Nakayama H, Shimamoto N, Formation of repressor-inducer-operator ternary complex: negative cooperativity of D-camphor binding to CamR. *Genes Cells* **16**, 1200-7 (2011)

5. 著書および総説

Shimamoto N, “Bacterial Transcription”(Essay), Encyclopedia of Systems Biology Eds. Dubitzky W. Wolkenhauer O., Cho K-H, Yokota H., Springer N.Y.

嶋本伸雄, “セントラルドグマ”, “翻訳開始因子”, “ポリペプチド鎖解離因子”, “プラズモン”, “表面プラスモン共鳴”, “パルスチェイス分析法”, “示差熱解析”, “ π - π *遷移”, “DNA-RNA ハイブリダイゼーション”, “DNA-DNA ハイブリダイゼーション”, “DNAの変性”, “Cot 解析”, “アニーリング”, “相補的塩基対”, “生物学辞典 第5版 岩波書店

雨宮陽介, 嶋本伸雄, ナノ構造体としてのDNA、パリティ (特集 DNAの物理) 26 (9) 2011 丸善

6. 招待講演、シンポジウム等

Nakayama H. and Shimamoto N., Stationary state is not stationary in *E.coli.*, *Annual Meeting of 2011 International RNA Society*, Nakijin, Kyoto, Japan

Shimamoto N. DNA length dependence of association and dissociation of a protein and its specific DNA site, , Nano-S&T 2011, Dalian, China

7. 学会発表

中山秀喜, 嶋本伸雄, 静止期におけるtmRNA の役割, 第5 回細菌学若手コロッセウム, 高知大学農学部キャンパス, 2011 年8 月

中山秀喜, 嶋本伸雄: 静止していない大腸菌の stationary phase、第8回21世紀大腸菌研究会、長野県木曾郡南木曾町、5月、2011

中山 秀喜, 嶋本 伸雄, tmRNAによるアミノ酸リサイクル, 第34回日本分子生物学会年会、一般口頭発表/ポスター、横浜、12月

中山秀喜, 吉田信介, 嶋本伸雄, 大腸菌のnon-planktonic な増殖と細胞多型, 第34回日本分子生物学会年会、ポスター、横浜、12月

8. その他特記事項

1) 外部資金

オリンパス(株) 共同研究

戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」

2) 知財権等

特許取得

発明の名称:「マルチウェルインキュベーション装置及びこれを用いた分析方法」 出願番号:PCT/JP2007/000409 特許登録日:2011年12月20日

発明の名称:「コーティング基板の製造方法、前記方法により製造されるコーティング基板、および、その用途」 出願番号:特願2007-003915 特許登録日:2012年1月20日

3) 学外活動

Shimamoto N.: Asian and Oceanian Conference of Transcription 国際委員会日本代表委員

Shimamoto N.: Genes to Cells transfer editor

嶋本伸雄: 分子生物学会若手支援富澤基金審査委員

嶋本伸雄: 生物物理学会分野委員

嶋本伸雄: 未踏技術協会(社)研究会「生命をはかる」幹事

嶋本伸雄: 毎日新聞「大学 Now」取材

嶋本伸雄: 「ニュースビュー」KBS 京都ラジオ 8 月コメンテーター(8/4, 11, 18, 25放送)

嶋本伸雄: 未踏技術協会(社)研究会「生命をはかる」「あそび心」の分析-あそび心をどう審査すればよいか、9月、東京

4. その他

インターネット入試による留学生用大学院後期課程コースの設計と構築

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

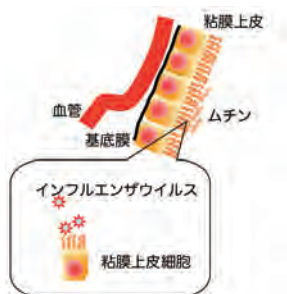


1. 研究概要

ムチンは、呼吸器、消化器、生殖器など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。ムチンは多様な糖鎖を持つことから、インフルエンザウイルスのもつレクチンであるヘマグルチニンや生体内に存在する様々なレクチンと結合する可能性がある。それらの相互作用を介した生物学的作用、すなわちインフルエンザウイルスの感染、癌細胞の悪性化、免疫細胞の活性制御などの分子機構を解析している。

1) インフルエンザウイルス受容体の解析

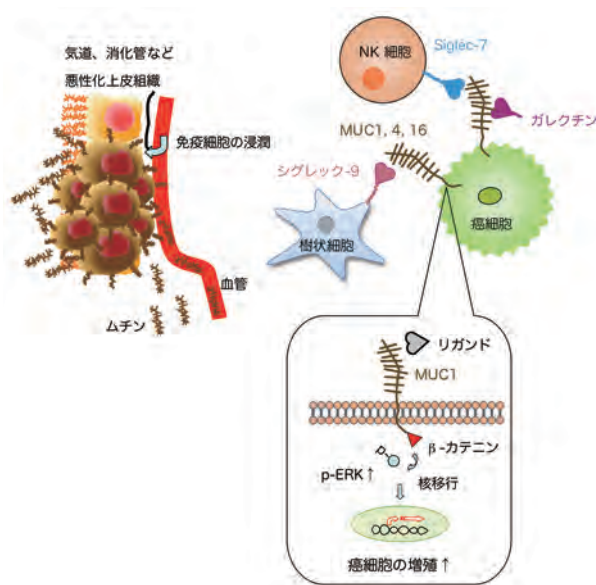
インフルエンザウイルスが最初に私達の体に侵入するとき、上皮細胞表面の糖タンパク質のシアル酸にウイルスのもつ被膜タンパク質であるヘマグルチニン(HA)が結合する。ウイルスの感染機構を研究する上で、HA と結合する受容体を単離し、調べるのが重要で、ムチンはその候補分子である。



2) 上皮性癌細胞の産生するムチンの生物学的意義

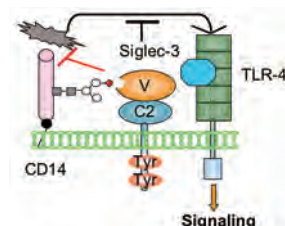
大半のがんは上皮細胞由来であることは良く知られている。正常な上皮組織では、細胞の極性が保持され、合成されたムチンは細胞のアピカル(頂端部)側に輸送されて、分泌されたり、あるいは膜タンパク質となる。癌化すると極性が無くなることにより、ムチンは細胞表面全体に輸送され、一部は癌組織全体に分泌され、血流中にも放出される。血流中に多くのムチンが存在する患者の5年生存率は低いことが知られているが、ムチンの生物学的意義はほとんど明らかにされていない。生体内には様々なレクチンが存在するが、担癌状態でその産生量が増加することが知られているガレクチンファミリーや主に免疫細胞上に発現しているレクチンであるシグレックファミリーなどは、ムチン上の糖鎖に結合する可能性が考え

られる。癌細胞上の膜結合型ムチンへのこれらのレクチンの結合はシグナル伝達の起点となり、癌の悪性化の役割を担うことが考えられる。また、免疫細胞上のシグレックへのムチンの結合は、シグレックファミリーの多くが免疫抑制性のモチーフを持つことから免疫抑制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、癌細胞の悪性化を克服する方法を開発することを目指している。



3) 免疫細胞上の膜結合型レクチンであるシグレックファミリーの機能解析

免疫細胞上には、シグレックファミリーと呼ばれる免疫抑制性のモチーフを持つ膜結合型レクチンが発現していることから、免疫機能の制御に関与していることが予想される。その中で、シグレック-3のTLR-4を介したシグナル伝達の制御及びシグレック-9の抗原提示時における作用について主に検討している。



2. 本年度の研究成果

1) 上皮性癌細胞の産生するムチンの生物学的意義

膜結合型ムチン MUC1 の強制発現細胞株 (HCT116/MUC1) を用いて、ガレクチン-3 の結合に伴う情報伝達について検討した。ヒト大腸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌などの癌組織において、癌細胞上の MUC1 とガレクチン-3 の共局在が観察され、両分子の相互作用が予測された。HCT116 細胞は、ガレクチン-3 と-1 を発現していたが、HCT116/MUC1 細胞の細胞表面にはガレクチン-3 のみが検出された。HCT116/MUC1 細胞にガレクチン-3 組み換え体を添加すると ERK1/2 のリン酸化が亢進し、細胞増殖も促進された。ガレクチン-3 をノックダウンした HCT116/MUC1 細胞あるいは同細胞の培養液にポリラクトサミンのポリマーを加えた場合、同細胞の増殖が抑制された。これらの結果は、培養液中に放出されたガレクチン-3 が細胞膜上の MUC1 に結合し、情報伝達を惹起したことを示している。

Mouse Lewis lung cancer の亜株を用いて高転移性株を樹立した。同細胞株では *in vitro* で増殖能と浸潤能が上昇した。DNA マイクロアレイにより高転移株において発現量の上昇した遺伝子を検索した結果、pp-GalNAc-T13 が同定された。低転移株に同遺伝子を導入すると浸潤性や運動能の上昇が認められた。さらに、高転移株において、様々な抗体やレクチンの反応性を検討したところ、唯一 trimeric Tn 抗原 (Tn 抗原がペプチド上に 3 個連続して結合した抗原) を認識する単クローン抗体 MLS128 の高い反応性が認められた。同抗原を発現している分子は、シンデカン-1 であることが免疫化学的に同定された。また、pp-GalNAc-T13 をノックダウンすると肺への転移は著しく減少した。これらの結果は、pp-GalNAc-T13 の発現がシンデカン-1 上に trimeric Tn 抗原の発現をもたらし、転移能を上昇させることを示唆している。

2) 免疫細胞上の膜結合型レクチン、シグレックファミリーの機能解析

シグレック-9 の機能を解析する過程で、活性化 T 細胞の細胞表面に特異的にプロヒピチンが発現することを見いだした。同分子に対する抗体は T 細胞シグナルを抑制し、新たな T 細胞制御機構が示唆された。

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.

Among various lectins in our body, galectin family, which is known to increase under tumor bearing state, and siglec family, which is mainly expressed on immune cells, are supposed to bind to mucins. Binding of these lectins to membrane-bound mucins expressed on tumor cells is expected to start signaling and play a role in tumor progression. In addition, binding of mucins to siglec family expressed on immune cells may lead to down-modulation of immune cells because many siglecs possess immune-regulatory motif. Our aim is to develop clinical ways to overcome tumor progression based on our researches.

As described above, siglec family may play a role in immune-regulation, we are also studying on the regulation of TLR-4 and T cell signaling by siglec-3 and siglec-9, respectively.

1: Biological significance of mucins produced by epithelial tumor cells. Co-localization of MUC1 and galectin-3 was observed in various human tumor tissues such as colon, stomach, pancreas, and lung. So we expected the interaction of galectin-3 with MUC1. We studied on the signal transduction through the binding of galectin-3 to MUC1 using HCT116 cells transfected with MUC1 cDNA. Galectin-3 and -1 were expressed in HCT116 cells. Galectin-3 was detected on the cell surface of HCT116/MUC1 cells but not HCT116 mock cells. When recombinant galectin-3 was added to the culture

medium of HCT116/MUC1 cells, phosphorylation of ERK1/2 was enhanced, leading to accelerated proliferation. When expression of galectin-3 was down-modulated by siRNA, or poly-lactosamine was added in the culture medium, proliferation of HCT116/MUC1 cells was inhibited. These results indicate that galectin-3 released from the cells into the culture medium binds to MUC1 on the cell surface and start signaling.

High metastatic sublines were established by repeated injection of mouse Lewis lung cancer sublines to analyze the mechanism for cancer metastasis. These sublines exhibited increased proliferation and invasion activity *in vitro*. Then, we explored genes that markedly altered in the expression levels by DNA microarray, and revealed that pp-GalNAc-T13 was up-regulated in the high metastatic sublines. Stable transfection of pp-GalNAc-T13 cDNA resulted in increased invasion and motility. Then, immunoblotting and flow cytometry using various mAbs and lectins were performed. Only anti-trimeric Tn antibody, designated MLS128, showed increased expression level of this antigen. Further studies using MLS128 revealed that syndecan-1 carried this trimeric Tn antigen. Stable silencing of endogenous pp-GalNAc-T13 of these cells resulted in reduced lung metastasis. These results suggested that high expression of pp-GalNAc-T13 gene generated trimeric Tn antigen on syndecan-1, leading to the enhanced metastasis.

2: Functional analysis of membrane bound lectin, siglec family, expressed on immune cells. Under the study on the function of siglec-9, we found that prohibitins are induced and expressed on the cell surface of activated T cells. Anti-prohibitin antibody inhibited the T cell signaling, suggesting a novel down-regulating system of activated T cells.

4. 発表論文

- H. Yurugi, S. Tanida, A. Ishida, K. Akita, M. Toda, M. Inoue, and H. Nakada: Expression of prohibitins on the surface of activated T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press
- K. Akita, S. Yoshida, Y. Ikehara, S. Shirakawa, M. Toda, M. Inoue, J. Kitawaki, H. Nakanishi, H. Narimatsu, and H. Nakada: Different levels of sialyl-Tn antigen expressed on MUC16 in endometriosis and ovarian cancer patients. *Int. J. Gynecol. Cancer.* in press
- N. Yuasa, H. Ogawa, T. Koizumi, K. Tsukamoto, A. Matsumoto-Takasaki, H. Asanuma, H. Nakada, and Y. Fujita-Yamaguchi. Construction and expression of

anti-Tn-antigen-specific single chain antibody genes from hybridoma producing MLS128 monoclonal antibody. *J. Biochem.* in press

- Y. Matsumoto, Q. Zhang, K. Akita, H. Nakada, K. Hamamura, N. Tokuda, A. Tsuchida, T. Matsubara, T. Hori, T. Okajima, K. Furukawa, and T. Urano: pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press
- A. Matsumoto-Takasaki, S. Hanashima, A. Aoki, N. Yuasa, H. Ogawa, R. Sato, H. Kawakami, M. Mizuno, H. Nakada, Y. Yamaguchi, and Y. Fujita-Yamaguchi: Surface plasmon resonance and NMR analyses of anti Tn-antigen MLS128 monoclonal antibody binding to two or three consecutive Tn-antigen clusters. *J. Biochem.* in press
- G. P. Subedi, T. Satoh, S. Hanashima, A. Ikeda, H. Nakada, R. Sato, M. Mizuno, N. Yuasa, Y. Fujita-Yamaguchi, and Y. Yamaguchi: Overproduction of anti-Tn antibody MLS128 single-chain Fv fragment in Escherichia coli cytoplasm using a novel pCold-PDI vector. *Protein Expr. Purif.* **82**:197-204 (2012)
- A. Matsumoto-Takasaki, N. Yuasa, D. Katagiri, T. Koyama, K. Sakai, N. Zamri, S. Phung, S. Chen, H. Nakada, M. Nakata, and Y. Fujita-Yamaguchi: Characterization of three different single chain antibodies recognizing non-reducing terminal mannose residues expressed in Escherichia coli by an inducible T7 expression system. *J. Biochem.* **150**:439-450 (2011)
- 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.* **72**:241-248 (2011)

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

- 中田 博:ムチンファミリー;腫瘍マーカーの発現、構造および腫瘍悪性化との関連性. 糖鎖産業技術フォーラム(疾患関連糖鎖バイオマーカーの迅速検出システムの開発と実用化)、Bio-Japan 2011、横浜市、2011.10.5
- 秋田 薫、池原 譲、中西速夫、成松 久、中田 博:MUC16上のsTn抗原の発現に基づく子宮内膜症と卵巣癌の識別、NEDO糖鎖プロジェクト成果報告会、東京都、2011.11.17

7. 学会発表

H. Nakada, S. Tanida, K. Akita, M. Toda, M. Inoue: MUC1 mediated signaling through ligation with Siglec-9. The 21st International Symposium on Glycoconjugates, Vienna (Austria), 2011.8.21-26

K. Akita, S. Yoshida, Y. Ikehara, S. Shirakawa, M. Toda, M. Inoue, J. Kitawaki, H. Nakanishi, H. Narimatsu, H. Nakada: Clinical evaluation of sialyl-Tn antigen level on CA125 core protein in patients with endometriosis and ovarian cancer. The 21st International Symposium on Glycoconjugates, Vienna (Austria), 2011.8.21-26

G.P. Subedi, T. Satoh, S. Hanashima, A. Ikeda, H. Nakada, R. Sato, M. Mizuno, N. Yuasa, Y. Fujita-Yamaguchi, Y. Yamaguchi: NMR analysis of an anti-carbohydrate antibody single-chain Fv fragment toward elucidation of the multivalent recognition mechanism. The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, Yokohama, 2011.11.15-18

中田 博、谷田周平、秋田 薫、戸田宗豊: 内在性レクチンの結合に伴う MUC1 を介したシグナル伝達. 第 30 回日本糖質学会年会、新潟県長岡市、2011.7.11-13

松本康之、章 青、浜村和紀、秋田 薫、中田 博、徳田典代、土田明子、岡島徹也、古川圭子、浦野 健、古川 鋼一: pp-GalNAc-T13 は trimeric Tn 抗原を形成し癌転移を亢進させる. 第 30 回日本糖質学会年会、新潟県長岡市、2011.7.11-13

谷田周平、秋田 薫、戸田宗豊、井上瑞江、中田 博: MUC1 と Galectin-3 の結合とその生物学的意義. 第 84 回日本生化学会大会、京都市、2011.9.21-24

森 勇伍、秋田 薫、谷田周平、石田有希子、戸田宗豊、井上瑞江、中田 博: ヒト大腸癌由来細胞における MUC1 と Galectin-3 の相互作用による増殖促進効果. 第 84 回日本生化学会大会、京都市、2011.9.21-24

松本康之、章 青、浜村和紀、秋田 薫、中田 博、徳田典代、土田明子、岡島徹也、古川圭子、浦野 健、古川 鋼一: pp-GalNAc-T13 による癌転移の分子メカニズム. 第 84 回日本生化学会大会、京都市、2011.9.21-24

笹野昂太、戸田宗豊、岩倉健司、碓氷泰市、村田健臣、中田 博: 人工グライコポリマーによる癌転移抑制および抗炎症作用. 第 84 回日本生化学会大会、京都市、2011.9.21-24

秋田 薫、池原 譲、井上瑞江、中西速夫、成松 久、中田 博: 子宮内膜症および卵巣癌患者における CA125 コアタンパク質上のシアルル Tn 抗原レベルの臨床的評価. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011.10.3-5

松本康之、章 青、浜村和紀、秋田 薫、中田 博、徳田典代、土田明子、岡島徹也、古川圭子、浦野 健、古川 鋼一: pp-GalNAc-T13 は trimeric Tn 抗原を合成することにより癌転移を亢進させる: 標的タンパク質の同定. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011.10.3-5

8. その他特記事項

- 1) 外部資金
共同研究(杏林製薬)
- 2) 知的財産等
特許: 活性化 T 細胞抑制剤の開発(申請中)
- 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
研究室メンバーの写真(15号館前にて)



神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

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)、マンノース(Man)、あるいはN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)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, GlcNAc β 1 \rightarrow Ser/Thr)を持つ糖鎖に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。これらの中で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。

ムチン型糖鎖の合成開始反応は糖転移酵素 UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase (以降 ppGalNAc-T)により触媒される。この酵素はヒトにおいては 20 種類から成る大きな遺伝子ファミリーを形成する(Fig. 1)が、それぞれのアイソザイムの性質はまだ明らかになっていない。我々はこれらのうち、

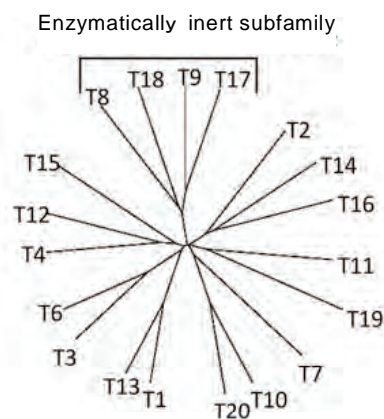
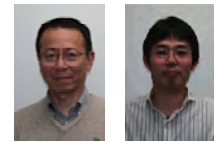


Fig. 1 A phylogenetic tree of human ppGalNAc-Ts

ppGalNAc-T9, -T17 をクローニングし、これらが神経特異的に発現することを報告した。また、ppGalNAc-T9, -T17 が属するサブファミリーは、*in vitro*での酵素活性が検出されておらず、生化学的な解析は極めて困難である。このような背景を踏まえ、我々の研究室では、O-グリコ

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中山喜明

Assist. Prof. Yoshiaki Nakayama Ph. D.

シド型糖鎖、およびそれに関連した分子の主に脳における機能解析を研究の目的として、次のような課題に取り組んでいる。

1) 細胞膜輸送におけるムチン型糖鎖合成酵素 ppGalNAc-T17 の機能解析

糖タンパク質糖鎖は立体構造の安定化に寄与するだけでなく、レクチンとの相互作用を介する細胞内タンパク質輸送の際の“荷札”として機能する。ムチン型糖鎖も、古くから細胞内輸送に関与する可能性が示唆されているものの、その詳細は明らかにされていない。

我々は ppGalNAc-T17 とそれが合成に関わるであろうムチン型糖鎖について解析を進め、ppGalNAc-T17 が、成体の脳においては海馬や視床、小脳の神経細胞に強く発現し、神経分化に関わることなどを報告してきた。近年、HEK293T 培養細胞を用いたゲノミクス解析により、ppGalNAc-T17 がエンドサイトーシス経路を調節している可能性が報告された。我々は ppGalNAc-T17 が関わる新たな現象について詳細な研究を行った。

2) ゼブラフィッシュを用いた ppGalNAc-Tファミリーの機能解析

我々は ppGalNAc-T1 の構造活性相関に関する研究を行い、酵素分子中のモチーフ内に存在する酵素活性に必要なアミノ酸残基を同定した。ppGalNAc-Tファミリーの中で ppGalNAc-T8, -T9, -T17, -T18 では、それらのアミノ酸のいくつかは他のアミノ酸に置換されている。そのため、他のアイソザイムと同じ基質ペプチドを用いた *in vitro* アッセイでは、酵素活性を検出することはできず、これらのアイソザイムの生化学的な特徴付けはきわめて困難である。そこで我々は、ゼブラフィッシュを用いて発現を抑制することで、これらのアイソザイムの機能解析を行い、ppGalNAc-T9, -T17 が脳の発生に関わることを見いだした。さらに、今年度は同じサブファミリーに属する ppGalNAc-T8, -T18 の機能解析に着手した。

3) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

今年度よりゼブラフィッシュを用いて、O-GlcNAc型糖鎖の機能解析を始めた。酵素遺伝子のクローニング、発現解析、発現抑制実験を行った。

2. 本年度の研究成果

1) 細胞膜輸送におけるムチン型糖鎖合成酵素 ppGalNAc-T17 の機能解析

HEK293T における ppGalNAc-T17 について、新たに細胞生物学的手法を用いて機能解析を行った。その結果、(i)細胞内栄養状態の指標である GlcNAc の濃度依存的に ppGalNAc-T17 の発現量が増加すること、(ii) ppGalNAc-T17 が液相エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシス経路を負に制御していること、(iii)その調節メカニズムの破綻は膜タンパク質の輸送異常によるリソソーム病様の症状を引き起こすという新たな知見を得た。これらの結果は ppGalNAc-T17 により形成されるムチン型糖鎖が、マクロピノサイトーシスを通じた細胞外分子の取り込みを制御することにより、細胞内栄養状態のホメオスタシスの維持に関与することを示唆している (Fig. 2)。

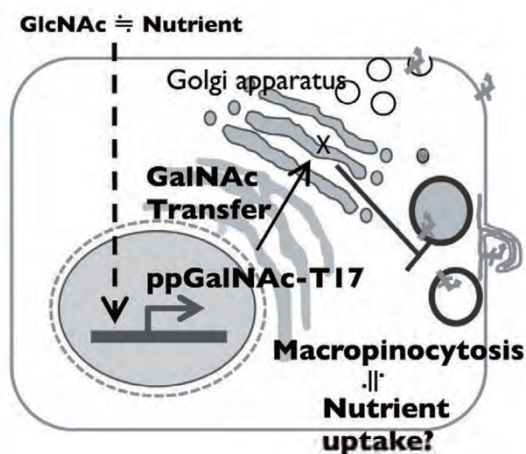


Fig. 2 Hypothetical roles of ppGalNAc-T17 in membrane trafficking

2) ゼブラフィッシュを用いた ppGalNAc-Tファミリーの機能解析

ゼブラフィッシュを用いて ppGalNAc-T8, -T18 の機能解析を行った。データベース検索により、ゼブラフィッシュでは染色体の重複により、ppGalNAc-T8 については5つ (ppGalNAc-T8a ~ e), ppGalNAc-T18 については2つ (ppGalNAc-T18a, b) のパラログ遺伝子が存在していることを見いだした。現在は、これらアイソザイムのクローニング、発現分布解析、ノックダウン実験を進めているが、今年度は、ppGalNAc-T18a, b の cDNA クローニングを完了した。これらのアイソザイムについて、RT-PCR によりどちらも受精後 18 時間から発現しており、さらに in situ hybridization により、受精後 24 時間のゼブラフィッシュ胚において、ppGalNAc-T18a mRNA が全身、特に脳や尾に強く発現していることを見いだした。また、ppGalNAc-T18a に対するモルホリノアンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験から、このアイソザイムがゼブラフ

ィッシュにおいて尾の形成に重要な働きをすることが示された (Fig. 3)。脳における機能についても検討中である。

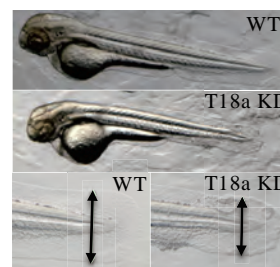


Fig. 3 Suppression of ppGalNAc-T18a in zebrafish embryos gave rise to the altered tail formation during the development.

3) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

細胞質、および細胞外に見いだされる O-GlcNAc 型糖鎖の機能をゼブラフィッシュを用いて調べた。この糖鎖構造の合成に関わる糖転移酵素をゼブラフィッシュで同定しその cDNA をクローニングした。初期胚における発現、機能解析を行い、O-GlcNAc 型糖鎖の発現が初期発生に必要であることを見いだした。

3. Research projects and annual reports

O-Glycosylation is an important post-translational modification of proteins, and is classified into several types based on the carbohydrate-protein linkage structures. We have been investigating roles of sugar chains with the linkage structures, GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr), Man α 1 \rightarrow Ser(Thr), or GlcNAc β 1 \rightarrow Ser(Thr). Among them, GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr) is the most frequently observed linkage, and O-glycans with this linkage are called the mucin carbohydrates since they are highly expressed in mucins secreted from epithelial cells. The mucin carbohydrate biosynthesis is initiated by a group of enzymes, UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (ppGalNAc-Ts). ppGalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in humans (Fig. 1). Interestingly, ppGalNAc-T8, -T9, -T17, and -T18 are catalytically inactive when assayed with classical assay methods, while ppGalNAc-T9 and -T17, which are cloned by us, are brain-specific isozymes and are biologically important for the neural differentiation. Based on these backgrounds, we have focused on the functions of glycosyltransferases to make O-glycan carbohydrate-linkage structures, and obtained the following findings.

1) Roles of mucin-type carbohydrates in intracellular membrane trafficking

Recent genome-scale analysis of HEK293T cells treated with a high GlcNAc concentration demonstrated that ppGalNAc-T17 is one of the genes upregulated, which are possibly involved in the fluid phase endocytosis. To assess its roles, we first biochemically characterized recombinant ppGalNAc-T17 in COS7 cells, and demonstrated that it was N-glycosylated, and localized mainly in the Golgi apparatus. We then suppressed the expression of endogenous ppGalNAc-T17 in HEK293T cells using siRNA. The suppression led to phenotypic changes of the cells with reduced lamellipodia formation, altered O-glycan profiles, and unusual accumulation of glycoconjugates in the late endosomes and lysosomes. Analysis of endocytotic pathways revealed that macropinocytosis, but neither clathrin- nor caveolin-dependent endocytosis, was elevated in the knockdown cells. This was further supported by the findings that recombinant ppGalNAc-T17 overexpressed in HEK293T cells inhibited macropinocytosis, and rescued the influences observed for the knockdown cells. Our data provide the first implication that a subset of mucin-type O-glycosylation produced by ppGalNAc-T17 is involved in the control of dynamic membrane trafficking probably between the cell surface and the late endosomes through macro-pinocytosis, in response to the nutrient concentration as exemplified by the environmentally available GlcNAc (Fig. 2).

2) Analysis of ppGalNAc-T family using zebrafish

We have been investigating ppGalNAc-T8 and -T18 that are catalytically inert under the conventional assay conditions. To characterize these isozymes, we first screened the database, and found that zebrafish have 5 and 2 paralogue genes for ppGalNAc-T8, and -T18, respectively. For ppGalNAc-T18, we cloned both paralogue genes, and showed that they were expressed throughout the early embryos with the stronger expression in the brain and the tail. Suppression of ppGalNAc-T18a in the embryos with specific morpholino oligos demonstrated the abnormal tail formation (Fig. 3).

3) Analysis of other O-glycosylation

We investigated the expression and roles of glycosyltransferases that are involved in the O-GlcNAcylation.

We found that the suppression of O-GlcNAcylation in zebrafish resulted in the abnormal development of embryos.

4. 発表論文

A. Miyake, S. Nihno, Y. Murakoshi, A. Satsuka, Y. Nakayama, and N. Itoh: Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mech. Dev.* in press.

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. **Human Genetic Diseases** 37-56 (2011)

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

Y. Nakayama, N. Nakamura, and A. Kurosaka: The Biological Roles of a putative Polypeptide GalNAc-transferase/WBSCR17. Glyco21, Vienne (Austria), 2011. 8. 21-26

N. Nakamura, E. Kaneda, Y. Nakayama, and A. Kurosaka: Developmental Roles of Putative Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. 2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology, Seattle, Washington (USA) 2011. 11. 11

Y. Nakayama, A. Wada, N. Nakamura, and A. Kurosaka: A putative polypeptide GalNAc-transferase, WBSCR17, regulates endocytosis in HEK293T cells. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

H. Fujiwara, T. Satoh, Y. Tsuji, Y. Nakayama, N. Nakamura, and A. Kurosaka: Characterization of a brain-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

N. Nakamura, E. Kaneda, Y. Nakayama, and A. Kurosaka: Functional analysis of N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4 in zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

T. Kawai, K. Ohshita, A. Kakii, N. Nakamura, Y. Nakayama, and A. Kurosaka: Functional analysis of N-acetylgalactosaminyltransferase 8 in zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

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)

課題名: 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

研究代表者: 黒坂 光, 取得年度: H21-23 年 (3 年)

研究分担者: 中山喜明, 取得年度: H21-23 年 (3 年)

科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名: 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

研究分担者: 黒坂 光, 取得年度: H22-23 年 (2 年)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

課題名: 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: 黒坂 光, 取得年度: H20-24 年 (5 年)

学術研究助成基金助成金・若手研究(B)

課題名: 網膜発生に関わるムチン型糖鎖の機能解明に向けた ppGalNAc-T の解析

研究代表者: 中山喜明, 取得年度: H23-24 年 (2 年)

産学連携共同研究(インタープロテイン社)

課題名: VEGFシステム調節薬のスクリーニング系に関する研究

研究代表者: 黒坂 光, 取得年度: H23 年 (1 年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

黒坂 光: 日本生化学会評議員, 日本薬学会近畿支部委員

4) 受賞等 なし

5) その他

黒坂 光: THE UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (バレンシア, スペイン)との大学間協定の締結のための交渉を行った。

黒坂 光: 京都産業大学附属高校との連携授業(実験)を実施した。

黒坂 光: 放射線取扱主任者として RI 管理を行った。



ラボ集合写真: 15号館テラスにて

抗老化医学研究室

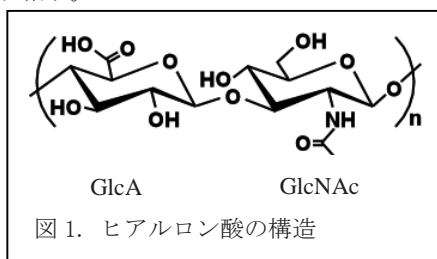
Laboratory of Anti-Aging Medicine

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。細胞はこのマトリックスにヒアルロン酸受容体を介して接着し、細胞内情報伝達系を活性化して細胞増殖や移動の調節に働くと考えられる(図2)。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

教授 板野 直樹

Prof. Naoki Itano, Ph.D.



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。

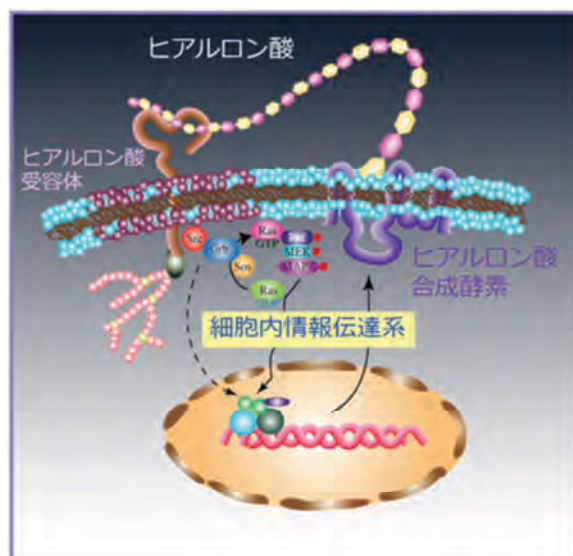


図2. ヒアルロン酸合成とシグナル伝達

2. 本年度の研究成果

私達は、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(*Cancer Res.* 70:7073-7083, 2010)。

私達は最近、ポリオーマミドルT抗原を発現するトランスジェニックマウス(MMTV-PyVT Tg)の乳癌において、Has2を選択的に欠損するモデルを作製し、腫瘍発生におけるHas2の役割を評価した。その結果、Has2欠損乳癌細胞は、ヌードマウス皮下移植下にその腫瘍成長速度が減弱した。更に、乳癌細胞におけるHas2の欠損は、腫瘍血管新生やリンパ管新生を顕減させた。以上の結果は、腫瘍発生におけるHas2の重要な役割を示唆している。

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 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 (*Cancer Res.* 70:7073-7083, 2010).

We recently generated Has2-null mammary carcinoma model in MMTV-polyoma virus middle T antigen transgenic mice (MMTV-PyVT Tg) to evaluate the role of Has2 in tumor development. The isolated Has2-null mammary carcinoma cells showed attenuated tumor growth in subcutaneously

implanted nude mice. Moreover, loss of Has2 in mammary carcinoma cells drastically reduced tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. Taken together, our current findings suggested the important roles of Has2 in tumor development.

4. 発表論文

H. Takano, K. Furuta, K. Yamashita, M. Sakanaka, N. Itano, E. Gohda, K. Nakayama, K. Kimata, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, and S. Tanaka: Restriction of mast cell proliferation through hyaluronan synthesis by co-cultured fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* (2012) in press.

J.A. Mack, R.J. Feldman, N. Itano, K. Kimata, M. Lauer, V.C. Hascall, E.V. Maytin: Enhanced inflammation and accelerated wound closure following tetrathorbol ester application or full-thickness wounding in mice lacking hyaluronan synthases Has1 and Has3. *J. Invest. Dermatol.* 132(1):198-207 (2012)

H. Yabushita, K. Iwasaki, K. Kanyama, Y. Obayashi, L. Zhuo, N. Itano, K. Kimata, A. Wakatsuki: Clinicopathological role of serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP)-hyaluronan complex in endometrial cancer. *Obstet. Gynecol. Int.* 2011:739150 (2011)

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.* 10. (2011)

5. 総説・著書および総説

J. Iijima, K. Konno, and N. Itano: Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. *Cancers* 3: 3189-3205 (2011)

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癌進展 岡山大学大学院セミナー、岡山市、2011.11.17

板野直樹 腫瘍関連マクロファージとヒアルロン酸リッチ腫瘍微小環境 平成 23 年度北海道大学遺伝子病制御研究所共同研究集会、札幌市、2011.9.6

N. Itano: Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer progression. Uppsala University Svedberg Seminar Series, Uppsala, Sweden, 2011.8.29

板野直樹 ヒアルロン酸合成異常と癌の進展 第 8 回日本病理学会カンファレンス、松本市、2011.8.6

7. 学会発表

なし

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
課題名:がん細胞の運命決定に働く淘汰圧の自己形成と回避の機構
研究代表者:板野直樹、取得年度:H23-25 年(3 年)
- 2) 知財権等
なし
- 3) 学外活動
日本糖質学会評議員
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
- 4) 受賞等
なし
- 5) その他
平成 23 年度京都産業大学教育プログラム支援制度
課題名:実践 PBL の導入による基礎と実務教育の結合
岡山大学医学部非常勤講師(2011.4.1~2012.3.31)

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. AKM Mahbub Hasan, Ph.D



1. 研究概要

細胞膜及びその近傍で行われる細胞内外のシグナル伝達機構を明らかにすることを目的として、2つの実験プロジェクトを同時並行で進めている。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(卵細胞プロジェクト)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

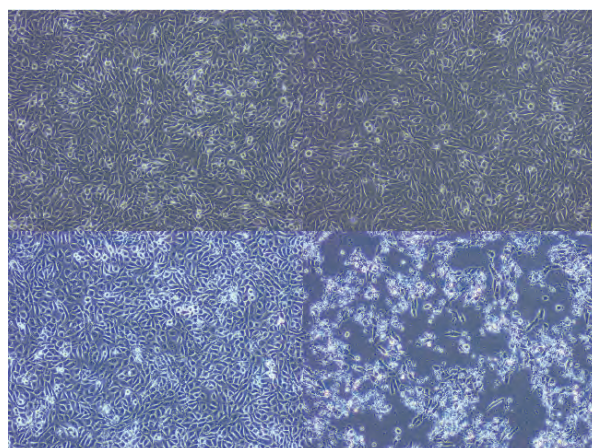
また、がんをテーマとする研究(がん細胞プロジェクト)では、以下の3点に重点を置いている。

- 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、これらの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」の一環として行っている。

2. 本年度の研究成果

1) ヒト膀胱がん細胞の血清飢餓環境下における抗アポトーシス性増殖機構の解析

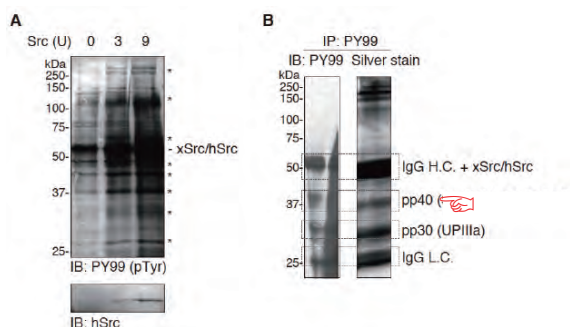
Src 依存的な血清飢餓抵抗性の増殖機構について、**5637** を含む4つの膀胱がん細胞株、ならびに他の幾つかのがん/不死化細胞を用いた比較解析を行った。血清飢餓環境下で **Src** の活性化および **Src** 特異的阻害剤 **PP2** に感受性の増殖を示すものは **5637** と2種類の膀胱がん細胞株に限られ、当該現象の膀胱がん特異性が示唆された。この膀胱がん特異性を裏付ける機構として、コレステロール依存性の膜マイクロドメインに局在するウロプラキシン **IIIa** (**UPIIIa**) の関与が幾つかの実験から示唆された。特に **UPIIIa** は血清飢餓に応答して **GM6001** (**MMP** 阻害剤) に感受性の部分分解を起こすことがわかり、この分解反応を抑制する処理により **Src** 活性化が抑制され細胞にアポトーシスが誘導されることがわかった。**GM6001** はまた、**EGFR** リガンドの一つである **HB-EGF** の血清飢餓応答性の分泌に対して阻害効果を持つことがわかった。これらの結果は、これまでに知られていなかったシグナル分子のネットワーク (**MMP**, **HB-EGF**, **UPIIIa**, **Src/EGFR**, **Met** など) が血清飢餓に応答して作動することにより、膀胱がん細胞に特異的なアポトーシス抵抗性が発現していることを示唆している(論文投稿中)。



膀胱がん細胞株 **5637**: 図では4通りの培養条件での細胞の状態を示している。

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 (UPIII) およびその他の受精関連分子の解析

未成熟卵母細胞および成熟卵母細胞のそれぞれから細胞膜マイクロドメインを調製し、精子依存的なシグナル伝達能や全発現タンパク質像(プロテオーム像)の比較解析などを行った。その結果、未成熟卵母細胞には精子依存的なチロシンキナーゼ Src 活性化能がないことや、卵成熟に伴うプロテオーム像の変化が多数あることなどが明らかにされた。また、未受精卵から調製した細胞膜マイクロドメインを用いた試験管内タンパク質リン酸化実験により、新規の Src 基質 pp40 (分子量 40 kDa) を同定し、その構造を質量分析により明らかにすることができた。この分子はこれまでにヒトがん細胞におけるチロシンリン酸化が報告されているが、その機能は不明であり、また卵細胞のような生殖細胞での発現及び生理機能についても全くわかっていない。今後はこの分子の卵細胞内における発現状態(発現量や局在性)や受精に伴うチロシンリン酸化の有無を検証していく。(総説論文発表あり、論文投稿準備中)



再構成実験系を用いた受精シグナル依存的チロシンキナーゼ基質 pp40 (☞で示す) の新規同定

3. Research projects and annual reports

In this year, we have made a progress in the cancer cell project as follows: Our previous study demonstrated that tyrosine phosphorylation of p145^{met}/b-subunit of hepatocyte growth factor receptor by epidermal growth factor receptor (EGFR) and Src contributes to the anti-apoptotic growth of human bladder carcinoma cell 5637 under serum-starved conditions. Here we show that some other cell lines of human bladder carcinoma, but not other types of human cancer cells, also exhibit Src-dependent, anti-apoptotic proliferation under serum-starved conditions, and that low-density, detergent-insoluble membrane microdomains (MD) serve as a structural platform for signaling events involving p145^{met}, EGFR, and Src. As an MD-associated molecule that may exhibit bladder carcinoma-specific cellular function, we

identified uroplakin IIIa (UPIIIa), a urothelium-specific protein. Results obtained so far revealed: 1) UPIIIa undergoes partial proteolysis in serum-starved cells; 2) a specific antibody to the extracellular domain of UPIIIa inhibits the proteolysis of UPIIIa and the activation of Src, and promotes apoptosis in serum-starved cells; and 3) knockdown of UPIIIa by short interfering RNA also promotes apoptosis in serum-starved cells. We also find that GM6001, a potent inhibitor of matrix metalloproteinase (MMP), inhibits the proteolysis of UPIIIa and promotes apoptosis in serum-starved cells and that serum starvation promotes up-regulation of the heparin-binding EGF-like growth factor in a manner that depends on the functions of MMP, Src, and UPIIIa. These results highlight a hitherto unknown signaling network involving a subset of MD-associated molecules in the anti-apoptotic mechanisms of human bladder carcinoma cells.

4. 発表論文 (すべて査読あり)

M. Nakai, J. Ito, K. Sato, J. Noguchi, H. Kaneko, N. Kashiwazaki, K. Kikuchi: Pre-treatment of sperm reduces success of intracytoplasmic sperm injection in the pig. *Reproduction* **142**:285-293 (2011)

S. Kushima, G. Mammadova, A.K.M. Mahub Hasan, Y. Fukami, K. Sato: Characterization of lipovitellin 2 as a tyrosine-phosphorylated protein in oocytes, eggs, and early embryos of *Xenopus laevis*. *Zool. Sci.* **28**:550-559 (2011)

5. 著書および総説 (すべて査読あり)

A.K.M. Mahub Hasan, T. Matsumoto, S. Kihira, J. Yoshida, K. Sato: Phospho-signaling at oocyte maturation and fertilization: Set up for embryogenesis and beyond Part II. Kinase regulators and substrates. In *Embryogenesis* (On-line book published by InTech Open Access Publisher) in press.

A.K.M. Mahub Hasan, T. Matsumoto, S. Kihira, J. Yoshida, K. Sato: Phospho-signaling at oocyte maturation and fertilization: Set up for embryogenesis and beyond. Part I. Protein kinases. In *Embryogenesis* (On-line book published by InTech Open Access Publisher) in press.

A.K.M. Mahub Hasan, Y. Fukami, and K. Sato: Gamete membrane microdomains and their associated molecules in fertilization signaling. *Mol. Reprod. Dev.* **78**:814-830 (2011)

6. 招待講演、国際シンポジウム・会議等

K. Sato, S. Kushima, T. Matsumoto, A. Hashimoto, Y. Maekawa, A.K.M. Mahub Hasan: Membrane microdomains and their associated signaling molecules in fertilization signaling. Commemorative Symposium of the 27th International Prize for Biology,

Kyoto, 2011.11.30-12.1.

K. Sato, S. Kushima, T. Matsumoto, A. Hashimoto, Y. Maekawa, AKM Mahbub Hasan: Membrane microdomains and their associated signaling molecules in fertilization signaling. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development, Holderness School (NH, USA), 2011.7.17-22.

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. 国内学会、研究会議など

佐藤賢一、玖島将太、松本尚士、マブハサン AKM: 卵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。新学術領域研究・領域会議、京都市、2011.6.30-7.1.

松本尚士、玖島将太、橋本亜樹、前川由佳、マブハサン AKM、佐藤賢一: ツメガエル卵細胞の受精及び細胞死シグナリングに関する研究。第 82 回日本動物学会大会、旭川市、2011.9.21-9.23.

マブハサン AKM、橋本亜樹、前川由佳、三田勇樹、戸阪智樹、深見泰夫、佐藤賢一: アフリカツメガエル配偶子間における膜マイクロドメイン依存性クロストーク。第 5 回日本ツメガエル研究集会、熱海市、2011.10.5-10.7.

松本尚士、玖島将太、橋本亜樹、前川由佳、マブハサン AKM、佐藤賢一: ツメガエル卵細胞の受精及び細胞死シグナリングに関する研究。第 5 回日本ツメガエル研究集会、熱海市、2011.10.5-10.7.

A.K.M. Mahbub Hasan, S. Kushima, T. Matsumoto, A. Hashimoto, Y. Maekawa, Y. Sanda, T. Tosaka, Y. Fukami, K. Sato: Membrane microdomain-mediated signaling crosstalk between egg and sperm in *Xenopus* fertilization. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011.12.13-16.

T. Matsumoto, S. Kushima, L. Yamada, R. Ikeda, AKM Mahbub Hasan, H. Sawada, K. Sato: Analysis of *Xenopus* fertilization signaling involving egg membrane microdomain functions and a possible anti-death mechanism. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011.12.13-16.

S. Kihira, J. Yoshida, Y. Hitomi, R. Hisatomi, AKM Mahbub Hasan, K. Sato: Src-dependent and MAPK-independent survival and proliferation of human bladder carcinoma cells under serum-deprived conditions. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011.12.13-16.

J. Yoshida, S. Kihira, Y. Hitomi, I. Kawaradani, AKM Mahbub Hasan, K. Sato: Possible nuclear localization of uroplakin III in human non-urothelial carcinoma cells. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011.12.13-16.

S. Kihira, J. Yoshida, AKM Mahbub Hasan, Y. Hitomi, Y. Kawada, T.

Asada, R. Hisatomi, A. Ohta, Y. Fukami, K. Sato: Membrane microdomain-associated UPIIIa is involved in Src-dependent mechanisms of serum-independent proliferation in human bladder carcinoma cells. 第 37 回日本生体エネルギー研究会討論会、京都市、2011.12.20-22.

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. 学内外の諸活動

共同世話人として第 7 回京都産業大学バイオフィォーラムを開催 (www.kyoto-su.ac.jp/departments/nls/news/20111221_bio.html) (12 月 19 日)

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) の表紙デザインに採用された。

2011 年 5 月 22 日に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/LABHPJ/Welcome.html>

オンライン図書 (題名: *Embryogenesis*、出版社: InTech) の編者となった (www.intechweb.org/)



研究室写真: 15 号館南側にて、卒業記念アルバム用に撮影 (2011 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。

NRP1 は分子量約 130 kDa の膜貫通型タンパク質であり、VEGF-A の受容体として血管内皮細胞に発現していることが発見された。血管において、NRP1 は VEGF-A と結合すると VEGFR2 のキナーゼ活性を増強し、血管新生や脈管形成・血管透過性の亢進を促進する。NRP1 は血管のみならず腫瘍にも発現しており、非小細胞肺癌、神経膠芽腫、大腸癌、卵巣癌患者の疾病組織において高発現していることが確認されている。また、NRP1 をラット前立腺がん細胞に誘導発現させた腫瘍の増殖は *in vivo* で促進されることが報告されている。以上の結果から、NRP1 は腫瘍細胞自体に、生存増殖シグナルを伝達していることが示唆されている。

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)、がん細胞の増殖、生存、および遊走を促進していることを見いだした。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。

2) 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) の及ぼすがん悪性化機構

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF) とそのチロシンキナーゼ型受容体 (FGFR) は、発生過程と成体において細胞の増殖、生存、遊走と分化を制御する必須な役割を果たしている。がんにおいて FGFR は、遺伝子増幅、染色体転座、変異等を含むいくつかのメカニズムで過剰に活性化されている。FGFR の変化は様々ながん、すなわち乳がん、膀胱がん、前立腺がん、子宮内膜がん、肺がん、血液がんにおいて報告されている。

これまで同定されている FGFR1-FGFR4 のすべては、がんの悪性化に関与することが報告されている。そのなかでも、FGFR3 の過剰発現や変異による活性化が数多くのがんで報告されている。最近の研究においては、膀胱がん、メラノーマ、多発性骨髄腫において発現する FGFR3 を標的とした創薬開発が進められている。FGFR3 を標的とした阻害剤は、FGFR3 を過剰発現または活性化しているがん患者に対して単独またはその他の阻害剤との組み合わせで、がん治療薬としての効果が期待されている。本研究においては、食道がん患者のがん組織で、FGFR3 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。FGFR3IIIc ががん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) 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。KS の原因遺伝子である *KAL-1* 遺伝子と *KAL-2* 遺伝子は、それぞれ Anosmin-1 と FGF 受容体 1 (FGFR1) をコードしている。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。*KAL-2* は第 8 染色体上の遺伝子で、膜貫通型チロシンキナーゼ型受容体である FGFR1 をコードしている。FGFR1 は、そのチロシンリ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 に結合するときに、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し、カルマン症候群患者の症状の回復と改善に向けて取り組みたい。

さらにこの成果を、神経回路形成の障害が原因となっているそのほかの疾患に対する治療法に向けて役立てたいと考えている。

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

悪性扁平上皮癌細胞 DJM-1 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。In vitro において、DJM-1 細胞を VEGF-A siRNA で処理すると、VEGF-A の分泌が低下し、コロニー形成が強く抑制された。DJM-1 細胞は VEGFRs を発現していないが、VEGF-A のレセプターである NRP1 を発現していた。VEGFR kinase inhibitor ではコロニー形成を抑制しなかったが、NRP1 の siRNA では VEGF-A 依存性のコロニー形成を抑制したことから、VEGF-A/NRP1 シグナルが DJM-1 細胞の生存と増殖を促進している事がわかった。足場タンパク質である GIPC1 と、RhoGEF の Syx は、VEGF-A 存在下で NRP1 の C 末端に結合し、複合体を形成した。それらに対する siRNA によって、DJM-1 細胞のコロニー形成は強く抑制された。VEGF-A/NRP1 シグナルは RhoA を活性化させ、RhoA の特異的阻害剤である C3 enzyme によって、DJM-1 細胞のコロニー形成は抑制された。このことから、VEGF-A は NRP1 と結合し、NRP1 が GIPC1/Syx と複合体を形成することで RhoA を活性化させ、腫瘍形成を亢進させる事が示唆された。

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。

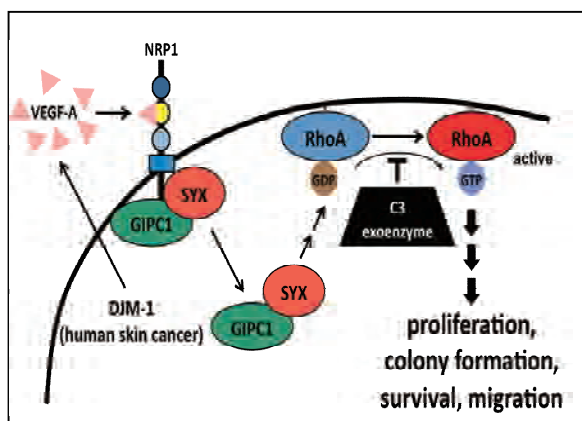


図1 悪性腫瘍における VEGF-A/NRP1 シグナル伝達

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。本研究室で食道がん患者のがん組織では、FGFR3 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膜貫通型 FGFR3IIIb、IIIc、可溶型 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 はリガンドである FGF2 に対する感受性を有している。FGF2 の発現上昇が食道がん患者の予後不良との関連性が報告されていることから、FGFR3IIIc の発現上昇も予後不良に関わっている可能性が高い。FGFR3IIIc は正常な間葉系の細胞に発現しており、上皮細胞における発現はほとんど認められない。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た。FGFR3IIIc ががん細胞の転移を促進する機構を明らかにする。

3) カルマン症候群患者の新規 acid box 変異型 FGFR1 の機能と神経細胞の分化との関連

カルマン症候群は中枢性性腺機能低下症と嗅覚異常を伴う先天性疾患で、第 8 染色体上の FGFR1 (線維芽細胞増殖因子受容体 1) 遺伝子の他 5 つの遺伝子が、原因遺伝子として同定されている。私どもは、以前カルマン症候群の患者の FGFR1 Acid Box に 1 アミノ酸挿入変異 (D133_D134insD) が生じていることを報告した。この患者では、嗅覚の低下と MRI による嗅球の形成不全が認められたが、ゴナドトロピン分泌不全を示す所見は認められなかった。FGFR1 Acid Box 変異によって神経細胞の機能に影響があるかを調べるため、PC12 細胞に FGFR1 正常型 (WT) または FGFR1 Acid Box 変異体 (FGFR1 mutant) を安定発現させた。FGF2 によって、FGFR1 mutant は FGFR1 WT と同程度の神経突起伸長を引き起こした。下流シグナル伝達経路タンパク質である MAPK (ERK1/2) と Akt のリン酸化の程度にも差異は見られなかった。しかし、FGFR1 mutant の神経突起は FGFR1 WT と比較して細くなっており、細胞骨格であるニューロフィラメント (NF) タンパク質量の低下が見られた。PLCγ の FGFR1 mutant への結合は FGFR1 WT と比較して低くなっていた。PLCγ の siRNA によるノックダウンは FGFR1 mutant に見られる表現型を引き起こした。以上の結果

から、FGFR1 WT と mutant による神経突起の太さの差には PLC γ の経路が関与していることが示唆された。

4) カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 は軸索反発因子 RGMa の成長円錐の崩壊作用を阻害する

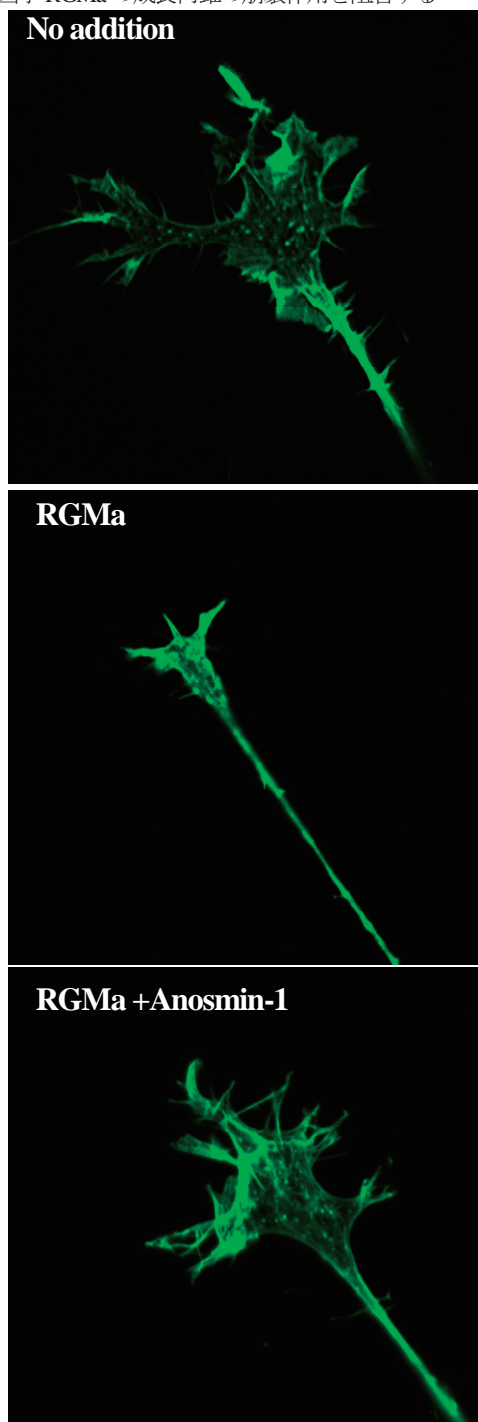


図2 Anosmin-1 添加による RGMa の成長円錐崩壊の抑制
成長円錐の F-actin を AlexaFluor 488-phalloidin (緑色) で染色した。

我々は、*KAL-1* がコードする細胞外分泌タンパク質 Anosmin-1 が、成長円錐の形成を促進することを見いだした。Anosmin-1 は、フィブロネクチン III 繰り返し構造をもち、RGMa の膜貫通型レセプターである Neogenin の細胞外領域と約 20% の相同性を持っている。RGMa は軸索ガイダンス分子であり、Neogenin に結合することによって成長円錐の崩壊を誘導する(Conrad, S. et al., 2007)。本研究では、Anosmin-1 が RGMa の可溶性レセプターとして作用し Neogenin への結合を阻害することから、成長円錐の形成を促進するという仮説を検証しようとした。

PC12 細胞を FGF2 で刺激し神経細胞へ分化誘導すると、神経突起を伸長し成長円錐を形成した(図 2: No addition)。Anosmin-1 は、PC12 細胞の成長円錐形成を促進し、RGMa は PC12 細胞の成長円錐を崩壊させた(図 2: RGMa)。RGMa と同時に Anosmin-1 を添加すると、RGMa によって誘導される成長円錐の崩壊を抑制した(図 2: RGMa+Anosmin-1)。正常型 Anosmin-1 は、生体内で Neogenin-RGMa の成長円錐崩壊シグナルを阻害する可溶性レセプターとして作用する可能性が示唆された。*KAL-1* 変異型カルマン症候群では、変異型 Anosmin-1 が中枢神経系における RGMa による神経軸索伸展の阻害やシナプス形成の阻害を抑制できないことが発症機序になっている可能性が考えられる。

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.

FGFs and their tyrosine kinase receptors (FGFRs) play essential roles in regulating cell proliferation, survival,

migration and differentiation during development and adult life. In cancer, FGFRs become overactivated by several mechanisms, including gene amplification, chromosomal translocation and mutations. FGFR alterations are detected in a variety of human cancers, such as breast, bladder, prostate, endometrial and lung cancers, as well as hematological malignancies. Since FGFR3 is frequently overexpressed and/or mutated in cancers and has been recognized as a potent oncogene, it is an attractive target for novel drug development. Several new FGFR3-targeting inhibitors/antibodies have been developed alone or in combination with other inhibitors in cancer patients with FGFR3 overexpression.

The third 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 of 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 angiogenesis and tumor malignancy. 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 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). DJM-1 cells express neuropilin-1 (NRP-1), another receptor for VEGF-A. 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 NRP1) suppressed the colony formations, too. These results suggest that VEGF-A induces the survival and growth of tumor cells via NRP-1 signaling. Further analysis revealed that VEGF-A induced to form complex of NRP-1, GIPC-1, and Syx RhoGEF. Indeed, VEGF-A administration activated RhoA activity in DJM-1 cells. On the other hand, inhibition of RhoA activity by C3 exoenzyme abrogated DJM-1 colony formation in soft agar. Taken together, these results suggest that VEGF-A binds to NRP-1 and induces to form complex GIPC-1 and Syx, resulting in activation of RhoA activity to promote colony formations of DJM-1 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 that 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 in 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} (WT) and the clone for FGFR1^{ABinsD} (M), we analyzed the length of the neurite outgrowth in the PC12 cells length. There was no difference in the length of neurites between WT and M. In the both clones, FGF2 induced the similar levels of phosphorylation of MAPK (ERK1/2) and Akt (Figure 3). As an evident phenotype in M, interestingly, differentiated M showed the narrower width neurites and less content of neurofilament 160 (NF160) in immunostaining and Western blotting analysis compared to that of WT. In

coimmunoprecipitation assay, M could not make the complex with PLC γ Figure 3. PLC γ siRNA treatment decreased the width of neurites in WT. Taken together, these results suggest that FGFR1 signaling via PLC γ has a crucial role for neurons with normal width and content of NF.

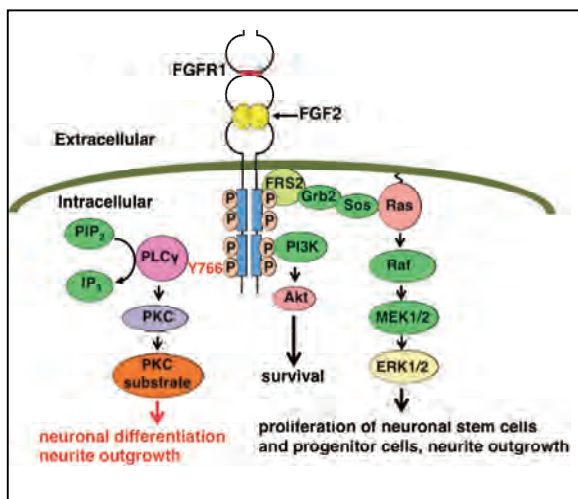


Figure 3 Intracellular signaling pathways downstream of FGFR1 in neurons.

3: Elevated expression of alternative spliced FGFR3 isoforms in human gastrointestinal cancer progression

Of the four human fibroblast growth factor receptors (FGFRs), the activating mutations of FGFR3 have been found to be involved in the development and progression of tumors. In order to investigate whether a change in the gene expression and splice variations of FGFR3 is associated with malignant progression in human gastrointestinal cancers, we examined the gene expression of FGFR3 isoforms in human esophageal cancer patients by RT-PCR. FGFR3 has three alternatively spliced isoforms. FGFR3 IIIb and FGFR3 IIIc are the transmembrane-type isoforms and have different ligand specificities. The third isoform, FGFR3 Δ TM, is the soluble isoform lacking the transmembrane domain and secreted extracellularly. The incidence of FGFR3 IIIc in the esophageal carcinoma (63 %) was significantly higher than in the normal human esophageal biopsies (0 %) ($P < 0.05$). In this study, we investigated the importance of FGFR3 IIIc in epithelial cancer cells. FGFR3 IIIc may have the potential to enhance malignant progression in epithelial cancers. Our findings suggest that the increased expression of FGFR3 IIIc may be an important marker for malignancy and potential anti-cancer therapeutic targets in esophageal cancer.

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

瀬尾美鈴、北河博紀、竹内祥人、大嶋朗、岡本沙矢香、清水昭

男：Anosmin-1 は RGMa の神経成長円錐崩壊作用を阻害する。

第 5 8 回日本生化学会近畿支部例会、守口市、2011.5.20

吉田亜佑美、清水昭男、Michael Klagsbrun、瀬尾美鈴：VEGF-A/NRP1 シグナルは GIPC1/Syx/RhoA を活性化することで悪性上皮癌細胞の生存と増殖を促進する。

第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会、東京台場、2011.6.22-24

岡本沙矢香、寺田基剛、清水昭男、佐藤直子、緒方勤、瀬尾美鈴：FGFR1 Acid Box 変異は細胞内シグナル伝達分子 PLC γ との相互作用を低下させ神経突起伸長に異常をきたす。

第 8 4 回日本生化学会大会合同年会、京都市、2011.9.21-24

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) 瀬尾美鈴：学会座長「細胞・細胞内輸送、細胞骨格」
第 5 8 回日本生化学会近畿支部例会 関西医科大学、守口市、2011.5.21
- 2) 瀬尾美鈴：日本生化学会近畿支部 代議員 (2010.10.1-)、
幹事 (2011.10.1-)
- 3) 瀬尾美鈴：京都産業大学図書館長 (2010.10.1-)

発生細胞生物学研究室

Laboratory of Cell and Developmental Biology

教授 中村 暢宏

Prof. Nobuhiro Nakamura, Ph.D



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。

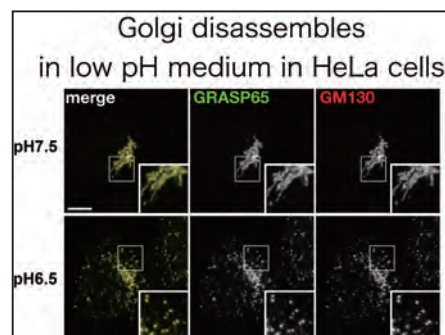
細胞はゴルジ体の機能状態をモニターして、その構造や細胞内での局在を、細胞の機能発現に合わせて巧妙に調節していると推察されるが、その解析はほとんど進んでいない。そこで、ゴルジ体に局在するタンパク質、特に細胞周期や細胞運動の制御や細胞死の情報伝達への関与が示唆されているタンパク質の挙動や機能を生化学的・分子生物学的・細胞生物学的・発生生物学的手法を用いて解析し、①ゴルジ体の構造維持の分子機構やその細胞周期調節との関連を明らかにするとともに、②ゴルジ体から核や細胞質全体へどのような情報伝達が行われているのかを明らかにすることを目的として研究を進めている。また、初期発生の観察が容易でかつ培養細胞系での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最終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

ほ乳類培養細胞において、細胞培養液の pH が低下すると、ゴルジ体が分散化する事を見いだした。ゴルジ体の構造変化が細胞増殖や細胞運動などの調節に関わっている事が知られており、アシドーシス時にゴルジ体が分散化することによって、細胞増殖や細胞運動などを調節している可能性が考えられた。この可能性を検証するために、pH 低下時のゴルジ体分散の分子機構の解析を行った。細胞培養液の pH 低下によって、細胞質の pH が顕著に低下していたが、ゴルジ体内腔の pH に変化はなかった。従って、細胞質の pH 低下がゴルジ体分散の主因であることが示唆された。低 pH 処理後まもなく、*cis*-Golgi から管状の構造物が生じ、これによって

cis-Golgi が先駆けてまず分散化し、*medial*-Golgi、*trans*-Golgi が続いて分散化することが明らかとなった。また、pH 低下の効

果は可逆的であり、正常な pH の培地に戻すと、2時間後にはコントロールと同様のレベルまでゴルジ体の構造が回復した。ゴルジ体の分散化はホスホリパーゼ A2 の阻害剤である ONO-RS-082 あるいは Bromoenol lactone によって阻害された。また、小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送に機能する小型 GTPase である rab1, rab2 の過剰発現によっても阻害された。したがって、ホスホリパーゼ A2 がゴルジ体からの管状構造物の形成とゴルジ体の分散化に機能しており、rab1 と rab2 はこれに拮抗的に働いていることが明らかとなった。



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 proposed 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 Golgi apparatus disassembles in cultured cells under low pH medium. Since the disassembly of the Golgi apparatus was shown to be involved in the regulation of cell growth and motility, it is probable that the disassembly of the Golgi apparatus has some role(s) in the control of cell growth and motility under acidosis. To substantiate this possibility, we have analyzed the molecular mechanism of the Golgi disassembly under the low pH. The low pH treatment reduced the cytoplasmic pH but not the luminal pH of the Golgi apparatus. Therefore, the reduced cytoplasmic pH was suggested to be the main cause of the Golgi disassembly. Shortly after the low pH treatment, *cis*-Golgi started to tubulate and disassembled. The disassembly of the *medial*- and *trans*-Golgi started following the *cis*-Golgi. The disassembly was reversible so that the Golgi reassembled near to the control level two hours after returning to the normal pH medium. The disassembly was inhibited by treating with inhibitors of phospholipase A2 (ONO-RS-082, Bromoenol lactone) and also by the higher-level expression of rab1 or rab2, small GTPases that is reported to function in the ER to Golgi transport. Therefore, it was suggested that phospholipase A2 is involved in the tubulation and disassembly of the Golgi apparatus and rab1 and rab2 regulate this process.

4. 発表論文

K. Tanimoto, K. Suzuki, E. Jokitalo, N. Sakai, T. Sakaguchi, D. Tamura, G. Fujii, K. Aoki, S. Takada, R. Ishida, M. Tanabe, H. Itoh, Y. Yoneda, M. Sohda, Y. Misumi and N. Nakamura.
Characterization of YIPF3 and YIPF4, *cis*-Golgi Localizing Yip

domain family proteins. *Cell Struct Funct* **36**: 171-185 (2011)
M. Hiyoshi, N. Takahashi-Makise, Y. Yoshidomi, N. Chutiwittonchai, T. Chihara, M. Okada, N. Nakamura, S. Okada and S. Suzu. HIV-1 Nef perturbs the function, structure, and signaling of the Golgi through the Src kinase Hck. *J Cell Physiol* **227**: 1090-1097 (2012); [Published online on 2011]

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

Nobuhiro Nakamura: Convergence and divergence of vesicular transport system over species. 第84回、日本生化学会大会（京都）2011年9月21日～24日（シンポジウム・オーガナイザー）

7. 学会発表

石田竜一、久保田広志、高橋弘樹、岡俊彦、北村朗、金城政孝、伊藤英晃：シャペロニン Hsp60 の ATP、Hsp10 依存的なダブルリング化について、第11回日本蛋白質科学会年会（大阪）2011年6月7～9日

8. その他特記事項

学外活動

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

各種審査員等

Nobuhiro Nakamura: Research Grant Council (RGC) of Hong Kong (2件) 2011年2月, 3月

中村暢宏：岡山大学テニユア・トラック教員中間評価（1件），2011年2月

中村暢宏：日本学術振興会 書類審査（43件）2011年8月

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

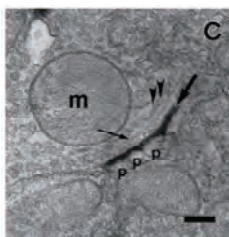
われわれが日常、物を考えたり、学習、記憶したりすることができるのは、脳の複雑さの中にわれわれの知識を超えた未だ謎と呼ぶべき機構が存在するからである。そして、その謎を明らかにすることで混沌とした脳に法則性を示すことができるようになる。われわれは、脳の個々の発生現象の制御機構を分子レベルで明らかにすると共に、脳全体の発生を統御する遺伝プログラムの解明を目指して研究を進めている。以上の問題にアプローチするために、10万個の神経細胞からなるシンプルな脳(ヒトの脳の百万分の一)を持つショウジョウバエをモデル動物として研究に用いている。

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繊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、特にシナプス間隙の分化と神経繊維の標的を制御する機構について研究している。

1) シナプス間隙マトリクスタンパク質 Hig の機能の解明

シナプス間隙は、シナプス前部と後部に挟まれた数十 nm の幅をもつ空間で、そこに放出された神経伝達物質が受容体に結合することにより神経伝達が行われる。このように、シナプス間隙は神経機能の中心を担うシナプスの一部であるが、そこにどのような物質が存在し、神経の発生や機能に関与しているのか不明な点が多い。

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われわれが同定した *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

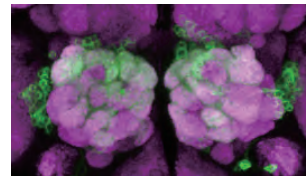


シナプス間隙における Hig タンパク質の局在。
m: ミトコンドリア、矢頭: シナプス小胞、矢: リボン状構造。p: シナプス後部末端、スケール: 200 nm。

子レベルで解明することを研究の目標とする。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。

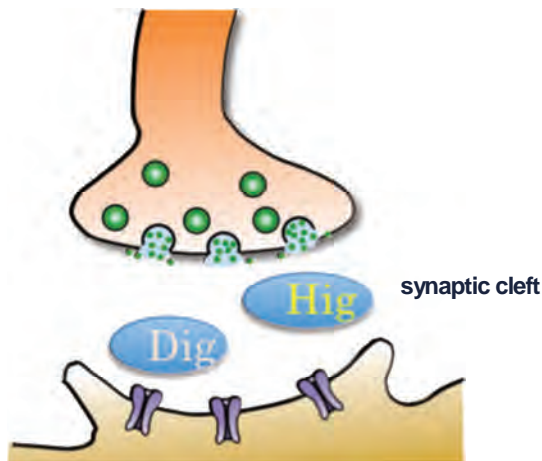


ショウジョウバエの脳内にある嗅覚一次中枢(緑および白)。

2. 本年度の研究成果

1) Hig タンパク質と相互作用する Dig タンパク質の解析

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。そこで、Dig タンパク質に対する抗体を作製して脳を染色してみると、Dig は確かにシナプス領域に存在して Hig の近傍にあるが、両者は必ずしも共局在しているわけではなかった。このことから、Dig と Hig はシナプス間隙で大きな複合体を構成している、あるいは間接的に相互作用している可能性が考えられる。また、*dig* 変異株においても野生株と同様に、輸送途上の Hig タンパク質が神経繊維に観察されることから、Dig は Hig のシナプス間隙への輸送に関与するというより、シナプス間隙にお



る Hig の局在しないし安定性により直接的に関与していると考えられる。

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。これらの結果は、ヒストンのメ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。

3. Research projects and annual reports

How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We have been studying molecular mechanisms underlying specific neuronal events that occur during nervous system development, and also trying 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*, which comprises 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 for Hig protein in synaptic clefts.

The *hig* (*hikaru geneki*) gene, identified by a reduced locomotor activity of the mutant flies (Hoshino *et al.*, Neuron 1993), encodes a protein localized to synaptic clefts in the brain (Hoshino *et al.*, Development 1996). The goal of this project is to reveal roles for Hig and other matrix proteins in the synaptic clefts. In addition, the absence of one of the human proteins resembling to Hig is known to cause epilepsy, mental retardation and 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 (Endo *et al.*, Nat. Neurosci. 2007). The purpose of this project is to reveal molecular mechanisms that regulate the precise axonal projection of ORNs by 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 component of the complex would help us reveal the function of Hig. We therefore decided to search the mutants exhibiting a 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 when *dig* was mutated. This indicates that Dig is required for Hig localization in the synaptic clefts. Antibody staining revealed that Dig localized to synaptic regions, but it did not precisely colocalize with Hig, suggesting that both proteins may interact indirectly, and form a large protein complex in synapses. Whether Dig forms a complex with Hig has to be tested by immunoprecipitation in the near future. The presence of Hig on the way of transport even in the neurites of *dig* mutants suggests that Dig is required for the localization or stability of Hig in the synaptic clefts rather than for its neurite transport.

Another gene *higl*, as revealed 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.

Immunofluorescent labeling 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). This is consistent with the notion that Hig is localized to the 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 present in the whole synaptic regions. This suggests that Hig protein, not only secreted from adjacent synaptic terminals but also diffused over a long distance through extracellular spaces, can be incorporated into synaptic clefts. We propose that Hig protein is tethered by specific scaffold components that collectively constitute an extracellular matrix in the synaptic clefts.

2: Identification of the genes affecting axonal projection of ORNs.

On the basis of mutant analysis, we have successfully identified three genes 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

H. Ito, (5名省略), C. Hama, D. Yamamoto: Fruitless Cooperates with Two Antagonistic Chromatin Factors to Establish Single-Neuron Sexual Dimorphism. *Cell* in press.

M. Nakayama, H. Sato, T. Okuda, N. Fujisawa, N. Kono, H. Arai, E. Suzuki, M. Umeda, H. O. Ishikawa and K. Matsuno: *Drosophila* carrying *pex3* or *pex16* mutations are models of Zellweger syndrome that reflect its symptoms associated with the absence of peroxisomes. *PLoS One* 6(8):e22984 (2011).

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* 69(2):87-92 (2011).

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

Hig protein as a possible component of the synaptic cleft extracellular matrix in *Drosophila*. Minoru Nakayama, Chihiro Hama
第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011. 12. 13-16

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 挑戦的萌芽研究
「ローランド型てんかん発症機構解明のためのショウジョウバエモデルの作成」(代表)

2. 知財権等

なし

3. 学外活動

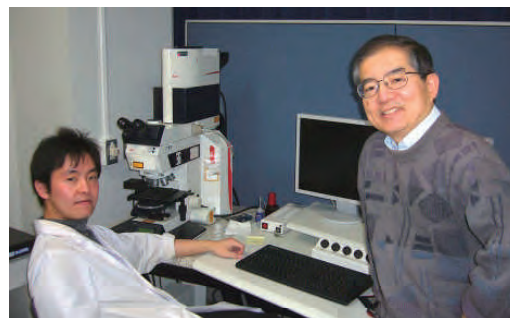
文部科学省脳科学研究戦略推進プログラム 課題選定委員

4. 受賞等

なし

5. その他

理化学研究所客員主管研究員



by M. Nakayama

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 (ネオグリコリピド) 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) 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。2) 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リコリピド化し、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。3) 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 に対する抗体を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た。現在、その抗体を用い、ファブリキウス嚢における CD24 陽性細胞を検索したところ、陽性細胞を観察することができた。しかしながら、CD24 陽性細胞の割合が相対的に低く、ファブリキウス嚢からの精製が困難であった。そこで、CD24 の発現を確認したニワトリ白血病由来の株細胞である DT-40 から CD24 の精製を試みている。現在までのとこ

ろ、ニワトリ CD24 は、マウス、ラット CD24 と同様に GPI アンカーをもつ膜タンパク質であることが分かったが、マウス、ラット CD24 の分離の場合と異なり、有機溶媒に不溶であった。精製の程度は不明であるが、分離した CD24 を使用して、糖鎖マイクロアレイの技術を用いて、レクチン MAA と SNA による結合シグナルを探り、シアル酸残基の結合様式を探索している。

2. 本年度の研究成果

1) 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。2) CD24 分子に結合しているポリラクトサミン鎖は N-グリコシド型糖鎖に結合していること。3) 実験に用いた抗 CD24 モノクローナル抗体の抗原決定基は、ラットとマウスの CD24 のアミノ酸配列の違いから、N-末端 11~13 番目の Asn-Gln (N-glycan bearing) Asn の領域と推定されていたが、13 番目の Asn にフコースの結合したキトビオース構造も含まれることが分かった。4) ニワトリ白血病由来の株細胞である DT-40 から CD24 の精製できた。ニワトリ CD24 は、マウス、ラット CD24 と同様に GPI アンカーをもつ膜タンパク質であることが分かった

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.

To explore the role of CD24 in an infection of A-type influenza virus, anti-serum against chicken CD24 was constructed using some polypeptides that differ amino acid sequence from those of mouse, rat CD24s. The anti-serum revealed the chick CD24, which was isolated from DT-40 cells, to be a membrane glycoprotein with GPI-anchor.

4. 論文

1. S.Fukui and M. Kawahara; Purification and characterization of CD24, one of major poly-N-acetyl-lactosamine-carrying glycoproteins, in PC12 cells. *Glycoconjugate J.*, 28(5), 277-278, 2011

5. 学会発表

1. S.Fukui and M. Kawahara; Purification and characterization of CD24, one of major poly-N-acetyl-lactosamine-carrying glycoproteins, in PC12 cells. 第 21 回 国際複合糖質シンポジウム 2011 年 8 月 ウイーン、オーストリア

6. その他特記事項

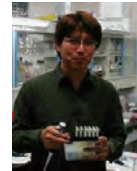
なし

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。

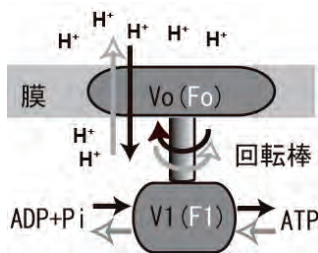


図1 ATP合成酵素の概念図。回転運動を介して水素イオンの輸送と化学反応を結びつけている。

我々は、複合体I の詳細な構造、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。本年度では、*C. elegans* に 20 度付近でも有効な ATP センサータンパク質 ATeam を導入し、咽頭筋において ATP レベル変化のリアルタイム検出に成功した。

3. Research projects and annual reports

1. Rotary mechanism of V-ATPase

Vacuole-type ATPases (V_0V_1) and F_0F_1 ATP synthases couple ATP hydrolysis/synthesis in the soluble V_1 or F_1 portion with proton (or Na^+) flow in the membrane-embedded V_0 or F_0 .

portion through rotation of one common shaft. Here we show at submillisecond resolutions the ATP-driven rotation of isolated V_1 and of the whole V_0V_1 from *Thermus thermophilus*, by attaching a 40-nm gold bead for which viscous drag is almost negligible. V_1 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_0V_1 exhibited twelve dwell positions per revolution, consistent with the twelve-fold symmetry of the V_0 rotor in *T. thermophilus*. Unlike F_1 that undergoes 80°-40° substepping, chemo-mechanical checkpoints in isolated V_1 are all at the ATP-waiting position, and V_0 adds further bumps through stator-rotor interactions outside and remote from V_1 .

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*, 2011, p233-238

Kishikawa J., Fujikawa M., Imamura H., Yasuda K., Noji H., Ishii N., Mitani S., *Yokoyama K. Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*. *Microsc. Res. Tech. 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：軸サブユニットの起源とトルク発生. 第11回 日本蛋白質科学研究会 ワークショップ、(吹田市, 6/22)

横山 謙：細菌型 V-ATPase の構造生物学. 第84回 日本生化学会大会 シンポジウム、(京都市, 9/22)

7. 学会発表

Yokoyama K.

Origin of rotor of Rotary ATPase. Gordon Research Conference, Bioenergetics (Proctor Academy, US. 6/26-7/1)

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84回 日本生化学会大会、(神戸市, 9/11-16)

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

ATP concentration change in *Caenorhabditis elegans*. The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan, (Yokoyama, 12/13-16)

岸川 淳一, 伊吹 達也, 南野 徹, 難波 啓一, 中西 温子, 宮田 知子, 今田 勝巳, 横山 謙

回転分子モーターの軸サブユニットの分子進化、第37回日本生体エネルギー研究会討論会 (京都. 12/20-22)

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

2. 新聞掲載

回転分子モーターのイオン輸送機構に関する研究成果が、京都新聞 3/15, 日刊工業新聞 3/8, 日本経済新聞 3/8 に取り上げられた。

3. 研究会開催

第37回日本生体エネルギー研究会討論会を代表世話人として開催した。(京都産業大学神山ホール、12/20-22)

タンパク質バイオジェネシス研究室

Laboratory of Protein Biogenesis

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。ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に変換して、具体的な生命活動を引き起こす「翻訳」はセントラルドグマのキーとなる過程である。この過程、はリボソームの内部において進行する。そこでは、デコーディング(情報処理)とペプチド結合形成(ケミストリー)が行われ、タンパク質の鎖がペプチド転移活性中心において生成されていく。合成途上鎖(polypeptidyl-tRNA)のポリペプチド部分は、リボソーム内部のトンネルを通過してリボソームの外に出て行く。

我々は、これらの過程が、機械的で単調なものではなく、リボソームと合成途上ポリペプチドがダイナミックに相互作用しつつ進行するものであることを示し、そのような現象に注目している。「合成途上で働く」という、タンパク質の新たなあり方も見いだした。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。合成途上鎖はタンパク質の運命決定を微調整していると一般化することもできそうだ。このような問題意識の下で、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)に注目している。合成途上鎖の全体

教授 伊藤 維昭

Prof. Koreaki Ito

助教 千葉 志信

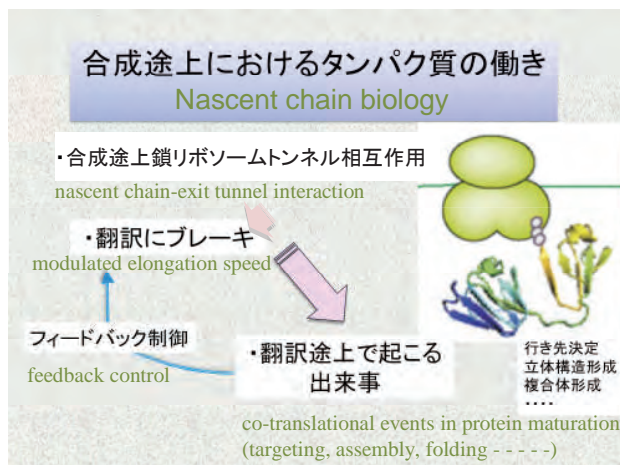
Assist. Prof. Shinobu Chiba



像を nascentome と呼ぶことを提案し、その検出方法を開発するなどして研究を進めている。

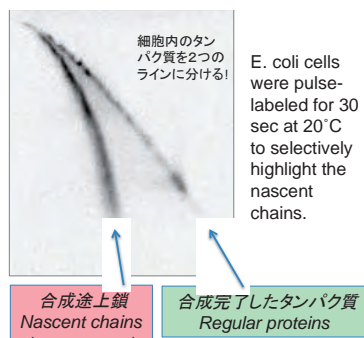
2. 本年度の研究成果

1) 翻訳伸長アレストの解析: 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と生きた菌体を用いた遺伝解析を組み合わせることで、アレスト配列とリボソームの相互作用様式について研究を進めた。そして MifM や SecM の合成途上鎖とリボソームは、生物種毎に異なる個別性の高い方式で相互作用することを見いだした。各生物は、それらのプロテオームに適合するようにリボソームトンネルを進化させてきたのかもしれない。本年度、リボソームが立ち止まる mifM mRNA 上の位置を詳細に決定する実験を進めた。その結果、MifM は SecM などのこれまでに知られているアレストペプチドとは、異なる新しい方式で翻訳伸長アレストを起こしていることがわかりつつある。



2) 細胞に於ける合成途上鎖(polypeptidyl-tRNA)の解析: 合成途上鎖の細胞に於ける動態に関する研究は少なく、それらを検出する標準的な実験手法もなかった。我々は細胞内の合成途上鎖 (polypeptidyl-tRNA) の全体像を“nascentome”と呼ぶことを提唱し、nascentome メンバーを選択的に検出する方法を開発した。tRNA を保持した1次元目と、切り離れた2次元目の泳動により、通常のタンパク質群 (tRNA がついていない) と合成途上鎖群 (tRNA がついていない) を別個の2本のライン上に分離する単純な方法である。

Nascentome はいくつかの異なる概念で整理する必要がある。全プロテオームメンバーが経験する過渡的存在としての“transient nascentome”の概念のほかに、個々のプロテオームメンバーが辿る合成途上状態を示す“sub-nascentome”、SecM などのように伸長アレストを起こす“stable nascentome”、終止コドンを欠く異常な mRNA などの翻訳による“dead end nascentome”などが有り得る。岡山大学のグループとの共同研究により、大腸菌細胞は dead end nascentome を生じるような、空回り翻訳を予想外の高頻度で行っているが、最低2種類存在するリボソーム救援機構によって dead end nascentome が処理されていることが示唆された。



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 have developed an experimental method that enable us 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 found that elongation arrest of MifM

is brought about by species-specific interaction between the MifM nascent polypeptid and the *B. subtilis* ribosome. We also determined the positions of ribosome stalling on the *mifM* mRNA and found that the MifM nascent chain provokes the ribosome stalling by novel mechanisms.

2. Although polypeptidyl-tRNAs are important components of translation, they have not been profiled in cellular contexts. We developed an experimental method that allows electrophoretic visualization of polypeptidyl-tRNAs of the cell, termed “nascentome”, by SDS-PAGE in two dimensions, first with peptidyl-tRNA ester bonds preserved and then after their in-gel hydrolysis. Now we can separate cellular proteins onto two lines of electrophoretically separated materials, representing nascent chains and translation-completed regular proteins, respectively. Collaborative experiments with Dr. Abo (Okayama University) using this method and the *E. coli* mutant defective in the ribosome-rescuing mechanisms allowed us to propose that *E. coli* cells produce aberrant mRNAs, lacking an in-frame stop codon, and its translation products (“dead end nascentome members”) at unexpectedly high frequencies.

4. 発表論文

Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., and Abo, T. (2011) Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **6**(12): e28413 (2011)

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* **108**: 13740-13745 (2011)

Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, 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* **474**: 235–238 (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* **108**: 6073-6078 (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* **108**: 798-803 (2011)

5. 著書および総説

Ron, D. and Ito, K.: A translational pause to localize. *Science* **331**: 543-544 (2011)

6. 招待講演、シンポジウム等

伊藤維昭:タンパク質誕生の初期における出来事. 京都産業大学総合生命科学部開設記念シンポジウム. 2011.3.10

Ito, K.: Controlling epigenetic connectivity in proteins. Microbial Genetics and Genomics IV. Harvard Medical School, Boston, U.S.A., April 29-May 1, 2011

森博幸、塚崎智也、越前友香、濡木理、伊藤維昭: プロトン駆動力を用いたSecDFによる蛋白質膜透過の昂進機構. 第11回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「細胞膜ダイナミクス: In vitro再構成系によるアプローチ」, 大阪, 2011年6月7-9日

Ito, K., Tsukazaki, T., Mori, H. and Nureki, O: Structure, function and regulation of bacterial Sec machinery. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Symposium Bacterial Protein Transport. Sapporo, September 6-10, 2011

森博幸、塚崎智也、越前友香、秋山芳展、濡木理、伊藤維昭: 蛋白質膜透過を促進する膜内在性因子SecDFの構造と機能. 第84回日本生化学会大会シンポジウム「生体膜エネルギー変換装置の超分子科学」, 京都, 2011年9月21-24日

Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualization of cellular polypeptidyl-tRNAs uncovers futile protein synthesis in *E. coli*. Cold Spring Harbor Asia Conference Protein Homeostasis in Health and Disease, Suzhou, China, September 26-30, 2011

Chiba, S., Kanomori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K.: In vitro study of translation arrest of MifM, a regulatory nascent chain that monitors membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. 第34回日本分子生物学会年会 Symposium “Regulatory Systems Mediated by Programmed Ribosomal Stalling”, 横浜, 2011.12.13-16

7. 学会発表

Ito, K.: Visualizing a dynamic nascentome, polypeptidyl-tRNAs of the cell. Microbial Genetics and Genomics IV. Harvard Medical School, Boston, U.S.A., April 29-May 1, 2011

千葉志信、金森崇、上田卓也、伊藤維昭: タンパク質膜組込をモニターする枯草菌翻訳アレスト因子MifMのin vitro解析. 平成23年度グラム陽性菌ゲノム機能会議, 福山, 2011年8月25-26日

Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K.: Modularity and species-specificity of translation arrest motifs in translocation monitor proteins. Cold Spring Harbor Asia Conference Protein Homeostasis in Health and Disease, Suzhou, China, September 26-30, 2011

千葉志信、金森 崇、上田卓也、秋山芳展、Kit Pogliano、伊藤維昭: 翻訳途上鎖のダイナミズムによる翻訳伸長の制御とそれを利用した蛋白質局在化モニタリング機構. 第37回日本生体エネルギー研究会, 京都, 2011年12月20-22日

森博幸、塚崎智也、越前友香、町田裕紀子、秋山芳展、Andres D. Maturana、濡木理、伊藤維昭: タンパク質の分泌を促進するSecDF複合体の構造と機能. 第37回日本生体エネルギー研究会, 京都, 2011年12月20-22日

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

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」 研究分担者: 伊藤維昭

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

生物遺伝資源に関する大腸菌小委員会及びNBRP 原核生物運営委員会委員 伊藤維昭

Evaluation Committee Member for the Global COE program of University of Hyogo, “Picobiology: Life Science at the atomic level” Koreaki Ito

日本学術振興会特別研究員等審査会委員 伊藤維昭

4. 受賞等

なし

発生システム研究室

Laboratory of Developmental Systems

教授 八杉 貞雄

Prof. Sadao Yasugi, Ph.D

助教 石井 泰雄

Assist. Prof. Yasuo Ishii, Ph.D



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、眼である。

(1) 消化器官の平滑筋分化に関する研究

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。胚期の消化管は基本的に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。2011年度には、これらの知見に基づいて、間充織からの平滑筋の分化過程に注目し、各消化器官の平滑筋層が形成される過程を明らかにし、また、平滑筋の機能制御に重要である腸管神経叢の分化過程を、神経冠細胞特異的抗体を用いて明らかにすることを目指した。

(2) 消化器官の幹細胞に関する研究

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を明らかにするために、昨年の Lgr5 遺伝子に続いて、Akt1, Dclk1, EphB2, EphB3, Hes1, Msi1, PTEN, Wdr43 遺伝子をマーカーとして、発生過程における幹細胞の局在を調べた。

(3) 心臓の発生に関する研究

心臓は発生の過程で最も早くから機能する器官であるが、はじめは心筋と心内膜からなるごく単純な一本の管にすぎない。心臓全体に血液を供給する冠動脈は、心臓が拍動を始めた後に、心外膜原基とよばれる心臓の外から移動してくる細胞群が、新たに追加されることによって生じる(図1)。近年、心外膜原基を起源とする細胞が、冠動脈だけでなく、心筋を含むさまざまな細胞に分化する能力をもつことが示され、その性質やふるまいは再生医学の観点からも注目されている。われわれは、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。

(4) 眼の形態形成に関する研究

眼の網膜のもととなる眼杯と将来水晶体になるレンズ胞は、前脳の一部である眼胞および眼胞を覆う表皮外胚葉の変形によって生じる(図2)が、その仕組みは明らかにされていない。われわれは、眼の形態異常を示すモデル胚、in vitro 培

養、遺伝子導入等を用い、眼の形成機構の分子レベル、細胞レベルでの解明を目指している。

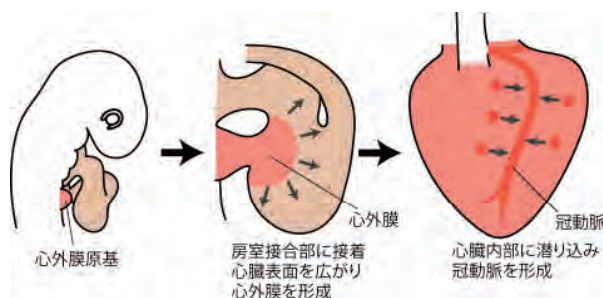


図1 心外膜原基の心臓への進入および冠動脈の形成。心外膜原基は房室接合部に接着したのち、心臓表面を覆う心外膜を形成する。その一部の細胞が心筋層に向かって潜り込み、冠動脈をつくる。

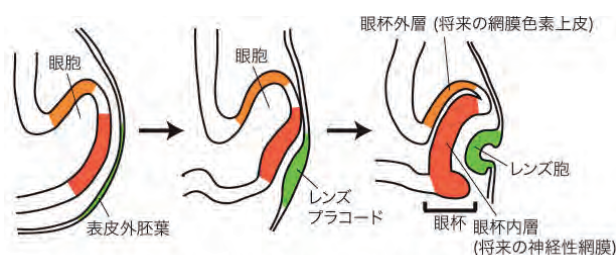


図2 発生初期の眼における形態形成運動。眼胞の表皮外胚葉に近い部分がくぼみ、二層の上皮組織からなる眼杯が生じる。それとほぼ同時に、表皮外胚葉が肥厚・陥入し、レンズ胞を形成する。

2. 本年度の研究成果

(1) 消化器官の平滑筋分化に関する研究

平滑筋は腸管における食物の移動に重要であり、神経冠由来の神経叢によるその機能制御は正常な消化にとって必須である。ニワトリの消化器官(食道、前胃、砂嚢、小腸、大腸)にはそれぞれ固有の平滑筋層が見られるが、器官特異的な筋層の配置がどのように決定されるかは明らかではない。この点を解明するために、平滑筋特異的アクチンに対する抗体を用いて、発生初期の器官について平滑筋の分布を明らかにした。その結果、孵卵6日には平滑筋が分化するが、器官特異的な層構造が確立するのは孵卵10日以後であることが明らかになった。また、消化器官の立体構造を保ったまま培養するコラーゲン内培養法を確立して、今後の研究に用いることとなった。

(2) 消化器官幹細胞に関する研究

上記の遺伝子の多くについて、DIG ラベルのプロブの作成に成功し、一部の遺伝子については in situ hybridization

を用いた発現解析を開始した。またそのポジティブコントロールとして、小腸上皮細胞のマーカーである CdxA の発現検出を行った。

(3) 心臓の発生に関する研究

心外膜原基は、心臓の房室接合部への接着を経て心臓へと進入するが、接着が心臓の特定の部位でのみおこる仕組みはよくわかっていない。ホールマウント胚および組織切片の観察により、心外膜原基が房室接合部だけでなく心房とも接している時期があることが示された (図 3A)。この観察結果は、心臓の部位によって、心外膜原基に対する接着親和性が異なることが、心外膜原基の接着部位を限定する上で重要であるというモデルを支持している (図 3B)。そのモデルをさらに検討するため、心外膜原基を心臓断片と接触した状態で培養する新たな手法を確立した (図 3C)。

(4) 眼の形態形成に関する研究

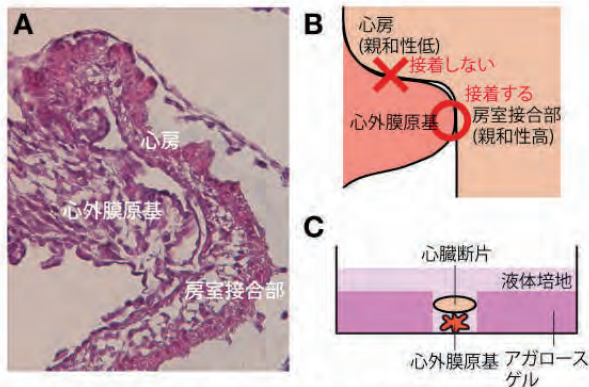


図3 心外膜原基の心臓への進入。A. 心外膜原基は、心臓の房室接合部に接着する際、心房にも接している。B. モデル-心外膜原基に対する接着親和性による進入経路の制御。D. 接着親和性を解析するための *in vitro* 培養法。

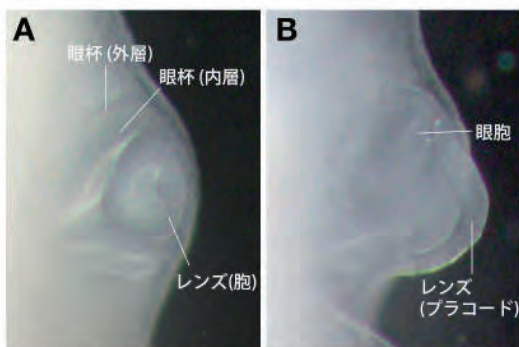


図4 通常の温度 (38°C) で発生させた胚 (A) と低温 (30°C) で発生させた胚 (B) の眼の形態の比較。通常の温度では、眼胞と表皮外胚葉がくぼみ、眼杯とレンズ胞を生じる。低温ではそれらの過程が阻害される。

眼の形態形成研究に有用なニワトリモデル胚を得る方法を確立した。2日間孵卵した受精卵を、低温 (30°C) でさらに2日間発生させることにより、突出した眼を持つ形態異常胚を得ることができた (図 4)。これらの胚では、眼杯およびレンズ胞

の形成に必要な上皮組織の陥入運動が、全く見られないか不完全であった。同様の胚は、全胚培養や単離した頭部の *in vitro* 培養を低温で行うことによっても得られた。このような形態異常胚は今後、眼の形態形成に関わる制御因子やシグナル伝達経路、組織間相互作用を探索・解析する上で有用である。加えて、眼胞の領域化に関わる転写因子遺伝子 Six3, Rx1, Optx2 の翻訳領域を単離し、今後の強制発現による機能解析に用いることとなった。

3. Research projects and annual reports

In 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 eyes of the chicken embryos.

(1) Smooth muscle layers of the 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 digestive organs. In the year 2011, we analyzed development of the smooth muscle layers and enteric ganglia that are important for the regulation of function of smooth muscle.

(2) Localization of stem cells in the developing digestive organs

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 therefore studied the expression of stem cell-specific marker genes during the intestinal development.

(3) Heart

Although the heart is the first functional organ in vertebrate embryos, the early embryonic heart is a simple tubular structure, consisting of only myocardium and endocardium. Formation of the coronary vessels, which are essential for adult heart functions, depends on entry of an extracardiac rudiment called the proepicardium (PE). Recent studies suggest that the PE and its derivatives are sources of stem cells useful for regenerative therapies for cardiovascular diseases. We investigate mechanisms underlying PE induction and entry, roles of PE-derived cells in heart development and their potential medical applications, using chick embryos as a model.

(4) Eye morphogenesis

Epithelial morphogenesis generates the basic structure of the vertebrate eye. The optic cup, the primordium of the light-sensitive retina, and the lens vesicle form through invagination of the optic vesicle and overlying surface ectoderm respectively. We study cellular and molecular mechanisms underlying these dynamic events, using model embryos exhibiting defects in eye morphology, in vitro culture and gene transfer techniques.

Results

(1) Smooth muscle layers of the digestive organs

Smooth muscle layers are important in the transport of the ingested food through the gut. Each organ of the gut has specific pattern of muscle layers, but the mechanisms that specify the pattern are largely unknown. We analyzed the early development of the organs (esophagus, proventriculus, gizzard, small and large intestines) with using the specific antibody to smooth muscle actin. The results showed that smooth muscle layer first appears at day 6 of incubation, and organ-specific arrangements of muscle layers are established after day 10. We also developed a culture method by which the three-dimensional architecture of the organs is well maintained.

(2) Localization of stem cells in the developing digestive organs

We cloned Akt1, Cclk1, EphB2, EphB3, Hes1, Msi1, PTEN and Wdr43 genes, known to be expressed in the stem cells of adult intestine of both mouse and chick, and made DIG-labeled probes. With these probes, we started in situ hybridization study of the expression pattern of these genes in the embryonic chicken intestine.

(3) Heart

The PE protrudes toward and attaches to the atrioventricular junction (AVJ) of the primitive heart tube. However, it remains unclear how the PE attaches to this specific region of the heart. Our whole-mount inspection and histological analysis showed that the PE is in close proximity not only to the AVJ but also to the sinoatrium (SA), supporting a model in which the AVJ has higher affinity to the PE than the SA. To test this model, we developed a new in vitro culture system where the PE and a heart segment can maintain their contact in a liquid culture medium.

(4) Eye morphogenesis

We established a new protocol to generate a chick embryo model useful to study eye morphogenesis. Incubation of

fertilized eggs at a low temperature (30 degrees Celsius) after two days of normal incubation (38 degrees Celsius) resulted in protruded eyes, in which the lens ectoderm and optic vesicle failed to invaginate. Similar defective eyes were also obtained in whole embryo culture and in vitro organ culture under low temperature conditions. This embryo model would be useful to survey candidate molecules and signaling pathways involved in eye morphogenesis. We also cloned whole coding sequence of eye-patterning genes, Six3, Rx1 and Optx2, for future gain-of-function analyses.

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* 11: 171-180 (2011)

5. 著書および総説

八杉貞雄: 動物の形態-進化と発生- (裳華房) (2011)

八杉貞雄、可知直毅 (編) : 生物事典 (旺文社) (2011)

八杉貞雄: C. ダーウィン著『種の起原』. 「科学」編集部 (編) 「科学者の本棚」 (岩波書店) (2011), pp. 220-223.

八杉貞雄: 分子発生学. 猪飼篤、野島博 (著) 「生化学・分子生物学演習」 (東京化学同人) (2011), pp. 281-290.

八杉貞雄: 私のフランス語. 日仏生物学会誌 51, 61-63 (2011)

石井泰雄: 私のアメリカ留学体験記. 日仏生物学会誌 51, 46-51 (2011)

6. 招待講演、シンポジウム等

八杉貞雄: ニワトリ胚の研究と現代発生生物学. 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, 2011. 12. 1.

石井泰雄: 器官形成研究のモデル生物としての鳥類胚-心臓発生における器官原基の統合 第84回日本生化学会大会. 京都市, 2011. 9. 21-24

石井泰雄: 冠動脈形成細胞のダイナミズム 京都産学公連携フォーラム2011. 京都市, 2011. 11. 18

八杉貞雄、石井泰雄: 第27回国際生物学賞シンポジウムの開催. 本シンポジウムは、昭和天皇在位60年を記念して設けられた国際生物学賞の受賞者の分野に関する国際シンポジウムである。2011年の分野は「発生生物学」で、受賞者はカリフォルニア工科大学のE. H. Davidson教授であった。シンポジウムは、京都産業大学と日本学術振興会の共催で、11月30日、12月1日に京都ガーデンパレスで、外国人9名、日本人12名をスピーカーとして行われ、最後に受賞者による公開講演会

が開催された。八杉はOrganizing Committeeの責任者として、また石井は委員として、シンポジウムの開催に務めた。

7. 学会発表

Okayama, Y., Kimura, W., Yasugi, S. and Fukuda, K. : Modification of BMP signaling is essential for the specification of the foregut endoderm in the chicken embryo. 日本発生物学会第44回大会. 那覇市, 2011. 5. 18-22.

Ishii, Y., Sugimoto S. and Yasugi, S. Sustained expression of coronary vessel/epicardial progenitor marker genes in the four-chambered chick embryonic heart. 日本発生物学会第44回大会. 那覇市, 2011. 5. 18-22.

石井泰雄、杉本成伸、八杉貞雄：ニワトリ胚期心臓における冠動脈前駆細胞マーカー遺伝子の発現. 日仏生物学会第174回例会、東京、2011. 5. 28

後藤悠太、武政智恵、木村航、八杉貞雄、福田公子：新規分子APOA1は初期肝臓マーカー遺伝子Hex誘導に関わる. 日本動物学会第82回大会. 旭川市, 2011. 9. 21-23.

石井泰雄、八杉貞雄、三川隆：心臓原基統合過程における組織間接着親和性の新規解析系の開発. 日仏生物学会第175回例会、仙台市、2011. 12. 3.

Ishii, Y., Garriock, R., Navetta, A., Coughlin, L and Mikawa, T. Guidance of coronary and epicardial precursor cells to the heart by myocardium-derived BMP signals. 第27回 国際生物学賞記念シンポジウム、京都、2011. 11. 30-12. 1.

Ishii, Y., Sugimoto S. and Yasugi, S. Sustained expression of coronary vessel/epicardial progenitor marker genes in the four-chambered chick embryonic heart. 第27回 国際生物学賞記念シンポジウム、京都、2011. 11. 30-12. 1.

8. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・研究活動スタート支援

課題名：冠動脈前駆細胞の誘導・移動メカニズム

研究代表者：石井泰雄、取得年度：H22-23年（2年、23年度分は辞退）

科学研究費補助金・基盤研究B

課題名：冠動脈・心外膜前駆細胞の動態とその制御

研究代表者：石井泰雄、取得年度：H23-27年（5年）

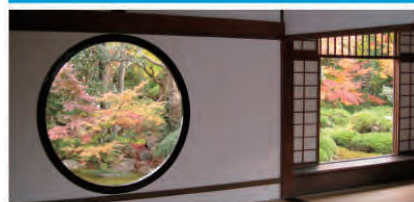
2) 知財権等 なし

3) 学外活動

八杉貞雄、石井泰雄：「高校生物教職員研究会 発生物学リカレント講座」講師、神戸市、2011. 10. 1-2.

石井泰雄：京都産学公連携フォーラム 2011（京都市、2011. 11. 18）にて、口頭発表（前述）およびポスター発表を行った。

4) 受賞等 なし



Sponsored by:
Kyoto Sangyo University
Japanese Society for Promotion of Science



タンパク質機能研究室

Lab. Protein Function

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

細胞の中の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いる。そして、立体構造の移り変わり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。本研究分野では分子シャペロンの作用機構について研究している。

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 ATP 合成酵素の構造、機構、制御について研究を展開している。

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

2010 年、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、一部の変性タンパク質は、空洞から外に（フタである GroES が結合しているにもかかわらず）逃げ出すことを明らかにした。2011 年、この新しい作用機構を tethering mechanism と名付けて発表した（次の図）。このメカニズムに照らして過去の GroEL 研究で重要とみなされているいくつかの論文内容を検討したところ、多くの訂正が必要であることを見出した。

教授 吉田 賢右

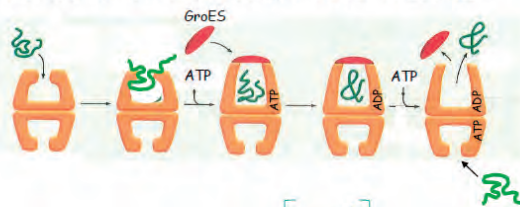
Prof. Masasuke Yoshida, Ph.D

助教 元島 史尋

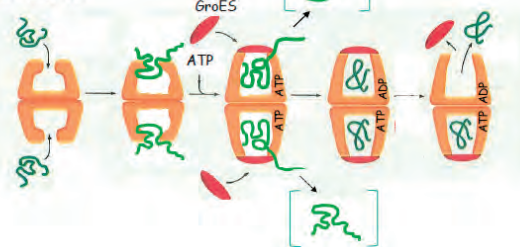
Assit. Prof. Fumihito Motojima, Ph.D



今までのモデル（“molecular biology of the Cell”の図を改変）



新しいモデル

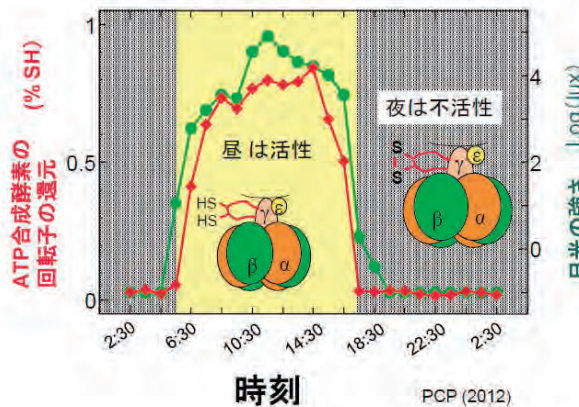


ATP 合成酵素

1) 制御機構の研究

細菌の ATP 合成酵素の阻害因子 ϵ の変異体で阻害作用を失ったものを持つ大腸菌は高塩濃度で生育に障害が起きることがわかった。植物の場合は、回転子である γ が、朝の日照とともに還元されて活性化して ATP を合成し、夜になると酸化されて ATP 加水分解を防ぐことを実証した（下図）。ヒト ATP 合成酵素にゆるく結合する DAPIT をノックダウンすると、ATP 合成酵素はアッセムブリー出来なくなることを見出した。

ホーレンソーのATP合成酵素は日光によって制御されている



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 does not dissociate GroES, 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.

We named this new mechanistic model as “Tethering mechanism” and revisited previous results from other groups that have been taken to be important contribution for the understanding of GroEL mechanism. We found, however, these papers contain many misunderstanding and misinterpretations. Many previous works should be carefully examined under the light of tethering mechanism.

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. We generated *E. coli* containing chromosomal ϵ gene that lacks inhibitory function. The mutant cell, to our surprise, is normal nearly in all aspect except for retarded growth in high salt condition. In plant, we for the first time, we succeeded in the in vivo demonstration of regulatory function of γ subunit. At dawn, γ in ATP synthase is reduced and starts ATP synthesis driven by

sunshine. At dusk, γ in ATP synthase is oxidized and becomes unable to hydrolyze precious ATP that is made by glycolysis and respiration produce ATP. DAPIT is a loosely associate subunit of human ATP synthase. The DAPIT-knockdown human cell lacks mature ATP synthase, indicating DAPIT is essential for the assembly of ATP synthase.

4. 発表論文

- Inoue Y, Kawai-Noma S, Koike-Takeshita A, Taguchi H, Yoshida M. Yeast Prion Protein New1 Can Break Sup35 Amyloid Fibrils into Fragments in an ATP-dependent Manner. *Genes to Cell*, 2011, 16, 545-556
- Hara, K. Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Yoshida, M., and Kino, K. (2011) “ATP photosynthetic vesicles for light-driven bioprocesses”, *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1133-1138.
- Taniguchi N, Suzuki T, Berney M, Yoshida M, Cook GM. The regulatory C-terminal domain of subunit ϵ of F₀F₁ ATP synthase is dispensable for growth and survival of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2011 Apr;193(8):2046-52.
- Ohsakaya S, Fujikawa M, Hisabori T, Yoshida M. Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem.* 2011 Jun 10;286(23):20292-6.
- Suzuki T, Wakabayashi C, Tanaka K, Feniouk BA, Yoshida M. Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F(o)F(1)-ATP Synthase by epsilon-subunit. *J Biol Chem.* 2011 May 13;286(19):16807-13.
- Yamasaki T, Nakazaki Y, Yoshida M, Watanabe YH. Roles of conserved arginines in ATP-binding domains of AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus*. *FEBS J.* 2011 Jul;278(13):2395-403.
- Soga N, Kinoshita K Jr, Yoshida M, Suzuki T. Efficient ATP synthesis by thermophilic *Bacillus* FoF1-ATP synthase. *FEBS J.* 2011 Aug;278(15):2647-54.
- Kohori A, Chiwata R, Hossain MD, Furuie S, Shiroguchi K, Adachi K, Yoshida M, Kinoshita K Jr. Torque generation in F1-ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice. *Biophys J.* 2011 Jul 6;101(1):188-95.
- Rak M, McStay GP, Fujikawa M, Yoshida M, Manfredi G, Tzagoloff A. Turnover of ATP synthase subunits in F1-depleted HeLa and yeast cells. *FEBS Lett.* 2011 Aug 19;585(16):2582-6.
- Watanabe R, Okuno D, Sakakihara S, Shimabukuro K, Iino R, Yoshida M, Noji H. Mechanical modulation of catalytic power on F(1)-ATPase. *Nat Chem Biol.* 2011 Nov 20;8(1):86-92.
- Usukura E, Suzuki T, Furuie S, Soga N, Saita E, Hisabori T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Torque generation and utilization in motor

enzyme F0F1-atp synthase: half-torque F1 with short-sized pushrod helix and reduced atp synthesis by half-torque F0F1. *J Biol Chem.* 2012 Jan 13;287(3):1884-91.

Kuruma Y, Suzuki T, Ono S, Yoshida M, Ueda T. Functional analysis of membranous Fo-a subunit of F1Fo-ATP synthase by in vitro protein synthesis. *Biochem J.* 2011 Dec 14.

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

Motojima F, Motojima-Miyazaki Y, Tanaka S, Yoshida M: Tethering mechanism of chaperonin. Cold Spring Harbor Symposium, Suzhou, China, 2011. 9. 27

吉田賢右: 理解したいという「欲望」に動かされて. 科研費特定領域「タンパク質の一生」若手ワークショップ. 2011. 9. 1

吉田賢右: ATP合成酵素の制御の解明にむけて. ICORP 終了シンポジウム. 京都産業大学 2011. 12. 20

7. 学会発表

島袋勝弥、野田直紀、吉田賢右、Murray Stewart, Thomas M. Roberts. Simultaneous reconstitution of MSP-based protrusion and retraction in the amoeboid sperm of *Ascaris* 第49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. Inhibitory factor-1 (IF1)によるヒト F1-ATPase の阻害の一分子解析. 第84回日本生化学会大会 2011. 9.

戸所泰人、カン スジン、田中健太郎、湯面郁子、岩崎 郁、鈴木俊治、吉田賢右、藤原敏道、阿久津秀雄. 脂質二重膜再構成 H⁺-ATP合成酵素 subunit c-ring の固体高分解能 NMR 法による構造解析. 第11回日本蛋白質科学会年会 2011. 6

藤川誠、森薫子、吉田賢右. Functional identification of unknown genes localized at mitochondria using MASC assay. 日本分子生物学会 2011. 12

菅原佳奈子、藤川誠、吉田賢右. Mitochondrial ATP-synthesis is affected by the activity of certain kinds of protein kinases 日本分子生物学会

溪口直弘、鈴木俊治、Michael Berney、吉田賢右、Gregory M. Cook. 細菌型 FoF1-ATP合成酵素における ε サブユニットの役割の生理学的解析 第37回日本生体エネルギー研究会 2011. 12. 21

Naoki Soga, Kazuhiko Kinoshita Jr, Masasuke Yoshida, Toshiharu Suzuki. Kinetic equivalence of ΔpH and ΔΨ in ATP synthesis by FoF1 from thermophilic *Bacillus PS3*. 第37回日本生体エネルギー研究会 2011. 12. 21

鈴木俊治、若林千晃、田中一巳、古池 晶、木下一彦、吉田賢右. Inhibitory factor-1 (IF1)による ATP合成酵素の機能制御機構

第37回日本生体エネルギー研究会 2011. 12. 21

元島史尋、吉田賢右. The interaction with the chaperonin cage changes the folding pathway of blue fluorescent protein (BFP) 第11回日本蛋白質科学会年会 2011.6.7

元島史尋、元島(宮崎)優子、吉田賢右. Chaperonin changes the heat capacity and pathway of BFP folding 第49回日本生物物理学会年会 2011.9.18

元島史尋、元島(宮崎)優子、吉田賢右. シャペロニン は疎水相互作用によって BFP のフォールディングを促進する 第37回 日本生体エネルギー研究会討論会 2011.12.22

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「タンパク質の社会」

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)

文部科学省科学研究費 新学術領域研究「揺らぎと生体機能」

2. 知財権等；

なし

3. 学外活動；

東京大学医学部非常勤講師

科学研究費 審査・評価第一部会

植物分子遺伝学研究室

Laboratory of 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

当研究室では、「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

昨年の年報にもあるように、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している。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が、これらのゲノムを任意に改変して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、ア)タバコを用いたストレス耐性植物の育成、イ)葉物野菜の機能性向上に関する研究、ウ)パンコムギへの葉緑体組換え技術の適用、エ)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。

具体的にア)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)を効率的に消去させるため、葉緑体に局在する ROS 消去系酵素の活性を高めることをめざしている。そのため、これら酵素の遺伝子を葉緑体ゲノムに導入し、強発現させることで、植物のストレス耐性を強化しようとしている。これまでの実験で、

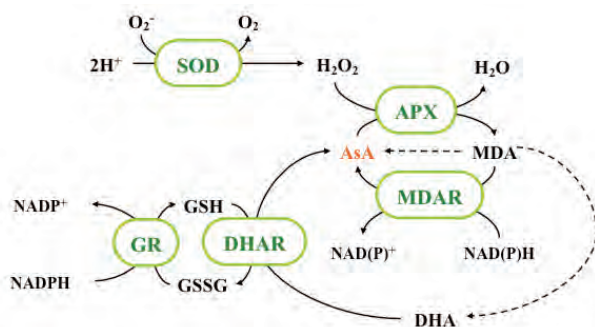


図 1. グルタチオン/アスコルベート回路

図1に示す葉緑体のアスコルベート/グルタチオン回路を構成する5つの酵素を単独あるいはオペロンとして葉緑体ゲノムに持つ組換え体を作成することに成功した。これらの組換え体は、当該酵素の活性が飛躍的に上昇し、強光などへのストレス耐性が高まることが示されている。またイ)では、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葉物野菜の鉄含量を高める方策を探っている。これまで行ってきたタバコの先行研究に続き、今年度はレタスの葉緑体の遺伝子組換え実験に着手した。現状ではまだレタスの組換え体は得られていないが、葉片から効率良く植物体を再生させることには成功している。ウ)では、葉緑体の遺伝子組換え技術を、作物であるパンコムギへ適用できないか種々検討している。最後にエ)では、葉緑体で発現させた有用タンパク質の安定化及び精製の簡素化に、カイコの多角体タンパク質が利用できないか検討している。現在、多角体を葉緑体で発現する組換えタバコが作出されており、今後、同じ組換え体に共発現させた任意のタンパク質が、期待通り多角体へ封入されるか調べる必要がある。

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に研究を進めている。雄性不稔とは、植物体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、我が国のハマダイコン集団における塩基多様度など、分子集団遺伝学の基本的パラメーターが解明されつつある。また *orf687*とは異なる機構で稔性を回復する未知の *Rf* 遺伝子については、遺伝子単離にむけた植物材料の育成などが行われている。

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ミトコンドリアの遺伝子を特定しようと考えている。

2. 本年度の研究成果

上記1)の(ア)の課題では、図1に示した回路を構成する酵素のうち、SODを葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出に成功した。また、GSHの合成を担う酵素の遺伝子(*gsh1*)を有する組換え体もできつつある。さらに近年、植物分子生物学のモデル植物として頻りに用いられるベンサミアナタバコの組換え体(APX)の作出にも成功した。この組換え体の後代の特徴付けしたところ、予想どおりAPXを強発現しており、非組換え体に比べてメチルピオロゲン(ROSを発生させる薬剤)に対する耐性も上昇していることがわかった。なお、昨年度に作出したAPX/MDAR、APX/SOD/MDAR オペロンを持つ組換えタバコについては世代更新を行い、それぞれを系統化した。イ)の課題では、岡山大学との共同研究を継続しており、レタスの組換え体が作出できた際には、先方の設備(ICP-MSなど)を用いて葉の鉄含量を正確に定量する予定である。ウ)の課題では、大量(2万5千個以上)の未熟胚をパンコムギから調製し(図2)、マーカー遺伝子(GFP)の導入を試みたが、組換え体は得られなかった。



図2. パンコムギ未熟胚からの植物体の再分化

10mg/LのAgNO₃を培地に添加することで(右図)、再分化効率が改善された。

なおエ)の課題は、客員研究員との共同研究であるが、今年度は進展がなかった。

2)高橋が、平成23年4月に熊本県、6月に山形県、平成24年3月に宮崎県(予定)の現地調査を行い、雄性不稔を示すハマダイコンを採集した。これらの個体からDNAを単離し、ミトコンドリアゲノムのタイプを調査したところ、すべてオグラ型と判定され、新規のミトコンドリアゲノムは発見できなかった。調査は継続中である。また今年度、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、mtDNAの全塩基配列データを次世代シーケンサーにより得た。その結果、オグラ型mtDNAは全長258,426bp、正常型mtDNAは全長244,037bpの環状DNA分子と考えられること(図3)、雄性不稔の原因遺伝子*orf138*は、両型の分化にともなうmtDNAの大規模な再構成の過程で偶然生じた、新規遺伝子であることがわかった。

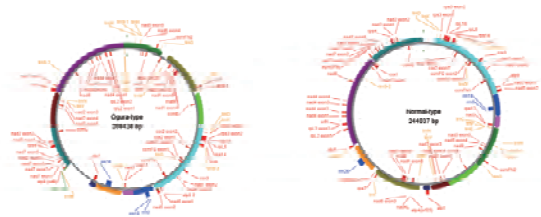


図3. ダイコンのミトコンドリアゲノムの構造

オグラ型(左)及び正常型(右)

3) *Ae. mutica*の細胞質を持つ置換コムギの2系統について、mtDNAを精製し、次世代シーケンサーにより配列データを得た。その結果、C13系統のmtDNAは全長420,346bp、C14系統のmtDNAは全長436,349bpの環状DNA分子であることがわかった。また両系統のミトコンドリアゲノムは、大規模なシャッフリングとわずかな点突然変異で区別できることなどが示された。

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. In order to reveal a mitochondrial gene(s) responsible for the phenotypic difference between alloplasmic

and euplasmic lines of common wheat, their complete mitochondrial genome sequences determined by the next-generation sequencer have been analyzed.

4. 発表論文

Y. Honma, Y. Yoshida, T. Terachi, K. Toriyama, T. Mikami and T.

Kubo: Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of

Oryza and *Brassica*. *Curr Genet.* **57**(4): 261-270 (2011)

KR. Takahasi, T. Matsuo and T. Takano-Shimizu-Kouno: Two types

of cis-trans compensation in the evolution of transcriptional regulation.

PNAS **108**:15276-15281 (2011)

5. 著書および総説

無し

6. 招待講演、シンポジウム等

寺地徹、田中義行:次世代シーケンサーを用いた高等植物ミトコン

ドリアのゲノム解析、次世代シーケンスセミナー、大阪市、

2011.5.27

寺地徹:葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物作出への試み、京

都産業大学 総合生命科学部 第2回バイオフォーラム、京都市、

2011.6.24

寺地徹:葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物作出への試み、岩

手県生物工学研究センター、第176回公開セミナー、北上市、

2011.7.22

寺地徹:植物の葉緑体を用いた有用たんぱく質の大量生産系の構

築、近畿バイオインダストリー振興会議、第27回シーズ公開会、大

阪市、2011.11.24

植物オルガネラゲノム研究センター:アグリビジネス創出フェア2011

への出展、千葉市、2011.11.30-12.2

7. 学会発表

Tanaka, Y., M. Tsuda, K. Yasumoto, H. Yamagishi and T. Terachi:

Mitochondrial genome analysis of radish (*Raphanus sativus*) by

next-generation sequencing. International Conference for Plant

Mitochondrial Biology, Hohenroda (Germany), 2011.5.14-19.

Yasumoto, K., J. Imamura, C. Koizuka, H. Yamagishi and T. Terachi:

A new fertility restorer gene for Ogura male-sterility found in wild

radish (*Raphanus raphanistrum* L.). International Conference for

Plant Mitochondrial Biology, Hohenroda (Germany), 2011.5.14-19.

辻村朋彦、大矢悠貴、山本裕範、寺地徹:活性酸素消去の異なる酵

素遺伝子を持つタバコ葉緑体形質転換体の比較。日本育種学会

第120回講演会、福井県、2011.9.23-24

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 2:正常

型とオグラ型ゲノムの比較。日本育種学会第 120 回講演会、福井

県、2011.9.23-24

Gyawali, Y. P., Y. Tanaka, M. Tsujimura and T. Terachi:

Comparative study on the mitochondrial genomes of alloplasmic

wheat lines with *Aegilops mutica* cytoplasm. 日本育種学会第 120

回講演会、福井県、2011.9.23-24

津田瑞江、田中義行、安本景太、寺地徹、山岸博:シロイヌナズナと

キャベツの体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの解析。日本育

種学会第120回講演会、福井県、2011.9.23-24

安本景太、寺地徹、山岸博、ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に

対する稔性回復遺伝子 Rft のマッピング。日本育種学会第 120 回

講演会、福井県、2011.9.23-24

Yoshimi, M., T. Saito, S. Isshiki, T. Terachi and H. Yamagishi:

Studies on a novel open reading frame (*orf*) found in the

mitochondrial genome of alloplasmic lines of eggplant showing male

sterility. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint

Conference, Kobe, 2011.11.28-12.2.

Tsujimura, T., Y. Tanaka and T. Terachi. Stable chloroplast

transformation in *Nicotiana benthamiana* and expression of a gene

encoding ROS scavenging enzyme APX. 8th Solanaceae and 2nd

Cucurbitaceae Genome Joint Conference, Kobe, 2011.11.28-12.2.

辻村真衣、富岡関子、森直樹、寺地徹:コムギ・エギロプス属植物の

ミトコンドリアゲノムの解析 1. チモフェービコムギの細胞質を持つ

置換系統のミトコンドリアゲノム。日本育種学会第 121 回講演会、宇

都宮市、2012.3.29-30

山岸博、津田瑞江、田中義行、寺地徹:シロイヌナズナとキャベツの

体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構造と後代への伝達。日本育

種学会第 121 回講演会、宇都宮市、2012.3.29-30

富岡関子、安本景太、平出美穂子、高橋亮、山岸博、寺地徹:ハマ

ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子

(*ppr-B*)の分子集団遺伝学的解析。日本育種学会第121回講演会、宇都宮市、2012.3.29-30

Gyawali, Y. P., Y. Tanaka, M. Tsujimura and T. Terachi: RNA expression pattern of selected mitochondrial genes and ORFs in fertile and male sterile common wheat alloplasmic lines with *Aegilops mutica* cytoplasm. 日本育種学会第121回講演会、宇都宮市、2012.3.29-30

田中義行、富岡関子、山岸博、寺地徹: ダイコンの OS40 型ミトコンドリアゲノムの構造解析 –正常型およびオグラ型との比較–: 日本育種学会第121回講演会、宇都宮市、2012.3.29-30

日本学術振興会 科研費審査委員

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

無し

5) その他

無し

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)

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

無し

3) 学外活動

寺地 徹:

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。

2. 本年度の研究成果

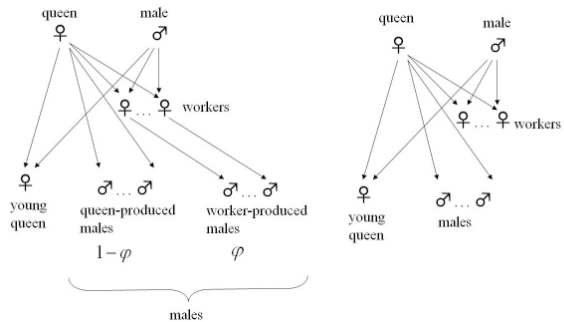
1) ワーカーが雄を生産する社会性膜翅目昆虫集団の有効な大きさ

ニホンミツバチやマルハナバチなどの多くの社会性膜翅目昆虫には、女王に加えてワーカーも雄の生産を行うものがある。ワーカーによる雄の生産が集団の有効な大きさ(N_e)に及ぼす影響を評価するために、中立遺伝子の頻度に生じる機会的変動を基準として、 N_e の一般式を導いた。得られた式の妥当性をコンピュータシミュレーションによって評価したところ、得られた式からの予測値は、広範な条件下でシミュレーション値とよく一致した。数値計算の結果、ワーカーによる雄の生産は、一般には集団の有効な大きさを減少させることが明らかになった。その減少は、マルハナバチのように性比が1あるいは雌に偏った集団でとくに著しいことが示された。一方、ニ

ホンミツバチのように性比が雄に偏った集団では、各ワーカーが少数の雄を生産し、しかも生産される雄数のワーカー間での違いが小さいときのみ、ワーカーによる雄の生産が、集団の有効な大きさを増加させることがわかった。膜翅目昆虫の多くの集団では、遺伝的変異が他の動物種に比べて小さいことが報告されているが、ワーカーによる雄生産はその重要な原因の1つであると考えられる。



セイヨウオオマルハナバチ



Breeding structure of eusocial Hymenoptera with and without male production by workers

2) 血統記録を持つ集団における中立遺伝子の頻度を推定するためのサンプリング法

中立な DNA マーカー座における遺伝子頻度は、希少動物集団の保全遺伝学における基礎となるパラメータである。本研究では、血統記録が利用できる集団において、中立遺伝子の頻度の推定誤差を最小にするためのサンプリング方法として、'最小距離法'を開発した。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。

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: *Effective population size in eusocial Hymenoptera with worker-produced males*

In many eusocial Hymenoptera, a proportion of males are produced by workers. To assess the effect of male production by workers on the effective population size N_e , a general expression of N_e in Hymenoptera with worker-produced males is derived on the basis of the genetic drift in the frequency of a neutral allele. Stochastic simulation verifies that the obtained expression gives a good prediction of N_e under a wide range of conditions. Numerical computation with the expression indicates that worker reproduction generally reduces N_e . The reduction can be serious in populations with a unity or female biased breeding sex ratio. Worker reproduction may increase N_e in populations with a male biased breeding sex ratio, only if each laying worker produce a small number of males and the difference of male progeny number among workers is not large. Worker reproduction could be an important cause of the generally lower genetic variation found in Hymenoptera, through its effect on N_e .

2: *Sampling method for estimating neutral allele frequency in a pedigreed population*

The allele frequency at neutral DNA marker loci is a fundamental parameter for establishing a conservation scheme for a set of livestock breeds. In this study, we proposed a novel 'minimum distance method' for estimating neutral allele frequencies, which minimizes the error by the use of pedigree information. The efficiency was evaluated using Monte Carlo simulation. The obtained method was also applied to microsatellite data of Japanese Black cattle population.

4. 発表論文

T. Nomura and J. Takahashi (2012). Effective population size in eusocial Hymenoptera with worker produced males. *Heredity*, in press

T. Honda, S. Sasazaki, K. Oyama, F. Mukai and T. Nomura (2012). Sampling method for estimating neutral allele frequency in a pedigreed population. *J. Anim. Breed. Genet.*, in press.

5. 著書および総説

野村哲郎・本多 健(2011). 黒毛和種の遺伝的多様性の評価と維持・回復のための方策. 農業技術体系 畜産編, 農山漁村文化協会.

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

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)

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, editor

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。

現在の以下の研究テーマを軸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。我々は Ia の結晶構造解析(Tsuge et al. JMB, 2003) および Ia-β TAD-アクチン複合体構造を明らかにし(Tsuge et al. PNAS 2008)この分野での研究をリードしている。さらに反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な反応状態での結晶構造解析を進めている。

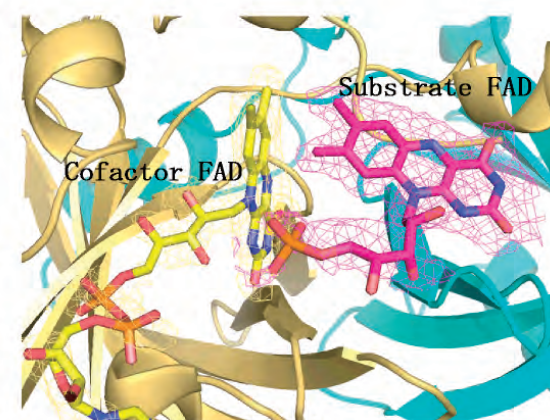
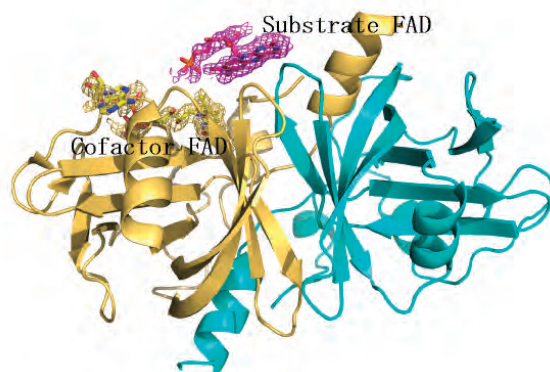
(2)インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造生物学:インフルエンザ A ウィルスによる 1918 年に発生したスペインかぜは世界的流行(パンデミック)を引き起こし、1000 万以上の死者を出した。鳥で感染したウイルスが変異をしてヒトへの感染が起こると考えられる。この強毒性の獲得にインフルエンザの持つ RNA ポリメラーゼのいくつかのアミノ酸の変異が重要である事がわかってきた。特に有名な変異は RNA ポリメラーゼ複合体の PB2 サブユニットにおける E627K の変異である。2009 年我々は、K627 部位を含む PB2 サブユニットの構造を明らかにして、強毒性獲得の分子基盤を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

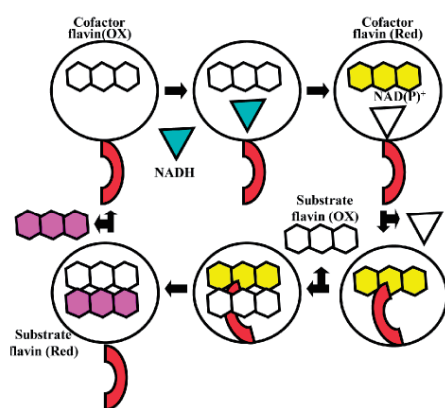
本年の研究成果に記載したフラビン還元酵素の結晶構造を明らかにしている。ヒト ADP リボシル基分解酵素 (PARG) の結晶構造解析を目的として、その発現系の構築と発現を行っている。また 100S リボソームの結晶構造解析に向け基礎研究を始めた。

2. 本年度の研究成果

(1)還元フラビンは様々な生物において重要な機能を担っている。フラビン還元酵素である好熱菌の TTHA0420 はコファクターの FAD と基質の NADH から基質となる第2のフラビンを還元する。我々はX線結晶構造解析により基質とコファクター2つのフラビンが結合する酵素の構造を初めて明らかにし、そのフラビンの還元機構を明らかにした。



TTHA0420 は一般のフラビン還元酵素と同様の GDH モチーフを持つが、さらにこのサブクラスは特異的な C 末端の YGG モチーフを持つ。点変異体と機能解析により、この C 末端が NADH の結合と基質フラビンの結合の選別に重要な働きをしている事が示唆された。



C-terminal role for NADH and substrate FAD binding

(2) Ia および Ia-アクチン複合体での様々な状態での結晶化に成功し、新たなリガンド複合体での X 線回折データを収集した。またその構造精密化を行っており、これらの一連の構造スナップショットから反応機構の詳細をとらえようとしている。

(3) 東京工業大学との共同研究により、新規ペルオキシダーゼ DyP の反応機構について、明らかにした。また創価大学との共同研究により、βラクトグロブリンキメラタンパク質の構造解析から、二量体形成の機構について明らかにした。

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 infectious factor and human protein.

(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 (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 (PNAS 2008). Furthermore we would like to reveal how proceed the ADP-ribosylation

(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 (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) Other Structural biology as mentioned below.

In this year, (1) we report the structure of TTHA0420 from *Thermus thermophilus* HB8 (JBC), which belongs to flavin reductase, and describe the dual binding mode of the substrate and co-factor flavins. We also report that TTHA0420 has not only the flavin reductase motif GDH but also a specific motif YGG in the C terminus as well as Phe-41 and Arg-11, which are conserved in its subclass. From the structure, these motifs are important for the substrate flavin binding. On the contrary, the C terminus is stacked on the NADH binding site, apparently to block NADH binding to the active site. To identify the function of the C-terminal region, we designed and expressed a mutant TTHA0420 enzyme in which the C-terminal five residues were deleted (TTHA0420-ΔC5). Notably, the activity of TTHA0420-ΔC5 was about 10 times higher than that of the wild-type enzyme at 20–40 °C. Our findings suggest that the C-terminal region of TTHA0420 may regulate the alternative binding of NADH and substrate flavin to the enzyme.

(2) We collected the new diffraction data of the Ia-actin with novel ligand and the structural refinement is going on.

(3) We also reported the reaction mechanism of novel peroxidase DyP (*FEBS J*) and the mechanism of dimer formation of β -lactoglobulin chimera : Gyuba with collaborative study (*Protein Sci*).

4. 発表論文

Imagawa T, Tsurumura T, Sugimoto Y, Aki K, Ishidoh K, Kuramitsu S, Tsuge H.:Structural basis of the free reduced flavin generation by flavin reductase from *Thermus thermophilus* HB8.

J Biol Chem. **286**(51):44078-85. (2011)

Ohtomo H, Konuma T, Utsunomiya H, Tsuge H, Ikeguchi

M.:Structure and stability of Gyuba, β -lactoglobulin chimera.

Protein Sci. **20**(11):1867-75. (2011)

Yoshida T, Tsuge H, Konno H, Hisabori T, Sugano Y.:The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue.

FEBS J. **278**(13):2387-94. (2011)

Inaka K, Takahashi S, Aritake K, Tsurumura T, Furubayashi N, Yan B, Hirota E, Sano S, Sato M, Kobayashi T, Yoshimura Y, Tanaka H,

Urade Y.:High-Quality Protein Crystal Growth of Mouse

Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in Microgravity

Cryst Growth Des. **11**(6):2107-2111.(2011)

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:感染症因子とヒトタンパク質の相互作用を見る:

X線の会、阪急グランドビル 26 階、2011.9.10

津下英明:アクチン ADP リボシル化の構造基盤

シンポジウム「ADP リボシル化によるシグナル伝達制御」

生化学会、京都国際会館、2011.9.21

津下英明: ADP リボシル化毒素構造研究の最前線

シンポジウム「疾患治療に用いる天然有機化合物の生合成遺伝子の包括的理解」徳島文理大学、2011.12.22

7. 学会発表

鶴村俊治、津下英明 ADP リボシル化毒素によるアクチン認識の特異性解析 日本蛋白質科学会、大阪府吹田市、2011.6.7-9

Tsurumura T., Tsuge H. Crystal structure of Ia-Actin complex with novel ligand 国際結晶学会 Madrid, 2011.8.25-26

Tsurumura T., Tsuge H. Structural basis for the Helicobacter pylori-carcinogenic TNF-alpha-inducing protein

国際結晶学会 Madrid, 2011.8.25-26

津下英明 ADP リボシル化反応に伴う酵素の構造変化

ビタミンB研究協議会、京都国際交流会館、2012. 2. 4

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)「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」

科学研究費補助金 新学術領域研究 「複合体構造解析による ADP リボシル化毒素の標的タンパク質認識機構の研究」

文部科学省 戦略的研究基盤研究支援事業 「タンパク質の生成と管理」

文部科学省 戦略的研究基盤研究支援事業 「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. 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

日本学術振興会 回折構造生物第169委員会 委員

ビタミンB研究委員会 委員

4. 受賞等

なし

5. その他

なし

植物育種学分野

Lab. 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、我々は世界の栽培・野生ダイコンについて、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子とそれに対する核の稔性回復遺伝子の分布と遺伝的変異を調査してきた。その結果、今日までに世界の栽培ダイコンがいくつかの野生ダイコンから多角的に成立し進化してきたことを明らかにした。またダイコン属野生種に生じたオグラ型雄性不稔遺伝子が、我国のハマダイコンにおいて変異を蓄積してきたことを明確にした。さらに、ハマダイコンの一部が我国において栽培ダイコンとして成立したことを遺伝学的根拠に基づいて明らかにした。

このような研究成果を踏まえて、さらに雄性不稔-稔性回復系における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。

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成し、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。さらに細胞質置換による細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子を単離するとともに、その遺伝子の作用機作を明らかにすることを目的に研究を進めている。

2. 本年度の研究成果

1) オグラ型雄性不稔とそれに対する稔性回復遺伝子

今日まで進めてきた栽培・野生ダイコンにおけるオグラ型細胞質を含めた細胞質の分化に関する研究を、さらに中国産のダイコンに拡張して実施した。その結果、中国の栽培ダイコンの一部に、オグラ型雄性不稔の原因遺伝子であるミトコンドリアの *orf138* を持つものが発見されかつ、それらは我々がオグラ型の標準品種としている「MS源助」と同一である「Aタイプ」の塩基配列を持つことが明らかになった。また中国の栽培ダイコンのうち正常型の細胞質を持つものの大部分は、我国の各地に分布する地域在来品種と共通のハプロタイプを持つことが認められた。このことは今後、我国各地の栽培ダイ

コンの成立と進化を詳しく解析する上で重要な指針となる。

一方中国産の栽培ダイコンに、細胞質は正常型であるものの、オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子を持つ品種があることを、交雑に基づく遺伝学的解析によって観察した。そこで、これらの稔性回復遺伝子を単離して、その機能と塩基配列を決定する実験を進めた。その結果従来の研究によって、中国ダイコンおよび日本のハマダイコンで明らかにされている稔性回復遺伝子とは異なる塩基配列と作用機作で稔性を回復する遺伝子が複数存在することが強く示唆された。現在これらの遺伝子の単離作業を進めている。

2) シロイヌナズナとキャベツの細胞融合による新しい雄性不稔の開発

植物分子生物学上のモデル植物であるシロイヌナズナと、世界の重要な野菜の1つであるキャベツとの間で雄性不稔性の体細胞雑種を得た。これらの体細胞雑種は、シロイヌナズナとキャベツのミトコンドリアゲノムをキメラ状に組み合わせて保持していた。そこで体細胞雑種が持つ雄性不稔細胞質をキャベツ類に導入することを目的として、戻し交雑を進めるとともに、戻し交雑による雄性不稔性とミトコンドリアゲノムの後代への伝達を調査した。本年度までにキャベツ類の戻し交雑によってBC₃世代(戻し交雑第3世代)が得られた。この世代の個体も明瞭な雄性不稔性を示したことから、この細胞質をキャベツ類へ導入して新しい雄性不稔を開発することが効果的であることが明らかになった。また、体細胞雑種およびその後代の各世代についてミトコンドリアゲノムの構造を調査した結果、体細胞雑種のミトコンドリアが示す特有のゲノム構造は安定して後代に伝達されることが認められた。今後、更に詳しくミトコンドリアゲノムの構造を解明することによって、雄性不稔化のメカニズムを明らかにする。

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

アブラナ科野生植物とダイコンとの属間交雑に由来する雄性不稔性のダイコンおよびナス属野生種と栽培ナスとの種間交雑に由来する雄性不稔性のナスについて、雄性不稔の原因遺伝子と稔性回復遺伝子を同定しようとした。複数の雄性不稔性ダイコンについて、ミトコンドリアの遺伝子の発現と表現型としての雄性不稔の発現との対応を調査し、雄性不稔の原因遺伝子候補となり得る新規 *orf* を発見した。

同様に雄性不稔ナスにおいても、ミトコンドリアの遺伝子の発現を詳細に調査することによって、雄性不稔の原因となる遺伝子の最有力候補を見出した。さらに、こ

れら雄性不稔に対する稔性回復遺伝子を単離するために、DNA マーカーの開発を進めた。多数の RAPD プライマーを用いた検討に基づき、稔性回復遺伝子に連鎖した DNA 増幅バンドを発見し、さらにそれらを SCAR 化することに成功した。それらの DNA マーカーを用いた解析によって、由来を異にする細胞質雄性不稔およびそれらに対する稔性回復遺伝子が共通のメカニズムを有することが示唆された。現在そのメカニズムを明らかにしている。

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 ones 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. For the establishments of new male sterile materials, we are utilizing organelle genome engineering methods such as cell fusion, and cytoplasm substitution.

1) Ogura CMS and its fertility restoring genes.

Ogura CMS found in a Japanese radish is the most important one in Cruciferous plants, being used worldwide. We have been studying the distributions and differentiations of Ogura CMS gene, *orf138*. We analysed, further, the cytoplasm of Chinese radishes this year. While the number of cultivars that possess the Ogura cytoplasm was small, it was found that all the *orf138* of Chinese radishes have the A type sequence. On the other hand, the major type in the normal cytoplasm was 'Type 3' which is distributed in local varieties in Japan. These findings of differentiations of cytoplasm in Chinese radishes would accelerate the studies on the evolution of wild and cultivated radishes grown in Japan and China.

2) New male sterile plants derived from the cell fusion.

We obtained somatic hybrids showing male sterility between *Arabidopsis thaliana* and cabbage varieties (*Brassica oleracea*). It was found by the molecular analyses of their mitochondrial genomes that the male sterile hybrids contain the various novel genome structures of mitochondria. Progenies of the somatic hybrids were produced by successive back-crosses with *B. oleracea*. So far, the male sterility was ascertained the BC₃ progenies. The novel mitochondrial structures were also transmitted steadily to the progenies.

The relationships between the novel mitochondrial genomes and the male sterility are now under investigation.

3) CMS of radish and eggplant by cytoplasm substitutions.

With the purpose to enlarge the numbers of CMS material plants, we are analyzing the molecular characteristics of alloplasmic radishes and eggplants under the collaborative projects with other institutions. We found unique *orfs* in male sterile alloplasmic lines both in radishes and eggplants. By the studies of their expressions, it was suggested that they are promising candidates of causal genes of CMS. Furthermore, we exploited DNA markers of fertility restorer genes of eggplants. The markers would be useful to identify the restorer genes and to clarify the mechanisms of CMS and fertility restoration.

4. 発表論文

L. Zhang, K. Yasumoto, H. Yamagishi: Identification of Cytoplasmic Male Sterility in Chinese Radish Following PCR Analysis of Mitochondrial DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* Published online: 24 December 2011.

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

安本景太、寺地徹、山岸博：ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 Rft マッピング。日本育種学会第 120 回講演会、福井県、2011. 9. 23-24

森悠太、安本景太、山岸博：黒ダイコンで発見された稔性回復遺伝子の *orf138* に対する作用。日本育種学会第 120 回講演会、福井県、2011. 9. 23-24

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 2：正常型とオグラ型ゲノムの比較。日本育種学会第 120 回講演会、福井県、2011. 9. 23-24

津田瑞江、田中義行、安本景太、寺地徹、山岸博：シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの解析。日本育種学会第 120 回講演会、福井県、2011. 9. 23-24
Yoshimi M., T. Saito, S. Isshiki, T. Terachi, H. Yamagishi : Studies on a novel open reading frame (*orf*) found in the mitochondrial genome of alloplasmic lines of eggplant showing male sterility. SOL&ICuGI 2011

山岸博、津田瑞江、田中義行、寺地徹：シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構造と後代への伝達。日本育種学会第 121 回講演会、宇都宮市、2012. 3. 29-30
吉見麻衣子、牟田部天平、一色司郎、齋藤猛雄、山岸博：細胞質置換雄性不稔ナスに対する稔性回復遺伝子の STS マーカー。日本育種学会第 121 回講演会、宇都宮市、2012. 3. 29-30
富岡関子、安本景太、平出美穂子、高橋亮、山岸博、寺地徹：ハマダイコンにおけるオグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 (*ppr-B*) の分子集団遺伝学的解析。日本育種学会第 121 回講演会、宇都宮市、2012. 3. 29-30
田中義行、富岡関子、山岸博、寺地徹：ダイコンの OS40 型ミトコンドリアゲノムの構造解析 -正常型およびオグラ型との比較-：日本育種学会第 121 回講演会、宇都宮市、2012. 3. 29-30

8. その他特記事項

1. 外部資金(代表者)

文科省科研費

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」(代表)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出基礎的研究推進事業

「オルガネラゲノム工学による細胞質雄性不稔の開発」(代表)

2. 学外活動

農林水産省委託プロジェクト研究「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のための技術開発」運営委員

3. その他

副学長(2010年10月～)

植物集団生物学分野

Lab. 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

植物育種における選抜方式の効率を決める主要なパラメータについて研究を行い、次の結果を得た。

分離集団から優良系統を育成する場合の選抜方式に関して従来多くの異なった方式が提案されてきたが、それらの中のいずれの方式がいかなる条件下で効率的であるかについては、未だ研究者や育種家の間で意見の一致をみていない。このような状況を解消するためには、各選抜方式の効率を評価・比較するための客観的な基準を設定しなければならない。この観点から我々は、各選抜方式によって達成される形質の改良度とその方式を実行するために要するコストをともに組み入れた効率評価方程式を提案した。我々が提案した方程式においては、各選抜方式における形質の改良度を表す指標として、従来の伝統的な選抜理論で用いられてきた期待選抜反応（選抜

開始時における選抜対象形質の集団平均値と選抜施行後の集団平均値の差）の代わりに、期待成功率（選抜施行後の集団平均値が育種家があらかじめ定めた達成目標値を超える確率 × 達成目標値を超えた場合の集団平均値）を新たに定義して用いた。期待成功率とコストを組み入れて作った効率評価方程式を使った解析によって、選抜方式の効率を決定するパラメータは、育種家の事業運営ポリシーによって大きく異なることがわかった。すなわち、育種家が実行するどの選抜プロジェクトにおいても最大の成功率を目指すというポリシー（ポリシー MRW）の下では、最適な選抜方式は、育種対象植物の経済的 중요度、分離集団の作製に用いた交配組み合わせの良否、市場環境（競争的か否か）などの要因によって大きく変わるのに対し、ひとつ一つの選抜プロジェクトでは格別高い成功率をねらわず、長期的にみたときの経済的見返りを最大にするというポリシー（ポリシー MCE）からは、最適な選抜方式は上記の育種対象植物の経済的重要度などの要因によってほとんど影響されない。高コストの選抜方式（大きな集団サイズと手間のかかる特性評価手法）は、ポリシー MRW の下で、しかも、育種対象が経済的に重要な植物、高競争的市場環境、遺伝ポテンシャルが極めて高い交配組み合わせといった条件下で選抜を行う場面でのみ有用である。それ以外の場面では、上記のような条件の如何にかかわらず、低あるいは中コストの選抜方式のほうが効率的である。

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 method 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 research subject.

Structure and constituent parameters of the optimality of selection procedures in plant breeding. The optimal selection procedure to be used effectively in practice has been a matter of dispute. To resolve this dispute, facilitating the exploitation and utilization of new efficient selection procedures, we present a theoretical framework derived based on the compromise between the effectiveness and cost of selection. As an indicator of the effectiveness of selection, we use a new parameter called the expected degree of success (the probability of a successfully high genetic gain being achieved \times average of all successful genetic gains), in place of the traditionally used expected genetic gain. The structure and constituent parameters of the optimality differ distinctly between two alternative management policies of breeders, i.e., achieving the highest economic reward in each selection program (policy MRW) versus the highest cost effectiveness, emphasizing the total result summed across selection programs performed for the same amount of long-term investment (policy MCE). The economic importance of the target plant, choice of the target population (cross combination), and market circumstances determine the optimality of selection procedures under MRW, but not under MCE. High-investment selection procedures will be preferable under MRW in selection with a correctly chosen, potential target population in an economically high-value plant. Low- or moderate-investment selection procedures are efficient under MCE.

4. 学会発表

石井卓朗、矢野健太郎、米澤勝衛：育種家のポリシーの違いによる最適育種方法の違い、日本育種学会第 119 回講演会、横浜市、2011. 3. 28-30

5. 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。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(図1)。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。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。

2. 本年度の研究成果

ダイズ根粒 *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6^T のゲノム塩基配列を決定し、報告した。この菌株は日本で栽培されていたダイズ根粒から分離されたもので、USDA の *Bradyrhizobium* 属標準菌株であり、分類学上重要な位置にある。USDA6^T ゲノムサイズは 9,207,384 bp であり(図2)、以前に決定したダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 のゲノム(9,105,828 bp)と同様にバクテリアとしては大きい。USDA6^T と USDA110 を全ゲノムレベルで比較すると、塩基配列レベルでの共直線性が認められる一方で、大きな逆位がゲノム上に存在することがわかった。また、ゲノム上の3箇所、極めて高レベルの塩基配列同一性が検出された。これらの領域の遺伝子構成と配列特性から考えて、3領域はもともと1つの共生アイランドの挿入に由来しているのかもしれない。祖先型の巨大な共生アイランドは、約 860kb であり、ゲノム上のバリン tRNA 遺伝子に挿入された後に、大規模なゲノム再編成を経て、現在の両者のゲノム構成になっている経緯が予想される。



図1 研究用のダイズ栽培例と共生窒素固定能を示す根粒

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 complete nucleotide sequence of the genome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6^T was determined. The genome of USDA6^T is a single circular chromosome of 9,207,384 bp. The genome size is similar to that of the genome of another soybean symbiont, *B. japonicum* USDA110 (9,105,828 bp). Comparison of the whole-genome sequences of USDA6^T and USDA110 showed colinearity of major regions in the two genomes, although a large inversion exists between them. A significantly high level of sequence conservation was detected in three regions on each genome. The gene constitution and nucleotide sequence features in these three regions indicate that they may have been derived from a symbiosis island. An ancestral, large symbiosis island, approximately 860 kb in total size, appears to have been split into these three regions by unknown large-scale genome rearrangements. The two integration events responsible for this appear to have taken place independently, but through comparable mechanisms, in both genomes.

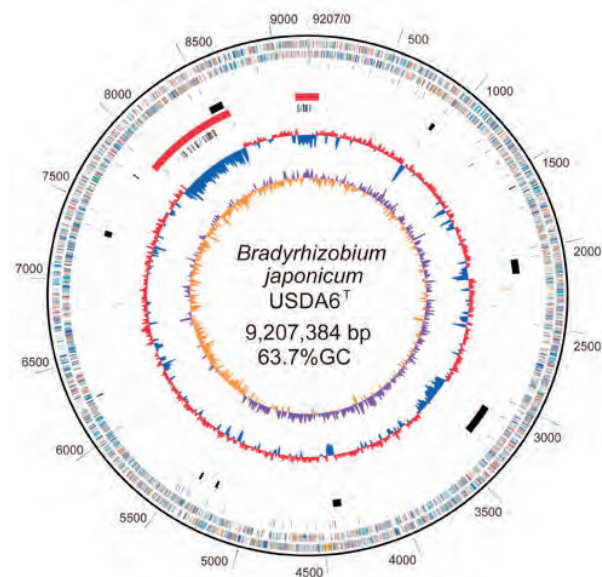


図2 全ゲノム構造を決定したダイズ根粒菌ゲノム地図

4. 発表論文

Kaneko T, Maita H, Hirakawa H, Uchiike N, Minamisawa K, Watanabe A, Sato S. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6. **Genes** Vol. 2 763-787

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

金子貴一、眞板寛子、内池伸和、南澤究、渡辺安希子、山田学、佐藤修正:ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6 のゲノム構造解析 植物微生物研究会、岡山市、2011.9.20-22

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注目して研究をおこなっている。ゲノム中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、組み換え率の違いで連鎖の強さが異なることになり、自然選択の効果が領域によって大きく異なる。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考え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の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きている。



図、研究材料のハクサンハタザオ (*A. halleri* ssp. *gemmifera*) 滋賀県の自生地での花

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、その重要性和反して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

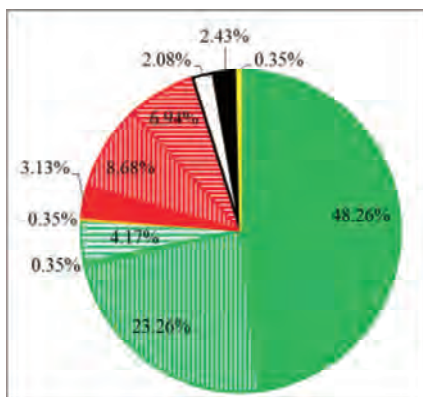
転移因子は多くの生物でゲノムの大部分を占めるなど染色体の構造を考える上で非常に重要な要素である。転移因子が生存上重要な遺伝子に挿入することで生物に有害な効果をもたらすことも有り、多くの生物で転移因子を不活化する機構が進化している。どのように転移因子がそのコピー数を増やしているのかやその不活化の機構はいまだ解明されていないことも多い。シロイヌナズナで最近明らかになった転移活性を持つ転移因子について、アブラナ科植物を用いて進化パターンを解析している。どのようにコピー数を増やし不活化をまぬがれているのかなどについて明らかにしようとしている。

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

本年度は動原体領域の進化機構を明らかにするために動原体の構成が異なる種を用いて実際に染色体の伝達率に差が見られるのかどうかの検証実験を進めている。動原体配列が異なる種や個体間で交配可能な組み合わせを探索し、F1 個体の作成をおこなった。また動原体特異的な挿入特異性を持った転移因子について異なる種で特異性が変化しているのかを検証した。シロイヌナズナ属だけではなくアブラナ科の多くの種で動原体に局在することが明らかとなった。今後、動原体特異性を持つ転移因子ファミリーの中で特異性を失ったものについてその配列の特徴を明らかにすることで挿入特異性が明らかになると期待される。また、熱により活性化される ONSEN と名付けられた転移因子ファミリーについてシロイヌナズナ近縁種における進化様式の解明に取り組んだ。ONSEN がアブラナ科に広く存在することを確認し、またいくつかの種ではシロイヌナズナと同様に熱による活性化が示された。さらにシロイヌナズナでインプリンティングが報告されている遺伝子群について分子進化的解析をおこない、インプリンティングと遺伝子重複に関連があることを示唆した。インプリンティングのパターンが種によって異なるのか、その場合にどのような進化パターンを示すのかについて検証をおこなっている。



図、A. lyrata の COPIA93 ファミリートランスポソンの挿入特異性。緑色は動原体に、赤色は転移因子に挿入しているコピーを示す。

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

なし

7. 学会発表

Sayuri Tsukahara, Akira Kawabe, Akie Kobayashi, Tetsuji Kakutani: Centromere-specific integration of Copia-type LTR retrotransposon in *A. lyrata*. XVIII international botanical congress (IBC2011), Melbourne (Australia), 2011.7.23-30

塚原小百合、河邊昭、小林啓恵、伊藤佑、会津智幸、新井理、豊田敦、藤山秋佐夫、樽谷芳明、角谷徹仁：A. lyrata における LTR レトロトランスポソンのセントロメア特異的分布の形成機構。第 83 回日本遺伝学会大会、京都、2011.9.20-23
吉田貴徳、河邊昭：ゲノムインプリンティングが typeI MADS 遺伝子の分子進化に及ぼす影響。第 83 回日本遺伝学会大会、京都、2011.9.20-23

8. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金新学術領域公募研究（代表）H23-24
科学研究費補助金新学術領域計画研究（分担）H23-27

2) 知財権等

なし

3) 学外活動

Genetica, Associate Editor

SMBE2011, Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution, Domestic Organization Committee, Workshop organizer “Plant Evolutionary Genomics”。

第 13 回日本進化学会、大会実行委員、ポスター賞審査委員

第 83 回日本遺伝学会、プログラム委員、ワークショップ世話人「転移因子と宿主の生存戦略」

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

北米原産の半水生植物ニューベキア(*Neobeckia aquatica*)は、生育環境に応じて発生する葉の形態を大きく変化させるという変わった特徴を持つ。この植物は湖畔に生育しており、陸上では楕円形の単葉を発生する一方、湖の水位が上昇して水没すると葉身が針状になった羽状複葉を発生して水の流れに抵抗できるようになる(図1)。このように生物が環境に应答して形態などの表現型を変化させることを表現型可塑性という。植物は移動できないので、表現型可塑性で変化する環境に対応することが、進化の過程で重要な要因の1つだったと考えられている。ニューベキアの示す葉の形態の表現型可塑性も、湖畔という水位が季節変動する環境への適応に役に立っていると考えられるが、どのように環境変化を受容して葉形を変化させているのかについては明らかとなっていない。光合成器官である葉の形態は光などの影響を受け、多くの植物が生育環境に応じて葉の厚さなどを変化させる。しかしながら、ニューベキアのように大きく葉形を変化させる植物は極めて珍しい。この植物を新しいモデルとして研究を進める事で、葉の形態形成機構や環境との関係について新たな知見が得られることが期待される。そこで私達は、ニューベキアの表現型可塑性の研究を進めている。



図1 ニューベキア (*Neobeckia aquatica*)
左: 陸上の形態 左: 水中の形態

2. 本年度の研究成果

これまでの研究で、ニューベキアは水没だけでなく、温度の変化によっても葉形を変化させること(図2)、葉の形は葉の発生の初期段階で決定されていること、葉形の変化には*KNOX1*遺伝子やジベレリンが関与することなどを明らかにしてきた。

ニューベキアは、気中で生育させると生育条件により単葉から複葉まで様々な形態の葉を発生する。本年度はまず、葉の形態と環境との関係を明らかにするため、様々な環境条件がニューベキアの葉形態に与える影響を系統的に解析した。様々な温度や光強度でニューベキアを生育し、発生した葉の形態をDissection Index(葉の周囲

の長さを面積の平方根で割った値で、葉の複雑度の指標となる)を測定することで定量的に評価した。その結果、温度が低下および光強度の上昇に伴って葉の複雑度が上昇する(よりギザギザの葉になる)ことが明らかとなった。温度や光強度により葉の形態が変化することの適応的な意義については不明であるが、変動する環境においても、効率よく光を受けて光合成を行うのに役に立っていると考えられる。また、湿度や光の波長などによっても葉の形態が変化する可能性があるため、適応的な意義を考察しながら、詳しく解析している。

次に、ニューベキアの葉形変化の発生学的基盤を明らかにするため、形態学的解析を行った。樹脂包埋法により葉の切片を観察したところ、葉の複雑度が上昇すると細胞の大きさは小さくなり、細胞数は減少していることがわかった。さらに、茎頂培養したニューベキア葉が大きくなって行く過程をタイムラプス撮影して観察した。単葉が形成される過程では、葉原基の基部の部分に新しい鋸歯が足されながら葉が大きくなっており、先端部に新しい鋸歯が足されることはなかった。また、複葉が形成される過程では、葉原基の基部から小葉原基が発生し、さらに、小葉原基の基部から二次小葉が形成されていた。Eduというヌクレオチドのアナログの取り込みにより細胞分裂している細胞を可視化したところ、基部でのみ細胞分裂が行われていることがわかった。これらの結果から、葉原基の基部の部分が形態形成の場であることが示唆された。ニューベキアの生育中に環境を変化させてやると、移行した時に形態形成をしていた葉は、移行的な

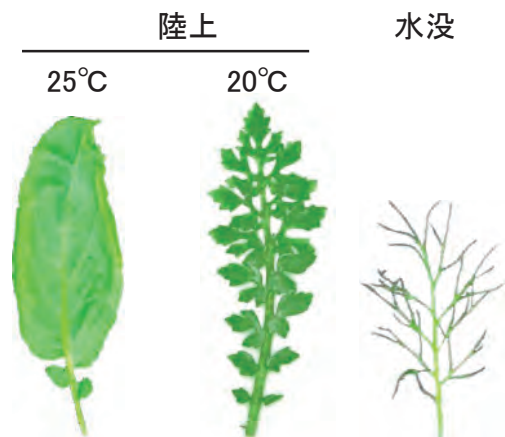


図2 ニューベキアの葉の形態の表現型可塑性

左: 25°C 中: 20°C 左: 水中
で生育したニューベキアの葉の形態

形態を示した。複葉を形成する条件から単葉を形成する条件に移行

させた時は、葉の上半分が複葉的で下半分が単葉的な形態となり、逆に移行させたときは葉の上半分が単葉的で下半分が複葉的な形態となった。この結果からも、移行したときの葉の先端部の形態はすでに決定しており、基部が形態を変化させていることが分かった。以上の結果から、ニューベキアの葉原基の基部が環境に応答し形態形成を行う重要な部位であることが明らかとなった。

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。そこで、次世代シーケンズを用いたトランスクリプトーム解析により、表現型可塑性の発現に重要な遺伝子を同定することを試みた。まず、複葉および単葉を発生する条件で生育させたニューベキアの茎頂からmRNAを単離し、次世代シーケンズによりmRNA-seq解析を行った。得られたリードをシロイヌナズナのゲノム配列情報をリファレンスとしてマッピングし、それぞれの遺伝子にマップされたリードの数を、複葉と単葉を作る条件間で統計的に比較することで網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、植物ホルモン関連遺伝子群や、葉の発生に関わる遺伝子群の発現が葉形変化に伴って変動していることが明らかとなった。今後は、これらの遺伝子の時空間遺伝子発現解析や機能解析を行い、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明らかにしていきたい。

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*.

Neobeckia alters its leaf morphology dramatically, from simple to compound shapes, depending on the growth conditions. Previously, our group showed that leaf shape changes in response to varying temperature, as well as to

underwater submergence. The final morphology of mature leaf is determined in early phases of primordium development, via the plant hormone gibberellin and *KNOX1* gene activity.

In this academic year, we first established the relationship between specific environmental conditions and leaf shapes. We systematically tested the effects of varying temperature and light intensity on the leaf complexity (i.e. how dissected the leaf is). The leaf complexity was quantitatively assessed by calculating the Dissection Index, which is the length of the leaf perimeter divided by the square root of the area. The results indicated that the lower the temperature is, or the higher the light intensity is, the more complex the leaf becomes. Although the adaptive significance of the morphological variation is as yet unclear, it is thought to help optimize the light reception and photosynthetic efficiency in a given environment in which the plant grows. Besides temperature and light intensity, moisture level and light spectrum likely influence the leaf shape. We are currently further assessing the effects of these environmental parameters on *Neobeckia* leaf morphology, while addressing the adaptive significance of the developmental plasticity.

Next we studied the morphogenesis of the *Neobeckia* leaf, in order to gain insights into the developmental mechanism behind the leaf shape change. The cell size and number were examined by plastic sectioning and found that they decrease as the complexity of the leaf morphology increases. We also monitored morphogenesis of young leaves, in time-lapse video capture of tissue cultured shoot apices. During the organogenesis of the simple leaves, the primordia grow as they form new serrations in the basal part of the leaf; new serrations do not appear in the upper region. The compound leaves grow as they initiate new leaflets in the basal region, and similarly, the secondary leaflets emerge in the basal region of the primary leaflets. We also visualized cell division activity by Edu staining of dividing cells. The leaves, regardless of the final morphological complexity, were found to undergo active cell division mostly in the basal region. These results indicate that the basal part of the leaf is the site of morphogenic regulation. Furthermore, upon environmental shifting experiments, the leaves that were at the stage of morphogenic regulation developed into mature leaves with shifted morphology. When a primordium was moved from the compound leaf-inducing condition to the simple leaf-inducing condition, it became a leaf with compound upper region and simple blade at the base, whereas shifting in the opposite direction resulted in a leaf with simple tip and compound base. These observations suggest that the

morphogenic outcome of the upper region was already fixed, while the base still retained the plasticity. Taken together, we propose that the basal part of the primordia is the critical domain for the environmental regulation of *Neobeckia* leaf morphology.

The phenotypic plasticity of the *Neobeckia* leaf is likely to be mediated by environmentally induced ectopic or excess activity of factors overseeing organ formation or meristem maintenance. In order to identify genes important for the environmental plasticity, we have conducted transcriptome analysis employing next-generation sequencing technology. The mRNA extracted from the shoot apices grown under the simple or compound leaf inducing condition was sequenced and mapped onto the genome sequence of *Arabidopsis*. The reads mapped to individual gene was statistically analyzed and compared between the simple and compound leafed samples. Groups of genes implicated in hormonal regulation or response, as well as genes involved in leaf development, were found differentially expressed. In future we plan to analyze the spatiotemporal expression and function of these genes and uncover the mechanism underlying the environmental plasticity of *Neobeckia* leaf morphogenesis.

4. 発表論文

- H. Nakayama, T. Yamaguchi and H. Tsukaya: An Evolutionary Developmental Model for the Acquisition and Diversification of Cladodes: Leaf-like Organs in the Genus *Asparagus*. *Plant Cell* in press
- T. Ito, Konno, S. Kubota, T. Ochiai, T. Sonoda, Y. Hayasi, Y. Fukuda, J. Yokoyama, H. Nakayama, T. Kameya and T. Kanno: A. Production and characterization of interspecific hybrids between *Asparagus kiusianus* Makino and *A. officinalis* L. *Euphytica* **182**: 285-294 (2011)
- T. Fukuda, I. Song, T. Ito, H. Hayakawa, Y. Minamiya, A. Kanno, H. Nakayama, and J. Yokoyama: Nucleotide Sequence Variations in a Medicinal Relative of *Asparagus*, *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merrill (Asparagaceae). *Am. J. Plant Sci.* **2**: 765-775 (2011)
- T. Fukuda, I. Song, H. Nakayama, T. Ito, A. Kanno, H. Hayakawa, Y. Minamiya, and J. Yokoyama: Phylogeography of *Asparagus schoberioides* Kunth (Asparagaceae) in Japan. *Am. J. Plant Sci.* **2**: 781-789 (2011)
- G. Horiguchi, H. Nakayama, N. Ishikawa, M. Kubo, T. Demura, H. Fukuda, and H. Tsukaya: *ANGUSTIFOLIA3* plays roles in adaxial/abaxial patterning and growth in leaf morphogenesis. *Plant Cell Physiol.* **52**: 112-124 (2011)

5. 著書および総説

H. Nakayama, N. Nakayama, A. Nakamasu, N. Sinha and S. Kimura:

Toward elucidating the mechanisms that regulate heterophylly. *Plant Morph.* in press

6. 招待講演、シンポジウム等

木村成介: 生育環境に応じて葉の形を変化させるニューベキアを用いた植物の表現型可塑性の研究. 第 21 回植物バイオテクノロジーシンポジウム「植物における遺伝子制御と形態形成・生理応答の新展開」、京都市、2011.12.18

中山北斗、中山尚美、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. 日本植物学会・日本植物形態学会共催シンポジウム「おかしな形はかしこい形? -環境に合わせた植物形態の進化-」、東京都文京区、2011.9.17

木村成介: 植物の葉の形態の多様性に関する研究. 京都大学化学研究所セミナー、宇治市、2011.3.4

7. 学会発表

N. Nakayama, R. Smith, T. Mandel, S. Kimura, A. Boudaud, C. Kuhlemeier: Mechanical regulation of auxin-mediated growth. 5th Mechanobiology Conference: Mechanobiology of Multicellular Systems, University of Singapore, Singapore, 2011.11.9-11

中益朗子、末松J信彦、木村成介: ニューベキアの複葉突起の等間隔性の解析とモデリング, 先端数理科学研究科開設記念シンポジウム、川崎市、2011.10.2-5

中山北斗、木村成介: 表現型可塑性を示すニューベキア(*Neobeckia aquatica*)を用いた葉の発生学的解析, 日本植物学会第 75 回大会、東京都文京区、2011.9.17-19

中益明子、中山北斗、木村成介: ニューベキア(*Neobeckia aquatica*)の複葉形成時における、等間隔性の解析とモデリング, 日本植物学会第 75 回大会、東京都文京区、2011.9.17-19

中益朗子、末松J信彦、木村成介: ニューベキアの葉の発生過程における表現型可塑性のモデリング, 第 71 回形の科学シンポジウム「形、模様、画像の時間変化の科学と応用」、千葉市、2011.6.17-19

8. その他特記事項

1) 外部資金

科学技術研究費補助金研究活動スタート支援

課題名: 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

研究代表者: 木村成介、取得年度: H22-23 年(2 年)

明治大学研究知財戦略機構若手研究助成

課題名: ニューベキアの葉の発生過程における表現型可塑性のモデリング

研究分担者: 木村成介、取得年度: H23 年(1 年)

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。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。

今回社会性カリバチの雄における繁殖戦略と社会構造の分析と、日本における絶滅危惧昆虫の2種を対象にその保全を目的とした分子生態学的研究をおこなった。

2. 本年度の研究成果

1) 社会性カリバチの雄の繁殖戦略について遺伝マーカーを使って産出時期と繁殖成功率の関連性について解析を行った。キアシナガバチの雄では、非繁殖期に一定の割合で雄を低頻度で生産する戦略が知られている。この早期に羽化する雄について繁殖成功率を解析したところ、通常の雄よりも成功率は低い、近親交配の高い地域では、これらの雄と女王が再交尾することで影響を回避していることが示唆された。



写真1. オオスズメバチ雄間の配偶者獲得競争

2) 現在局所的に分布している絶滅危惧種モノサシトンボの保全を目的に各集団の遺伝構造を解析した。ミトコンドリアDNAを解析したところ、本種は各集団に高い遺伝的多様性が維持されていることを明らかにした。また集団間の分化程度を解析したところ、各集団には遺伝子交流が存在していることが示唆された。本種は十分な遺伝的多様性を維持してい

るが、色彩変異との関係は不明である。今後は種内変異の表現型と遺伝子型の関係性について解明し、保全に役立てていく予定である。

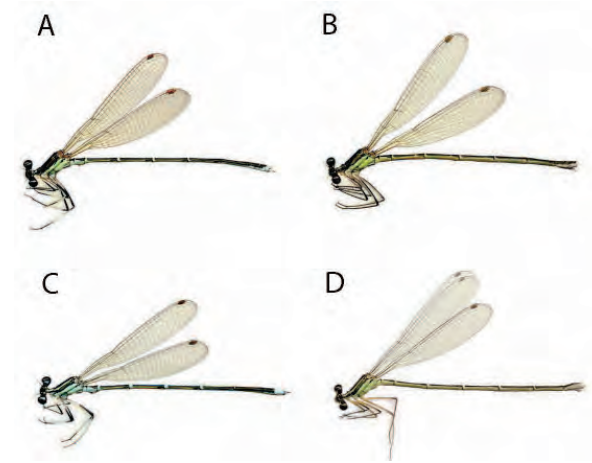


写真2. 絶滅危惧種のモノサシトンボの色彩変異 (Photo by T. Yamanaka)

3) 絶滅危惧種のタガメの生態系における生態的地位の分析とその保全を目的に非致死性的サンプリング法の確立を試みた。各種の実験を行ったところ、タガメを殺さずに安定同位体分析に必要な細胞単離法を確立することができた。現在この手法を用いてNとCの同位体比から日本の水田生態系における物質循環の解明とタガメの食性解析を進めている。



写真3. 絶滅危惧種のタガメがクサガメを捕食する様子 (Photo by S. Ohba)

3. Research projects and annual reports

1: *Reproductivity of early males of the temperate paper wasp.*

In *Polistes* paper wasps, haploid early males can mate with early emerging females and leave viable offspring. In contrast, diploid early males are eventually sterile because they contribute triploid offspring via diploid sperm. Clarifying the ploidy of early males is important for determining whether early male production is a reproductive strategy for the species. We examined the mating behavior and the ploidy of early males in the Japanese paper wasp, *Polistes rothneyi iwatai* van der Vecht. Thirteen early males from four colonies were all diploid. Two of the nine early males (22.2%) attempted to mate with females, but only one individual (11.1%) was successful (the female's spermatheca contained spermatozoa). These results suggest that although most early males of *P. rothneyi iwatai* do not produce offspring, their mating may be linked to the occasional production of triploid females.

2: *Taxonomic uncertainty of a highly endangered brook damselfly, Copera tokyoensis Asahina, 1948 (Odonata: Platycnemididae), revealed by the mitochondrial gene genealogy.*

In the Japanese main islands, two brook damselfly species are sympatrically distributed. One is highly endangered damselfly, *Copera tokyoensis*, Asahina, 1948, and the other is a congeneric common species, *C. annulata* (Selys, 1863). Mitochondrial gene genealogy reconstructed by the maximum likelihood method showed that they are not reciprocally monophyletic. These two congeneric species might have experienced mitochondrial introgressions possibly through hybridizations. The effect of hybridization against endangered species is generally poorly understood. Taxonomic uncertainty might also explain this situation because extremely dispersed pattern of the haplotype network could not be appeared by once or twice hybridization. Three closely located populations of *C. tokyoensis* in the Kanto district showed significant population differentiation. It might suggest the low dispersal tendency of this endangered species.

3: *A non-lethal sampling method for estimating the trophic position of an endangered giant water bug using stable isotope analysis.*

We propose a non-lethal sampling method involving stable isotope analysis for estimating the trophic position of the endangered giant water bug *Kirkaldyia* (= *Lethocerus*) *deyrolli* (Heteroptera: Belostomatidae) in the wild. *Kirkaldyia deyrolli* individuals were collected and their d15N and d13C values were measured. The d15N and d13C

values of periphyton and particulate organic matter, the basal food sources in lentic ecosystems of rice fields, were also measured to estimate the trophic position of *K. deyrolli*. When individual isotopic signatures of the whole body were compared with those of their middle leg tarsus, we found strong correlations between them for both d15N and d13C. To estimate their trophic position without killing individuals, we constructed a regression model incorporating their middle leg tarsus's isotopic signatures and their body size as explanatory variables. This non-lethal method revealed that *K. deyrolli* showed great individual variation in its d15N which is a proxy of trophic position, ranging from 5.60‰ to 8.11‰. To evaluate the negative effects of our non-lethal method on the fitness of *K. deyrolli*, we examined how the removal of the middle leg tarsus affected reproductive performance under laboratory conditions. A comparison between the manipulated and unmanipulated individuals revealed that the removal treatment did not have any negative effects on female clutch size or egg hatchability for males. In conclusion, stable isotope analysis of the middle leg tarsus of *K. deyrolli* is useful for estimating its trophic position without lethal or any negative fitness effects.

4. 発表論文

Yamasaki K., Takahashi J., Ono M., Tsuchida K. (2011) Reproductivity of early males of the temperate paper wasp *Polistes rothneyi iwatai*. *Entomological Science* 14:383-386.(2011).

Kiyoshi, T., Takahashi, J., Yamanaka, T., Tanaka, K., Hamasaki, K., Tsuchida, K. and Tsubaki, Y. (2011) Taxonomic uncertainty of a highly endangered brook damselfly, *Copera tokyoensis* Asahina, 1948 (Odonata: Platycnemididae), revealed by the mitochondrial gene genealogy. *Conservation Genetics*. 12:845-849. (2011).

S. Ohba, J. Takahashi and N. Okuda: A non-lethal sampling method for estimating the trophic position of an endangered giant water bug using stable isotope analysis. *Insect Conservation and Diversity*. in press.

5. 招待講演、シンポジウム等

高橋純一：招待講演「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、綾部市、2011.2.9

高橋純一：講演「ミツバチに学ぶエコライフ - 趣味養蜂のすすめ -」、京都産業大学市民講座、京都市、2011.6.19

高橋純一：招待講演「養蜂とバイオテクノロジー」、社団法人

日本養蜂はちみつ協会青年部ブロック大会、東京、2011.8.23
高橋純一：招待講演「みつばちの生態と恵み」、大阪府農業養
ほう共同組合ハチミツ品評会、大阪市、2011.9.27
高橋純一：招待講演「日本発！ミツバチイノベーション」、日
本養蜂ハチミツ協会関東ブロック大会、熊谷市、2011.12.6
高橋純一：招待講演「養蜂とバイオテクノロジー」、社団法人
日本養蜂はちみつ協会理事会、東京、2011.12.19

4) 受賞等

高橋純一：公益信託エスぺック地球環境研究技術基金研究奨励
賞、2011.8.25

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤 B

課題名：同所的近縁種の生息地分離と形質置換をもたらす生態
学的要因

研究分担者：高橋純一、取得年度：H23-25 年(3 年)

公益信託増進会自然観等保護活動助成金

課題名：京都府における絶滅危惧種ヒスマイトトンボの保全を
目的とした保全遺伝学的研究

研究代表者：高橋純一、取得年度：H22-23 年(2 年)

共同研究・社団法人日本養蜂はちみつ協会

課題名：スーパービーの効果試験

研究代表者：高橋純一、取得年度：H23 (1 年)

共同研究・社団法人日本養蜂はちみつ協会

課題名：ミツバチヘギイタダニ用殺ダニ剤の効果と総合的防除
方法の検討

研究代表者：高橋純一、取得年度：H23 (1 年)

共同研究・社団法人日本養蜂はちみつ協会

課題名：ミツバチ系統造成を目的とした DNA 育法の開発

研究代表者：高橋純一、取得年度：H23 (1 年)

共同研究・社団法人日本養蜂はちみつ協会

課題名：国産蜂蜜における蜜源特定法の開発と効能分析

研究代表者：高橋純一、取得年度：H23 (1 年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

高橋純一：社団法人日本養蜂はちみつ協会技術委員

高橋純一：社団法人日本養蜂はちみつ協会みつばち協議会委員

高橋純一：京都府庁舎「養蜂展」監修

高橋純一：京都府養蜂組合顧問

高橋純一：TBS 赤坂ミツバチプロジェクトみつばちあ監修

植物生理学研究室

Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry

准教授 本橋 健

Assoc. Prof. Ken Motohashi, Ph. D

助教 桶川 友季

Assist. Prof. Yuki Okegawa, Ph. D

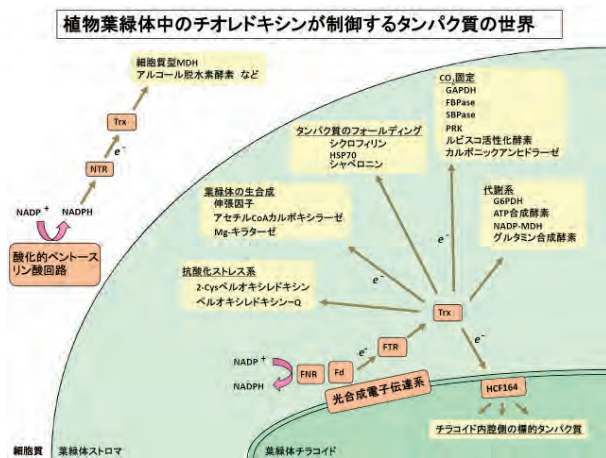


1. 研究概要

植物生理学研究室では、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、チオレドキシシ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。本研究室が発足してから2年間は、チオレドキシシ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シ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、ストロマ画分は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シンは、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シ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

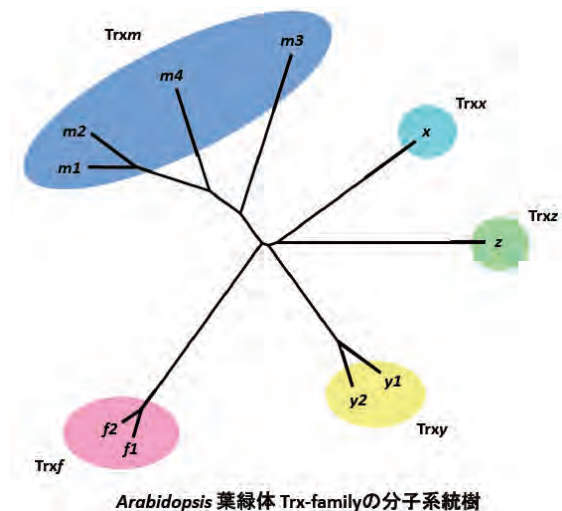
の異なる多くの標的タンパク質を、チオレドキシシンはどのように見分け、葉緑体内で混乱することなく相手タンパク質を認識し、必要な還元力(つまり電子)を供給しているのか、明らかにする。また、葉緑体中に複数のアイソフォームを持つチオレドキシシンファミリータンパク質が植物葉緑体内でどのように使い分けられているのか、その分子機構、生理学的意義を明らかにする。

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囲まれたオルガネラである。葉緑体には、さらにチラコイド膜と呼ばれる膜を持っており、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シ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、チオレドキシシ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。チラコイド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シ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て、これらのタンパク質の機能解析を進めた。植物体での各チオレドキシンアイソフォームの存在量は不明であるため、各アイソフォームに対し特異的に反応する抗体を作成し、葉における各アイソフォームの存在量を明らかにした。

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

私たちのこれまでの研究から、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。生化学的な解析などから、チラコイド膜タンパク質である CcdA がチラコイド膜を超える還元力受け渡しの候補因子であることが明らかとなってきた。本年度は、CcdA タンパク質の欠損によるチラコイド内腔への還元力受け渡し経路の不全が、どのような生理機能と結びついているか明らかにすることを目的として、モデル植物であるシロイヌナズナより CcdA 欠失変異体を取得することを試みた。T-DNA 挿入変異株のうち、ヘテロ接合体は容易に取得できるが、ホモ接合体は致死性、または、光に対して感受性を示すことが明らかとなった。

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 have made specific antibodies for 5 groups of stromal thioredoxins, and determined the concentration of each Trx isoforms in *Arabidopsis* leaves.

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. Last year, we demonstrated CcdA could be reduced, in which a luminal thioredoxin-like protein was reduced. In this year, we have started the physiological analysis of the ccdA deficient T-DNA insertion lines in *Arabidopsis thaliana*.

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

本橋健: 葉緑体機能を調節する多様なレドックス制御経路. 甲南生物化学セミナー、神戸市、2011.9.16

7. 学会発表

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ンの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

平純考、桶川友季、杉本和彦、安部真人、三芳秀人、鹿内利治:新規な光合成サイクリック電子伝達阻害剤の探索、第52回植物生理学会、仙台市、2011.3.20-22

西川友理、桶川友季、佐藤望、山本宏、鹿内利治:イネにおけるPGR5 依存の光化学系 I サイクリック電子伝達の生理機能解明、第52回植物生理学会、仙台市、2011.3.20-22

平純考、桶川友季、杉本和彦、三芳秀人、鹿内利治:アンチマイシン A に代わる新規な光合成サイクリック電子伝達阻害剤、第2回日本光合成学会、京都市、2011.6.3-4

4) 受賞等
なし

5) その他 研究室メンバーの写真



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

課題名:高等植物葉緑体におけるチオレドキシファミリータンパク質の機能分担解析

研究代表者:本橋 健

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:植物葉緑体におけるチラコイド内腔タンパク質ジスルフィド結合酸化還元調節の役割

研究代表者:本橋 健

学術研究助成基金助成金 若手研究 B

課題名:葉緑体ストロマからチラコイド内腔への還元力伝達機構の解明

研究代表者:桶川友季

日本私立学校振興・共済事業団 学術研究振興資金若手研究者奨励金

課題名:植物の葉緑体内におけるチオレドキシシステム解明

研究代表者:桶川友季

2) 知財権等

なし

3) 学外活動

本橋 健:甲南大学理工学部生物学科 非常勤講師

本橋 健:第53回日本植物生理学会年会委員

桶川友季:第53回日本植物生理学会年会委員

動物生命医科学科の教育研究活動

学科主任: 大槻 公一

1. 特筆すべき教育成果

鳥取大学及び岐阜大学との連携教育開始

平成20年度に文部科学省が募集した「大学教育充実のための戦略的連携支援プロジェクト」に、鳥取大学が中心となって、本学及び岐阜大学が参加する形で応募した。提案課題は、「獣医・動物医科学系教育コンソーシアムによる社会の安全・安心に貢献する人材の育成」である。複数の獣医系大学とその周辺領域をカバーする動物医科学系教育機関が連携して、より充実した教育を実施するものである。当時総合生命科学部は設置されていなかったが、動物生命医科学科も平成22年度には設置される予定であったので、本学も参加することが決まった。

幸い私たちの提案課題は採択された。鳥取大学、岐阜大学、本学間の10年間にわたる学術交流協定も締結された。

共同獣医学科設立が決定している鳥取大学と岐阜大学では、平成21年度から各種獣医学専門教育科目のテレビ講義式、学生または教員の移動による連携教育が開始された。本学には平成22年度にテレビ講義のための装置一式が設置された。そこで、平成23年度から試験的に、法学部及び法科大学院教員による「動物と法概論(1単位)」の講義を、鳥取大学及び岐阜大学の6年次の獣医学科学生に発信した(資料1)。獣医師国家試験に法律関連の問題が多く出題されるために受講学生からは好評であった。

本学動物生命医科学科に在学する最高学年の学生は2年次であるため、平成24年度から聴講する予定である。平成24年度からは、本学経営学部教員も参画する「動物と法・経営概論(2単位)」の正規の授業(選択科目)にする予定である。

平成23年12月22日に鳥取大学で実施された本教育プロジェクトに対する外部評価で極めて高い評価がなされた(資料2)。本教育プロジェクトは後7年間続行する事が決定している。本学科教員は全員獣医師の資格を有しており、各自の専門科目についても本教育プロジェクトを通して発信することになる。また本教育プロジェクトが本学科の将来に大きな希望をもたらすことが期待される。

大阪府立大学との学術交流協定締結及び教育並びに研究協力

平成21年1月に本学と大阪府立大学間で包括的学術交流協定が締結された。本学術交流の真の目的は、

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻と本学動物生命医科学科との連携教育実施にある。すなわち、鳥取大学及び岐阜大学獣医学科学生と同じ「動物と法概論」を聴講させることにある。

研究協力も重要な課題であるため、松本耕三教授が中心となって、これまでセミナーを通して3回両大学の教員の研究交流がなされている(資料3)。

2. 特筆すべき研究成果

平成23年3月18日、本学は京都市保健福祉局と食の安全・安心、公衆衛生の維持・向上を図るため、相互連携に関する協定を締結した。この学術交流ののち、動物生命医科学科および鳥インフルエンザ研究センターと、京都市保健衛生推進室、衛生環境研究所が主体となり、広範囲な公衆衛生の維持・向上、また食の安全・安心の確保について共同で調査・研究を開始した。

2011年11月1日から、京都市衛生環境研究所職員8人を京都産業大学の総合生命科学部の客員研究員として受け入れた。これにより、効率良く共同で調査・研究を進めるとともに、定期的なセミナーの開催により、技術的・学術的な情報交換が可能となった。

西野佳以准教授が中心となって本学術交流を精力的に推進している。その概要は以下の通りである。

1. 連携内容

(1) 主な調査研究項目

〔感染症関係〕

- ・ヒト、鳥及び豚インフルエンザウイルスの疫学的・遺伝子学的解析情報の共有と、鳥及び豚インフルエンザのヒトへの感染の危険性
- ・蚊や昆虫、動物が媒介する病原微生物

〔食品衛生関係〕

- ・食品中の有害物質や微生物
- ・たばこ煙等環境微粒子

(2) 相互連携により期待される効果

共同研究を通じて、まずはヒト及び鳥インフルエンザウイルス簡易測定法の精度向上、蚊媒介性ウイルスの保有状況サーベイランスの実施、食品有害物質の簡易検出法の開発等。

2. 2011年連携研究活動報告

(1) 衛生害虫関係 (前田、染谷)

京都市内の各所で蚊およびダニを捕獲し、京都市に生息する蚊やダニの種類を同定した。

(2) 細菌・ウイルス関係 (大槻、村田、前田、高桑、西野、今野、染谷)

①「鳥インフルエンザウイルス」のヒトへの感染

鴨川に飛来するカモ等の渡り鳥からの糞便を採取し、発育鶏卵を用いてインフルエンザウイルスの分離を行った。

②「衛生害虫(蚊・ダニ・ノミ)」の各種病原体保有状況の調査とその分子生物学的解析

京都市内の各所で捕獲した蚊類におけるフラビウイルス(日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス)やチクングニアウイルスの保有状況を調査した。また同様に、捕獲したダニ類におけるリッケチアの保有状況を調査した。

③「野生動物」の各種病原体保有状況の調査とその分子生物学的解析

京都市内で捕獲されたイノシシにおける、フラビウイルスおよびリッケチアの感染疫学調査を実施した。

④家畜における各種病原体保有状況の調査

牛におけるバルトネラの保有状況を分子疫学的に調査し、分離を試みた。また、ボルナ病ウイルスに対する抗体の保有状況を調査した。

(3) その他

*京都市衛生環境研究所 衛生動物部門主体

① マダニの採取 (池永充宏)

北区	氷室	5月20日, 7月28日
右京区	沢池	5月20日, 6月6日 7月15日
	京北弓楯	8月9日
	嵐山公園	8月25日
左京区	大文字山	7月12日
	花脊峠頂上	8月30日
	花脊別所	8月30日
	貴船芹生峠	8月30日
	静原キャンプ場	8月30日
山科区	毘沙門堂付近	5月26日
東山区	將軍塚	9月8日
西京区	灰方	8月31日
	吉峰峠	8月31日
	十輪寺	8月31日

京都市関係部局との共同研究活動は一括して資料 4

に示した。

2. 総括

動物生命医科学科で教授している内容は、獣医学のそれと近接しており、極めて実学性の高い部門である。卒業生は獣医師と共通性の高い事柄を扱う職業に就くことが予想される。したがって、獣医学教育と接点を持つ教育を実施する事が重要である。その意味で、鳥取大学及び岐阜大学との連携教育を実施する事、大阪府立大学と教育及び研究で接点を持つ事は非常に意味のある事である。

また、本学科の存在意義を明らかにするために、地域のニーズに応えることには大きな意義がある。

以上より、本学科が大きな発展を果たすためには、まず効果的な充実した学部教育を実施する事が何よりも大切である。それと同時に、地域で頼られる研究を行い、地域から得られる研究材料を大事にして地域貢献することにもしっかり目を向けねばならない。それがあって、始めて将来性のある充実した研究成果が上がってくるであろう。

本学科は上々の滑り出しをみせている。

授業科目名	動物と法概論
授業担当者	京都産業大学法学部 耳野健二教授、寺沢知子教授、岩本誠吾教授 高橋佳子教授、太田照美教授、 京都産業大学大学院法務研究科 四宮章夫教授、川本哲郎教授
開講時期	6月15日、22日、29日、7月6日、13日、20日、22日 水曜日2限
単位数	1
授業形態	講義
授業概要	獣医療と法との関わりを理解することは重要であるが、困難なものである。この講義では、幅広いテーマを取り上げ、それぞれのテーマの専門家が各自の立場から解説を行うことによって、全体像が容易に把握できることを目指している。
到達目標	「動物と法」の全体像の概略を把握すること。
授業内容	第1回「法哲学から見た自然と生命」 －現代社会における法・自然・社会の相互関係－（耳野） 第2回「獣医師の民事責任」 －人、ヒト、獣と法－（寺沢） 第3回「獣医師とコンプライアンス」 「獣医療過誤と慰謝料請求」（四宮） 第4回「生物テロの現状と規制」 －国際条約による規制、国際テロ防止の現状－（岩本） 第5回「危機に備える」 －地方自治体と危機管理体制、行政の市民 対応とマスコミ対応－（高橋） 第6回「生き物と国家との関わり」 －国家補償の仕組み、生活安全と国家責任、公表と国家責任 －（太田） 第7回「獣医療と法」 ①インフォームド・コンセント、②先端医療と法－遺伝子、GM、クローン、異種間移植など、③ペットと法－葬儀、介護、グリーフ・ケアなど、④比較法 外国の事情 －イギリス、フランスを中心に、⑤「動物による侵害 －犯罪と不法行為－」（川本）
その他	評価方法：毎回提出のレポートによる評価 参考図書：青木人志「動物の比較法文化」、「法と動物」

資料2

平成21年度 大学教育充実のための戦略的大学連携支援プログラム
「獣医・動物医科学系教育コンソーシアムによる
社会の安全・安心に貢献する人材の育成」実施に係る
外部評価結果報告書

外部評価委員

鳥取県農林水産部長	鹿田道夫
北海道大学教授	橋本善春
麻布大学学長	政岡俊夫

平成23年12月22日

総 評

国々の枠組みを越えて人々の社会活動における国際化が急速に出現している今日、高等教育の重要性は一層高まりつつある。欧州では大学間の競争を通じて高等教育の質を維持・向上させること、学生および教員の大学間移動の促進、および高等教育と経済界間の相互作用を促進させるなどを目指して、1999年にヨーロッパ29カ国によって「ボローニャ宣言」が採択された。その内容は、専門教育制度を含む高等教育機構の一層の充実を骨子とする「ヨーロッパ高等教育圏」の構築を実現させる計画として今日も引き続きその活動が行われており、北米や豪州各国に於いても同様の計画が進められている。

我が国の獣医師養成制度のもとで重要な役割を果たす現在の獣医学教育は、これまでその教育組織、臨床獣医学教育を含む教育内容、教育用動物病院の機能および実施される臨床教育の深度等に関して種々の問題点が指摘されている。これらの課題の解決には複数の獣医科大学が協調し、それぞれの大学の特色と専門教育上の利点を相互に提供しつつ獣医師養成機関としての職能教育の質を高める工夫が必要とされる。本戦略的大学連携支援プログラムでは上記の利点を最大限に活かすべく、地域の獣医師養成に主導的に関わる鳥取大学、岐阜大学、および生物学関連教育に特色をもつ京都産業大学が大学の枠を越えて新たな教育アウトプットの創出を企図して実施されたものである。

本事業計画の実施に際して、予め綿密に以下の6つの計画大項目を設定してから連携教育事業が展開されている（I. 実施計画、II. 管理運営組織、III. 実施状況、IV. 学務支援、V. 情報公開、VI. 自己点検・評価）。加えて連携教育活動を詳細に把握する事を目的として、さらに15の中項目と4つの小項目を設けて細部をより詳細に分析・評価し、本事業を実効性あるものとしている。

外部評価委員によって示された達成状況評価結果では、何れの項目別評価においても「達成出来ている」との評価結果が得られている。特に本事業期間のみならず今後10年間を視野に入れた教育連携を予定していること、獣医師の職業倫理や獣医学関連法規などを扱う法学教育体系を有する関連大学と連携していること、大学間連携教育を実現させる多地点制御遠隔講義システム稼働についての経験を積むことを可能にしたこと、各大学の特色ある実習教育等を受講させるために相互に学生の大学間の移動プログラムを実現したこと、また情報を公開しそれに基づいて地域自治体組織との連携活動などを実施している。他の獣医科大学に先駆けて新たな時代に必要とされる先進的な教育プログラムの構築に意欲的に取り組まれた本プログラム関係者の姿勢と熱意は、今後の高等教育関係者の新たな役割を示唆するものとして評価される。

外部評価委員代表

橋本善春

項目別評価

I. 実施計画

<内部評価結果>

(水準) 期待される水準にある

(判断理由) 本事業の実施期間3年を通してスムーズな実施と目標の達成を可能とする計画がなされており成果が期待できる。

<外部評価結果>

(達成状況) 達成できている

(判断理由) 3大学が連携し、野生動物や家畜を起因とする病気等による社会不安を解消し、社会の安全・安心に貢献する人材を育成するための新しいシステムによる取り組みは興味深く、実施計画は3大学で綿密に計画され、3年間を区分し、到達目標を明確に定めるなど成果が期待できる。

II. 管理運営組織

1. 協定
2. 運営組織
3. 教員組織
4. 設備・備品の設置状況

<内部評価結果>

(水準) 期待される水準にある

(判断理由) 10年間を視野に入れた教育連携を実施することが可能な3大学間の協定がなされており、各大学の教員組織及び直接関係する教員の専門性から、連携により各大学の教育強化が可能になると判断できる。遠隔講義に必要な多地点制御遠隔講義システムと実習に必要な設備備品などが適切に配置されている。各種委員会の設置は教育連携事業の効率的運営が期待できる。

<外部評価結果>

(達成状況) 達成できている

(判断理由) 綿密に本大学連携支援プログラム実施の基盤となる協定内容、各構成組織、およびそれを実現させるための連携教育設備備品等の配置が事前に良く検討されて実施されており、本プログラムが円滑かつ効果的に実施されていると判断される。3年間の協定ではあるが、残る課題も多く、本格的な運用を目指して10年以内は協定が有効としていることは評価できる。

III. 実施状況

1. 委員会の運営
2. 講義実施に向けての準備状況（海外視察など）
 - (1) 模擬講義
 - (2) 教員の視察
3. 教育プログラムと実施状況
4. 社会との連携
 - (1) 自治体関係者などとの連携
 - (2) 獣医学関係者との連携

<内部評価結果>

(水準) 期待される水準を上回る

(判断理由) 準備の年と位置づけている初年度（平成21年度）には、各委員会および教育フォーラムで実施計画を再度精査して、授業科目の選定、実施方法の検討を行っている。年度ごとの計画に従って適切に実施されている。設備・備品についても適切な配置が行われ、本事業のポイントである多地点制御遠隔講義システムの準備を模擬講義で綿密に行っている。関係の教員は国内外に視察を行ってスキルアップに努めている。実施年度（平成22-23年度）においては、運営に係る委員会を機能的に開催して、事業内容の検証を随時行い、申請時のプログラムにこだわることなく、教育連携する授業科目、特別講演（遠隔授業、教員移動による授業、学生移動による授業）などの充実にも努めている。講演会や特別セミナーは、地方自治体および獣医師会関係者に公開して社会との連携に努めている。連携教育の実施状況は、専門家集団である国立大学獣医学協議会や獣医学会関係者に報告して広く意見を求めており、関係者の注目を集めている。

<外部評価結果>

(達成状況) 達成できている

(判断理由) 事前に本プログラムの実施効果を高めるべく、各委員会を頻回開催して、それらの活性度を高めた上で、多くの模擬講義・実習を実施し、国内外大学での視察結果を各授業にフィードバックしつつ教育効果をより高いものにしている。さらに、プログラムの新たな教育効果を自治体関係者に公開することで自治体との連携が図られ、実社会への情報提供・交換に有効となっているうえ、学生および教員に対しても、多方面から学べる機会を提供する場になっているなど、プログラム全体の効果を相乗的に高める工夫が見られる。しかし、本項目は内部評価の判定通り（期待される水準を上回る）、3年間での到達目標を十分にクリアしていると評価できるが、教育プログラムにおいて動物医学教育への取り組みの充実が望まれる。

IV. 学務支援

1. 臨時職員の雇用
2. TAの雇用

3. 学生移動の支援

<内部評価結果>

(水準) 期待される水準にある

(判断理由) 多地点制御遠隔講義システムは事前のテストにもかかわらず多くのトラブルに遭遇しているが、大学既存のネットワークシステムを使用しているのでやむを得ない部分であり、オペレータの雇用で対処していることは評価できる。各授業にはTAが適切に配置されて円滑な実施が図られている。関係大学間の学生移動には最も注意を要するところであるが、移動に可能な支援がなされている。

<外部評価結果>

(達成状況) 達成できている

(判断理由) 新しいシステムと既存のシステムを利用したの取り組みで、試行錯誤を重ねながらプログラムの実施が計画通りにできており、実施にあたってはIT技術者とTAを雇ってきめ細かく個々の授業に対応している。しかし、多地点制御遠隔講義システムは、まだハード面でトラブルが多く、適切な対処方法が必要である。また、学生移動型実習等についても実施者側の工夫が認められるが、学生たちのアンケートを元にプログラムの充実と実施のさらなる改善を期待する。

V. 情報公開

<内部評価結果>

(水準) 期待される水準にある

(判断理由) ホームページの立ち上げ、月報、学内広報誌への投稿、新聞社への寄稿、合同フォーラムなどにより学内外へのプログラム周知に努めている。

<外部評価結果>

(達成状況) 概ね達成できている

(判断理由) 広報委員会が中心となってHPの立ち上げや報道機関への情報提供、広報誌の発行など幅広く取り組み成果を上げているが、HPの一部に準備中(学生からのメッセージなど)があり、なお改善が望まれる。

VI. 自己点検・評価

1. 授業評価(アンケート)
2. 実施者の自己点検・評価
3. 中間内部評価
4. 文部科学省中間評価

<内部評価結果>

(水準) 期待される水準にある

(判断理由) 主たる授業、実習の後にはアンケート用紙を配布して学生の意見を聴取しており、講義、実習に対する学生の評価は概ね良好である。中間評価は、各大学の内部評価と大学間の相互評価とし、実施状況および成果については総じて良好な評価となっているが、学生移動型授業に関しては計画時点で十分配慮していても、実施時期、移動方法、宿泊などに関して学生の不満が散見されるため、支援も含めてさらなる検討が望まれる。また、本プロジェクト開始当初から頻発した多地点制御遠隔講義システムのトラブルは、オペレータの採用と実施経験により最終年度にはほぼ解消しているが、多地点制御遠隔講義システムは本プロジェクトの生命線であり、継続事業の成果にも直結するため、更に維持管理の徹底を要す。

<外部評価結果>

(達成状況) 達成できている

(判断理由) 自己点検・自己評価などで、本プログラムの課題をしっかりと浮き彫りにして、改善に努めよう取り組んでおり評価できる。プログラム開始後一定の時点での中間相互評価においても、本プログラムが大学間を相互補完する新しいシステムとして評価され、学生が新たな試みに刺激を受けている様子が見て取れる。遠隔講義の学生の評価は、ハード面で問題があったものの、講義面での評価は高く、プログラムの達成度を高める努力がなされていると判断でき、今後の教育効果も期待できる。文科省中間評価においては、平成24年度以降も継続するよう要望されるなど、他大学、自治体等への波及効果が期待されている。

備考：

1. 内部評価

各大項目における評価基準は次の通りである。

- ・ 関係者に期待される基準を大きく上回る
- ・ 関係者に期待される基準を上回る
- ・ 関係者に期待される基準にある
- ・ 関係者に期待される基準を下回る

想定される関係者：学生、教職員、地方自治体、獣医療関係者、文部科学省

2. 外部評価

各大項目における評価基準は次の通りである。

- ・ 十分達成できている
- ・ 達成できている
- ・ 概ね達成できている
- ・ やや達成できていない
- ・ 達成できていない

京都産業大学と大阪府立大学との教育連携事業の一環として、以下のセミナーを当大学にて開催した。

第3回大阪府立大学・京都産業大学教育連携セミナーの開催

日時：平成23年8月2日(日)15:00～17:00

場所：総合生命科学部15号館 1F 15102 セミナー室

講演者：大阪府立大学・生命環境科学研究科・獣医学専攻

桑村 充 先生(獣医病理学)

「ミエリン変異ラットを用いた新規のミエリン形成・維持メカニズムの解明」

東 泰孝 先生(応用薬理学教室)

「インターロイキン-19の免疫学的役割について」

渡来 仁 先生(獣医免疫学教室)

「DDS技術を基盤としたワクチン開発～Th1免疫誘導を可能にするリポソーム粘膜ワクチン～」

以上の3演題にて、各分野における最先端研究のご講演があり、それぞれのご講演に対し、活発な議論がなされた。

**「感染症および食品の安全対策」における京都市と京都産業大学の
相互連携に関する学術協定の締結**

2011年 京都産業大学・京都市合同会議、共同研究活動等一覧

1	日時等	2011年平成23年1月26日(京都産業大学)
	参加者	(本学)動物生命医科学科全員、今井、岡本、(京都市)石川、三宅、今野、木沢、峯野、他
	内容	顔合わせ、共同研究についての準備のための打ち合わせ
2	日時等	2011年3月16日(京都市衛生環境研究所)
	参加者	(本学)前田、染谷、(京都市)石川、他
	内容	衛生環境研究所所員との顔あわせ、衛生環境研究所の施設見学、および研究打合せ
3	日時等	2011年4月15日(京都産業大学)
	参加者	(本学)大槻、村田、前田、西野、染谷、岡本、(京都市)峯野、他
	内容	共同研究の打ち合わせ
4	日時等	2011年6月2日(京都産業大学)
	参加者	(本学)大槻、村田、前田、高桑、西野、染谷、岡本、(京都市)峯野、石川、近野、他
	内容	共同研究の打ち合わせ
5	日時等	2011年6月17日(京都市衛生環境研究所・食肉検査部門) 第1回京産大・京都市食肉検査部門合同会議
	参加者	(本学)村田、前田、西野、染谷、イゴール・ベラド フェルナンデス(本学大学院生)、(京都市)谷川、田邊、栗田、中川、村北、小野
	内容	食肉検査部門所員との顔合わせ、施設見学、および家畜感染症の研究打ち合わせ等
6	日時等	2011年6月20日(京都市衛生環境研究所)
	参加者	(本学)前田、染谷、ベラド フェルナンデス、(京都市)峯野、他
	内容	昆虫媒介性感染症の研究打ち合わせ、および活動計画の確認等。
7	日時等	2011年7月15日(京都産業大学)、第2回京産大・京都市食肉検査部門合同会議
	参加者	(本学)大槻、村田、前田、西野、染谷、(京都市)中川(課長)、谷川、中川、村北、小野
	内容	本学施設見学、および家畜感染症の研究打ち合わせ
8	日時等	2011年8月10日(京都産業大学)
	参加者	(本学)前田、ベラド フェルナンデス、(京都市)大西
	内容	研究打ち合わせ(共同研究の具体化、役割分担の確認等)
9	日時等	2011年8月16日(京都市内)
	参加者	(本学)前田、ベラド フェルナンデス、(立命館大)米島(本学客員研究員)、(京都市)大西
	内容	研究打ち合わせ、蚊の採集
10	日時等	2011年8月26日(京都市内)
	参加者	(本学)前田、ベラド フェルナンデス、米島(立命館大、本学客員研究員)、(京都市)大西
	内容	蚊の採集

11	日時等	2011年8月27日(京都産業大学)
	参加者	(本学)前田、ベラド フェルナンデス、米島、(京都市)大西
	内容	蚊の分類・同定
12	日時等	2011年8月29日(京都産業大学)
	参加者	(本学)前田、ベラド フェルナンデス、米島、(京都市)大西
	内容	蚊の分類・同定
13	日時等	2011年9月2日(京都産業大学)
	参加者	(本学)前田、ベラド フェルナンデス、米島、(京都市)大西
	内容	蚊の分類・同定
14	日時等	2011年9月13日(京都産業大学)
	参加者	(本学)前田、染谷、ベラド フェルナンデス、米島、(京都市)大西、池永
	内容	蚊の乳剤作製とウイルス遺伝子の検索
15	日時等	2011年10月6日(京都産業大学)、第3回京産大・京都市食肉検査部門合同会議
	参加者	(本学)大槻、前田、染谷、今野、西野、(京都市)中川(課長)、栗田、村北
	内容	本学部の客員研究員顔合わせ、本学施設見学、および今後の学術交流の在り方について検討
16	日時等	2011年10月14日(京都市衛生環境研究所)
	参加者	(本学)前田、染谷、ベラド フェルナンデス、(京都市)大西、池永、近野、杉江、三宅、峯野
	内容	研究打ち合わせ(実験結果の検討、今後の計画)、研修(マダニの同定)
17	日時等	2011年10月24日(京都産業大学)
	参加者	(本学)前田、高桑、染谷、ベラド フェルナンデス、(京都市)近野、杉江
	内容	研究打ち合わせ(実験結果の検討、今後の計画)、研修(インフルエンザウイルスの分離)
18	日時等	2011年10月27日(京都産業大学)
	参加者	(本学)前田、染谷、(京都市)池永
	内容	研究打ち合わせ(実験結果の検討、今後の計画)、研修(PCR法によるマダニ検体からのリケッチアの検出)
19	日時等	2011年11月18日(京都市家庭動物相談所)
	参加者	(本学)前田、染谷、ベラド フェルナンデス、(京都市)永井、斉藤、池永
	内容	顔合わせ、施設見学
20	日時等	2011年11月18日(京都市衛生環境研究所)
	参加者	(本学)前田、染谷、ベラド フェルナンデス、(京都市衛生環境研究所)池永、近野、杉江、三宅、峯野
	内容	研究打ち合わせ(実験結果の検討、研究成果発表の方針の相談、今後の計画)
21	日時等	2011年11月18日(京都市衛生環境研究所・食肉検査部門)、第4回京産大・京都市食肉検査部門合同会議
	参加者	(本学)村田、前田、染谷、今野、ベラド フェルナンデス、西野、(京都市)中川(課長)、栗田、村北、田邊
	内容	食肉検査部門の業務内容に関するセミナー(食肉検査部門・田邊)、今後の学術交流の在り方について検討、実験施設の見学
22	日時等	2011年12月2日(京都市内、京都産業大学)
	参加者	(本学)高桑、藪田、(京都市)近野、杉江、中村、馬口
	内容	ウイルス分離用カモ糞の採取、およびウイルス分離
23	日時等	2011年12月12日(京都市内、京都産業大学)
	参加者	(本学)高桑、藪田、(京都市)近野、中村、馬口

	内容	ウイルス分離用カモ糞の採取、およびウイルス分離
24	日時等	2011年12月19日(京都市内、京都産業大学)
	参加者	(本学)高桑、薮田、(京都市)近野、杉江、中村、馬口
	内容	ウイルス分離用カモ糞の採取、およびウイルス分離
25	日時等	2011年12月22日(京都産業大学)、第5回京産大・京都市食肉検査部門合同会議
	参加者	(本学)村田、前田、染谷、今野、西野、(京都市)中川(課長)、栗田、村北、田邊
	内容	「ボルナ病とボルナ病ウイルス」に関するセミナー(本学・西野)、本学施設見学

家畜衛生学研究室

Laboratory of Animal Hygiene

教授 大槻 公一

Prof. Koichi Otsuki, DVM, Ph. D



1 及び2. 研究概要及び本年度の研究成果

1970年代から国内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。調査を琵琶湖東岸に的を絞って行なっている。おおむね渡り鳥が飛来した11月から北帰行を完了する4月まで毎月2回程度採材を行なっている。また、時期は限定されたが、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。現在2期目である。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、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の森田公一教授、山城 哲教授と協力しながら実施している。ベトナムは日本と異なり、家畜産業界は常に鳥インフルエンザ発生に悩まされており、ウイルスは常在化していると思われている。鳥インフルエンザ撲滅まで長期間必要である。成果の一部は可能なものから専門雑誌に順次公表しているが、東南アジアで信頼できるデータを出すのは困難性が高く、しかもベトナム政府の公表許可を得るのは容易ではない。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きた。研究成果の一部は、企業の請求により、専門雑誌に公表している。また、企業と共同で特許出願も行なっている。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実学的要素が強く、常に成果の社会還元が求められる。したがって、私立大学である本学動物生命医科学科の一構成分野である本研究室は、この方面における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。

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

なし

5. 総説及び解説文

- 大槻公一. 講座 注目される感染症と制御対策7 鳥インフルエンザ. 防菌防黴, 39(6), 375-387, 2011.
- 大槻公一, 高桑弘樹, 常國良太, 井上瑞江, 藪田淑予. 2010年晩秋から国内で多発した鳥インフルエンザ. 京都産業大学先端科学技術研究所報, No. 10, 45-61, 2011.
- 大槻公一. 発生が止まらない鳥インフルエンザ. SEEDer, No. 5, 78-82, 2011.
- 大槻公一. 鳥インフルエンザウイルスの生態. 東海畜産学会報, 22, 2-6, 2011.
- 大槻公一. 日本各地で発生している高病原性鳥インフルエンザ. 鶏の研究, 86(3月号), 15-20, 2011.
- 大槻公一. 鳥インフルエンザの国内における発生. 養鶏の友, No. 597(11月号), 12-15, 2011.

6. 招待講演、シンポジウム等

- 大槻公一: 鳥インフルエンザの発生状況とその対策. 日本防菌防黴学会学術講演会 2011 及び第39回通常総会 日本防菌防黴学会主催 大阪府吹田市 関西大学 2011年5月23日
- 大槻公一: 鳥インフルエンザの現状と対策. 東海畜産学会主催 平成23年度東海畜産学会シンポジウム 名古屋市 名古屋大学野依記念学術交流館 2011年7月6日
- 大槻公一: 鳥インフルエンザの新たな状況への対応策について. 日本家禽学会主催 平成23年度・日本家禽学会秋季大会公開シンポジウム 青森県十和田市 北里大学獣医学部 2011年8月24日

7. 学会発表

Hotta, K., Usui, T., Takakuwa, H., Yamaguchi, T., Mai, Le Q., Otsuki, K., and Yamashiro, T.: Pathogenic analysis of influenza virus H6N1 subtype circulating among poultry in northern Vietnam. XV International Congress of Virology. Sapporo 2011.9.11-16

8. その他特記事項

外部資金

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

課題名: 新型インフルエンザ対策に係る自然科学及び社会科学融合研究

研究代表者: 大槻公一、取得年度: H20-24年(5年)

感染症研究国際ネットワーク推進プログラム

研究課題名: 新興・再興感染症臨床疫学研究拠点 ベトナムにおける長崎大学感染症研究プロジェクト

研究代表者: 森田公一、取得年度: H22-26年(5年)

科学研究費補助金基盤研究(B)

研究課題: 新型インフルエンザ等新興感染症対策としての有効な教育介入手法に関する国際比較研究

研究代表者: 坪内暁子、取得年度: H22-24年(3年)

知財権等

特許: 抗ウイルス物質、抗ウイルス繊維及び抗ウイルス繊維構造物
: 鳥インフルエンザウイルス不活化剤

学外活動

鳥取大学特任教授 農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター

財団法人鳥取県食鳥肉衛生協会理事(H4年より)

京都府・京都市新型インフルエンザ対策専門家会議

委員(H18年より)

京都府農林水産部広域防疫対策センターに係る専門家チーム委員(H18年より)

近畿ブロック家畜病性鑑定ネットワーク協議会委員

(H23年より)

京都府家畜改良増殖審議会委員(H23年より)

京都府立医科大学医学部 非常勤講師

社会貢献(講演)

大槻公一. 鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザ防疫対策確立と感染症対策. 地球益P&C研究所主催 京都市 2011年4月28日

大槻公一. 高病原性鳥インフルエンザ発生に関

する最新の知見について. 京都府農林水産部畜産課主

催 『第2回「高病原性鳥インフルエンザに係

る防疫対策会議』京都市 2011年5月30日

大槻公一. 白鳥への給餌を考える～人と野鳥の関

わり方と鳥インフルエンザの問題を通して～.

長野県安曇野市主催 シンポジウム『白鳥への餌

付けについて』長野県安曇野市 2011年9月3

- 日
- 大槻公一. 高病原性鳥インフルエンザの発生と侵入防止対策について. 鶏病研究会山口県支部主催 平成23年度鶏病研究会山口県支部鶏病技術研修会 特別講演 山口市 2011年9月20日
- 大槻公一. 鳥インフルエンザってどういう病気. 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 2011年9月23日
- 大槻公一. 鳥インフルエンザってどういう病気. 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 京都府舞鶴市 2011年10月1日
- 大槻公一. 発生が止まらない鳥インフルエンザについて. 鶏病研究会奈良県支部主催 平成23年度近畿地区鶏病技術研修会 特別講演 奈良市 2011年10月7日
- 大槻公一. 野鳥における高病原性鳥インフルエンザの伝搬の仕組み. 社団法人岐阜県獣医師会主催 平成23年度獣医学術研修会(傷病野生鳥獣保護) 岐阜市 2011年10月11日
- 大槻公一. インフルエンザウイルスについて. 京都府立医科大学 京都市 2011年10月12日
- 大槻公一. 鳥インフルエンザの最近の動向について. 鶏病研究会高知県支部主催 平成23年度中国四国地区鶏病技術研修会 特別講演 高知市 2011年10月14日
- 大槻公一. インフルエンザから家族を守る. NHK文化センター大阪総支社主催 スズケン市民講座 大阪市 2011年10月15日
- 大槻公一. 農学教育のあらましと鳥インフルエンザに関する研究概要について. 静岡県立静岡高等学校主催 平成23年度進路講演会 静岡市 2011年10月21日
- 大槻公一. 最近の鳥インフルエンザの動向と新型インフルエンザの現状. 日立アプライアンス主催 日立特別講演会 京都市 2011年10月28日
- 大槻公一. 最近の鳥インフルエンザの動向と対策について. 大阪府と阪神地区感染症懇話会(大阪検疫所、関西空港検疫所、神戸検疫所で構成)共催 感染症担当者研修会 大阪市 2011年11月7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 2011年11月17日
- 大槻公一. 鳥インフルエンザについて. 社団法人岡山県獣医師会主催 平成23年度獣医公衆衛生講習会(中国地区) 岡山市 2011年11月18日
- 大槻公一. 高病原性鳥インフルエンザの最近の動向. 兵庫県姫路家畜保健衛生所主催 養鶏講習会兵庫県加西市 2011年11月21日
- 大槻公一. 高病原性鳥インフルエンザからの新型インフルエンザ出現の可能性と防疫対策について. 滋賀県健康福祉部主催 平成23年度動物由来感染症対策研修会 大津市 2011年11月24日
- 大槻公一. 鳥インフルエンザウイルス拡大の原因考察について. 社団法人日本ペストコントロール協会主催 平成23年度感染症指導者講習会 東京都墨田区 2011年11月25日
- 大槻公一. 鳥インフルエンザの現状と対策. 東富士農産株式会社主催 ピビオ研究会 東京都文京区 東京大学農学部 2011年12月1日
- 大槻公一. アジア全域で流行が止まらない鳥インフルエンザの実態と今後の見通し. 公益財団法人千里ライフサイエンス振興財団主催 千里ライフサイエンスフォーラム(2011年12月度) 大阪府豊中市 2011年12月15日
- 大槻公一. 鳥インフルエンザの防疫対策. 静岡県ペストコントロール協会主催 鳥インフルエンザ研修会 静岡市 2012年2月1日
- 社会貢献(報道関係記事等)
- 新聞記事
- 2011年8月21日 毎日新聞
「知って得、とり・たまごの集い」講演告知
- 2011年9月14日 読売新聞
安曇野市の冬の風物詩 ハクチョウ給餌はか非か
- 2011年10月22日 産経新聞
「大学の挑戦」センターの紹介
- 2011年11月21日 南日本新聞
厳戒ツルの里-鳥インフルエンザ感染1年①
- 2011年11月23日 京都新聞
京産大と市衛環研鳥インフル感染調査へ
- 2012年1月21日 南日本新聞
宮崎鳥インフル1年 渡り鳥監視強化
- 2012年1月26日 中日新聞
昨年被害の豊橋、新城 鳥インフル農家厳戒
- 2012年2月12日 朝日新聞
「スワンの教訓-公園再生に向けて」中

免疫病理学研究室

Lab.for Immunopathology



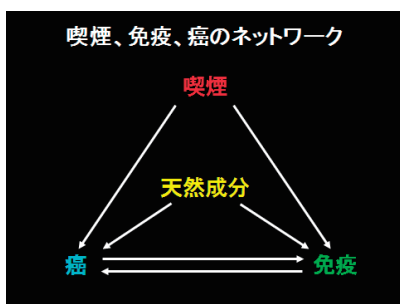
教授 竹内 実

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

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

グラム陰性菌由来の内毒素である Lipopolysaccharide (LPS)は、様々な免疫活性を有し、タバコ煙や環境中に含まれており、呼吸や喫煙により肺に吸入することにより肺胞領域に取り込まれる。この取り込まれた LPS による肺免疫細胞への影響について研究している。また、肺に影響を与え、アレルギーを発症させることで知られているスギ花粉がある。日本スギ花粉(*Cryptomeria japonica* pollen)は、カギ状の突起(パピラ)を有する単粒球形の形状で、I型の過敏症を引き起こすことで知られている。しかし、スギ花粉とその成分が生体に吸入されてからの肺免疫系に及ぼす影響については十分な解明はされていないため、スギ花粉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。

1) 天然成分の免疫作用とその応用について

① 蜂蜜

天然成分には様々な生理活性が知られており、蜂蜜には、グルコース、フルクトースのほか各種ビタミン、ミネラル、

アミノ酸が含まれ、栄養が豊富な天然の食品として親しまれている。しかし、蜂蜜は食用としてだけでなく、伝統的な薬として古くから世界各国で利用され、美容、健康維持の他、怪我、火傷などの創傷治療



の治療に用いられている。また、蜂蜜は花の種類によって成分が異なるため、Manuka honey、Pasture honey、Jelly bush honey、Jungle honey などの様々な種類がある。蜂蜜のひとつである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蜜蜂が長期にわたり樹木や花から集めてできた蜂蜜である。ジャングルハニーを作る蜜蜂の種類は、*Apis mellifera adonsonii* であり、蜜になる主な花の樹木としては、*Pentaclethra macrophylla*、*Chrysophyllum albidum*、*Milicia excels* などがある。ジャングルハニーの成分には、糖質、ビタミン、グルコン酸、タンパク、ミネラル、アミノ酸などが含まれ、一般の蜂蜜に比べこれらの成分が約3倍以上多く含まれているのが特徴である。ナイジェリアでは、この蜂蜜が健康や美容の他、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。そのため食用ではなく、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。

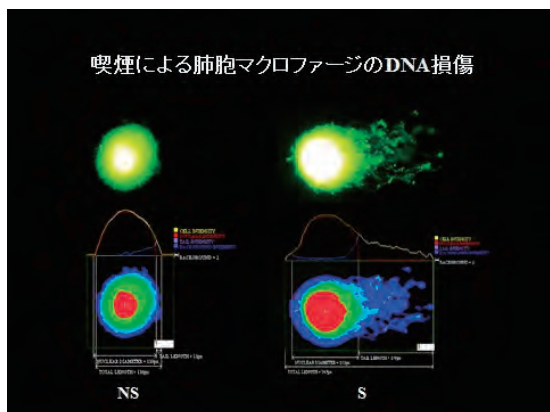
②アガリクス茸

アガリクスは、学名「アガリクスブラゼイムリル (Agaricus blazei Murill)」、和名を「カワリハラタケ」という食用キノコで、ブラジル、サンパウロ郊外約200 km のピエダーテ地方と呼ばれる高地に唯一自生している。野生のアガリクス茸は昼間 35 度、夜間 20~25 度、湿度 80%、そして夕方になると定期的にやってくるスコールという気候条件のもとでしか生育しないと言われている。この地で暮らす人々が昔から食用にしてきたキノコである。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と有効成分について研究している。

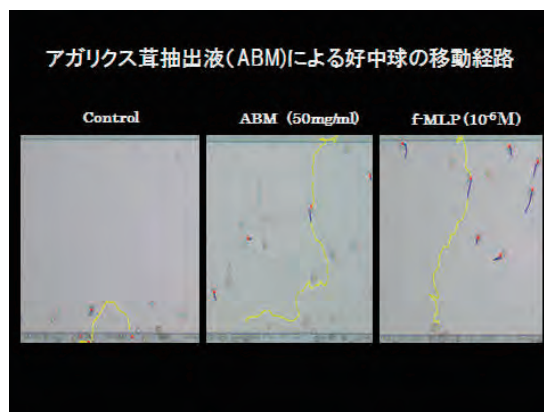


2. 本年度の研究成果

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。さらに、肺胞マクロファージがタバコ粒子を細胞質内に取り込み、細胞内部構造を複雑化させ、細胞胞体のサイズも増加し、空胞変性が認められ、その結果、細胞内に封入体を形成していることが電子顕微鏡により確認された。この細胞内に形成された封入体が、細胞内で処理されず、残存し続けることが、肺胞マクロファージの ROS 産生を増強し DNA 損傷を誘導し、その結果、肺胞マクロファージの食食機能などの免疫機能の抑制を引き起こす可能性が示唆された。



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、好中球の移動方向性、移動速度を増強し、細菌感染の初期対応である運動性機能を亢進することが解明された。また、アガリクス茸熱水抽出液も好中球の運動性を亢進し、移動方向性を高め、移動速度を速めることが証明された。さらに、アガリクスは、機能低下した好中球の食食機能を回復させることも証明され、これらの天然成分物質は、細菌への移動性を早め、食食作用を高め、好中球機能を活性化し、細菌感染を防御する可能性が示唆された。



LPS による肺の初期免疫応答に関しては、LPS の気管支内投与により、肺細血管から好中球の肺間質、肺胞腔への流入が認められ、急性肺炎症が引き起こされた。好中球の肺への誘導機構としては、LPS に対して肺胞マクロファージがまず初期応答として反応し、LPS により肺胞マクロファージが Toll Like Receptor(細菌認識受容体:TLR)を介して刺激され、その後、好中球の走化因子が産生されることが確認され、肺胞マクロファージが好中球誘導の初期応答として関与してい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 immuno-enhancing substances may act to restore suppressed immune functions.

1: Study for tobacco smoke

The World Health Organization (WHO) reports that mortality from pulmonary diseases associated with exposure to cigarette smoke including respiratory infections, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung cancers, has increased. It has been suggested that these diseases may be at least partially related to cigarette smoke-induced impairment of the pulmonary immune system. Cigarette smoke is a major risk factor for pulmonary diseases. Cigarette tobacco smoke particles are inhaled into the lung and reach alveolar space, and then directly encounter Alveolar Macrophages (AM). AM play an important role as the first line of defense in the pulmonary immune system. AM phagocytize microorganisms, produce reactive oxygen species (ROS) and play an important role in immunological surveillance for the lung. In previous studies, we demonstrated that tobacco smoking inhibits immune functions such as phagocytic activity, antigen presentation and induces DNA damage 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

Natural products are known to have biological activity, and we have previously investigated the effect of natural products on immune function. Honey contains various vitamins, minerals and amino acids as well as glucose and fructose and is popular as a natural food. There is a wide variety of honey (Manuka honey, Pasture honey, Jelly bush honey etc), and the varieties are due to components of flower sources. One variety, Jungle honey is produced by the African wild bees (*Apis mellifera adansonii*) in the virgin forest of the Nsukka district, Enugu state of Nigeria. The bees usually have their nests (the honey combs) inside the hollow of tree trunks. 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 has been traditionally used as medicine in Brazil. Agaricus blazei Murill has been reported for anti-tumor activity and immune activity. It is unclear how Agaricus blazei Murill hot water extract activates the immune system and anti-tumor activity. We have demonstrated that extract of Agaricus blazei Murill activated immune functions in mice. However, the mechanism of the activity of immune functions and anti-tumor activity by Agaricus blazei Murill is not well defined. Therefore, we are focusing on immune cells functions associated with anti-tumor activity by Agaricus blazei Murill hot water extract and its characterization of effective component.

4. 発表論文

Miyahara, Emiko; Nishie, Makiko; Takumi, Shota; Miyahara, 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*. 317(2):109-16 (2011)

Koichiro Yoshimoto, Tsunao Kishida, Hiroshi Nakano, Masahiro Matsui, Masaharu Shin-Ya, Taketoshi Shimada, Shigeru Nakai, Jiro Imanishi, Minoru Takeuchi, Yasuo Hisa and Osam Mazda: Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Immunotherapy*. 34(2):139-48 (2011)

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*.2011:1-7 (2011)

石田喬裕 竹内実: 喫煙による肺胞マクロファージを介した抗原特異的および非特異的なリンパ球増殖反応に及ぼす影響 *京都産業大学論集* 自然科学系列 第40号,71-108 (2011)

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

竹内実 「喫煙と免疫機能」 経済産業省化学物質評価研究機構セミナー 久喜、埼玉 2011年6月13日

竹内実 「喫煙とDNA損傷」 鹿児島大学環境医学セミナー 鹿児島大学、鹿児島 2011年7月4日

Minoru Takeuchi 「Effect of tobacco smoke exposure on immune functions and DNA damage in alveolar macrophage」 Seminar in Center for Health and the Environment, UC Davis, CA, USA 2011年8月23日

竹内実 「はちみつの効用について」 日本養蜂はちみつ協会 東京 2011年12月19日

7. 学会発表

Minoru Takeuchi, Shinichi Inoue, Yuriko Hirono, Mayuko Miyagawa, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Osamu Mazda, Sonoko Nagai, Toru Takeuchi, K.E. Pinkerton: EFFECT OF ENVIRONMENTAL TOBACCO SMOKE EXPOSURE TO ALVEOLAR MACROPHAGE ASSOCIATED WITH INNATE IMMUNITY IN THE LUNG. Sixth World Congress on Pediatric Critical Care One World Sharing Knowledge. Sydney (Australia) 2011.3.13-17

Yuriko Hirono, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Mayuko Miyagawa, Masaaki Sakura, Sumire Inaga, Osamu Mazda, Sonoko Nagai, Toru Takeuchi, K.E. Pinkerton and Minoru Takeuchi: The Inhibitory Mechanism Of Apoptosis In DNA Damaged-Alveolar Macrophages By Cigarette Smoke. .ATS 2011 International Conference. Denver (U.S.A.) 2011.5.13-18

Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Masahito Nose, Yuriko Hirono, Masaaki Sakura, Minoru Takeuchi: EFFECT OF CIGARETTE SMOKE ON LPS-INDUCED LUNG INFLAMMATION. 16th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology. Shanghai (China), 2011.11.3-6

Eri Shigeyoshi, Masahito Nose, Ayaka Kawazoe, Yuriko Hirono, Masaaki Sakura, Minoru Takeuchi: EFFECT OF HONEY ON IMMUNOLOGICAL FUNCTIONS OF ALVEOLAR MACROPHAGES AND ANTIBODY PRODUCTION. 16th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology. Shanghai (China), 2011.11.3-6

KAWAZOE Ayaka, SHIGEYOSHI Eri, NOSE Masahito, HIRONO Yuriko, SAKURA Masaaki, TAKEUCHI Minoru: Effect of Cigarette Smoking on LPS-induced lung inflammation. 第40回日本免疫学会学術集会、幕張(千葉)、2011.11.27-29

HIRONO Yuriko, KAWAZOE Ayaka, SHIGEYOSHI Eri, NOSE Masahito, SAKURA Masaaki, INAGA Sumire, TAKAKUWA Hiroki, OTSUKI Koichi, TAKEUCHI Minoru: Effect of Cigarette Smoke and Avian Influenza Virus on Alveolar Macrophages. 第40回日本免疫学会学術集会、幕張(千葉)、2011.11.27-29

SHIGEYOSHI Eri, KAWAZOE Ayaka, NOSE Masahito, HIRONO Yuriko, SAKURA Masaaki, TAKEUCHI Minoru: Effect of Jungle Honey on Antibody Production and Its Mechanism. 第40回日本免疫学会学術集会、幕張(千葉)、2011.11.27-29

NOSE Masahito, KAWAZOE Ayaka, SHIGEYOSHI Eri, HIRONO Yuriko, TANAHASHI Yasuyuki, SAKURA Masaaki, TAKEUCHI Minoru: Effect of Cigarette Smoke on Induced Immune Cells in Lung by Inhalation of Cryptomeria Japonica Pollen. 第40回日本免疫学会学術集会、幕張(千葉)、2011.11.27-29

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
経済産業省化学物質評価研究機構

2. 知材権等

なし

3. 学外活動

京都府獣医師会支部役員、
Pulmonology 編集委員、
WJR 編集委員、
京都高等教育研究センター副所長など

4. 受賞等

なし

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！



研究室メンバー



カリフォルニア大学デービス校(UCD)とも共同研究を行っています。

研究室一同、お待ちしております。

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



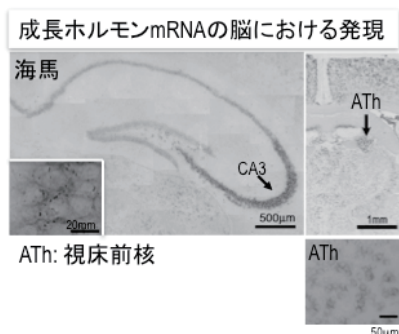
1. 研究概要

「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―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脳内で発現し、てんかん発症の閾値を決定することを発見していた。本年度は、成長ホルモンシグナル系が脳内に存在し、情動系の行動にも影響する事を見つけた。今後は、成長ホルモンシグナル系の下流の遺伝子産物が、てんかん発症や情動系の行動にどのように影響するのかについて、更なる研究を進める。



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成したところ、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ている。

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に、いくつか特殊飼料を成長期に与えたところ、うつ症状、不安障害、統合失調症に影響を与える成分を見つけた。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。

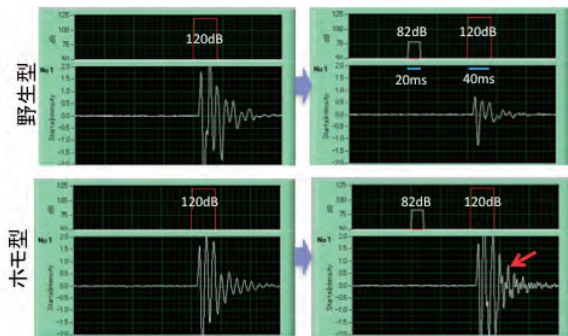
2. 本年度の研究成果

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、マウスは興奮を示したり、活動量の低下を示した。この行動変化は、てんかん応答性を示す遺伝子の発現変動に相関性があった。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) を欠損したマウスは、うつ・不安障害、環境適応不全、睡眠障害、ホルモン恒常性障害 (成長阻害や性行動不全) に加え、新たに、統合失調症様症状も示す事がわかった。



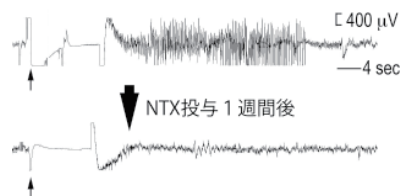
マウスに大きな音 (120dB) を聞かせると、驚愕反応 (震え) を示す。このマウスの震えを加速度センサーにより感知した図を示した。正常のマウスだと、先に小さい音 (82dB) を聞かせることで突然与えられた大きい音にそれほど驚かなくなる (プレパルス抑制)。一方でシアル酸修飾酵素遺伝子欠損マウスは、相変わらず激しく驚く (矢印)。このプレパルス抑制は、情報処理における障害の指標として用いられており、統合失調症では、このマウスのようにプレパルス抑制が減弱する。

3) ストレス性情動系障害への飼料摂取効果の検討

平成 22-23 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」に採択され、研究を開始したところ、特殊飼料中に含まれる成分が、うつ症状、不安障害、統合失調症に影響を与えることがわかった。

4) ボツリヌス毒素によるてんかん発作抑制機構の解明

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。このことからてんかん治療への応用についても論文をまとめている。ボツリヌス毒素の中枢神経系への作用と軸索輸送については共著論文を発表した。



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. In this year, we evaluated that a specific material, that was contained in specific mouse foods, affected depression, anxiety, environmental adjustment disorder, and activity. We aim to investigate brain metabolic mechanisms that were generated from food and correlation of the metabolism with emotional behaviors.

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

Torii Y, Akaike N, Harakawa T, Kato K, Sugimoto N, Goto Y, Nakahira S, Kohda T, Kozaki S, Kaji R, Ginnaga A. Type A1 but Not Type A2 Botulinum Toxin Decreases the Grip Strength of the Contralateral Foreleg Through Axonal Transport From the Toxin-Treated Foreleg of Rats. *J Pharmacol Sci.* 117:275-285 (2011)

5. 著書および総説

Kato K. 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 6 (2011)

6. 招待講演、シンポジウム等

加藤啓子 「てんかん,不安障害, うつ病の治療薬スクリーニング法の開発」 関西 8 私大新技術説明会 JST東京別館ホール 2012.3.16

加藤啓子「モデルマウスを利用した食品・治療薬スクリーニング法」 次世代医療システム産業化フォーラム 大阪商工会議所 2011.9.15

加藤啓子 ストレス障害を緩和する食品・治療薬の開発 第3回創薬シーズ相談会 「バイオスプリングボード関西」 新阪急ビル9階 2011.6.13

7. 学会発表

加藤啓子, 菅野拓 てんかん及び, 情動行動における脳内成長ホルモンシグナル系の関与について 第152回日本獣医学会 大阪府立大学 2011.9.19 (口演)

加藤啓子, 菅野拓, 平林義雄 てんかん及び, 情動行動への脳内成長ホルモンシグナル系関与 第54回神経化学会 金沢 2011.9.26-29 (口演)

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4号館4階AV会議室 2011.2.23 (口演)

8. その他特記事項

1. 外部資金

京都産業大学「特定課題研究」ストレス性情動系障害に関わる糖・脂質関連分子メカニズムの解明 (研究代表者:加藤啓子, E1105)

基盤研究 (C) てんかん~不安障害・睡眠障害に至る神経疾患分子メカニズムの解明 (研究代表者:加藤啓子, 22580338)

基盤研究 (B) 難治性脳神経疾患へのボツリヌス毒素を治療応用するための基礎研究 (研究代表者:小崎 俊司, 共同研究者:加藤啓子, 17234567)

A step 研究成果最適展開支援事業フィージビリティスタディ可能性発掘タイプ シーズ顕在化 ストレス障害を解消する油脂食品の開発 (研究責任者:加藤啓子 AS2211285E)

2. 知材権等

新規特許なし。

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

ホームページ

http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kato/Home_J.html/Welcome.html

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ついて研究を進めている。

人や動物が外界から色々な刺激を受けると、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変化に対して体を適応させる反応であるが、長期に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。

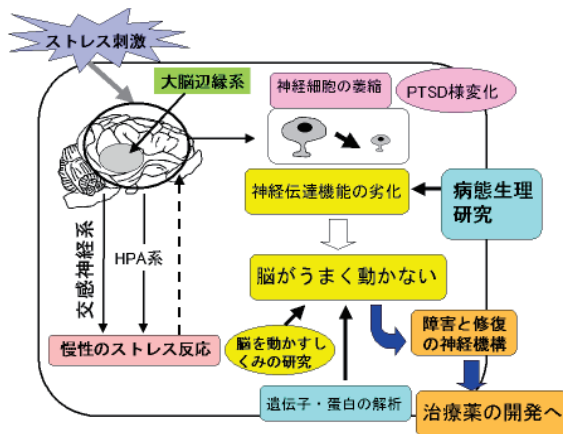


図 1. 本研究の概略

本分野では以下の研究を主に行っている。

- 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) 脳の局所における神経伝達物質の変動を検出するため、バイオセンサーの試作に着手した。バイオセンサーはボルタメトリーを原理を利用したタイプであるが、金属ワイヤー単体あるいはガラスキャピラリーに収納した形のものを検証している。このバイオセンサーと接続する数百 MHz の送信周波数を利用したワイヤレスシステムの検証も同時に進めている。これまでのところ、標本の静電容量の差が原因と思われる信号入力系の不安定なところが見つかっており、これを解消するためにシステムの改良を続けている。

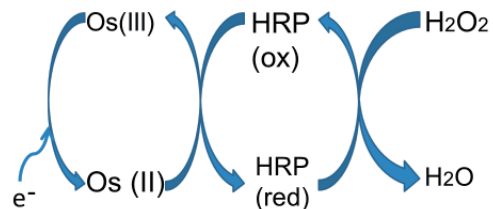


図 2. バイオセンサーの最終反応を示した模式図

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のアラキドン酸誘導体の局在を検証するとともに、そのバイオセンサーの開発を進めている。前者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い、それぞれの配列をほぼ同定した。本年度は、昨年度に得られた蛋白を抗原として抗体を得る作業を進め、ポリクローナル抗体を得ることができた。今後、得られた抗体の交差反応性を調べる必要がある。

3) ストレスによって障害を受けた脳の部位を特定し、その場所へより正確にアプローチするためには、対象となる動物の脳地図が必要となる。これまでの脳地図はいわゆる脳定位固定装置を利用して作製されているが、個体毎の誤差の補正は経験によるところが多い。そこで、個体の脳に即した、脳定位固定装置を使わない脳定位手術法の検討を進めている。

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 in the *in vivo* and *in vitro* preparations,

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 the telemetry system and biosensors

We have developed the telemetry system for detecting neural signals from the freely moving animals. We are further modifying this technique to measure intrinsic neurotransmitters and/or neuromodulators in the central nervous system *in vivo* and *in vitro*. There are found drift and fluctuation in the measurement system, probably due to difference in electrostatic capacitance in the preparations. Further improvement is required for eliminating these drift and fluctuation. On the other hand, to make multichannel biosensor, we are examining the materials and manufacturing processes.

2) Polyclonal antibodies for 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 the receptor, and obtained the targeted protein. We obtained rabbit anti-immunoglobulin for the extracellular domain of the receptor. However, cross-reactivity of the antibody remains unclear and should be examined..

3) Examination of frameless stereotaxic method in the brain

Stereotaxic mapping is essential for approaching the targeted nuclei in the brain of the animals. Generally, the stereotaxic instrument is used with the atlas, which has been made in each animal. However, there is still error in the coordinates for the nuclei, due to variation in the skull and brain size. We are now developing frameless stereotaxic

approach into the intracerebral structures without use of the stereotaxic instrument.

鳥取大学獣医学科との連携による遠隔講義(獣医生化学・生理学模擬講義)の実施

東日本大震災・被災地への支援

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.* **84:103-109 (2011)**

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

齋藤敏之、藤原清悦、笹森壮一郎、今野兼次郎、久倉勝治、小林英司、大河内信弘、明間立雄、山口峻司:無線記録によるブタ海馬の神経活動データの信頼性—高周波数域における検証。

第 151 回日本獣医学会学術集会、東京農工大学、府中市、2011.3.30-4.1

齋藤敏之、嘉屋元博:ブタの脳におけるカンナイノイド受容体解析(第1報)。第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪府立大学、堺市、2011.9.19-21

8. その他の特記事項

1)外部資金 なし

2)知財権等 なし

3)学外活動

齋藤敏之:自治医科大学先端医療技術開発センター・非常勤講師

齋藤敏之:茨城県立医療大学学外共同研究員

4)受賞等 なし

5)その他

図書館委員会・委員

京都市環境衛生研究所との学術交流協定締結

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、様々な微生物が存在する。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、生態学的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の病原性の発現メカニズムや自然環境中での存在様式の解明、公衆衛生対策のための基礎的な研究を行っている。具体的な研究対象は、蚊やダニ等の節足動物が媒介する人獣共通感染症である(図1)。近年の地球温暖化に伴う媒介蚊の生息範囲の拡大と、それに伴う各種の節足動物媒介性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、海外で流行するウイルスや細菌等病原体の侵入と、その国内流行への対策が急務となっている。そこで、本研究室では以下の研究テーマについて研究を行っている。

- (a) 蚊媒介性人獣共通感染症の京都市および中国・広東省における感染疫学的解析
- (b) 蚊媒介性人獣共通感染症であるフラビウイルスの新規検査法やワクチンの開発
- (c) フラビウイルスの分子生物学的解析
- (d) ダニ媒介性感染症の京都市における感染疫学的解析
- (e) ダニ媒介性感染症であるリッケチアの新規検査法の開発

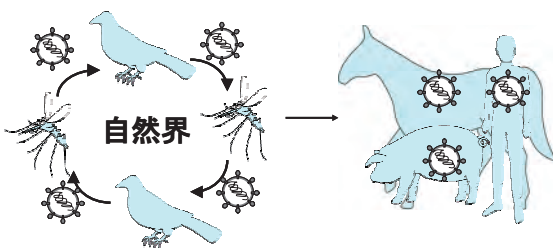


図1.蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

節足動物媒介性人獣共通感染症の例として、蚊が媒介するウエストナイルウイルス感染症の感染環を示す。自然界では、蚊が媒介者となってトリの間で生活環が維持されている。しかし、突発的にウマやブタ、ヒトに感染し脳炎等の重篤な症状を引き起こす。

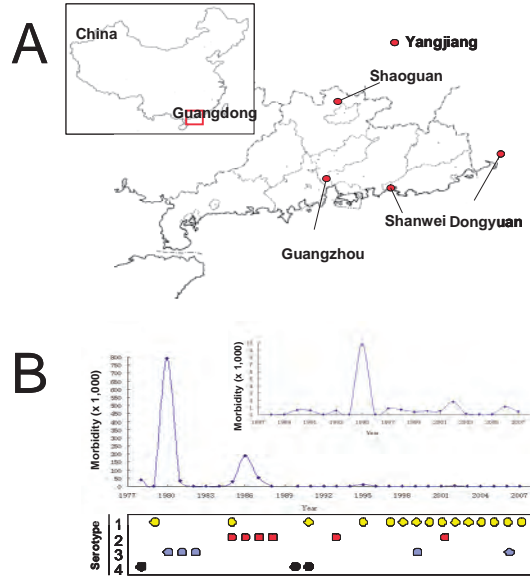


図2. 中国・広東省における蚊媒介性感染症である Dengue 熱の流行調査

A 本研究の調査地である中国・広東省(Guangdong)の地理的な位置を四角内に示す。また、広東省での調査都市を右下図に示す。B. 1977年から2007年までの Dengue 熱患者の推移(上図)と当該年度の流行を引き起こした Dengue ウイルスの血清型(下図)を示す。

2. 今年度の進展・成果

(1) 蚊媒介性人獣共通感染症の中国・広東省における感染疫学的解析

蚊媒介性感染症の一つである Dengue 熱の中国・広東省での調査を行った(図2)。本研究の成果は、”Re-emergence of Dengue Virus Serotype 2, 3, and 4 and Its Co-circulation with Predominant Dengue Virus 1 in Guangdong Province, 2010” および “Characterization of Dengue in Guangdong Province, China, 1976-2010” として投稿準備中である。本研究は、中国・広東省 CDC の Dr. Ke. Chang-Wen および彼の博士課程の生徒である Jiang Shu との共同研究として行っている。

(2) 蚊媒介性人獣共通感染症の京都市における感染疫学的解析

京都市環境衛生研究所の大西修、近野真由美、杉江真理子・研究員および立命館大学の中谷友樹・准教授と同大学院2年生の米島万有子さん、国立感染症研究所の二瓶直子・客員研究員、当教室の大学院1年生であるイゴール・ペラド フェルナンデス君との共同研究として行っている。京都市内の複数の定点で蚊を捕獲し、蚊が保有する可能性のあるフラビウイルス(日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルス、

デングウイルス等)やチクングニヤウイルスの遺伝子の検出を試みたが、全て陰性であった。

(3) 蚊媒介性人獣共通感染症であるフラビウイルスの分子生物学的解析

フラビウイルス感染は、ウイルスと細胞表面との接触により始まる。しかし、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。そこで本研究室の大学院生のイゴール君とともに、フラビウイルス粒子の膜タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の検索・同定を試みている。

(4) ダニ媒介性感染症の京都市における感染疫学的解析

京都市環境衛生研究所の池永充宏・係長および本学総合生命科学部の染谷梓・助教との共同研究として行っている。京都市内の複数の定点において経時的にダニを捕獲し、種を同定するとともにダニが保有するリケッチア種の検出を行った(結果は染谷助教の項を参照)。

3. Research projects and annual reports

Many micro-organisms are surrounding of environment. Some of them infect to plants or to animals including human, and cause unique diseases to their host, but the others do not. Some live in animal intestine and help food-digestion of host animals. Or some have a role for host plants or animals evolution. Microbes surrounding our environment interact with their host, and make micro- and macro-cosmos in nature.

We are now studying the pathology, ecology, and other basic researches of zoonoses. We, especially, focus on mosquito- and tick-borne diseases. Recently, arthropod vectors are spreading their living places due to global warming. And the diseases are becoming a great threat on world-wide public health. In Japan, it is also urgent to establish the detection and prevention system for these diseases. Now, we are doing research on;

- (a) Epidemiological study on mosquito-borne zoonoses in Kyoto-City, Japan, and Guangdong province, China
- (b) Development of new diagnostic protocols and vaccine for mosquito-borne flaviviruses
- (c) Molecular biological study of mosquito-borne flaviviruses
- (d) Epidemiological study on tick-borne zoonoses in Kyoto-City, Japan
- (e) Development of new diagnostic protocols for tick-borne Rickettsial diseases

(1) Epidemiological study on mosquito-borne zoonoses in Guangdong province, China:

In this year, we performed epidemiological study on dengue fever in Guangdong province, China. We are now

preparing two related-papers, "Re-emergence of Dengue Virus Serotype 2, 3, and 4 and Its Co-circulation with Predominant Dengue Virus 1 in Guangdong Province, 2010" and "Characterization of Dengue in Guangdong Province, China, 1976-2010". We collaborate with Dr. Chang-Wen, Ke who is one of directors of Guangdong CDC, China, and his graduate student, Miss Jiang Shu in this study.

(2) Epidemiological study on mosquito-borne zoonoses in Kyoto-City, Japan:

We collected mosquitoes, which are the vector of many mosquito-borne zoonoses, at several fixed point observation in Kyoto-City, Japan. We tried to detect the pathogen's nucleic acids within mosquitoes by a standard reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real time RT-PCR protocol. However we did not detect any nucleic acids of our interest pathogens, flaviviruses and Chikungunya virus. In this study, we collaborated with Mr. Osamu Oonishi, Miss Mayumi Konno, and Miss Mariko Sugie, researchers of Kyoto City Institute of Health and environmental Sciences, Dr. Tomoki Nakaya, Associate Professor of Ritsumeikan University, and his Graduate student, Miss Mayuko Yoneshima. And also we collaborated with Dr. Naoko Nihei who is a researcher of National Institute of Infectious Diseases.

(3) Molecular biological study of mosquito-borne flaviviruses:

Flaviviruses infection to its host animals, starts by attachment of viruses to the cell surface receptor proteins. However the detail mechanism of virus infection is still unclear. To study the first event of virus infection, we tried to identify the interaction partners of the virus, which locates at the host cellular surface.

(4) Epidemiological study on tick-borne zoonoses in Kyoto-City, Japan:

We collected ticks, which are the vector of many tick-borne zoonoses, at several fixed point observation in Kyoto-City, Japan. We tried to detect nucleic acids of *Rickettsia* spp., which cause a tick-borne disease, by a standard RT-PCR protocol. We collaborated with Mitsuhiro Ikenaga who is a researcher of Kyoto City Institute of Health and environmental Sciences, and Dr. Azusa Someya, an assistant professor of Kyoto Sangyo University in this study.

4. 発表論文

Moritoh, K., Maeda, A., Sasaki, N., and Agui, T.

Development and application of West Nile virus

subgenomic replicon RNA expressing secreted alkaline phosphatase. *J. Vet. Med. Sci.*, 73 (5): 683-686, 2011

5. 著書および総説

特になし。

6. 招待講演、シンポジウム等

特になし。

7. 学会発表

前田秋彦、前田潤子、染谷梓、西野佳以、村田英雄、Velado Fernandez, Igor、倉根一郎. ウエストナイルウイルスのウイルス様粒子作製法の改良. 第 152 回日本獣医学界 (大阪), 2011.9.17

前田秋彦、Chang-Wen, Ke, Jiang Shu, 倉根一郎. 中国・広東省の 1978-2010 年におけるデングウイルス感染症の流行調査. 第 18 回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (東京), 2011.11.11

8. その他特記事項

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」

2) 知財権等

特になし。

3) 学外活動

Journal の reviewer 等。

4) 受賞歴

特になし。

5) その他

5-1) 担当講義

生命倫理

動物医科学概論

生物学通論 B

5-2) その他の活動

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

京都産業大学・市民講座など

5-3) その他、特記事項

本年度は、研究面において様々なプロジェクトをスタートした。京都市環境衛生研究所、立命館大学、国立感染症研究

所および中国・広東省 CDC の各共同研究員の方々と様々な個別の課題について現在検討している。また、本年度より本研究室に所属し、研究生活をスタートさせた大学院生や、本研究室で実験を行う他の研究室の学生も増え、漸く大学の研究室らしくなってきた(図 3)。



図 3. 段々賑やかになってきた研究室の風景

実験医科遺伝学研究室

Lab. Genetics in Experimental Medicine

教授 松本 耕三

Prof. Kozo Matsumoto, DVM, Ph.D

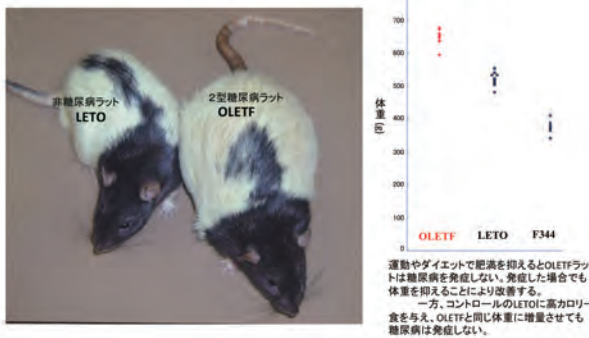


1. 研究概要

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とし、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い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ていることが多い。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

肥満と2型糖尿病、その発症機構は？



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、まずその点からの解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F34へ導入した系統(このような系統をコンジュニック系統と呼ぶ)を作成する必要がある。同時にF34ラットも肥満ベースのF34ラットとするため、肥満遺伝子を導入したコンジュ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、糖尿病コンジュニック系統と肥満コンジュニック系統とを交配したダブルコンジュ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

ダブルコンジュニック系統の開発

今年度はNidd2, Nidd4, Nidd6の各糖尿病原因遺伝子座導入コンジュニック系統と肥満コンジュニック系統とのF1を作成に引き続き、F1同志を交配してF2を作成中である。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ュ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。

実際、まだ数は少ないがそれらダブルコンジュニック系統の血糖値の検査を行った。しかし、今のところ、予定していたような値を示していない。原因は不明であるが、いずれにしろ、数が必要なことから、引き続きダブルコンジュニック系統の作成を継続している。

同時に、求める遺伝子の確定のために、Real Time PCRを予定しているが、コンジュニック系統の導入遺伝子座領域に含まれる遺伝子をデータベースで抽出し、それら遺伝子、約400近くについてのプライマー設計について検討し、その一部を作成し、正常に作動するかを検討している。

腎炎モデル動物の開発

糖尿病性腎炎は云うまでもなく、腎不全は増大している。そのモデル動物の作成を他大学、他研究期間との共同研究で行っている。今年度は腎炎遺伝子座二つを導入した系統の準備段階として、一つをホモ、片方をヘテロとした系統作成を行った。解析はスムーズに進み、予定した系統が得られた。

照射食品の安全性の検討:

この研究は他大学との共同研究である。食品の腐敗等を防ぐ意味で、放射線照射は大変有効である。しかし、照射により通常存在しない物質が発生し、それが人体に害をなすようでは困る。そのような物質の検討を行っている。

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(2011 年度分)

1. Genetic interaction between hyperglycemic QTLs is manifested by high calorie diet in the OLETF derived congenic rat. Fukumura T., Kose H., Takeda C., Kurita Y., Ochiai K., Yamada T., and Matsumoto K. Exp. Animals, 60, 125-132, 2011
2. Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dotradecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphoma U937 cells. Da-Yong Yu D-Y., Zhao Q-L., Furuta M., Todoriki S., Izumi K., Yamakage K., Matsumoto K., Nomura T., and Kondo T. Apoptosis In press.

5. 著書および総説(2011 年度分)

無し

6. 招待講演、シンポジウム等(2011 年度分)

1. LECラット研究の初期の頃 松本耕三 LECラット研究会、2011.7.8 札幌

7. 学会発表(2011年度分)

1. Safety analysis of 2-alkylcyclobutanones derived from irradiated foods as an unique radiolytic product. Furuta, M., Izumi, K., Yamakage, K., Todoriki, S., Kondo, T., & Matusumoto, K. IMPR conference June 13-16 Montreal

8. その他特記事項

無し

栄養衛生学研究室

Laboratory of Nutrition-related Hygiene

教授 村田 英雄

Prof. Hideo Murata, D.V.M., Ph.D



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進展させ、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と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。昨年度、その反応生成物メラミンシアヌレートには針状と球・顆粒状(以下球状)の2種類が存在することを見出した。(図1)。実際の発症例では腎臓のネフロン部位に球状結晶の存在しか報告されていないため、本年度は、球状に至る結晶形成にどのような要因が関わるかについて、さらに検討を進めた。

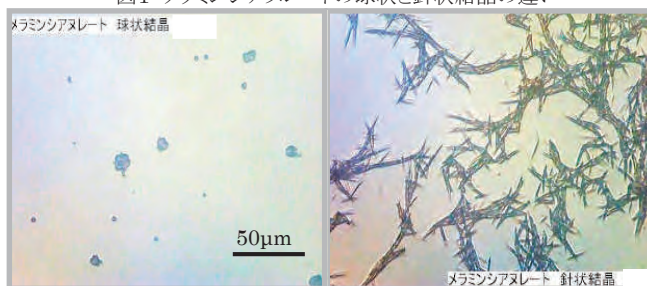
具体的には、メラミン及びシアヌル酸水溶液を混和してメラミンシアヌレートを生成させた際に、①pH 水準が生成物の形状に影響するか否か、②幾つかの血漿タンパク質(すなわち、代表的な血漿タンパク成分であるアルブミン(ウシ由来)とガンマグロブリン(ウシ由来)、及び腎機能の診断マーカーであるβ2ミクログロブリン(ヒト由来))が反応物の生成時に存在した場合に、それらが生成物の形状に影響するか否か、を *in vitro* 下で検討した。

その結果、①pH4~8間の生成環境は針状結晶構造の変化には影響を与えないこと、②-(1)いずれのタンパク質の存在下でも球状結晶が生成し得ること、を確認した。この場合、

球状の結晶を生成させる濃度には、タンパク質間で差がみられ、ガンマグロブリンが最も効率よく球状の結晶を形成させた。さらに、②-(2)これらのタンパク質を限外濾過(分子量10KDa)したメラミンあるいはシアヌル酸の濾過液を混合してメラミンシアヌレート結晶を形成させた場合、その形状は球状ではなく、針状になった。

これらの成績から、球状の結晶形成には①pH水準が関与する可能性は低い、②タンパク質の存在が必要である、と示唆される結論を得た。どの種類のたんぱく質が、腎臓のどの部位で、どのように球状結晶形成に関与して、最終的に結石を誘発するののかについては、今後の検討課題である。

図1 メラミンシアヌレートの球状と針状結晶の違い



2) 簡易・迅速なメラミンスクリーニング法の確立

本年度は実施しなかった。次年度以降に開発と応用を加速する。

3. Research projects and annual reports

As well as humans, all human-associated animals, including livestock, companion and experimental animals, have the 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

Of the needle- and granular-type melamine cyanurate crystal forms reported here last year, we confirmed *in vitro* that the latter granular one, which is supposed to be accumulated as a urolite in the nephron in natural and

experimental cases, was produced by mixing melamine and cyanuric acid solutions under the presence of several selected serum proteins, such as serum albumin, gamma-globulin and beta2-microglobulin (a clinical indicator of renal function). Among these proteins tested, gamma-globulin was revealed to be the most effective intervener. When these proteins were sifted with a 10K-dalton ultrafiltration from both of the melamine and cyanuric acid solutions, the mixture of these protein-free (melamine and cyanuric acid) filtrates produced the needle-type form, not the granular one. These results indicate that the presence of the proteins seems prerequisite for the formation of the granular-type crystals. On the other hand, a range of pH4 to 8 in the mixture did not seem to have affected the crystal morphology, leaving the needle-type crystals unchanged. The detailed mechanism of the non-specific intervention of serum proteins on the granular-type crystal formation is yet to be clarified but the present findings seem an important clue to understand the in vivo pathogenesis of the melamine-induced urolithiasis in the nephron.

2: Development of a melamine screening method

No substantial experiments on this theme have been carried out this year.

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.*, **73**:1059-1060 (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.*, **73**:665-671 (2011)

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.*, **187**:16-17(2011)

村田英雄 (分担訳) イラストでみる獣医免疫学 (第7版) I. R. Tizard 著、古澤・保田・多田監訳 (インターズー社、2011) ISBN978-4-89995-456-9

6. 招待講演、シンポジウム等

村田英雄：日本における動物倫理の歴史と現状。京都産業大学人権委員会主催/平成23年度前期人権啓発講演会、2011.07.06.

村田英雄：飼料汚染カビ毒デオキシニバレノール(DON)：その除去の試みと問題点。京都府獣医師会/産業動物部会研修会、2011.07.24.

7. 学会発表

本年度はなし

8. その他特記事項

1. 知財権等

国内特許：1件 (特許第4753183号、2011.06.03登録)

出願人：(独)農業・食品産業技術総合研究機構

発明者：村田英雄、宮崎茂、嶋田伸明

名称：紫外線照射による飼料汚染マイコトキシンの除去法及びそのための装置

2. 学外活動

農業資材審議会専門委員

The Veterinary Journal 誌の Editorial Advisory 委員

研究室メンバー (S. Taksinoros, DVM と村田)

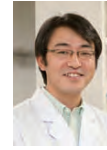


感染症学研究室

Laboratory of Infectious Disease

准教授 高桑 弘樹

Assoc. Prof. Hiroki Takakuwa, DVM, 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, et al. Molecular epidemiology of avian

influenza viruses circulating among healthy poultry flocks in farms in northern vietnam. *Prev. Vet. Med.* in press

K. Hotta, H. Takakuwa, Q. M. T. Le, S. L. Phuong, T. Murase, E. Ono, T. Ito, K. Otsuki, and T. Yamashiro. Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian influenza viruses from ducks in hanoi, vietnam. *Virus Res.* in press

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, E. Ono, T. Usui, R. Tsunekuni, H. Ito, H. Ozaki, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, and K. Otsuki: Molecular epidemiology of avian influenza viruses collected from wild birds in northern Vietnam during year 2006-2009. 5th Japan-China Bilateral Symposium on Influenza, Tokyo (Japan), 2011.1.24-25

H. Takakuwa, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, E. Ono, T. Usui, R. Tsunekuni, H. Ito, H. Ozaki, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, and K. Otsuki: Molecular epidemiology of avian influenza viruses in wild birds in northern Vietnam during year 2006-2009. 5th Annual Meeting EPIZONE, Arnhem (Netherlands), 2011.4.12-13

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

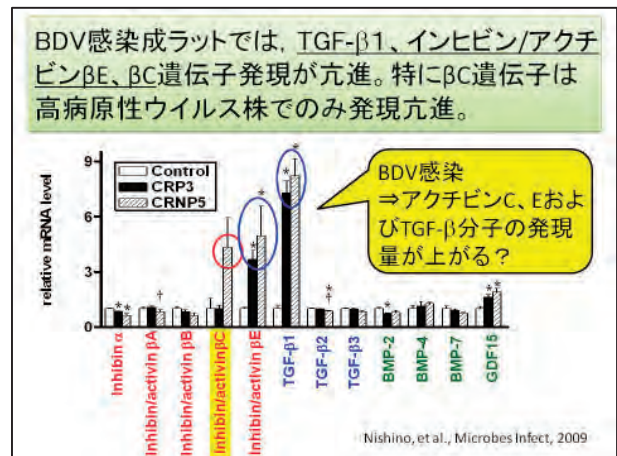
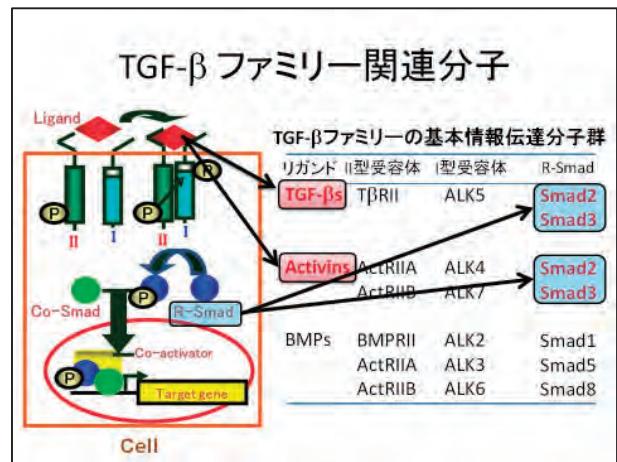
Smad3 の発現はマウスにおけるボルナ病の神経症状悪化に関与している。

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino, DVM, Ph.D



BDV は温血動物に広範囲に感染し、致死的な進行性非化膿性髄膜脳炎をおこす。しかし、感染によりなぜ神経症状が現れるのかは明らかではない。一方、脳における TGF-β ファミリーの発現はアルツハイマー病等の神経疾患の発症に関与することが報告されている。私達はこれまでに、BDV 感染ラット脳内で特定の TGF-β ファミリー関連遺伝子の発現量が増加することを報告してきた。本年度は、TGF-β あるいはアクチビンがボルナ病の発症に関与しているかを探るために、これら分子の下流シグナル分子である Smad3 の発現量がひくりマウスを用い、ボルナ病の程度について解析を行った。



マウスは、Smad3 遺伝子が正常な野生型 (WT) と、遺伝子対のうち片方が不活性型であるヘテロ (HT) (いずれも 8 週齢、C57BL/6) を用いた。マウスの脳内に、 2×10^3 FFU の BDV マウス順化株 (CRNP5 株) を接種した。感染後 8 週間の病態観察を行った。4 週間後および 8 週間後に安楽殺し、脳および血液を採材した。脳はウイルス力価測定に、血液は抗 BDV 抗体価測定に用いた。

その結果、BDV 感染によりボルナ病(スコア 2 レベルまで)を発症した頭数は、4 週間後で Smad3-WT マウスは 11/11 頭、Smad3-HT マウスは 4/9 頭、8 週間後で WT マウスは 6/6 頭、HT マウスは 5/5 頭だった。このうち、明らかな神経症状を示した個体は、WT マウスは 6/6 頭、HT マウスは 3/5 頭だった。

感染 4 週間後のマウスの脳内ウイルス量は、WT マウスに比べ HT マウスでは低かったが、8 週間後には同等量となった。一方、HT マウスの抗 BDV 抗体価は、WT マウスに比べ早期に上昇した。

以上の結果から、活性型 Smad3 の発現量が WT マウスに比べ低いことが予測される HT マウスでは、WT マウスに比べボルナ病の発症は遅く、程度も軽減する傾向を示した。その原因として HT マウスにおける脳内ウイルス増殖の遅延が関与している可能性が示唆された。また、液性免疫応答の早期誘導が病態にどのように関与しているかは今後の課題である。

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

なし。

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 p163)」近代出版、(2011.5.10)

西野佳以:感染モデル動物・伴侶動物におけるボルナ病の病態. 臨床獣医 29 (2): 12-15. 2011.

6.招待講演、シンポジウム等

西野佳以:BDV 研究における過去と未来. 第2回日本ボルナウイルス研究会公開シンポジウム、大阪市、2011.9.21

西野佳以:ウイルス感染と口蹄疫. (社)京都府獣医師会京都支部平成23年度研修会、京都市、2011.12.17

7. 学会発表

Y. Nishino, H. Madarame, K. Fujino, S. Kojima, Y. Fukuhara, S. Kameoka, M. Inoue: Neurovirulence of Borna disease virus in infected nude rats, International Union of Microbiological Societies Congress (IUMS) 2011, Sapporo, 2011.9.13

内田裕子、山本健晴、斑目広郎、大石 亮、村上 賢、舟場正幸、染谷梓、前田秋彦、西野佳以: 不活性型 Smad3 発現マウスにおけるボルナ病ウイルス感染病態の解析. 第152回日本獣医学会、大阪、2011.9.20

前田秋彦、前田潤子、染谷梓、西野佳以、村田英雄、Velado

Fernandez Igor, 倉根一郎:ウエストナイルウイルスのウイルス様粒子作製法の改良. 第152回日本獣医学会、大阪、2011.9.19

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

日本ボルナウイルス研究会 副会長

第2回日本ボルナウイルス研究会公開シンポジウム 主催(大阪市、2011.9.21)

8-4 受賞等

なし

8-5 その他

京都産業大学・京都市学術交流事業における共同研究、ならびに衛生環境研究所食肉検査部門との合同会議(計4回)

大学教育充実のための戦略的学連携支援プログラム「獣医・動物医科系教育コンソーシアムによる社会の安全・安心に貢献する人材の育成」事業における、模擬遠隔特別講義「動物と法概論(京都産業大学、川本哲郎教授)」評価担当(2011.3.7)

生化学遠隔模擬講義(鳥取大学、浅野淳准教授による「エネルギー代謝の統合制御」、2011.6.1)のコーディネーター

オープンキャンパスにおける模擬実験(2011.8.20)

福知山高等学校における模擬授業「生命の基本単位と微生物」(福知山市、2011.11.10)

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

本学への移籍2年目でしたが、学内外で新たな共同研究を立ち上げる事が出来、ほぼ研究基盤整備が整いました。

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

助教 今野 兼次郎

Assistant Professor Kenjiro Konno,
D. V. M., Ph. D., DJCLAM



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あ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、徐々に動き出しました。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

- J. Iijima, K. Konno, N. Itano : Inflammatory Alterations of the Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. 3(3):3189-3205 (2011)
- 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 (2011)

平成 23 年 9 月 22 日(木)～23 日(金)に国立循環器病研究センター研究所において、開催された研修会(実験動物医学専門医を目指す者が参加。「実験大動物の獣医学的管理」)において、講師として参加し、講義や実技を担当した。

5. 著書および総説

なし

6. 招待講演、シンポジウム等

Kenjiro Konno: New Stent Development using Göttingen Miniature Pig in Japan. Workshop with Göttingen Minipigs, Denmark, 2011.9.1-2

7. 学会発表

齋藤敏之、藤原清悦、笹森壮一郎、今野兼次郎、久倉勝治、小林英司、大河内信弘、明間立雄、山口峻司: 無線記録によるブタ海馬の神経活動データの信頼性 高周波数域における検証、日本獣医学会学術集会、府中市、2011.3.30～4.1

8. その他特記事項

日本救急医学会主催 第 1 回日本 ATOM 大阪市大コース
平成 23 年 4 月 23 日(土)および 24 日(日)に大阪府立大学りんくうキャンパスにおいて開催された本コースの開催準備から、コースで用いたブタの周術期管理、特に麻酔管理を担当。
なお、本コースの認定を 2008 年に受けている。

平成 23 年度実験動物関係高度技術研修(第 1 回生殖工学技術)
平成 23 年 6 月 7 日から 10 日に熊本大学生命資源研究・支援センターで開催された本研修に参加し、無事研修を終えると共に、参加者との情報交換を図った。

大阪府立生野高等学校スーパーサイエンスハイスクール(SSH)プロジェクト
平成 23 年 8 月 3 日(水)～5 日(金)に大阪大学医学部で開催された本プロジェクトに講師として参加。参加した高校 1 年生に対して、講義や実習を通じて命の大切さを伝えた。

デンマーク エレガード社ミニブタ研修会

平成 23 年 9 月 1 日(木)～2 日(金)に、デンマークに本社のあるエレガード社(世界一の実験動物としてのミニブタを生産・供給)主催のミニブタ研修会に招聘され、日本におけるミニブタを用いた研究に関して紹介。

平成 23 年度日本実験動物医学会ウェットハンド研修会

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)。一方、*R. japonica* はダニを介して人に感染し、日本紅斑熱を引き起こす。また、*Bartonella henselae* は猫ひっかき病などの人獣共通感染症の原因菌で、ネコノミからも検出されている。そこで、これらの吸血昆虫が保有する病原体の分布状況を調査するため、京都市近郊で飼育されている各種動物の血液およびノミ・ダニを代表とする外部寄生虫を採集した。収集した検体からDNAを抽出し、*gltA* 遺伝子または16S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーを用いて、*Rickettsia* 属菌および *Bartonella* 属菌の保有状況を調査した。

3. Research projects and annual reports

The microorganism exists in all places, and might threaten health of humans and animals. Zoonotic and food poisoning microorganism which can infect both animals and humans cause concern in the contemporary society where relationships between humans and animals are various. These pathogens do not always cause same symptoms in animals and humans. These differences will be a key to reveal the mechanism of infection.

Rickettsia felis is an emerging pathogen which causes flea-borne spotted fever in human. Besides, *R. japonica*, the etiological agent of Japanese spotted fever is also associated with arthropod vector, mainly ticks and *Bartonella henselae*, which cause cat scratch disease, have been detected in fleas. Therefore, the prevalence of these pathogens present in ectoparasites such as flea and tick were examined using

助教 染谷 梓

Assist. Prof. Azusa Someya, D.V.M., Ph.D



molecular techniques. Blood samples, fleas and ticks collected around Kyoto city were investigated for the presence of the rickettsial *gltA*, *ompB*, and 16S rRNA genes using PCR method. Detection of bartonella DNA was also performed.

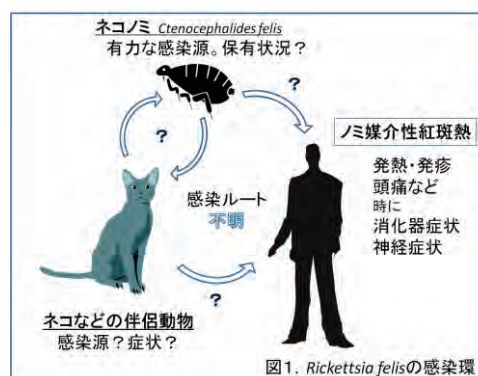


図1. *Rickettsia felis*の感染環

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.* 150:132-139 (2011)

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

前田秋彦、前田潤子、染谷梓、西野佳以、村田英雄、V. F. Igor、倉根一郎:ウエストナイルウイルスのウイルス様粒子作成法の改良。第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011.9.19

染谷梓、E. Petit, N. Haddad, E. Bouhsira, M. Franc, F. Popelin, P. Arne, H.-J. Boulouis : Hedgehog flea (*Archaeopsylla erinacei*) is the main reservoir of *Rickettsia felis* in Europe. 第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011.9.20

内田裕子、山本健晴、斑目広郎、大石亮、村上賢、舟場正幸、染谷梓、前田秋彦、西野佳以:不活性型 Smad3 発現マウスにおけるボルナ病ウイルス感染病態の解析。第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011.9.20

8. その他特記事項

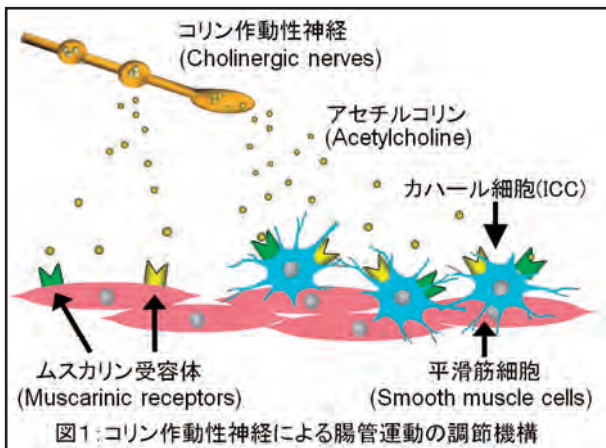
京都市衛生環境研究所との共同研究
大阪府立大学客員研究員

薬理学研究室

Laboratory of Pharmacology

1. 研究概要

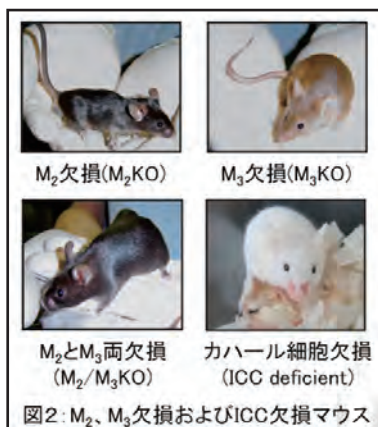
腸管の運動はコリン作動性神経から放出されるアセチルコリンとその受容体であるムスカリン受容体によって興奮性に調節されている。ムスカリン受容体には、これまでにM₁からM₅までの5つのサブタイプが同定されており、このうち、腸管平滑筋細胞にはM₂とM₃サブタイプが存在している。コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンがこれらのムスカリン受容体を刺激すると、平滑筋細胞内のCa²⁺濃度が増加し、最終的に筋は収縮する。また、近年、腸管の神経叢に存在するカハール細胞(ICC)と呼ばれる間質細胞にもムスカリン受容体が存在しており、腸管の運動調節に重要な役割を果たして



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

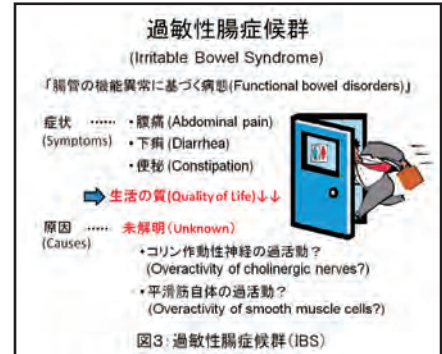


助教 棚橋 靖行

Assist. Prof. Yasuyuki Tanahashi, D.V.M., Ph.D



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

本年度は、腸管平滑筋の収縮調節において重要な、ムスカリン受容体によるATP感受性カリウムチャンネル調節機構に焦点を当てて研究を行った。実験にはマウス小腸から酵素処理により単離した縦走平滑筋細胞標本を用い、ムスカリン受容体の非選択的作動薬であるカルバコール(CCh)によるATP感受性カリウムチャンネル電流(K_{ATP}電流)に対する効果を検討した。その結果、平滑筋細胞標本に同カリウムチャンネルの選択的開口薬を適用すると、K_{ATP}電流が生じた。さらに同電流を誘発させながらCChを追適用すると、K_{ATP}電流の振幅が徐々に減少し、プラトーに達するような持続性の抑制効果が発現した。このCChによるK_{ATP}電流の抑制効果は、ムスカリン受容体の拮抗薬であるアトロピンの存在下では発現しなかった。これらの結果から、マウス小腸縦走平滑筋細胞において、ムスカリン受容体はATP感受性カリウムチャンネルを抑制的に調節していることが明らかとなった。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ンネル活性化機構および過活動膀胱の病態解析に関する研究については、第84回日本薬理学会年会、第152回日本獣医学会にて、それぞれ公表した。京都産業大学免疫病理学教室との共同研究であるスギ花粉暴露による肺胞免疫に対する喫煙の効果に関する研究については、第40回日本免疫学会学術集会において公表した。

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 deep muscular 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 2011, we focused on mechanism of muscarinic regulations of ATP sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels in the longitudinal smooth muscle cells of small intestine. We investigated effects of carbachol (CCh), nonselective muscarinic agonist, on the current through the K_{ATP} channels (I_{KATP}) in the longitudinal smooth muscle cells from small intestine of mice using the whole-cell patch clamp technique. Extracellular application of a selective opener of the K_{ATP} channels induced I_{KATP}. Additional application of CCh induced a sustained reduction in I_{KATP} amplitude, which developed progressively and reached a plateau. The CCh-induced I_{KATP} suppression was abolished by atropine, nonselective muscarinic antagonist. These results suggest that stimulations of muscarinic receptors inhibit the activity of the K_{ATP} channels in longitudinal smooth muscle cells from small intestine of mice. In addition, we collaborated in studies about mechanism of muscarinic activation of cationic channels and pathophysiology of overactive bladder with Laboratory of Veterinary Pharmacology in Gifu University and effects of cigarette smoke on induced immune cells in lung by Inhalation of Cryptomeria Japonica Pollen with Laboratory of Immunopathology in Kyoto Sangyo University. These works were presented in the 84th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, the 152th Meeting of the Japanese

Society of Veterinary Science, and the 40th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, respectively.

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

Toshihiro Unno, Michiko Inasaki, Hayato Matsuyama, Yasuyuki Tanahashi, Takio Kitazawa, Masahisa Yamada, Jurgen Wess and Seiichi Komori : Role of M₃ muscarinic receptor-coupled signalling molecule in the activation of muscarinic cation channels in mouse ileal smooth muscle cells., 第 84 回日本薬理学会年会、横浜市、2011.3.22-24 (誌上開催)

海野年弘、小出健人、安藤久美子、杉山京子、松井隆輔、松山勇人、酒井洋樹、棚橋靖行、小森成一 : 過活動膀胱モデルマウスの膀胱における神経刺激収縮反応の変化、第 152 回日本獣医学会学術集会、堺市、2011.9.19-21

Masahito Nose, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Yuriko Hirono, Yasuyuki Tanahashi, Masaaki Sakura, Minoru Takeuchi : Effect of Cigarette Smoke on Induced Immune Cells in Lung by Inhalation of Cryptomeria Japonica Pollen., 第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉市、2011.11.27-29

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 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:

- i. 担当講義: 動物医科学概論、化学通論 A、化学通論 B、基礎化学 I、基礎化学 II、薬理学・毒性学、実験動物学・毒性学実習
- ii. 京都産業大学オープンキャンパス動物生命科学科模擬実験: 腸の運動メカニズムを探る

年報第2号発刊にあたって～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

平成22年4月に開設しました総合生命科学部が開設2年目を無事迎えることができましたこと、関係各位に厚く御礼申し上げます。

本学で9番目となる総合生命科学部は、「生命システム学科」「生命資源環境学科」「動物生命医科学科」からなり、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。

さて、平成23年に発生した東日本大震災、紀伊半島集中豪雨によるこれまでにない未曾有の自然災害は、人々の日常生活に甚大な被害、影響を与えることとなり、また、自然を前に人間の力が如何に無力であったか、改めて認識させられることになったのではないのでしょうか。

産業革命以降の目覚ましい各種技術の発展は、それまでの生活環境に大きな影響を与え、一見豊かな生活を送れるようになったかと思えたものの、経済成長に陰りが見えはじめた21世紀、本当の豊かさとは何か、改めて問い直す機会が訪れていると言っても過言ではありません。

自然の脅威の前に無力である人類が、今改めてとるべき行動の選択肢は多岐に渡り、その選択を誤った場合、取り返しがつかない事態を招く恐れもあることを、今改めて再確認し慎重な対応が求められています。

このような非連続的でかつ、よりの確に、より早く対応することを求められる社会において、本学部が果たすべき使命は何か。それを再確認しつつ、学部運営の支援にあたるのが、我々事務スタッフに求められる使命であると、実感する一年であったと思います。

動物や植物等と共存する人類が知り得た英知はまだ極一部であり、それを伝授、継承することが教育であり、またそれを多く知っていることが成果であると捉えがちではないのでしょうか。未だに解明されていない生命のシステムの発見、動物や植物と共存し地球環境の悪化防止策の構築、人類の脅威に対抗する技術の創出、“無”を解明し“有”を創り出すダイナミックな知識活動こそが、本学部の存在意義であり、それに興味を持ち、社会で活躍する人材を育成することが使命であり、それを支援するのが我々スタッフの使命であると肝に命じなければ、との決意のもとに京都産業大学総合生命科学部年報第2号発刊のご挨拶とさせていただきます。

平成23年 総合生命科学部事務室の主な取り組み

タイ王国・マヒドン大学獣医学部と学術交流協定を締結

平成23年3月に、タイ王国・マヒドン大学獣医学部と学術交流協定を締結。同大学との共同研究を進めるとともに、留学生の受け入れを促進。平成23年9月に、工学研究科博士後期課程の大学院生として1名を受け入れる。

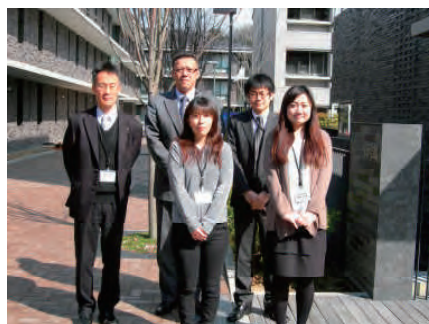
平成23年度国際生物学賞記念シンポジウム及び受賞者記念講演会の開催

第27回国際生物学賞受賞者であるエリック・ハリス・デヴィッドソン博士（米国カリフォルニア工科大学）を招き、記念講演会及び同博士の研究分野である発生生物学の研究者20名を国内外から招聘し、シンポジウムを開催した。

総合生命科学部事務室スタッフ

後列（右から） 仲村 井上 鈴木

前列（右から） 加藤 平元



2011年 総合生命科学部主催シンポジウム等一覧

1	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)
	演題	重金属集積植物の機構解明と応用
	世話人	河邊 昭 准教授
	日時等	【2011年 1月7日 16:45~17:45 バイオフォーラム】
2	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)
	演題	サイトカインによるin vivo免疫応答制御
	世話人	竹内 実 教授
	日時等	【2011年 1月12日 16:00~17:30 バイオフォーラム】
3	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)
	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
	世話人	中村 暢宏 教授
	日時等	【2011年 1月14日 16:45~17:45 バイオフォーラム】
4	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 徹 教授、木村 成介 准教授
	日時等	【2011年 2月21日 16:00~16:45 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
5	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 徹 教授、河邊 昭 准教授
	日時等	【2011年 2月21日 16:45~17:30 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
6	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 徹 教授、河邊 昭 准教授
	日時等	【2011年 2月23日 16:00~17:00 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】

7	講師①	伊藤 維昭 教授(総合生命科学部生命システム学科)
	演題	タンパク質誕生の初期における出来事
	講師②	吉田 賢右 教授(総合生命科学部生命システム学科)
	演題	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
	講師③	三原 勝芳 博士(九州大学医学研究院名誉教授)
	演題	ミトコンドリア融合・分裂の分子機構と生理的意義
	講師④	藤木 幸夫 教授(九州大学大学院理学研究院生物科学部門)
	演題	ペルオキシソームの形成制御・高次生命機能とその障害
	講師⑤	田中 啓二 博士(東京都臨床医学総合研究所・所長代行)
	演題	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
	講師⑥	大隅 良典 博士(東京工業大学特任教授)
	演題	酵母から見てきたオートファジーの世界
	世話人	永田 和宏 教授
	日時等	【2011年3月10日 13:00~17:00 第1回 総合生命科学部シンポジウム】
8	講師	小山 知嗣 特命助教(京都大学大学院生命科学研究科)
	演題	平らな葉を縮れ葉にしてわかったこと
	世話人	木村 成介 准教授
	日時等	【2011年5月13日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
9	講師	藤井 壮太 博士(京都大学大学院理学研究科JSPS特別研究員)
	演題	高等植物の生殖にかかわるpentatricopeptide repeat遺伝子の進化
	世話人	河邊 昭 准教授
	日時等	【2011年6月10日 16:00~17:00 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
10	講師	今村 亨 主幹研究員((独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門)
	演題	FGFの機能・受容機構と医療応用に関する最近の展開
	世話人	瀬尾 美鈴 教授
	日時等	【2011年6月17日 16:00~17:00 バイオフォーラム】
11	講師	Allen Buskirk 博士 (Department of Chemistry and Biochemistry Brigham Young University, U.S.A.)
	演題	Identification of peptide sequences that inhibit their own translation
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2011年6月21日 15:30~16:30 生命科学セミナー】
12	講師	寺地 徹 教授(総合生命科学部生命資源環境学科)
	演題	葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物作出への試み
	世話人	河邊 昭 准教授
	日時等	【2011年6月24日 16:00~17:00 バイオフォーラム】

13	講師	Jonathan Gibbins 博士 (School of Biological Sciences, University of Reading, UK)
	演題	Collagen and the regulation of platelet function: a precarious balance between bleeding and thrombosis.
	世話人	永田 和宏 教授
	日時等	【2011年7月29日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
14	講師	井上 健太郎 博士 (Associate Professor, Department of Plant Science, University of California, Davis)
	演題	Evolution of questions about protein import channel
	世話人	木村 成介 准教授
	日時等	【2011年8月22日 16:00~17:00 バイオフォーラム】
15	講師①	Catherine Rabouille 博士 (Senior Group Leader Hubrecht Institute for Developmental biology and stem cell research)
	演題	Modulation of secretion by signaling.
	講師②	David K. Banfield 博士 (Professor The Hong Kong University of Science and Technology (HKUST))
	演題	Mechanisms of Protein retention in the Golgi
	世話人	中村 暢宏 教授
	日時等	【2011年9月22日 16:00~18:30 バイオフォーラム】
16	講師	松田 美穂 博士 (Laboratory of Molecular Genetics, NICHD, NIH, USA)
	演題	Epb4115, a Mind Bomb 1 Interacting Protein, Promotes Neuronal Differentiation by Facilitating Disassembly of Apical Junctional Complexes.
	世話人	永田 和宏 教授
	日時等	【2011年10月3日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
17	講師	Kent E Pinkerton 教授 (カリフォルニア大学デービス校(UCD)獣医学部教授・健康環境センター長)
	演題	Health Effects of Inhaled Nanoparticles on Human Health: How Tiny Particles Might Affect the Nose, Brain, Heart and Lungs
	世話人	竹内 実 教授
	日時等	【2011年10月5日 13:15~14:15 バイオフォーラム】
18	講師	黒木 登志夫 博士 (日本学術振興会学術システム研究センター副所長)
	演題	理系にとって必要な文章力とプレゼンテーション力
	世話人	永田 和宏 教授
	日時等	【2011年10月6日 16:00~17:00 総合生命科学部・理学部・コンピュータ理工学部 合同セミナー】
19	講師	中潟 直己 教授 (熊本大学 生命資源研究・支援センター)
	演題	マウスにおける生殖工学技術とその応用
	世話人	松本 耕三 教授
	日時等	【2011年10月7日 16:00~17:00 バイオフォーラム】

20	講師	久保 友彦 准教授(北海道大学・農学研究院)
	演題	テンサイ細胞質雄性不稔性の特殊性と普遍性
	世話人	寺地 徹 教授
	日時等	【2011年11月7日 16:00～17:00 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
21	講師	濱田 隆宏 博士(京都大学大学院理学研究科生物科学専攻)
	演題	シロイヌナズナにおける微小管の役割 ～プロテオーム解析とイメージング解析から見えてきた世界～
	世話人	木村 成介 准教授
	日時等	【2011年11月9日 16:00～17:00 生命科学セミナー】
22	講師①	佐藤 雅彦 准教授(京都府立大学大学院生命環境科学研究科)
	演題	環境ストレスに対するマスターレギュレーターとしてのVOZ転写因子の機能
	講師②	武田 征士 助教(京都府立大学大学院生命環境科学研究科)
	演題	植物器官の位置決めと成長に関わる分子メカニズム
	講師③	小山 知嗣 特命助教(京都大学大学院生命科学研究科)
	演題	葉の形態の複雑さを決めるTCP転写因子の制御ネットワーク
	講師④	木村 成介 准教授(総合生命科学部生命資源環境学科)
	演題	生育環境に応じて葉の形を変化させるニューベキアを用いた植物の表現型可塑性の研究
	講師⑤	小泉 望 教授(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)
	演題	細胞質スプライシングにより制御されるシロイヌナズナの転写因子bZIP60
	世話人	寺地 徹 教授、木村 成介 准教授
	日時等	【2011年12月8日 14:30～18:00 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (第21回植物バイテクシンポジウム:京都植物バイテク談話会と共催)】
23	講師	Alexander Mankin 博士 (Center for Pharmaceutical Biotechnology University of Illinois, U.S.A.)
	演題	Encounters of the nascent peptide and macrolide antibiotics in the exit tunnel of the ribosome
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2011年12月12日 16:30～17:30 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
24	講師	井柳 堯 名誉教授(兵庫県立大学)
	演題	一酸化窒素合成酵素の機能と構造解析
	世話人	津下 英明 教授
	日時等	【2011年12月14日 16:00～17:00 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
25	講師	Eric S. Haag 准教授(メリーランド大学 生物学部)
	演題	Genetic and molecular approaches to the evolution of self-fertility in <i>Caenorhabditis</i>
	世話人	黒坂 光 教授、佐藤 賢一 教授、浜 千尋 教授
	日時等	【2011年12月19日 13:30～14:30 バイオフォーラム】

26	講師	Daniel Wilson 博士 (Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany)
	演題	Man against Microbe: Antibiotic inhibition of ribosome function
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2011年12月19日 15:00～16:00 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
27	講師	Roland Beckmann 博士 (Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany)
	演題	Cryo-EM analysis of co-translational events
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2011年12月19日 16:30～17:30 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業セミナー】
28	講師①	岩田 想 教授(京都大学大学院 医学研究科 分子細胞情報学)
	演題	創薬ターゲット膜タンパク質の構造解析
	講師②	植田 和光 教授(京都大学大学院 農学研究科応用生命科学専攻 細胞生化学研究室)
	演題	コレステロール排出ポンプ ABCA1 –作用と制御のメカニズム
	世話人	横山 謙 教授
	日時等	【2011年12月21日 14:30～16:45 バイオフォーラム】
29	講師	木下 哲 特任准教授(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)
	演題	父・母ゲノムのせめぎ合い ～被子植物のタネの大きさと生殖隔離のエピジェネティック制御～
	世話人	河邊 昭 准教授
	日時等	【2011年12月23日 13:30～14:30 バイオフォーラム】

第1回 総合生命科学部シンポジウム講師
 上段(左から)伊藤 吉田 三原
 下段(左から)藤木 大隅 田中



たんぱく質「不良品」 処理の仕組み解明

京産大など

京都産業大学の永田和宏教授、九州大学の稲葉謙次特任准教授らは細胞内で正しい立体構造にならなかつた「不良品」たんぱく質を処理する仕組みを明らかにした。特定の酵素が仲介役を果たしていることがわかった。たんぱく質の品質管理がうまくいかないことが原因とされる、アルツハイマー病やパーキンソン病のメカニズム解明に役立つ成果という。米科学誌「モレキュラー・セル」(電子版)に19日掲載される。

不良品の処理は、細胞内でたんぱく質を作る工場となる小胞体の中で進む。細胞には不良品たんぱく質を見つけると小さく切断し、小胞体の外に運び出して分解する仕組みがある。関連する物質は分かっていたが、詳細な仕組みは不明だった。研究チームは大型放射光施設「Spring-8」などを使い、不良品たんぱく質を切る役割を担う酵素「ERdj5」を分析。不良品を選別する分子や、小胞体の外に運ぶ分子と結合しやすい立体構造であることを見つけた。酵素はこの構造を生かして不良品の切断だけでなく、選別から細胞外への運搬まで一連の行程を進めていることがわかった。

2011. 2. 19 京都新聞

25 社会3 第3種郵便物認可

不良品のタンパク質

アルツハイマー発症仕組み解くヒント

排除酵素の働き解明

京産大教授ら

細胞内でタンパク質の合成などを行っていた小胞体で、不良品のタンパク質を排除する酵素の構造と働きを、京都産業大総合生命科学部の永田和宏教授、九州大の稲葉謙次准教授たちのグループが解明した。アルツハイマー病の発症メカニズムなどの解明にも役立つ成果という。米科学誌「モレキュラー・セル」で19日発表する。

タンパク質が機能するためには、きちんと折り畳まれて立体構造になる必要がある。誤った構造の「不良品」が小胞体にたまるとう、アルツハイマー病などさまざまな病気の原因になると考えられている。

永田教授たちは、小胞体で「不良品」になったタンパク質を解きほぐしている酵素ERdj5を発見していた。今回、酵素の構造と働きを詳細に調べた。

ERdj5は、働きが異なる二つの領域に分かれていた。一方の領域は「不良品」を引き連れてくるタンパク質EDEmと結合して「不良品」を解きほぐし、もう一方は、解きほぐされた「不良品」を別の運び屋のタンパク質BiPに引き渡し、小胞体の外への排出を促進していた。

永田教授は「小胞体でタンパク質の折り畳みに関わる分子なども含め、生命活動に欠かせないタンパク質の品質管理の仕組みを解明していきたい」と話している。(松尾浩道)

「回転分子
モーター」

30度回転で一旦停止

京産大など 動きの仕組み解明

京都産業大学と大阪医科大、早稲田大学など、素イオン輸送を担うこのチームは、細胞のエネルギー源であるアデノシン三リン酸(ATP)の合成や分解にかかわる「回転分子モーター」の解明に役立つ成果だ。それATPの合成や分解

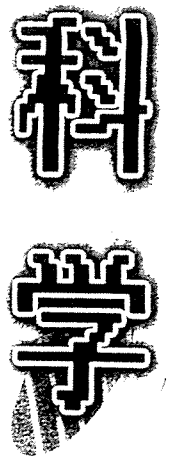
動きを直接観察した。水、英科学誌ネイチャー・コミュニケーションズに8日掲載された。エ、回転分子モーターにはF型とV型があり、それぞれATPの合成や分解の1)の金微粒子を、直径40ナ(ナは10億分の1)の金微粒子を、熱菌ではATP合成酵素、人では分解酵素として機能している。

このタイプは好熱菌ではATP合成酵素、人では分解酵素として機能している。

このタイプは好熱菌ではATP合成酵素、人では分解酵素として機能している。

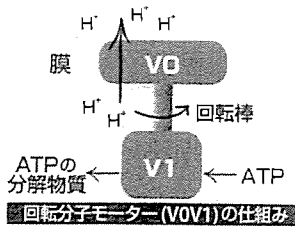
このタイプは好熱菌ではATP合成酵素、人では分解酵素として機能している。

細胞内でエネルギー生産などの役割を担って回転する分子が一定の角度ごとに小停止しながら回転する様子を直接観察することに、京都産業大総合生命科学部の横山謙教授や大阪医科大の吉池晶助教たちのグループが成功した。分子の回転によるイオン輸送の仕組みの解明につながる成果という。



回転分子の観察に成功

京産大・横山教授ら イオン輸送の仕組み解明へ



生体内のエネルギーの基となる物質ATPを作ったり、分解したりする酵素は、自身が回転する分子「回転分子モーター」二つが、回転棒で連なったような形をしている。回転分子モーターは、一つがATPの分解・合成を担い、細胞内の膜の内部にあるもう一つは、イオンの輸送を行うポンプのような役割を果たしているが、回転運動とイオン輸送の

関係の詳細は分かっている。横山教授たちは、バクテリアのATP分解酵素V0V1の回転運動を、目印となる金微粒子をつけて光学顕微鏡で観察した。その結果、V0V1は、約30度ごとに小停止しながら回転していることが分かった。イオンの輸送を担うV0部分の外周には、12個の水素イオンの結合部分があることから、水素イオンが一つずつ輸送されることに起因すると考えられるという。

横山教授は「V0V1の結晶構造をより詳細に解析し、回転によるイオンの輸送の全容を解明したい」と話している。(松尾浩道)

大学 NOW

21世紀はライフサイエンスの時代といわれる。生命活動を支える分子レベルの仕組み、エネルギーや食料など生物資源としての側面、さらには動植物と地球環境との関連など、幅広い視点から「生命」を考察するのが京都産業大学総合生命科学部だ。

学部長の永田和宏教授(細胞生物学)は「一方的に講義を聞くのではなく、自分の手を動かすことが大切」と実験

幅広い視点で「生命」を研究

京都産業大学総合生命科学部 (京都市)

豊富な教員、実験を重視

重視の方針を貫いている。「今の学生はすぐに答えを知りたがる。しかし、科学の世界には正解がないことがほとんどだ。実験をすれば私たちがいかに何も分かっていないか実感できる。『こんなこともまだ分かっていない』ということを分かってほしい」

が2人1組で数人ずつの学生を受け持ち、ノートの取り方やレポートの書き方など学生生活に必須の技術を指導する。「京都の名所や食べ物などにつき自分が不思議に思ったことを科学的に考えなさい」などユニークな課題を与えることもある。

研究も多かった。生命システム学科2年の北山英輝さん(20)は「和歌山県立向陽高出身」は「高校の生物や化学の授業で興味を持ち、もう少し深いことを学びたかった。人前で論理的に話す経験が少なかったため、セミナーはいい経験になる」。生命

そのために少人数教育を重視し、1学年115人の定員に対し、47人の教員を配している。学生はケノム解析など最新の手法に早くから触れることができる。

一方、生命システム学科では高校の学習からの橋渡しとして1年生を対象にフレッシュヤーズセミナーを開催。教員

「今の学生は自分で『問い』を見つけてのが苦手。しかし、自発的に問題点を見つけ、その答えを論理的に導くことはどんな職業に就いても必要」(楠本伸雄教授)という考えからだ。だが、「琵琶湖疏水はなぜ緑色か」「原料の組成を交えて生八橋の生地をつくとどうなるか」など個性的な研

【神原雅晴】



実験に力を入れる総合生命科学部生命システム学科の研究室(京都市北区、森園道子撮影)

★生命活動の全体をシステムととらえて学ぶ生命システム▽生命科学によって地球資源枯渇問題の解決を目指す生命資源環境▽動物由来の感染症の克服などを目指す動物生命医科——の3学科がある。鳥インフルエンザ研究センターなど世界的に注目される研究施設とも連携する。

脳出血引き起こす難病

モヤモヤ病関与 遺伝子を特定

脳の血管が細くなって脳出血などを引き起こす難病「モヤモヤ病」の発症と深くかかわる遺伝子とその働きを、京都大学医学研究科の小泉昭夫教授や京都産業大、国立循環器病センターなどのグループが突き止めた。治療薬の開発につながる成果としており、米科学誌「プロス・ワン」で21日発表する。

治療薬開発に期待

京大・京産大など

モヤモヤ病は日本での発症率(約1万人に1人)が高い。原因は不明だが、家族性の発症も15%程度あり、遺伝子

他、日経新聞等3紙に掲載

「モヤモヤ病」発症
関係遺伝子を発見
京大など

「モヤモヤ病」発症のなりやすさを左右する遺伝子を、京大や国立循環器病研究センター、京都産業大などの研究グループが見つけた。予防や治療

法の確立に役立つ成果で、21日に米科学誌「プロスワン」に発表する。
患者の約15%が家族性であることから、グループは、3世代にわたってこの病気の患者がいる国内8家系の42人の遺伝子を調査。ある一つの遺伝子のアミノ酸配列に、患者特有の変異があることを突き止めた。

erinの働きをなくしたところ、眼球や脊椎の動脈に異常な枝分かれを確認、血管形成で重要な働きをすることが結論づけた。
家族性と確認できない患者も含め日本人の患者161人の約9割にmysterinの変異が見つかつたが、患者ではない約2/3%にも変異があり、「発症には遺伝子の変異だけでなく、ウイルス性感染症など何らかの要因がかかわっているのではないか」(小泉教授)という。
グループは、患者の体細胞からiPS(人工多能性幹)細胞を作ることにも成功しており、病気の予防や治療法の開発に役立てる。
(松尾浩道)

「モヤモヤ病」の 関連遺伝子特定

京大・京産大など

脳に血液を送る血管が詰まる難病「モヤモヤ病」に深くかかわる遺伝子を、京大、京都産業大などの国際研究グループが発見した。調べた患者の75%がこの遺伝子に同じ変異が見つかつた。米科学誌「プロスワン」で21日発表する。
モヤモヤ病は東アジアに多く、国内では約1万人に1人が発症するとされる。京大の小泉昭夫教授らは、モヤモヤ病患者が3世代にわたっている八つの家系で発病した全員について、同じ変異が起きている遺伝子を発見。この遺伝子をミステリンと名付けた。さらに日本、韓国、中国のモヤモヤ病患者計251人を調べると、187人(75%)がこの変異があつた。この変異がある人は、モヤモヤ病に1.2倍もかかりやすくなることがわかつた。ゼブラフィッシュでミステリンを働かなくしたところ、頭の中の血管に異常が起きたことから、ミステリンは頭内部の血管の発達に関係していると考えられる。ただし、この変異があつても必ず発病するわけではないため、環境などもかわっていると考えられるとわかつた。
(鍛冶信太郎)

県内最大のコハクチョウ飛来地がある安曇野市。渡り鳥による鳥インフルエンザ発生を警戒し、今年に入り、地元で27年間続いているハクチョウへの給餌の是非をめぐる議論が本格的に始まった。ハクチョウの過密を招く給餌を段階的に減らし、感染のリスクを分散させたい市。給餌などで観光資源を維持してきた愛護団体からは反発の声も上がり、方向性は定まっていない。(柳沢護)

ニュース 追跡

雪の北アルプスを背景に舞うコハクチョウの姿は、冬の安曇野を象徴する風物詩となっており、毎年、全国から観光客や熱心なファンが訪れている。

昨冬、隣愛知県も含む9県の計24農場で、相次いで鳥インフルエンザが発生。後に陰性と判明したものの、県内でも今年1月下旬、小諸市で見つかった野生のコガモ1羽の死骸から簡易検査で陽性反応が出て、県や養鶏業者が対応に追われた。

農林水産省は先月下旬、一連の鳥インフルエンザは

安曇野市の冬の風物詩

ハクチョウ給餌 是非か

コハクチョウ飛来地 1984年12月、旧豊科町(現安曇野市)の犀川(さいがわ)ダム湖(通称・白鳥湖)でコハクチョウ5羽の飛来が確認されて以来、地元有志の餌付けで飛来数が増え、2005~06年の冬には過去最高の2398羽が越冬。日中の餌場、ねぐらを合わせると、現在、安曇野市豊科田沢、明科中川手、穂高北穂高の3か所が主な飛来地で、地元2団体と1個人が給餌を続けている。昨シーズンは1348羽で、越冬日数は過去最高の228日だった。



給餌に群がるハクチョウとカモ。鳥インフルエンザウイルスの元々の宿主はカモ類とされる。1月20日、安曇野市の御宝田遊水池で。

○ 観光資源の維持

× 鳥インフル警戒

「渡り鳥がウイルスを持ち込んだ可能性が高い」との調査結果を発表。給餌で過密化する渡り鳥を警戒する傾向が全国的に強まっている。

「人から餌をもらうことが当たり前になっている。給餌は続ける」。今月3日、市主催のシンポジウム「白鳥への給餌を考える」で、客席で話を聞いていた愛護者「アルプス白鳥の会」

事務局担当の会田仁さん

(62)が声を上げた。その後パネリストの鳥類専門家らが「野生生物への給餌は基本的に好ましくない」と相次いで指摘。別の団体幹部は「まるで(給餌してきた)自分たちが悪い」と態度を硬化させた。

決裂を危惧した市は「過剰な給餌を止め、ハクチョウが自立できる環境を」

「としたシンポジウムの宣言文の採択を、急ぎ見送った。

会田さんは「私たちは飛来地を守り、市も(補助金を出して)支援してきた。いきなり手のひらを返すな」と憤った。

市の対応を「給餌見直し派」も批判する。今年7月、給餌の抜本的な見直しを求める要請書を市に提出した

「信州野鳥の会」の植松晃岳代表幹事は「市には約5年前から給餌の見直しを求めてきたが、観光優先で真剣に取り合ってもらえなかった。もう場当たり的な対応は許されないと厳しい。

シンポジウムに参加した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は、給餌で過密化した渡り鳥の危険性を「時限爆弾の上に座っているようなもの」と指摘した。「ウイルスの元々の宿主はカモ類。ハクチョウに給餌すると、ハクチョウを上回る数のカモ類が群がるので、感染拡大しやすくなる。ハクチョウはむしろ被害者」と解説し、「カモ類の分散」がポイントだと強調した。

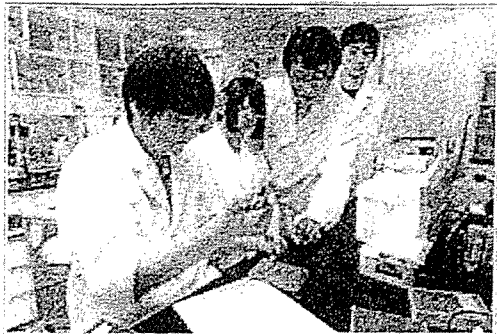
先進事例はある。国内最大規模の飛来地がある山形県酒田市。40年近く給餌を続けてきた愛護団体「酒田市白鳥を愛する会」(池田昭三会長)は市の要請を受け入れ、2008年に給餌をやめた。1万羽近くいたハクチョウの飛来数は、給餌中止後も変化はないのに、3万羽以上いたカモ類は姿を見せなくなったという。

同会メンバーは、蓄積した野鳥の知識を生かし、市とも連携して、傷付いた鳥などの監視活動を行っているといい、安曇野市が学ばべき点は多そうだと。今年も、来月中旬には、コハクチョウの飛来が始まる。

最新設備でウイルスの実態解明

京都産業大学工学研究科1年の堤直人さん(23)は工学部4年生だった昨春、学内の「鳥インフルエンザ研究センター」で初めて取り組んだ実験の感動が忘れられないという。ペトナムで採集されたカモの糞をニワトリの発育鶏卵に接種して培養したところ、インフルエンザウイルスが分離できたのだ。

カモをはじめとする水鳥のインフルエンザウイルスは通常、家禽には簡単に感染しないが、いったん感染すると毒性が増す場合がある。このメカニズムはま



鳥インフルエンザ研究センターで学生を指導する総合生命科学部の高桑弘樹准教授(右から2人目)

京都産業大 鳥インフルエンザ研究センター

大学の挑戦

十分に解明されていないため、ニワトリに人為的に感染させることでウイルスの変異過程を探るのが今後の狙い。将来、微生物研究に携わりたいと大学院に進んだ堤さんは「最新の実験機器がそろった充実した研究環境のなかで成果を出したい」と力を込めた。

研究センターは平成18年10月に設立された。鳥インフルエンザは近年、パンデミック(世界的大流行)が危惧される新型インフルエンザの出現にも関与していると考え、流行予測や感染経路の確定、ウイルスの実態調査などを進めるのが目的だ。

鳥インフルエンザ研究の第一人者として知られる総合生命科学部の大槻公一教授がセンター長を務め、研究員のほか、大学院や学部生も研究に従事する。こうした専門機関を設置している大学は東京大学や北海道大学など国立の一部に限られ、私立大では医療系を除けば、京都産業大しかない。昨夏にはH5N1型など強

毒性ウイルスを扱うことができる「BSL3特別実験室」も開設され、最先端の研究成果が期待されている。

「鳥インフルエンザが流行する海外の動向がカギになる」と語るのは、研究員を兼務する総合生命科学部の高桑弘樹准教授。研究センターでは、長崎大学熱帯医学研究所がペトナムの国立衛生疫学研究所内に開設した研究室を拠点に共同研究を続けている。実験に使われるペトナムのカモの糞もここでサンプル採集されたものだ。

この結果、近年日本や韓国などで確認された鳥インフルエンザウイルスと類似型のものがペトナムの野鳥の間に広がっていることを高桑准教授らが突き止めた。今後はヒトへの感染メカニズムの解明を視野に入れ、抗ウイルス性薬剤の開発も産学連携で進めたいという。高桑准教授は「強毒性ウイルスの出現を察知して警告を発し、先回りして予防することも夢ではない」と話している。

感染ツルの里

インフル感染1年

②

出水平野のツルに異変が起きた昨年12月、その数日前の羽数調査で、飛来数は1万3000羽を記録していた。ひしめき合う環境で、高病原性鳥インフルエンザに感染したと確認されたツルは7羽だけだった。ツルは感染しにくいのか、それとも感染が分かりにくいのだろうか。

「鳥インフルエンザが頭をよぎった」。鹿児島大学農学部の高瀬公三教授(家畜ん疾病学)は、死んだナベツ

ルが鹿大に持ち込まれた12月20日を振り返る。出水市職員から「後ろ向きに歩いていたら」と報告を受けた。特有の神経症状だった。国内でのツルの高病原性鳥インフルエンザ感染確認は初めて。高瀬教授が鹿大に赴任した2000年から出水平野で毎季実施するふん便検査でも、ウイルス検出例はない。感染が確認されたという。

年末から今年初めにかけもなかつた。診断したツルには下痢やよだれの形跡もなかった。「感染後すぐ発症したのだろう。動き回ってウイルスをまき散らした可能性は低い」

発生以降、推移を見守り続けた。ツルは感染しにくいとみる。「夜はねぐらで密集して過ごす。感染しやすいから、もつと発症したり、ふん便からウイルスが検出されたりしたはず」と説明、「感染がほかになかったとは言

いが切れないが、多かつたとも考えにくい」という。



高病原性鳥インフルエンザに感染したナベツルの診断結果を説明する高瀬公三教授
=17日、鹿児島大学

野鳥の壁

「7羽だけ」残る疑問

農林水産省の高病原性鳥インフルエンザ疫学調査チーム長で鳥取大学農学部の伊藤壽啓教授(獣医公衆衛生学)は「ツルの場合、感染しても発症しないケースがあるのかもしれない。研究ではつきりさ

すが、研究ではつきりさす。消化器や呼吸器など、鳥によってウイルスの主な増殖場所が異なる点に着目する京都産業大学の太田一鳥インフルエンザ研究セ

Q&A

高病原性鳥インフルエンザ

家畜伝染病予防法で指定された鶏などの病気を模索する。

ウイルス表面のタンパク質がH5型とH7型のうち、強毒タイプが高病原性といわれる。いずれかの型に感染したら弱毒タイプでも高病原性としていたが、7月の法改正で国際的な診断基準に合わせ、農林水産省によつて、鶏が感染すると多くが死亡とされる。いずれかの型に感染したら弱毒タイプでも高病原性としていたが、7月の法改正で国際的な診断基準に合わせ、

なると着目する京都産業大学の太田一鳥インフルエンザ研究セ

ンター長(獣医微生物学)は「出水のわぐらの一部の水からウイルスが検出されている。感染は広がっていた可能性が高い」と推測する。ツルは呼吸器で増殖するタイプと想定。腸などの消化器で増殖するタイプに比べて、ふん便に出るウイルス量は少なくなる。ふん便検査で検出されなかったことも合点がいく」と説明する。

「感染は7羽だけだったのか」という疑問は残っているが、環境省は9月、出水など国内で相次いだ事例を受けて、ナベツルやマナツルを、感染リスクが高い野鳥種に加える。一方で、3人は「相

た。専門家の見解は異なる。一方で、3人は「相

鳥インフル感染調査へ

京に飛来の渡り鳥

京都産業大と京都市衛 表し、水際での感染拡大
生環境研究所は22日、鴨 防止につなげる。

川など京都市内に飛来す 京産大は学内の鳥イン
フルエンザ研究センター
の渡り鳥が強毒性の鳥イン

京産大と市衛環研

ンフルエンザウイルスに (大槻公二センター長)
感染していないかを確認 が、琵琶湖に飛来した渡
る調査を、今冬から共 り鳥のふんなどから鳥イ
ンフルエンザウイルスの
同で始めることを明らか 調査を行っている。今年
にした。結果は市民に公

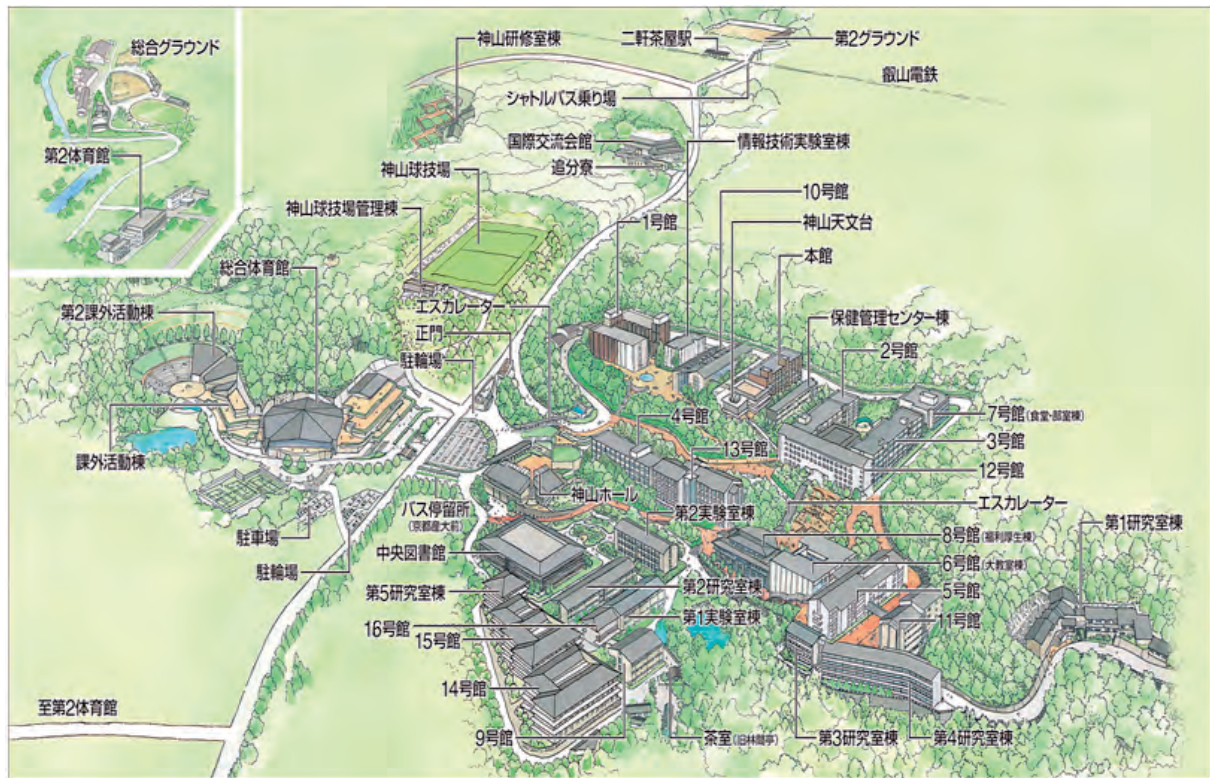
3月に京産大と市は感染 解析。検査結果を、養鶏
症や食の安全の研究につ 農家の防疫対策や市民が
いて連携協定を締結して みだりに渡り鳥に近づか
おり、市衛生環境研究所 ないように呼びかける注
の職員8人を京産大が客 意喚起に役立てる。

員研究員として受け入 大槻センター長は「お
れ、共同研究を行うこと 互いの研究に蓄積や設備
を決めた。

大学と市の合同チーム ンフルエンザをはじめと
は、鴨川をはじめとする するさまざまな伝染病の
京都市内の河川や池に飛 発生予測や予防対策の構
来する力毛などのふんを 築につなげたい」と話し
採取、京産大が保有する ている。

(松尾道)

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 (1 F) 動物生命医科学科 (B 1 F)
9 号 館	生命資源環境学科 (2 F・3 F)
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 2 号 2 0 1 1 (平成 2 3 年)

発 行 日 2 0 1 2 (平成 2 4) 年 6 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/>