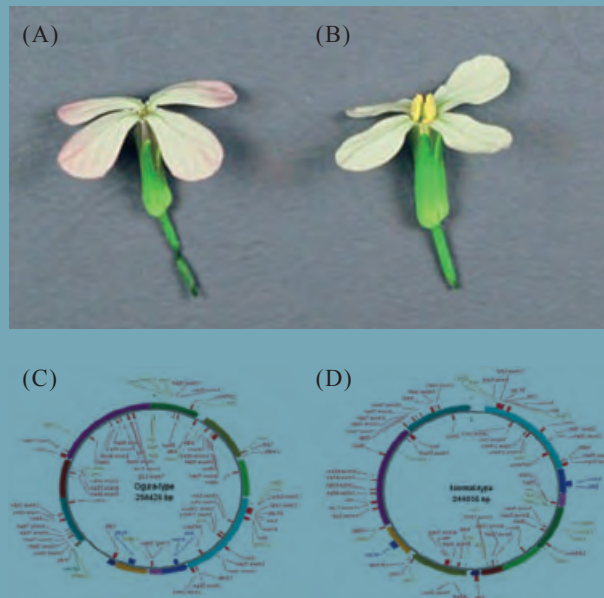


# 京都産業大学総合生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences  
Kyoto Sangyo University



《第3号》

2012  
平成24年

#### オグラ型雄性不稔ダイコンのミトコンドリアゲノムの構造と *orf138* の起源

植物体の生育は正常であるにも係わらず、機能を持った花粉が形成されない現象を雄性不稔という。またこの形質が母性遺伝を示す場合、特に細胞質雄性不稔と呼ばれる。ダイコン (*Raphanus sativus*) で発見されたオグラ型雄性不稔の原因遺伝子は、ミトコンドリアの *orf138* であるが、この遺伝子の起源は不明であった。我々は今回、次世代シーケンサーを用いて、ダイコンのオグラ型と正常型のミトコンドリアゲノムの構造を初めて明らかにした。

オグラ型と正常型のミトコンドリアゲノムは 11 のシンテニックな領域から構成されており、両者間に著しい構造変異が認められた。ゲノム解読によりこの構造変異は、シンテニックな領域の末端にある短いリピート配列を介した組換えに起因することが示された。また *orf138* 遺伝子はオグラ型に固有の領域の 1 つに位置しており、構造変異の過程で偶然生じた新規遺伝子であると考えられた。

雄性不稔を示すダイコンの花 (A) と正常な花粉をつける花 (B)

ダイコンのオグラ型 (C) 及び正常型 (D) ミトコンドリアゲノムの構造

(Tanaka et al. BMC Genomics 2012, 13:352 doi:10.1186/1471-2164-13-352 から引用)

## 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
2012年 総合生命科学部 研究室トピックス	5
2012年活動記録	
生命システム学科	
生命システム学科の教育研究活動	6
永田和宏 教授(学部長)	8
嶋本伸雄 教授(副学部長)	13
黒坂光 教授(学科主任)	16
吉田賢右 客員教授(副学科主任)	21
板野直樹 教授	26
佐藤賢一 教授	29
瀬尾美鈴 教授	32
中田博 教授	38
中村暢宏 教授	43
浜千尋 教授	46
福井成行 教授	49
横山謙 教授	51
伊藤維昭 客員教授	54
八杉貞雄 客員教授	57
生命資源環境学科	
生命資源環境学科の教育研究活動	60
寺地徹 教授(学科主任)	61
野村哲郎 教授(副学科主任)	65
津下英明 教授	67
山岸博 教授	70
金子貴一 准教授	73
河邊昭 准教授	75
木村成介 准教授	78
高橋純一 准教授	82
本橋健 准教授	86
動物生命医科学科	
動物生命医科学科の教育研究活動	89
大槻公一 客員教授(学科主任)	92
竹内実 教授(副学科主任)	95
加藤啓子 教授	99
齋藤敏之 教授	102
前田秋彦 教授	105
村田英雄 教授	108
松本耕三 客員教授	110
高桑弘樹 准教授	112
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3号発刊にあたって～総合生命科学部事務室から～	122
総合生命科学部プロジェクト研究支援制度研究成果中間報告書および評価	123
第1回総合生命科学部研究交流会演題一覧	124
2012年総合生命科学部主催シンポジウム等一覧	128
新聞掲載記事	133



## 巻 頭 言

総合生命科学部長  
永 田 和 宏

京都産業大学に新しく総合生命科学部が発足して3年が経過した。3つの学科は、それぞれの特徴を生かしつつ、かつそれぞれが補完することによって、生命科学の基礎を総合的、かつ多角的に学生たちに教授するべく、講義、演習、実習などを行ってきた。その歩みは予想したよりも順調に推移してきたと思っている。

本年6月には、第一回の教員研究交流会を開催した。研究交流会は、2日間にわたり全教員が口頭発表を行うとともに、プロジェクト助教、ポスドク、大学院生などによるポスター発表も行われ、15号館の廊下を利用して50題あまりのポスターが並んだのは壮観であった（プログラム、発表演題一覧は124ページ参照）。

研究交流会は、学科や研究室の異なる研究者が一堂に会して、それぞれの研究の進展を把握するとともに、学部全体のアクティビティを確認することに大きな意義がある。大学院生も含めてほとんどの学部構成員が出席し、熱心に聴講するとともに、活発な質疑応答を行なった。ポスター発表においても、廊下が通りづらくなるほどの盛況で、活発な議論が展開していることに、充実ぶりをうかがうことができた。このような交流会は、今後も定期的に継続していく予定である。

また本年は学部発足3年目ということもあり、大学に対して中間報告書を提出して、その評価を受けた。中間報告では、特にプロジェクト研究制度が評価の対象となり、プロジェクト助教、ポスドクなどを獲得している研究者が、発足から2年間の成果を発表論文とともに個別に報告書としてまとめ、それに対する大学側の評価が返された。本年報には、学部としての総括と、学部全体への評価のみを資料として掲載した（123ページ参照）。

このような学部主導での自己評価のシステムは、本学において初めての試みである。背景には、よりよい教育・研究環境を整えるよう大学に要請し、その分、自らの活動に対しては責任を持ちたいという意志と姿勢がある。来年度（平成25年度）は、いよいよ第一期生の卒業を迎える年度であり、また現在申請中の「生命科学研究科」に第一期の大学院生の入学試験を実施することになっている。また本年度より文科省からの「グローバル人材育成推進事業」に採択され、本学では「理系産業人の育成」を謳っていることもあり、本総合生命科学部においても英語教育を充実させ、世界で活躍できる産業人、研究者の育成に取り組む環境が整ってきた。

いよいよ本学部、研究科の真価の問われる時期に差し掛かっている。教育、研究ともに順調な発展を見せていると自負しているが、決してこれに満足しているわけではない。今後とも、どんどん新しい試みにチャレンジし、よりよい学部・研究科をめざしていかなければならないと、全教員が覚悟を新たにしているところである。

## 総合生命科学部教員研究室一覧

学科	役職	職名	氏名	スタッフ等名簿				
				助教・講師	特定研究員 (PD)	特定研究員 (TR)	客員研究員	嘱託・契約職員
生命システム	学部長	教授	永田和宏	潮田亮	森戸大介	石田玉美		木曾和美子 福田泰子
	副学部長	教授	嶋本伸雄	中山秀喜			Suganthan Rajan Babu 高橋麻矢子	成田礎野美
	学科主任	教授	黒坂光	中山喜明 中村直介			肥塚靖彦	
	副学科主任	客員教授	吉田賢右	元島史尋	菅原奈子 鈴木俊良 寿税元 野田英一 島優二 郎子		中村純治 平山尚志 由山良 隆	石崎陽子 中嶋晶一 田木純 巳子
		教授	板野直樹				飯島順子	
		教授	佐藤賢一	井尻貴之				横山朋子
		教授	瀬尾美鈴				上野信洋	清水昭男
		教授	中田博	秋田薫 石田有希子			河野正孝	谷田周平
		教授	中村暢宏		石田竜一			
		教授	浜千尋	中山実				
		教授	福井成行					
	教授	横山謙		岸川淳一			中西温子	
	客員教授	伊藤維昭	千葉志信	千葉直美		茶谷悠平		
	客員教授	八杉貞雄	石井泰雄				藤本聖恵	
生命資源環境	学科主任	教授	寺地徹	高橋亮		塚谷真衣 久堀麻衣子	田中義行 野山添幹 山本本 真 本 衣子	キヤリヤフアラト 植村香織
	副学科主任	教授	野村哲郎					遠藤千尋 米川安寿 秋浩
		教授	津下英明	鶴村俊治				津守耶良
		教授	山岸博	高橋亮 安本景太				山下陽子
		准教授	金子貴一					
		准教授	河邊昭		吉田貴徳 岡本山 郁斗	吉田初佳		山中美和子
		准教授	木村成介				中山尚美 益庭朗 子 大加藤伸也 竹種内学 春藤敏剛 藤井本 卓 藤 勝矢	
		准教授	高橋純一					
	准教授	本橋健	桶川友季			泉井桂		
動物生命医科	学科主任	客員教授	大槻公一			藪田淑予	池永充宏 伊藤藤隆 大栗西田知 近野真由 杉江真美 田村北 輝 村 佳 史	
	副学科主任	教授	竹内実				佐倉正明	廣野由里子 田中美子
		教授	加藤啓子					渡邊裕子
		教授	齋藤敏之				中山隆明 本村昇 中米 昇 嶋 万有子	
		教授	前田秋彦					
		教授	村田英雄					
		客員教授	松本耕三					
		准教授	高桑弘樹					
		准教授	西野佳以				萩原克郎	
		助教	今野兼次郎					
	助教	染谷梓						
	助教	棚橋靖行					川原瑞穂	

## 総合生命科学部事務室スタッフ名簿

役 職 名 等	氏 名
学長室 総合生命科学部長補佐	椎 清 二
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)	横 野 美沙緒
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)	増 岡 さおり
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)	池 田 竜之介
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	栗 本 倫 世
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	重 吉 瑛 里
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	西 田 真佐子
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)	吉 田 哲 治
教学センター特定職員 (R I業務担当)	碓 山 菜々子

## 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	浜 千 尋
人権センター運営委員会	前 田 秋 彦
人権委員会	中 田 博
人権センター窓口相談員	西 野 佳 以
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)	竹 内 実
自己点検・評価運営委員会 (総合生命科学部)	津 下 英 明
自己点検・評価運営委員会 (工学研究科)	佐 藤 賢 一
学部 F D / S D 推進ワーキンググループ	嶋 本 伸 雄
大学院 F D / S D 推進ワーキンググループ	金 子 貴 一
	高 桑 弘 樹
教務委員会	浜 千 尋
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会	福 井 成 行
入学試験委員会	加 藤 啓 子
進路センター運営委員会	板 野 直 樹
図書館委員会	齋 藤 敏 之
国際交流推進委員会	村 田 英 雄
留学アドバイザー	染 谷 梓
大学院委員会	佐 藤 賢 一
教職課程教育センター運営委員会	八 杉 貞 雄
	木 村 成 介
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	高 橋 純 一
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
論集編集系列委員会	伊 藤 維 昭

スタッフ等名簿	その他
大学院生	
小 谷 友 理 (D1) 浅 野 慶 太 (M2)	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)
Ksenia Pavlovna Shcherbakova (D2)	
金 田 鋭 一 (M2) 川 合 多美子 (M2) 和 田 あゆみ (M2)	
高 橋 由 樹 (M2) 田 中 翔 太 (M2) 藤 井 克 弥 (M1)	
	Theerawut Chanmee (外国人特別生)
紀 平 成 (M2) 吉 田 潤 平 (M2)	
吉 田 亜佑美 (D1) 竹 内 祥 人 (M1)	
万 木 肇 (D3) 森 勇 伍 (D1) 岡 本 陽 己 (M2) 奥 村 蓉 子 (M2) 笹 野 昂 太 (M2) 和 田 澤 元 (M2) 田 中 みなみ (M1) 西 尾 隆 男 (M1)	佐々木 綾 (大学院委託生) 村 上 憲 (大学院委託生) 永 原 秀 剛 (大学院委託生)
中 森 健 太 (M1) 齋 藤 隆 康 (M1) 芦 田 航 (M1) 飯 田 英 明 (M1) 中 村 卓 哉 (M1)	
藤 井 裕 也 (M2) 辻 村 朋 彦 (M2) 村 田 洋 樹 (M2) 大 矢 悠 貴 (M1) 福 永 明 日 美 (M1) 井 上 理 恵 子 (M1)	
柴 田 幸 平 (M2)	
羽 瀧 加 菜 子 (M2) 森 悠 太 (M2)	
廣 谷 潤 (M2) 内 池 伸 和 (M1) 宮 澤 幸 樹 (M1)	
野 瀬 雅 仁 (M2) 佐々木 一 馬 (M1)	
Srimontri Paitoon (D1)	
Velado Fernandes Igor (D2)	
Sarawut Taksinoros (D2)	
佐々木 大 樹 (M2) 庄 司 早 希 (M2)	





## 2012年 総合生命科学部 研究室トピックス

### 【中田 博 教授 研究室】

- ・ 大学院生（博士後期課程3年）：万木 肇  
2012年12月 第85回日本生化学会大会 鈴木絃一メモリアル賞受賞

### 【永田 和宏 教授 研究室】

- ・ 特定研究員（PD）：平山 尚志郎  
2012年4月 学振特別研究員（PD）に採用  
2012年8月 東京大学大学院薬学系研究科助教（村田茂穂研究室）に採用され赴任
- ・ 特定研究員（PD）：萩原 誠智  
2012年4月 学振特別研究員（PD）に採用  
九州大学生体防御医学研究所（稲葉謙次研究室）に赴任
- ・ 特定研究員（TR）：新木 和孝  
2012年4月 学振特別研究員（PD）に採用  
産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター（夏目徹研究室）に赴任
- ・ 委託生：垣花 太一  
2012年4月 学振特別研究員(DC2)に採用
- ・ 委託生：伊藤 進也  
2012年12月 第85回日本生化学会大会 鈴木絃一メモリアル賞受賞

### 【河邊 昭 准教授 研究室】

- ・ 特定研究員（TR）：降旗 初佳  
2012年9月 日本遺伝学会第84回大会 Best Papers 賞
- ・ Faculty of 1000 にmust read paperとして選出  
Tsukahara S, Kawabe A, Kobayashi A, Ito T, Aizu T, Shin-i T, Toyoda A, Fujiyama A, Tarutani Y, Kakutani T.  
Centromere-targeted de novo integrations of an LTR retrotransposon of Arabidopsis lyrata.  
Genes & Development 26: 705-13 (2012)

### 【木村 成介 准教授 研究室】

- ・ 特定研究員（PD）：中山 北斗  
2012年9月 日本植物形態学会第16回平瀬賞受賞
- ・ 中益明子（客員研究員）、末松信彦（共同研究者）、木村成介  
2012年11月 Poster Award for Excellence,  
International Conference on Modeling Analysis and Simulation

### 【棚橋 靖行 助教 研究室】

- ・ 棚橋靖行、海野年弘、松山勇人、北澤多喜雄、山田真久、Jurgen Wess、小森成一  
2012年9月 第154回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会奨励賞受賞

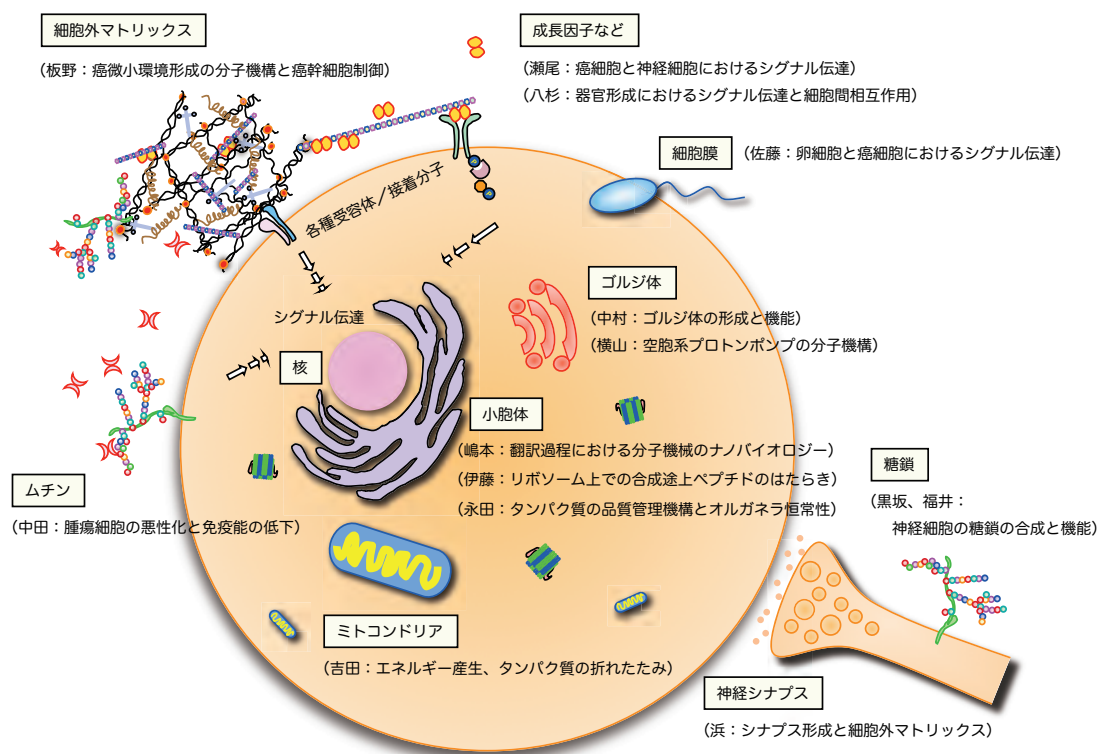
### 【瀬尾 美鈴 教授 研究室】

- ・ 客員研究員：上野 信洋  
2012年4月 日本弁理士会登録

## 生命システム学科

### 【研究】

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、分子レベルの機能を細胞・組織・個体レベルでの生命活動に結びつけて解析している。研究内容は図に示したように多岐にわたり、遺伝子の転写、翻訳の機構、小胞体における新生タンパク質のフォールディングと品質管理機構、ゴルジ体構造維持の分子機構、ミトコンドリアでのエネルギー産生機構、リン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾反応、細胞表面受容体分子の機能、細胞外マトリックスにおける分子機能に至るまで、まさにタンパク質・複合糖質の合成から成熟過程、さらにそれらの輸送・運搬までを完全に包含している。また対象とする生命現象も多様であり、受精、発生、神経、癌などにおける標的分子の機能を解析し、疾病を機能分子の異常によるシステム破綻ととらえて研究を展開している。



## 【教育】

別表は、生命システム学科の主に専任教員が担当する授業科目のリストである。本学科は定員 45 名に対して 14 名の専任教員が教育を担当し、入学から卒業に至るまで徹底した少人数教育を実践している。特に1年春学期のフレッシューズセミナーと研究室に配属されてから受講する基礎・応用特別研究では、教員1名が3～4名の学生を対象として指導している。カリキュラム全体の構成は、入学後に生物学、化学の基礎を学んだ後に、生物化学、分子生物学、細胞生物学、生物学実験、化学実験などの生命科学の基礎専門科目を1年、2年次に学習する。その後、より専門性の高い発生学、神経生物学、免疫学、タンパク質の構造に関わる科目、応用的な実験科目(生命システム実習)などを学習し、3年秋学期からは研究室に所属して卒業研究に取り組む。また、大学院への進学を強く推奨している。卒業後は、製薬、食品、化学系などの分野への就職を想定している。

科目名	配当学年	担当教員
フレッシューズセミナー	1	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	1	八杉、嶋本
化学通論A、B	1	横山
生命システム概論	1	吉田、永田
物質生物化学	1	黒坂、浜
分子生物学	2	伊藤、瀬尾
遺伝子工学	2	伊藤、嶋本
代謝生物化学	2	吉田、中田
細胞生物学	2	福井、永田
発生生物学	2	佐藤、八杉
システム生物学	3	中村、板野
バイオ解析科学	3	中村、板野
タンパク質制御システム	3	吉田、永田
糖鎖生物学	3	福井、中田
細胞情報システム学	3	瀬尾
免疫学	3	中田
神経生物学	3	浜
構造生物学	3	横山
腫瘍生物学	3	佐藤
再生システム学	3	八杉
放射線生物学	3	黒坂
薬理学	3	板野
生命システム演習Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ	1, 2	瀬尾、板野、横山、黒坂、中村
生命システム英語購読Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ	2, 3	黒坂、嶋本、吉田、中田、伊藤、永田
生物学実験	1	福井、佐藤、中村、浜
生命システム実習Ⅰ、Ⅱ	2, 3	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	3	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	4	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。)

# 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 潮田 亮

Assist. Prof. 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。今年度も引き続き、この研究目標に沿った研究を推進した。従来の研究目標に加えて、本研究室でクローニングし、命名した新規遺伝子 *mysterin* についても、新たな研究(テーマ4)がスタートした。

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。

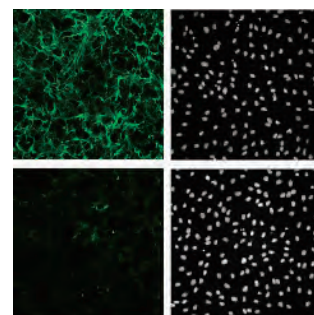
### 4) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterin* の機能

Moyamoya 病は特に日本人に多い、脳血管障害を伴う病気であるが、その原因遺伝子の探索を共同研究として行い、巨大な遺伝子 *mysterin* をクローニングした。この遺伝子のコードするタンパク質 *mysterin* の機能を明らかにする。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

Hsp47 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 Col003 を得ることができ、特許を出願した。Col003 は Hsp47 および P4H に直接結合することによって、小胞体内でプロコラーゲンとの結合を阻害し、コラーゲンの分泌を抑制する。



(図は左上が正常な細胞によるコラーゲン分泌を、左下が Col003 添加による分泌阻害を示す。)

### 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選

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。細胞に ER ストレスがかかり、大量の糖タンパク質が変性して、EDEM/ERdj5 経路が飽和してしまった際に、非糖タンパク質分解経路 BiP/ERdj5 経路が駆動される。即ち、BiP/ERdj5 経路は、ストレス存在下のバックアップシステムとして機能していることが明らかになった。

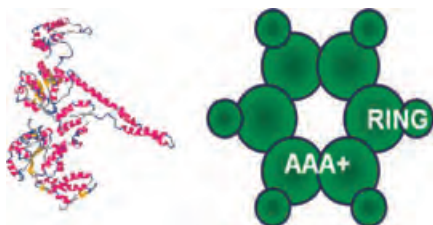
### 3) タンパク質品質管理における小胞体レドックスネットワークの意義

小胞体には20種類を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アクトーム解析)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つの酸化酵素および酸化還元酵素がハブ複合体を作って、酸化反応の起点になり、次々に酸化反応を引き起こすという事実を見出した。さらに主要な酸化酵素 Ero1a の活性化機構をNMRなどの手法を用いて明らかにした。

### 4) Moyamoya 病原因遺伝子 mysterin の機能

Moyamoya 病の原因遺伝子としてクローニングした mysterin は、分子量約600kDaという巨大な分子であった。しかも、この分子はオリゴマーを作り、巨大なタンパク質分解酵素プロテアソーム以上の大きさになることを明らかにした。Mysterin をゼブラフィッシュでノックダウンすると、血管のガイダンスに異常が起こることが明らかになり、病態との関わりの上で重要

な発見となった。現在、さらに結合タンパク質などを含めて、その機能解析を行っている。



### 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, and revealed that 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 promising as the therapeutic reagent for human fibrotic diseases including liver cirrhosis.

**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. This year, we found alternative degradation pathway for non-glycoproteins, BiP/ERdj5 pathway, and showed that this pathway serves as a backup system under the cellular stresses including ER stress.

**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. Functional analysis of a novel protein, mysterin.** We cloned a novel gene encoding a huge protein, and named it as mysterin, which is a causative gene for human steno-occlusive disease called as moyamoya disease. Mysterin with a size of 560 kDa contains ring figure domain, which causes a polyubiquitination of misfolded proteins, and two walker type

ATPase domains. We also found that mysterin makes an oligomer structure and figured out which domains are necessary for oligomer formation. Thus mysterin is a novel oligomeric AAA<sup>+</sup> protein with ring figure. We preliminarily found that knockdown of mysterin in zebra fish caused an aberrantly oriented blood vessels during the development, and would continue such functional analysis.

#### 4. 発表論文

T. Kakugawa, S. Yokota, Y. Ishimatsu, T. Hayashi, S. Nakashima, S. Hara, N. Sakamoto, H. Kubota, M. Mine, Y. Matsuoka, H. Mukae, K. Nagata & S. Kohno : Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress and Chaperones* in press

T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Nagata, K. Kato & N. Hosokawa : Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded  $\alpha$ 1-antitrypsin variant. *FEBS J.* in press

M. F. Abdul-Wahab, T. Homma, M. Wright, D. Olerenshaw, T. R. Dafforn, K. Nagata, A. D. Miller: The pH sensitivity of murine hsp47 binding to collagen is affected by mutations in the breach histidine cluster *J. Biol. Chem.* In press

M. Yagi-Utsumi, S. Yoshikawa, Y. Yamaguchi, Y. Nishi, E. Kurimoto, Y. Ishida, T. Homma, J. Haseki, Y. Nishikawa, T. Koide, K. Nagata and K. Kato : NMR and mutational identification of the collagen-binding site of the chaperone Hsp47. *PLoS ONE* 7(9):e45930(2012)

K. Hisatomi, H. Mukae, N. Sakamoto, Y. Ishimatsu, T. Kakugawa, S. Hara, H. Fujita, S. Nakamichi, H. Oku, Y. Urata, H. Kubota, K. Nagata and S. Kohno: Pirfenidone inhibits TGF- $\beta$ 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulm Med.* 12:24(2012)

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.* 287(26):22253-22265(2012)

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.* 287(9):6810-6818(2012)

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.* 125(5):1118-1128(2012)

#### 5. 著書および総説

D.J. Klionsky, K. Nagata et al: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy *Autophagy* 8(4):445-544(2012)

D. Morito and K. Nagata: ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases. *Frontiers in Inflammation* 3:48 (2012)

M. Hagiwara and K. Nagata: Redox-dependent protein quality control in the ER : folding to degradation. *Antioxidants & Redox Signaling* 16(10):1119-1128(2012)

T. Kakihana, K. Nagata and R. Sitia: Peroxides and peroxidases in the endoplasmic reticulum : integrating redox homeostasis and oxidative folding. *Antioxidants & Redox Signaling* 16(8):763-771(2012)

潮田亮 : 糖タンパク質の小胞体関連分解経路. 生体の化学 (医学書院) Vol.63, No.5 (2012)

#### 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の世界. 九大グローバルCOEプログラム理医連携特別講演会「独創的研究の世界発信を続ける七人の侍」、福岡市、2012.2.29

Kazuhiro Nagata : Regulation of redox homeostasis in the ER. Cold Spring Harbor Meeting, Molecular Chaperones & Stress Responses, Cold Spring Harbor(USA), 2012.05.02

Kazuhiro Nagata : Protein homeostasis through quality control pathways in mammalian cells. 第45回日本発生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会シンポジウム、神戸市、2012.5.30

Kazuhiro Nagata : Regulation of ER oxidoreductases and protein quality control system in the ER. 第12回日本蛋白質科学会年会シンポジウム、名古屋市、2012.6.20

Kazuhiro Nagata : Two distinct ERAD pathways for misfolded glycoproteins and non - glycoproteins. SFB594 3<sup>rd</sup> International Symposium on Molecular Machines in Protein Folding and Protein Transport, Munich(Germany), 2012.07.24

永田和宏 : コラーゲン特異的分子シャペロンHSP47の基礎と臨床 第13回GGA・HSP勉強会 特別講演、東京都、2012.8.4

永田和宏 : タンパク質品質管理と小胞体ホメオスタシスの維持機構. 東大公開シンポジウム「タンパク質の細胞内交通整理」特別講演、東京都、2012.09.10

永田和宏 : ストレス応答と細胞内恒常性維持機構. 第71回日本癌学会学術総会 特別講演、札幌市、2012.09.19

Kazuhiro Nagata : Regulation and structure of a novel AAA+/ubiquitin ligase protein, mysterin. EMBO/EMBL Symposium "Quality Control-From Molecules to Organelles", Heiderberg(Germany), 2012.09.21

永田和宏 : タンパク質の品質管理 : 悪貨は良貨を駆逐するか?

秋田大学文部科学省理数学生育成支援事業「七人の侍による記念講演会」、秋田市、2012.10.24

永田和宏 : ER oxidoreductases are involved in productive folding and degradation of nascent polypeptides in the ER

第7回小胞体ストレス研究会、広島市、2012.11.9

永田和宏 : タンパク質品質管理機構から細胞内恒常性維持機構へ。第7回臨床ストレス応答学会大会 特別講演、東京都、2012.11.24

Kazuhiro Nagata : Regulation of redox homeostasis and proteostasis in the ER. Kyoto University-Durham University Joint International Symposium, Kyoto, 2012.11.29

永田和宏 : タンパク質の異常と病気。京都府歯科医師会西京支部第2回学術講演会 特別講演、京都市、2012.12.8

永田和宏 : Two distinct ERAD pathways contribute for maintaining the protein homeostasis in the ER. 第85回日本生化学会大会シンポジウム、福岡市、2012.12.16

## 7. 学会発表

Omolola Afolayan, Eva-Rachele Pesce, Jun Hoseki, Shoshiro Hirayama, Kazuhiro Nagata, Caroline Knox and Gregory L. Blatch : Biochemical characterisation of Pfj2, a *Plasmodium falciparum* heat shock protein 40 chaperone potentially involved in protein quality control in the endoplasmic reticulum. South African Society for Biochemistry and Molecular Biology conference, Drakensberg (South African), 1.29-2.1(2012)

Ryo Ushioda, Jun Hoseki, Kazuhiro Nagata : Glycosylation-Independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会ワークショップ、神戸市、2012.5.28-31 (口頭発表)

Yuri Kotani, Daisuke Morito, Shunichiro Iemura, Toru Natsume, Kazuhiro Nagata : De-ubiquitinating enzyme for moyamoya disease-susceptible protein, Mysterin. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、神戸市、2012.5.28-31 (口頭発表)

Daisuke Morito, Yuri Kotani, Kouki Nishikawa, Satoru Yamazaki, Shun-ichiro Iemura, Toru Natsume, Seiji Takashima, Akio Koizumi, Yoshinori Fujimori, Kazuhiro Nagata : Structure and Function of AAA+/ubiquitin ligase Mysterin/RNF213. FASEB summer research conferences "Quality Life through Research", Saxtons River (USA), 2012.7.29-8.3 (口頭発表)

Shinya Itoh, Koji Ogawa, Motoki Takagi, Takatsugu Hirokawa, Takayuki Doi, Naoki Goshima, Tohru Natsume, Kazuhiro Natata : Inhibition of collagen-specific molecular chaperone Hsp47 with small molecules. FASEB summer research conferences "Quality Life through Research", Saxtons River (USA), 2012.7.29-8.3

Taichi Kakihana, Kazutaka Araki, Stefano Vavassori, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Roberto Sitia and

Kazuhiro Nagata : Dynamic regulation of Ero1 $\alpha$  and Prx4 localization in the secretory pathway. FASEB summer research conferences "Quality Life through Research", Saxtons River (USA), 2012.7.29-8.3

Ryo Ushioda, Jun Hoseki, Kazuhiro Nagata : Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. EMBO/EMBL Symposium "Quality Control-From Molecules to Organelles-", Heiderberg (Germany), 2012.9.19-22

Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Shunichiro Iemura, Toru Natsume, Seiji Takashima, Kazuhiro Nagata : Regulation of mysterin, a moyamoya disease-associated protein, by de-ubiquitinating enzyme. EMBO/EMBL Symposium "Quality Control-From Molecules to Organelles-", Heiderberg (Germany), 2012.9.19-22

伊藤進也、永田和宏 : 線維化疾患治療のためのコラーゲン分泌阻害剤の同定。イノベーションジャパン 2012—大学見本市—、東京都、2012.9.27.28 (口頭発表)

Daisuke Morito, Kouki Nishikawa, Yuri Kotani, Satoru Yamazaki, Shun-ichiro Iemura, Toru Natsume, Seiji Takashima, Akio Koizumi, Yoshinori Fujimori, Kazuhiro Nagata : Dynamic regulation of moyamoya disease-associated huge ATPase/ubiquitin ligase mysterin. International Symposium 2012 "Neuro-Vascular Wiring", Nara (Japan), 2012.11.12-13

森戸大介、西川幸希、寶関淳、小谷友里、高島成二、小泉昭夫、藤吉好則、永田和宏 : モヤモヤ病感受性遺伝子産物ミステリンの構造と機能。第7回臨床ストレス応答学会大会、東京都、2012.11.24-25

川崎邦人、池田一雄、潮田亮、永田和宏 : 肝星細胞における ER ストレスを介したアポトーシス：コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 ノックアウトの効果。第7回臨床ストレス応答学会大会、東京都、2012.11.24-25

伊藤進也、小川浩二、高木基樹、吉田将人、広川貴次、新家一男、土井隆行、五島直樹、夏目徹、永田和宏 : 線維化疾患治療を目指したコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 阻害剤の探索。第85回日本生化学会大会シンポジウム、福岡市、2012.12.13-16

浅野慶太、平山尚志郎、森戸大介、永田和宏 : 熱ショックによる TDP-43 の凝集体形成。第85回日本生化学会大会シンポジウム、福岡市、2012.12.13-16

## 8. その他特記事項

### 1) 外部資金

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 (H F S P)

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・基盤研究S

課題名: レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の研究、研究代表者: 永田和宏、取得年度: H24-28 年(5 年)

科学技術振興機構CREST「「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」」特定課題

課題名: 小胞体恒常性維持機構: Redox, Ca<sup>2+</sup>, タンパク質品質管理のクロストーク、研究代表者: 永田和宏、取得年度: H24 年(1 年)

科学研究費補助金・新学術領域「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解-生理的準安定状態を捉える新技術-

課題名: 小胞体恒常性を維持するための複合体形成と調節機構の研究、研究代表者: 潮田亮、取得年度: H24-25 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)

国立遺伝学研究所「共同研究(A)」

研究課題名: 新規巨大タンパク質ミスチリンの機能解析、研究代表者: 森戸大介、取得年度: H24 年(1 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)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名: 小胞体内酸化還元バランスのダイナミックな制御機構の解明、研究代表者: 垣花太一、取得年度: H24-25 年(2 年)

2) 知財権等

出願日: 2012年7月24日

名称: 2-ヒドロキシベンズアルデヒド化合物、これを含有するコラーゲン細胞外分泌阻害剤及び医薬品組成物

発明者: 夏目徹、永田和宏、伊藤進也、土井隆行、吉田将人

出願日: 2012年8月8日

名称: カルシウムポンプ制御物質のスクリーニング方法、メラニン色素合成阻害物質のスクリーニング方法、ベクター、並びに細胞

発明者: 潮田亮、永田和宏

3) 学外活動

永田和宏: 「最先端・次世代研究開発支援プログラム」進捗管理委員会委員

永田和宏: 日本学会会議(細胞生物学) 連携会員

永田和宏: 戦略的創造研究推進事業(さきがけ) 研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」の領域アドバイザー

永田和宏: 科研費特定領域研究「ユビキチンネオバイオロジー: 拡大するタンパク質制御システム」(岩井班) 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: 安田記念医学財団 理事

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 常任編集委員

永田和宏: 秋田大学工学資源学部 非常勤講師

永田和宏: 神戸常盤大学 非常勤講師

永田和宏: 京都府立嵯峨野高等学校「スーパーサイエンスハイスクール」学術顧問および運営委員会委員長

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

永田和宏: 京都創生百人委員会 委員

永田和宏: 日本生化学会 評議員

永田和宏: 日本結合組織学会 評議員

4) 受賞等

伊藤進也: 第85回日本生化学会大会 鈴木紘一メモリアル賞受賞

5) その他 研究室メンバー(及びそれ以外)のお花見





# 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、生理現象をタンパク質等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本研究室の行うナノバイオロジーである。

### 1) 大腸菌の寿命のナノ細胞遺伝学

寿命は親子が同定できる生物のみ定義出来るが、バクテリアは無数の寿命があるという誤った俗説がある。大腸菌は近年親子の定義が出来る様になり、寿命有限、無限が論争中である。しかし、通常の生理的条件下では、大腸菌は、3-10 日が寿命である。それ以後は、集団として遺伝子組換による適応を行い数ヶ月生存する。

増殖が停止した細胞の研究は困難で、大腸菌の寿命を決めている機構の研究は少ない。われわれは、タンパク質の合成・分解に焦点を当て、新鮮培地での分裂の再開を生死の指標にして、挑戦をしている。

### 2) 転写における abortive initiation の意義

abortive initiation は、転写開始から転写伸長へと RNA 合成のモードが切り替わる前に起こる短鎖 RNA の放出で調節機構の一つとして働くが、その分子機構の議論は定義を含めて混乱しており、整理を試みモデルの提案を行った。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) Nanoindentation

10nm 程度の先端を持つナノ針を押しつけて、そのへこみから物質の分子構造を解析するのが、nanoindentation である。われわれは、ダイヤモンド表面に DNA をシラン膜を介して共有結合させることに成功していた (Lamgmuir 25, 203(2009))。AFM を用いた nanoindentation の分野の進展をまとめて、我々の成果の学問上の位置を明らかにしたうえで、ダイヤモンドの(100)面の欠陥格子点の single dangling bondを通して、

シラン膜がダイヤと共有結合し、その結合密度を、シラン膜の溶媒の誘電率によって制御出来ることを示した(成果論文 1)。

### 2) abortive initiation を行う転写複合体のモデルの提案

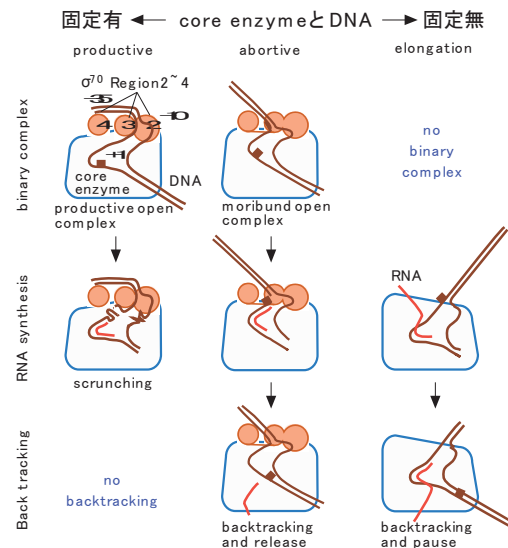


図1 Abortive complex の新モデル。abortive な open complex は 20base 程度まで  $\sigma$  backtracking 可能な状態にある。abortive transcription は initiation は短鎖 RNA 合成は initiation complex、backtracking は elongation complex に似ており、initiation から elongation に伴って、コンフォメーションを切り替わるときの副産物の様相を持つ。

Abortive initiation をおこなう複合体 Moribund complex について、我々の得ている  $\sigma$ -70 転写開始因子の protein footprinting, ExoIII DNA footprinting, Permanganese DNA footprinting の結果を総合し、Backtracking や  $\sigma$ -70 との結合が弱くなっていることをもとに、分子モデルを提案した。RNA 伸長時の Two Pawl Ratchet 機構(Brownian Ratchet と俗称される)との関係も明らかにした。

3) tmRNA の新機能の発見: tmRNA の欠損 ( $\Delta$ ssrA) と合成致死の遺伝子を分離した。いずれもシャペロン、ペプチダーゼ系の AAA+protease 遺伝子であった。生存には tmRNA が関わる過程と、AAA+protease 過程とが並列していることを意味する。この致死性は、アミノ酸添加で相補されることから、AAA+protease による protein turning over が生存に必須であ

ることが示唆された。このように、大腸菌の増殖や生存に関わる新概念が得られつつある。

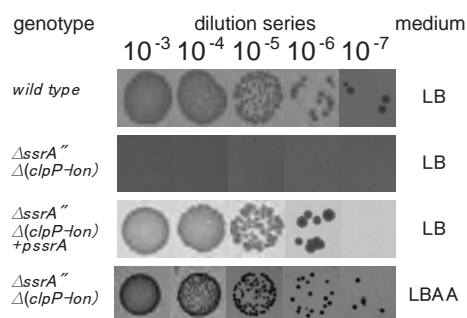


図 2 *ssrA* と AAA+proteases との合成致死。LBAA は LB 培地に 20 アミノ酸を加えたもの

### 3. Research projects and annual reports

Ribosome and RNA polymerase are central nano-machines responsible for translation and transcription, respectively.

The understanding of biological phenomena as motions of the nano-machines is termed “nanobiology”.

#### 1) New model of abortive transcription

Abortive transcription is an iterative synthesis and release of 2–15 base transcripts in the presence of 4NTP. It works as a regulatory mechanism of transcription initiation. The molecular model for the transcription complex performing abortive transcription, moribund complex, was built up for the first time. It explains the previously obtained results of protein footprinting of  $\sigma$ -70, a subunit of *E. coli* RNA polymerase, ExoIII footprinting of promoter DNA, and permanganate footprinting of promoter DNA. The proposed model incorporates the weakened DNA- $\sigma$  interaction and backtracking. Combined with about 200 references in the related field, a review on nanobiology of RNA polymerase is being prepared.

#### 2) New function of tmRNA

The survival of a bacterium in stationary state is one of the most critical selection processes in evolution. We are challenging to clarify a survival mechanism of *E. coli* by using genetics and the newest tools of nano-manipulation in combination. One of the sensors of amino-acid starvation is tmRNA, encoded by *ssrA*, which is conserved in all bacteria.

We have identified the several genes encoding AAA+proteases are synthetically lethal with *ssrA*. One of such lethality of  $\Delta ssrA \Delta(clpP-lon)$  was complemented by the presence of 20 amino acids, suggesting a new function of tmRNA to postpone the cell death with the amino acids produced by protein turning over.

The 100S ribosome, the dimeric 70S ribosome, has been suggested to be the hibernation form of ribosome, but there is no convincing evidence. Conventional gene expression methods are not effective in stationary state. We have been developing a nano-injection technique to a bacterial cells on the basis of nano-manipulation of a needle. We also reviewed the field in the published paper 1.

### 4. 発表論文

Shcherbakova, K., Hatakeyama, A., Amemiya, Y., and Shimamoto N., (2012) Nanoindentation as a Tool to Clarify the Mechanism Causing Variable Stiffness of a Silane Layer on Diamond, in “Nanoindentation in Materials Science” ed. Nemecek, J. 161–78, Intech Open Access, in press (査読有)

### 5. 著書および総説

Shimamoto N., “Bacterial Transcription”, 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”, “表面プラズモン共鳴”, “パルスチェイス分析法”, “示差熱解析”, “ $\pi$ - $\pi$ \*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 (2013)

嶋本伸雄\_ナノマシンとしての RNA polymerase in 新英語論文セミナー21 世紀の分子生物学 渡辺公綱、桂勲編

### 6. 招待講演、シンポジウム等

招待講演 (国際)

Shimamoto N., Nakayama, H. (2012) A new function of tmRNA the adaptation to stationary phase in “Advanced Bioregulation and RNA”, Furano, Hokkaido, Japan, 2月

Nakayama, H., Shimamoto N. (2012) New function of tmRNA and adaptation to steady state in “Asian and Oceanian Conference on Transcription (ACT 2012)”, Segipo, Jeju-do, Korea, 6月

Shcherbakova K, Hatakeyama A., Amemiya Y, Shimamoto N. (2012) The Mechanism Causing Variable Stiffness of a Silane Layer on Diamond in “Asian and Oceanian Conference on Transcription (ACT 2012)”, Segipo, Jeju-do, Korea, 6月

Shimamoto N., Nakayama, H. (2012) How *E. coli* survives or dies? in Seminar Workshop in Microbial Biology, Hyderabad, India, 12月

## 7. 学会発表

嶋本伸雄 (2012) DNAとタンパク質の複合体における緩和の問題、領域11と12の合同シンポジウム、日本物理学会春期年会、関西西宮、3月

中山 秀喜、嶋本 伸雄 (2012) ”tmRNA の定常期適応における役割” 第9回 21世紀大腸菌研究会、長浜、6月

Shimamoto N., Nakayama, H. (2012) Molecular Mechanism For Enterobacterial Survival, in “A Healthier Future through Laboratory Animal Research 2012”, Bangkok, Thai, 7月

嶋本伸雄 (2012) DNAとタンパク質の結合平衡はdetailed balanceしているか？、力学的決定性と統計性の中間領域を探るIV、関西セミナーハウス、3月

嶋本伸雄 (2012) タンパク質-DNAの中の「超化学」現象、第2回複雑系数理とその応用に関するシンポジウム、北大電子科学研究所、11月

中山秀喜、Ksenia Scherbakova、嶋本伸雄 (2012) ”tmRNA によるアミノ酸の供給” 第1回 RIBOSOME MEETING、広島、3月

中山秀喜、嶋本 伸雄 (2012) ”tmRNA によるアミノ酸の再生” 第14回日本RNA学会年会、仙台、7月

中山 秀喜、嶋本 伸雄 (2012) ”tmRNA の定常期適応における役割” 第6回細菌学若手コロッセウム、八王子、8月

中山 秀喜、嶋本 伸雄 (2012) ”tmRNA の定常期適応における役割” 第35回分子生物学会年会、福岡、12月

Shcherbakova K, 雨宮 陽介、畠山 明子、嶋本 伸雄 Method for forming an APTES layer on diamond surface for biomolecule immobilization, 第9回 21世紀大腸菌研究会、長浜、6月

Shcherbakova K, 中山 秀喜, 畠山 明子、嶋本 伸雄 Injection of biomolecules into single bacterial cells, 第35回日本分子生物学会年会、福岡、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

特許第 5019300 号 嶋本伸雄 マルチウェルインキュベーション装置およびこれを用いた分析方法

### 3) 学外活動

Shimamoto N.: Asian and Oceanian Conference of Transcription 国際ボードメンバー

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」「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

嶋本伸雄: 留学生用大学院後期課程コースについてのタイ国立 Kasetsart 大学との提携チームのメンバー

### 技術補佐員の移動

竹内 実: 2011年からオリンパスとの共同研究を担当し、ナノ針プロジェクトを Shcherbakova とともに遂行した。3月まで勤務。

柏 雅美、吉田 信介: 2011年から勤務を開始、柏は7月から、姫路工業大学のプロジェクトに移動、吉田は10月、ノーベル賞の発表の数日前に、京大の山中研に移動。



竹内 実 博士 柏 雅美 博士 吉田 信介 博士

# 神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

## 1. 研究概要

タンパク質は翻訳後に正しくフォールディングされ、さらに様々な修飾反応を受けて機能的な分子となる。糖鎖の付加反応は重要な修飾反応の一つであり、糖鎖はタンパク質の安定化、細胞間の接着や認識などに関わる。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 $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thr, Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thr, GlcNAc $\beta$ 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。この中で GalNAc $\alpha$ 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 GalNAc-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。我々はこれまでに、GalNAc-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てきた。この2つのアイソザイムは、酵素活性に関わるモチーフ内の保存されたアミノ酸残基に置換を持ち、in vitroでの酵素活性がほとんど検出されず、生化学的な解析は極めて困難なサブファミリーに属する。一方で、このサブファミリーは従来の

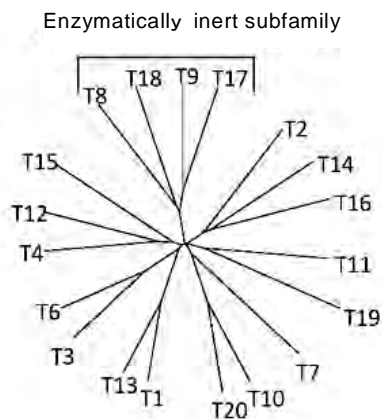
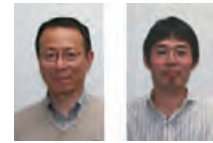


Fig. 1 A phylogenetic tree of human GalNAc-Ts

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中山喜明

Assist. Prof. Yoshiaki Nakayama Ph. D.

酵素とは異なった機能を持つ可能性も指摘されている。このような背景を踏まえ、我々の研究室では、O-グリコシド型糖鎖、およびそれに関連した分子の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 GalNAc-T17 の機能解析

我々は GalNAc-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、神経分化に関す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、GalNAc-T17 がエンドサイトーシス経路を調節している可能性が指摘された。そこで、我々は GalNAc-T17 が関わる新たな機能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 GalNAc-T ファミリーの網羅的な発現および機能解析

近年、GalNAc-T ファミリーのいくつかのアイソザイムの機能解析がなされ、疾患との関連、および一部の内在性基質が明らかにされてきた。しかしながら、GalNAc-Tファミリーは、互いに重複する組織発現、および基質特異性を有するため、ファミリー全体の機能解析は進んでいない。我々は GalNAc-T9, -T17 等の Y サブファミリーに属するアイソザイムを中心として機能解析を行ってきたが、今年度は、ゼブラフィッシュにおける GalNAc-T ファミリーの網羅的な機能解析に着手した。

### 3) P19胚性腫瘍細胞を用いた新規神経分化モデルの確立

神経細胞の機能や分化の解析等に用いられる、多分化能を有するマウス胚性腫瘍由来 P19 細胞は、レチノイン酸存在下で浮遊培養することで、神経、およびグリア細胞へと分化する。しかしこの方法では、非神経系細胞が増殖すること、成熟した神経細胞への分化に長期間の培養が必要である等の問題点があった。我々は、接着培養系に神経分化に関わる因子を加えて培養することで、P19 細胞を短期間で効率よく神経細胞へと分化させる事に成功した。

### 3) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

ゼブラフィッシュを用いて、新規 O-グリコシド型糖鎖の機能解析を行った。今年度は糖鎖合成酵素の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 GalNAc-T17 の機能解析

HEK293T における GalNAc-T17 について、細胞生物学的手法を用いて機能解析を行い、以下の新しい知見を得た。(i) GalNAc-T17 がゴルジ局在性の分子であること。(ii) 細胞内栄養状態の指標である GlcNAc の濃度依存的に GalNAc-T17 の発現量が増加すること。(iii) GalNAc-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すること。(iv) GalNAc-T17 によるその調節メカニズムの破綻が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こと。これらの結果は GalNAc-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。

### 2) ゼブラフィッシュを用いた GalNAc-T ファミリーの網羅的な発現および機能解析

データベース検索よりゼブラフィッシュが 18 種類の GalNAc-T アイソザイムを発現していること、GalNAc-T8 と-T18 がそれぞれ5種類、および2種類のパラログ遺伝子を有することを見いだした。我々はパラログも含めてほとんど全てのアイソザイム cDNA のクローニングを完了した。次に、決定した塩基配列をもとに、ゼブラフィッシュの初期胚(主に24時間胚)における発現を whole mount in situ hybridization (WISH) 法により解析した。その結果、それぞれのアイソザイムは特徴的な発現パターンを有するものの、その多

くは脳、および尾の筋肉に発現する事が明らかとなった(Fig. 2)。さらに、GalNAc-T18 については発現抑制実験を行い、機能阻害胚において尾部に嚢胞が生じる等の表現型の変化を観察した。尾部凍結切片を解析したところ、細胞接着に関わるカドヘリンやインテグリンの局在性に変化があ

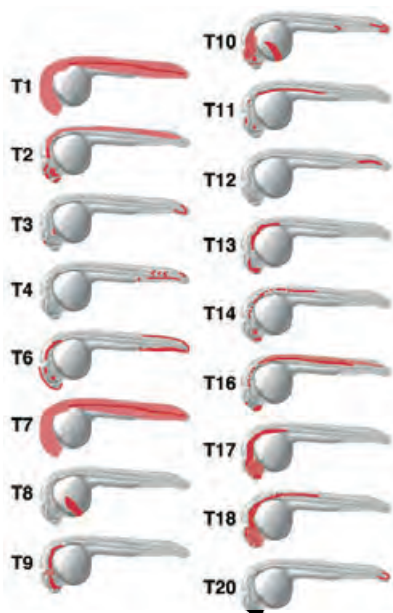


Fig. 2 Expression of GalNAc-Ts in zebrafish embryos

ることを見いだした。

### 3) P19 胚性腫瘍細胞を用いた新規神経分化モデルの確立

P19 細胞の従来の分化方法は、レチノイン酸存在下で浮遊培養し、細胞凝集塊を形成させる方法が用いられてきた。我々は、浮遊培養が非神経細胞の増殖の原因と考え、接着培養を基本とした短期間で効率の良い神経細胞分化系を確立した。これまでの神経細胞分化に関わる因子の研究に基づき、(i) ラミニンをコートした培養皿上で培養する、(ii) インスリンやトランスフェリン等の神経分化因子含む無血清培地を用いる、(iii) レチノイン酸に加えて、ノッチシグナル阻害剤である DAPT を添加する、(iv) 分化の初期段階に FGF8 を添加する等の条件を取り入れた。その結果、3~4 日目に神経突起が形成され、6 日目にはより活発な突起伸張が観察された。免疫染色やウェスタンブロットティングなどによる解析により、6 日目では成熟神経細胞への分化が認められたにもかかわらず、グリア細胞は存在しなかった。以上より、新しい方法では、P19 細胞は従来の約半分以下の時間で、効率よく神経細胞にのみ分化することが明らかとなった。

### 4) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

細胞質、および細胞外で発現する新規 O-グリコシド型糖鎖の機能を、ゼブラフィッシュを用いて調べた。我々はこの糖鎖構造の合成に関わる糖転移酵素が初期胚において脳に強く発現することを見いだした。また、本酵素の発現を抑制すると、脳において形態異常を生じるのに対し、他の組織での表現型の変化は観察されなかった。このことから、この酵素が主に脳において機能する事が示唆された。

## 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 $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser(Thr), Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser(Thr), or GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ Ser(Thr). Among them, GalNAc $\alpha$ 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 (GalNAc-Ts). GalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in

humans (Fig. 1). Interestingly, GalNAc-T8, -T9, -T17, and -T18 are catalytically inactive when assayed with classical assay methods, while GalNAc-T9 and -T17, which were 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 GalNAc-T17 is one of the genes upregulated, which are possibly involved in the fluid phase endocytosis. To assess its roles in membrane trafficking, we first biochemically characterized recombinant GalNAc-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 GalNAc-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 endocytic 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 GalNAc-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 GalNAc-T17 is involved in the control of dynamic membrane trafficking probably between the cell surface and the late endosomes through macropinocytosis, in response to the nutrient concentration as exemplified by the environmentally available GlcNAc.

### **2) Comprehensive Analysis of GalNAc-T family in zebrafish embryos**

Recently, functions and endogenous substrates of some of the GalNAc-T isozymes have been clarified. The overall function of the family, however, still remains to be elucidated. We have been investigating GalNAc-T9 and -T17 that are catalytically inert

isozymes under the conventional assay conditions. To carry out comprehensive analysis of the GalNAc-T family, the expression of all the isozymes in zebrafish embryos were investigated by WISH, finding that most of the isozymes have characteristic expression patterns in the embryos with most frequent expression in the brains and the tail muscles. We then suppressed the expressions of GalNAc-T18. Since it has two paralogue genes, designated GalNAc-T18a and -T18b, antisense morpholino oligos specific for each paralogue was designed to suppress each paralogue independently. Suppression of each paralogue gave similar morphological alterations in the embryos, giving rise to abnormal fin fold with cysts in some of the morphants. This indicates that GalNAc-T18 is involved in tail development in zebrafish.

### **3) A rapid and efficient method for neuronal induction of P19 embryonic carcinoma cell line**

P19 mouse embryonic carcinoma cells are pluripotent cells, and can differentiate into neurons and glial cells by performing nonadherent cell culture in the presence of retinoic acid (RA) to form cell aggregates. The method, however, has several drawbacks that it takes long time to differentiate into mature neurons, and that non-neuronal cells occupy the majority of cell population after day 10. To overcome these problems, we employed an adherent serum-free culture in a laminin-coated dish. A  $\gamma$ -secretase inhibitor, DAPT, and a neural inducing factor, FGF8 were included in the medium together with RA to accelerate neurogenesis. The cells were first cultured with RA, FGF8, and DAPT for 2 days, with FGF8 and DAPT for the following 2 days, and with DAPT for the last 2 days. With the new method, P19 cells efficiently differentiated into cells with neurite-like protrusions within 4 days. Western blot analysis demonstrated the expression of neural progenitor and neuron markers 2 and 4 days after the induction, respectively.

### **4) Analysis of other O-glycosylation**

We investigated the expression and roles of glycosyltransferases that are involved in the formation of novel O-glycosylation. We found that the enzyme was highly expressed in the brain, and that its suppression in zebrafish embryos resulted in altered brain development. This indicates that the enzyme is responsible for the normal development of brain.

#### 4. 発表論文

- A. Miyake, S. Nihno, Y. Murakoshi, A. Satsuka, Y. Nakayama, N. Itoh: Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mech. Dev.* **128**, 577-590
- I. Kimura, Y. Nakayama, M. Konishi, K. Terasawa, M. Ohta, N. Itoh, M. Fujimoto: Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**(7) 687-696
- Y. Nakayama, N. Nakamura, S. Oki, M. Wakabayashi, Y. Ishihama, A. Miyake, N. Itoh, A. Kurosaka: A putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase/Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSCR17) regulates lamellipodium formation and macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* **287**(38) 32222-32235
- 中村直介, 黒坂 光: ゼブラフィッシュを用いた筋ジストロフィーに  
関係する糖鎖修飾機構の解析 京都産業大学総合学術研究  
所所報 7:73-78 2012

#### 5. 著書および総説

- Y. Nakayama, N. Nakamura, D. Tsuji, K. Itoh, A. Kurosaka:  
Genetic diseases associated with protein glycosylation  
disorders in mammals. *Genetic Disorders, Intech, in press.*

#### 6. 学会発表

- A. Kurosaka, N. Nakamura, Y. Nakayama: Roles of mucin-type  
carbohydrates in zebrafish development. The 2012 CU-  
KSU-MUSC Joint Seminar in Science & Technology,  
Bangkok (Thailand) 2012.3.15-16
- Y. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka: Roles of mucin-type  
carbohydrates in endocytosis. The 2012 CU-KSU-MUSC  
Joint Seminar in Science & Technology, Bangkok (Thailand)  
2012.3.15-16
- 中村直介, 中山喜明, 田原聖明, 西村和真, 三宅歩, 伊藤信  
行, 黒坂光: ゼブラフィッシュ後脳において WBSCR17 が関  
わるムチン型糖鎖の機能解. 2012 年度 包括脳ネットワーク  
夏のワークショップ, 仙台市, 2012.7.26
- 中山喜明, 中村直介, 黒坂光: GalNAc-T 様遺伝子 WBSCR17  
はエンドサイトーシス経路を調節する. 第31回日本糖質学会  
年会. 鹿児島市. 2012.9.17-20
- A. Kurosaka, N. Nakamura, N. Nakayama: Biological roles of a  
brain-specific polypeptide GalNAc-transferase in zebrafish.  
The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science  
Associations Congress (AFLAS 2012), Bangkok (Thailand)  
2012.10.10-12.

- T. Kawai, E. Kaneda, N. Nakamura, N. Nakayama, A. Kurosaka: Functional analysis of polypeptide N-acetyl-  
galactosaminyltransferase-like 4 and 8 in zebrafish. The 5th  
Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations  
Congress (AFLAS 2012), Bangkok (Thailand) 2012.10.  
10-12.

- Y. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka: A Putative  
Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase/WBSCR17  
Regulates Cell Adhesion and Endocytic Pathways in  
HEK293T cells. American Society for Matrix Biology and  
Society for Glycobiology Joint Meeting 2012, San Diego  
(USA) 2012.11.11-14

- N. Nakamura, Y. Nakayama, A. Miyake, N. Itoh, A. Kurosaka:  
Developmental roles of mucin-type glycosylation in zebrafish.  
American Society for Matrix Biology and Society  
for Glycobiology Joint Meeting 2012, San Diego (USA)  
2012.11.11-14

- 和田あゆみ, 中山喜明, 中村直介, 黒坂光: 単層培養条件下  
におけるマウス胚性腫瘍由来 P19 細胞の神経分化誘導. 第  
35 回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2012.12.11-14

- 川合多美子, 青木俊輔, 高橋由衣, 中村直介, 中山喜明, 黒  
坂光: ゼブラフィッシュ初期発生におけるポリペプチド N-アセ  
チルガラクトサミン転移酵素の機能解析 第 35 回日本分子生  
物学会年会, 福岡市, 2012.12.11-14

- 金田鋭一, 中村直介, 中山喜明, 黒坂光: ゼブラフィッシュにお  
ける N-acetylgalactosaminyltransferase-like4 の機能解析. 第  
35 回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2012.12.11-14

#### 7. 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)

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: H22-24 年 (3 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  
GalNAc-T の解析

研究代表者: 中山喜明, 取得年度: H23-24 年 (2 年)

新学術領域, 神経糖鎖生物学

課題名:神経回路形成におけるムチン型糖鎖による新たな膜輸送制御システムの解析

研究代表者:中山喜明, 取得年度:H24-25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:H24年(1年)

学内競争的資金, 特定課題研究

課題名:モデル生物における Dystroglycan のムチン型糖鎖修飾の生理的意義

研究分担者:黒坂光, 中山喜明, 取得年度:H23-24年(2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:タイ国 Kasetsart 大学を訪問し, 協定締結の打ち合わせを行った.

黒坂光:教員免許状更新講習(モデル動物を用いた神経発生遺伝学)を担当した(2012.8.24).

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号館裏にて



# 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つの回転モーターの複合したものである。つまり、ATP 加水分解で駆動される  $F_1$  モーターと、プロトン（つまり水素イオン）で駆動される  $F_0$  モーターである。そして両者は、共通のシャフト（回転軸）で連結されている。 $F_0$  モーターがプロトンで回転すれば、 $F_1$  モーターは逆回転を強いられて、その結果、ATP が合成される。 $F_1$  モーター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、このモーター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

教授 吉田 賢右

Prof. Masasuke Yoshida, Ph.D

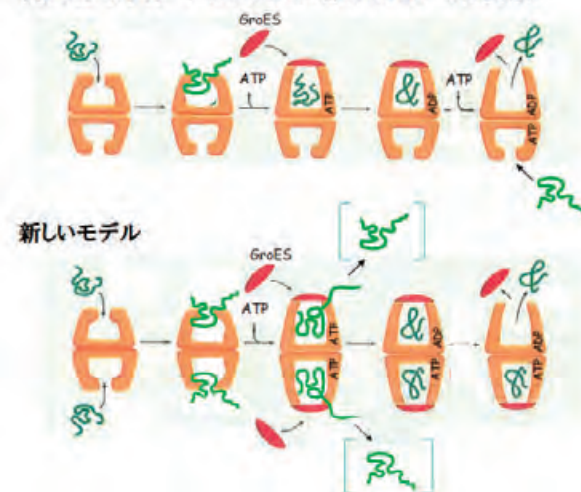
助教 元島 史尋

Assit. Prof. Fumihito Motojima, Ph.D



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。

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



### ATP 合成酵素

#### 1) トルク（回転力）が半減したモーター

ATP 合成酵素の  $F_1$  部分では、固定子は中央の回転子と 2 箇所て接している。そのうち、 $F_0$  に近いところの接触は、固定子が腕の肘 (**helix-loop-helix**) のように飛び出ている回転子と接触する。Loop を除去しても ATP 加水分解によって駆動される回転のトルクは変化しない。Helix を 1 ターン以上 (5 オングストローム) 短くする (= 肘の長さを短くする) と、トルクは半分になった。変異のない場合、ATP 加水分解にともなう固定子の構造変化によってこの肘が回転子を押し動きをしてトルクの半分を生み出している (あとの半分は別の接触部位で生成する)、ところが、変異によって肘が短くなると空振りすることになりその半分のトルクが生成できなくなった、と思われる。短小の肘を持つ ATP 合成酵素のエネルギー変換効率は半分になっているはずだが、それでもゆっくりと ATP 合成することができた。しかし、この合成は ATP 濃度がマイクロモラー (あるいはそれ以下) に達したところで平衡に達して停止する。細胞内のミリモラーの濃度の ATP を合成するためには、ATP 合成酵素のモーターは 100% 近いエネルギー変換効率がなければならない。完璧というべき変換効率は、ぜいたくではなくて、生物にとって **MUST** なのである。

2) ATP 合成反応では、 $\Delta pH$  と  $\Delta \psi$  (膜電位) は等価 ATP 合成において、膜をはさんでプロトンのポテンシャル ( $\Delta \mu H^+ = Z \Delta pH + \Delta \psi$ ;  $Z$  は定数) の高い側から低い側にプロトンが流れるエネルギーでモーターが回る。 $\Delta \mu H^+$  の式から明らかのように、エネルギー (どこで反応が平衡に達して止まるか) からみれば  $\Delta pH$  と  $\Delta \psi$  は等価である。つまり、同じ値の  $\Delta \mu H^+$  を与えるなら、個々の  $\Delta pH$  と  $\Delta \psi$  の値はどうでもいいのである。では、ATP 合成速度についてはどうかというと、式は何も語らない。それは反応機構に依存する。実験で決めるしかない。これについて、今までも 10 指にあまる論文があるが、結論は一致せず、定説は出来ていない。そこで、 $\Delta pH$  と  $\Delta \psi$  の大きさを様々に変化させて、その時の ATP 合成速度を測定した。先行論文の 1 つの欠点は、膜小胞を作成するときに使うリン脂質中に混入する  $K^+$  に気がつかなかったことである。これは、リン脂質 6 mg/ml 中に 5mM に及び、大きな誤差をもたらす。また、膜小胞内側の  $K^+ < 1mM$  にすると、 $K^+$  イオン勾配による  $\Delta \psi$  が、Nernst の式で計算した通りに生じていないらしいことがわかったので、 $K^+ < 1mM$  の実験の結果は検討から除外した。このような注意を払って得られた結果は、ATP 合成速度は個々の  $\Delta pH$  と  $\Delta \psi$  の値ではなく、ただその合計値  $\Delta \mu H^+$  にだけ依存することを示した。これは、ATP 合成反応の律速ステップは  $\Delta pH$  と  $\Delta \psi$  のどちらにも依存せず、ただプロトンの移動しやすさだけに依存することを意味する。換言すれば、プロトンが ATP 合成酵素の中を流れる時に、pH によって左右される過程 (例えば、中性の pK 値のカルボキシル基に結合解離すること) は律速になっていない。神経の  $K^+$  チャネルの結晶構造で示されたように、プロトンだけ通すフィルターと疎水的なトンネルが考えやすい。あるいは、溶液中の pH による影響を受けないカルボキシル基 (Fo-c subunit のカルボキシル基) の関与が考えられる。

### 3) ヒト ATP 合成酵素の阻害因子 IF1 の役割

ミトコンドリアには、ATP 合成酵素の阻害因子 IF1 が存在する。これは細菌や葉緑体になく小さなタンパク質であり、ATP 合成酵素に結合してその ATP 加水分解活性を阻害することが、in vitro の実験からわかっている。実際の細胞で、IF1 がどのような状況でどんな作用をするのか、調べた論文がいくつか発表されているが、矛盾した結果があり、定説がない。それは、一過性のノックダウン細胞を使っているがゆえの結果の不安定性である、と考えて、ずっと IF1 のノックダウン状態の続く細胞をつくって調べた。その結果、IF1 ノックダウン細胞では次のことが観察された。細胞中の ATP 濃度が少し下がる、ミトコンドリアの  $\Delta \psi$  が少し上昇する、過酸化物が少し増

える。しかし、細胞の増殖やグルコースの消費やミトコンドリアの ATP 合成は影響を受けない。以前に報告されたミトコンドリアの形態の変化は認められない。ミトコンドリアが  $\Delta \mu H^+$  を失うと、ATP 濃度が急降下するが 10 分ほどで回復する (野生型細胞は急降下が見られない)。虚血とグルコース除去という条件では、正常細胞も死んでしまうが、IF1 ノックダウン細胞は正常細胞よりも少し早く死ぬ。したがって、IF1 は ATP 濃度の維持に役立っているものの、細胞の生存にそれほど決定的な影響を及ぼさない、と言える。

### 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*

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) 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. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> is also able to catalyze the reverse reaction, ATP hydrolysis-driven proton pumping, which actually occurs in some cases and conditions. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> is a motor enzyme composed of two rotary motors, membrane integral F<sub>0</sub> which converts

the proton motive force into rotation, and water-soluble  $F_1$  which converts the rotation into synthesis of ATP.  $F_1$  has a subunit composition of  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$  and acts as ATPase when isolated.

In  $F_1$ , the central  $\gamma$  subunit rotates inside the  $\alpha_3\beta_3$ -ring. Here we report structural features of  $F_1$  responsible for torque generation and catalytic ability of the low-torque  $F_0F_1$ . (i) Deletion of one or two turns in the  $\alpha$ -helix in the C-terminal domain of catalytic  $\beta$  subunit at the rotor/stator contact region generates mutant  $F_1$ s, termed  $F_1(1/2)$ s, that rotate with about half the normal torque. This helix would support the helix-loop-helix structure acting as a solid “pushrod” to push the rotor  $\gamma$  subunit, but the short helix in  $F_1(1/2)$ s would fail to accomplish this task. (ii) Three different half-torque  $F_0F_1(1/2)$ s were purified and reconstituted into proteoliposomes. They carry out ATP-driven proton-pumping and build up the same small transmembrane  $\Delta pH$ , indicating that the final  $\Delta pH$  is directly related to the amount of torque. (iii) The half-torque  $F_0F_1(1/2)$ s can catalyze ATP synthesis, though slowly. The rate of synthesis varies widely among the three  $F_0F_1(1/2)$ s, which suggests that the rate reflects subtle conformational variations of individual mutants.

The proton motive force that drives this reaction consists of two components, the pH difference ( $\Delta pH$ ) across the membrane and transmembrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ). The two are considered thermodynamically equivalent, but kinetic equivalence in the actual ATP synthesis is not warranted, and previous experimental results vary. Here, we show that with the thermophilic *Bacillus* PS3 ATP synthase that lacks an inhibitory domain of the  $\varepsilon$  subunit,  $\Delta pH$  imposed by acid-base transition and  $\Delta\psi$  produced by valinomycin-mediated  $K^+$  diffusion potential contribute equally to the rate of ATP synthesis within the experimental range examined ( $\Delta pH$  -0.3 to 2.2,  $\Delta\psi$  -30 to 140 mV, pH around the catalytic domain 8.0). Either  $\Delta pH$  or  $\Delta\psi$  alone can drive synthesis, even when the other slightly opposes.  $\Delta\psi$  was estimated from the Nernst equation, which appeared valid down to 1 mM  $K^+$  inside the proteoliposomes, due to careful removal of  $K^+$  from the lipid.

It has been known that isolated IF1, an evolutionarily well-conserved mitochondrial protein, can inhibit the ATP hydrolysis activity of  $F_0F_1$ . We generated HeLa cells with permanent IF1-knockdown (IF1-KD cells) and compared their energy metabolism with control cells. Under optimum growth conditions, IF1-KD cells have lower cellular ATP levels and generate a higher pmf and more reactive oxygen species. Nonetheless, IF1-KD cells and control cells show the same

rates of cell growth, glucose consumption and mitochondrial ATP synthesis. Furthermore, contrary to previous reports, the morphology of mitochondria in IF1-KD cells appears to be normal. When cells encounter sudden dissipation of pmf, the cytoplasmic ATP level in IF1-KD cells drops immediately (~1 min) while it remains unchanged in the control cells, indicating occurrence of futile ATP hydrolysis by  $F_0F_1$  in the absence of IF1. The lowered ATP level in IF1-KD cells then recovers gradually (~10 min) to the original level by consuming more glucose than control cells. The viability of IF1-KD cells and control cells is the same in the absence of pmf. Thus, IF1 contributes to ATP homeostasis but its deficiency does not affect the growth and survival of HeLa cells. Only when cells are exposed to chemical ischemia (no glycolysis and no respiration) or high concentrations of reactive oxygen species, does IF1 exhibit its ability to alleviate cell injury.

#### 4. 発表論文

- Usukura E, Suzuki T, Furuike S, Soga N, Saita E, Hisabori T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Torque generation and utilization in motor enzyme  $F_0F_1$ -atp synthase: half-torque  $F_1$  with short-sized pushrod helix and reduced atp synthesis by half-torque  $F_0F_1$ . *J Biol Chem*. 2012 Jan 13; 287(3): 1884-91.
- Soga N, Kinoshita K, Yoshida M, Suzuki T. Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis. *J Biol Chem*. 2012 Mar 16; 287(12): 9633-9.
- Mizuno S, Nakazaki Y, Yoshida M, Watanabe YH. Orientation of the amino-terminal domain of ClpB affects the disaggregation of the protein. *FEBS J*. 2012 Apr; 279(8): 1474-84. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08540.x. Epub 2012 Mar 16
- Konno H, Nakane T, Yoshida M, Ueoka-Nakanishi H, Hara S, Hisabori T. Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol*. 2012 Apr; 53(4): 626-34. doi: 10.1093/pcp/pcs018. Epub 2012 Feb 22.
- Yumen I, Iwasaki I, Suzuki T, Todokoro Y, Tanaka K, Okada O, Fujiwara T, Yoshida M, Akutsu H. Purification, characterization and reconstitution into membranes of the oligomeric c-subunit ring of thermophilic F(o)F(1)-ATP synthase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2012 Apr; 82(2): 396-401. Epub 2012 Feb 20.
- Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial  $F_0F_1$ , to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell

- viability. *J Biol Chem.* 2012 May 25; 287(22): 18781-7. Epub 2012 Apr 9
- Adachi K, Oiwa K, Yoshida M, Nishizaka T, Kinoshita K Jr. Controlled rotation of the F(1)-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis. *Nat Commun.* 2012 Aug 28; 3: 1022. doi: 10.1038/ncomms2026.
- Nojima T, Ikegami T, Taguchi H, Yoshida M. Flexibility of GroES Mobile Loop Is Required for Efficient Chaperonin Function. *J Mol Biol.* 2012 Sep 14; 422(2): 291-9. Epub 2012 May 25.
- Suno R, Shimoyama M, Abe A, Shimamura T, Shimodate N, Watanabe YH, Akiyama Y, Yoshida M. Conformational transition of the lid helix covering the protease active site is essential for the ATP-dependent protease activity of FtsH. *FEBS Lett.* 2012 Sep 21; 586(19):3117-21
- Motojima F, Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M. Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25; 109(39): 15740-5.
- Nojima T, Konno H, Koderia N, Seio K, Taguchi H, Yoshida M. Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA backbone. *PLoS One.* 2012; 7(12): e52534. doi: 10.1371/journal.pone.0052534. Epub 2012 Dec 26.

## 5. 著書および総説 なし

## 6. 招待講演、シンポジウム等

- Yoshida M: Mammalian IF1, an inhibitor of ATP synthase in mitochondria; from single molecule to KO mouse. The 17th European Bioenergetics Conference・2012. 9. 16・フライブルグ/ドイツ
- 吉田賢右: 回転する ATP 合成酵素の機構と制御. 九州大学 2012. 2. 29
- 吉田賢右: ATP 合成酵素のモーターとブレーキ. 秋田大学 2012. 10. 23
- 吉田賢右: ATP 合成酵素の機構と制御. 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 2012. 11. 29
- 吉田賢右, 元島史尋: シャペロニンの新しい作用機構. 蛋白質科学会, 名古屋 2012. 6. 20
- 元島史尋: シャペロン補助フォールディングにおける揺らぎ制御の役割. 新学術領域「揺らぎと生体機能」第5回公開シンポジウム 2012. 1. 7
- 元島史尋: シャペロン補助フォールディングにおける揺らぎ制御の役割. 新学術領域「揺らぎと生体機能」「水と ATP」合同公開シンポジウム 2012. 9. 14

## 7. 学会発表

- 島袋勝弥, 野田直紀, 吉田賢右, Thomas M. Roberts. Ascaris 精子をもちいたアメーバ運動装置の in vitro 再構成 Simulta 日本生物物理学会年会 2012. 9. 22-23. 名古屋
- 税田英一郎, 木下一彦, 吉田賢右. Torque input/output profiles of F1-ATPase. 日本生物物理学会. 年会 2012. 9. 22-23. 名古屋
- 菅原佳奈子, 藤川誠, 吉田賢右. Chemical screening of protein kinase affected mitochondrial ATP-synthesis. 日本発生物学会・日本細胞生物学会合同大会・2012. 5. 28-31. 神戸
- Kanako Sugawara, Makoto Fujikawa, Masasuke Yoshida Screening of protein kinase inhibitors that affect ATP synthesis activity using MASC assay. The 17th European Bioenergetics Conference・2012. 9. 15-22・フライブルグ/ドイツ
- 菅原佳奈子, 藤川誠, 吉田賢右. ATP 合成酵素の活性に影響する因子の探索. 日本生体エネルギー研究会第38回討論会・2012. 12. 22-24. 岡山
- M. Fujikawa, M. Yoshida. Novel factors essential for human mitochondrial FoF1-ATP synthase activity found by MASC (Mitochondrial Activity of SLO-permeabilized Cells) screening The 17th European Bioenergetics Conference・2012, 9/15-22・フライブルグ/ドイツ
- M. Fujikawa, M. Mori, K. Sugawara, M. Yoshida. Functional identification of unknown genes localized at mitochondria using MASC assay. 日本発生物学会・日本細胞生物学会合同大会・2012.5. 28-31. 神戸
- 藤川誠, 吉田賢右. MASC アッセイスクリーニングで同定した新規ミトコンドリア蛋白質 C2orf47 は FoF1-ATP 合成酵素に必須であり, グルコース供給レベルに応じて発現制御される. 日本生体エネルギー研究会・2012. 12. 22-24. 岡山
- Taniguchi M, Suzuki S, Berney M, Yoshida M, and Cook GM. Physiological Importance of the Epsilon Subunit of Bacterial FOF1-ATP Synthase The 17th European Bioenergetics Conference・2012. 9/15-22・フライブルグ/ドイツ
- 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 サブユニットの生理学的解析. 日本生体エネルギー研究会・2012. 12. 22-24. 岡山
- 鈴木俊治, 田中一巳, 若林千晃, 税田英一郎, 古池 晶, 木下一彦, 吉田賢右. Single-molecule analyses of the rotation and regulation of human F1-ATPase. 日本生物物理学会, 2012. 9. 22-23, 名古屋
- 鈴木俊治, 田中一巳, 若林千晃, 古池 晶, 税田英一郎, 木下一彦, 吉田賢右. Single-molecule analyses of the rotation and regulation of human F1-ATPase. 日本生化学会, 2012. 12. 14-16. 福岡
- 元島史尋, 元島 (宮崎) 優子, 吉田賢右. The conformational restriction of denatured protein encapsulated in the chaperonin cage.

日本生物物理学会、2012. 9. 22-23、名古屋  
元島史尋、元島（宮崎）優子、吉田賢右、シャペロニンが kinetically-trapped state を回避しつつタンパク質をフォールドするメカニズム、日本生化学会、2012. 12. 14-16、福岡  
元島（宮崎）優子、元島史尋、吉田賢右、大腸菌 Hsp90 (HtpG) の基質タンパク質のスクリーニング、日本生化学会、2012. 12. 14-16、福岡  
田中翔太、元島（宮崎）優子、元島史尋、吉田賢右、Split luciferase のシャペロニンによるフォールディング、日本生化学会、2012. 12. 14-16、福岡  
藤井克弥、新谷大基、Daniel Xu、元島史尋、吉田賢右、シャペロニン空洞内に閉じ込めたタンパク質の熱変性、日本生化学会、2012. 12. 14-16、福岡

## 8. その他特記事項

### 1. 外部資金；

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

研究代表者：吉田賢右（H23-27）

科学研究費補助金・基盤研究（S）

課題名：ATP合成酵素の構造と制御と生理

研究代表者：吉田賢右（H23-25）

科学研究費補助金 新学術領域研究「天然変性タンパク質」

課題名：天然変性タンパク質と分子シャペロンの相互作用の解明

研究代表者：吉田賢右（H24-25）

科学研究費補助金 新学術領域研究「揺らぎと生体機能」

課題名：シャペロニン援助フォールディングにおけるタンパク質の揺らぎ制御の解析

研究代表者：元島史尋（H23-24）

### 2. 知財権等；

なし

### 3. 学外活動；

吉田賢右: 東京大学医学部非常勤講師

吉田賢右: JST CREST 「ライフサイエンスの革新をめざした構造生命科学と先端的基盤技術」領域アドバイザー

# 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、 $\beta$ -1,3と $\beta$ -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。

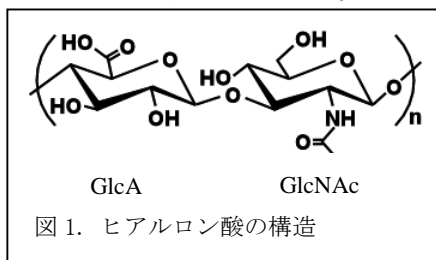


図1. ヒアルロン酸の構造

### 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

教授 板野 直樹

Prof. Naoki Itano, Ph.D.



確な機構については、未だ十分な解明がなされていない。近年、多くの癌において、「癌幹細胞」の存在が報告されており、この細胞が癌の源であるという考えに注目が集まっている。癌幹細胞は、従来の化学療法や放射線治療に抵抗性を示すことから、転移や再発を引き起こす最大の要因と考えられ、根治的治療の標的として重要視されている。

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

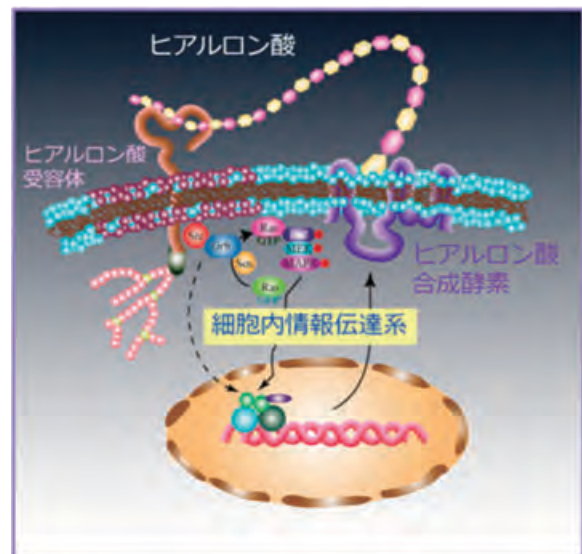


図2. ヒアルロン酸合成とシグナル伝達

## 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  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -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

I. Sakabe, A. Asai, J. Iijima, and M. Maruyama: Age-related guanine nucleotide exchange factor, mouse Zizimin2, induces filopodia in bone marrow-derived dendritic cells. *Immun. Ageing*. in press

V. Goncharova, N. Serobyany, S. Iizuka, I. Schraufstatter, A. de Ridder, T. Povaliy, V. Wacker, N. Itano, K. Kimata, I.A. Orlovskaja, Y. Yamaguchi and S. Khaldoyanidi: Hyaluronan expressed by the hematopoietic microenvironment is required for bone marrow hematopoiesis. *J. Biol. Chem.* 287(30):25419-25433 (2012)

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) 35(3):408-412 (2012)

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 tetraphorbol ester application or full-thickness wounding in mice lacking hyaluronan synthases Has1 and Has3. *J. Invest. Dermatol.* 132(1):198-207 (2012)

#### 5. 総説・著書および総説

なし

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

板野直樹 ヒアルロン酸腫瘍微小環境の形成と癌の進展 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012. 4. 28.

板野直樹 ヒアルロン酸合成促進剤開発のためのスクリーニングシステム 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」、京都、2012. 1. 27.

#### 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  
日本生化学会評議員  
日本糖質学会評議員  
日本結合組織学会評議員  
日本がん転移学会評議員  
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  
GlycoScience Protocol Online Database 分担執筆  
N. Itano: Application of anti-GAG antibody and biotinylated hyaluronan binding protein(bHABP) (1) ~ Detection of hyaluronan using biotinylated hyaluronan binding proteins. *GlycoPOD*  
<http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t173> (2012)  
N. Itano: Enzyme assay of hyaluronan synthase. *GlycoPOD*  
<http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t126> (2012)



岡山大学平成 24 年度医学研究インターンシップ学生の受け入れと指導、平成 24 年 9 月 3 日～11 月 28 日  
岡山大学院医歯薬学総合研究科・大橋俊孝先生（右奥）、岡山大学医学部 3 年生・岡田征大さん（中央奥）と研究室のメンバー



# 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 井尻 貴之

Assist. Prof. Takashi Ijiri, Ph.D



## 1. 研究概要

発がんの3大原因は放射線、化学物質、ウイルスと言われている。このなかでウイルス発がんは、1911年のペイトン・ラウス博士によるニワトリに肉腫をつくるウイルス、すなわちラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)の発見をその研究の端緒としている。この歴史的な発見は、およそ半世紀を経たのちになされたラウス肉腫ウイルスのがん遺伝子であるウイルス性サーク遺伝子(v-src)の発見、およびこの発がん遺伝子によく似た構造をもつニワトリ細胞性がん遺伝子あるいは原がん遺伝子の細胞性サーク遺伝子(c-src)の発見、そしてこれら2つの遺伝子からつくられるタンパク質産物(Srcと総称する)それぞれに共通に見られるタンパク質チロシンリン酸化酵素活性(protein-tyrosine kinase activity)の発見へとつながり、現代の分子・細胞レベルのシグナル伝達機構研究の礎のひとつとなっている。発生情報学研究室では、アフリカツメガエルの卵細胞や初期胚、およびいくつかの種類のヒト培養がん細胞をモデル実験系として用い、それらの細胞機能におけるSrcの役割を明らかにするという課題に取り組んでいる。

アフリカツメガエルの卵細胞や初期胚を用いた研究(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、および受精に伴う卵細胞膜微小領域(膜マイクロドメイン)の構造と機能の変化

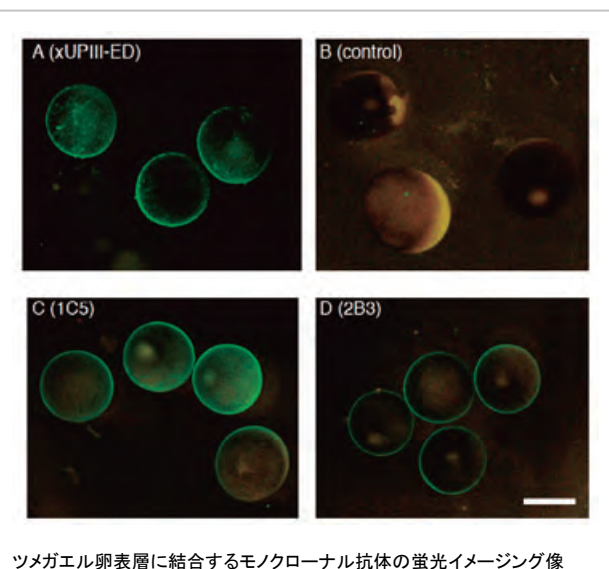
また、ヒトがん細胞を用いた研究(がん細胞プロジェクト)では、以下の3点に重点を置いている。

- 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

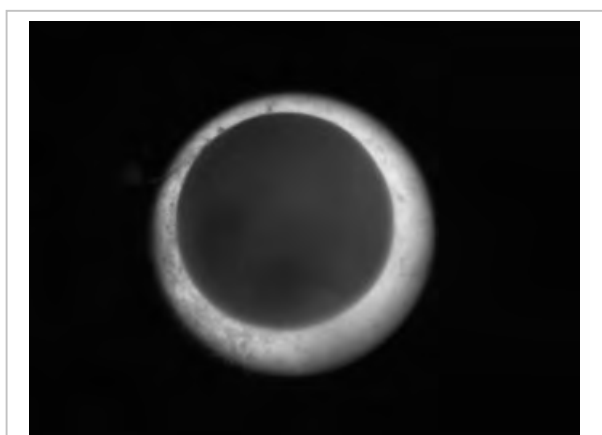
がん細胞プロジェクトで昨年までに得られた知見を中心にまとめた内容を大学院生による学会発表および学術雑誌などで発表することができた(*Biology Open*, *J. Signal Transd.* など)。卵細胞プロジェクトでは以下の知見が得られた(一部については論文投稿準備中)。

未受精卵(MII oocytes/unfertilized eggs)から調製した膜マイクロドメイン(MD)に精子やカテプシンBを添加すると Src の活性化や uroplakin IIIa のリン酸化、およびセルフリー未受精卵抽出液における細胞周期の再開といった受精に伴うシグナル伝達反応が誘導される。未成熟卵母細胞(GV oocytes)から調製した MD ではこの受精シグナル伝達反応の試験管内再構成ができないことが明らかとなった。わたしたちはこれまでに精子受容体の候補分子である uroplakin IIIa の卵表層における発現状態が、未成熟卵母細胞とインビトロでプロゲステロン処理を受けた成熟卵母細胞あるいは生体ホルモン処理により成熟・排卵された未受精卵とのあいだで異なることを明らかにしている。このことが上記の卵成熟前後での MD 機能の変化に関係している可能性がある。



卵細胞膜タンパク質(MD 局在タンパク質を含む)を抗原とするラットモノクローナル抗体ライブラリを作成し、未受精卵の表層および卵細胞から可溶化された特定の卵タンパク質に対する特異的結合性をもつ抗体クローンのスクリーニングを

行った。その結果、10種類程度の抗体クローンが選抜された（上図は間接蛍光抗体法による抗体の卵表層への結合の様子を示す）。今後これらの抗体クローンの標的タンパク質の分子同定や抗体が結合することによる卵細胞の機能の変化（受精阻害あるいは精子非依存的な卵活性化の誘導等）を検証する。また前述の実験結果を受けて、MD プロテオームの卵成熟に伴う変化や未受精卵 MD における動物極と植物極プロテオームの違いを2次元電気泳動法により明らかにするための実験を行いつつある。



ATP センサータンパク質 ATeam を微小注入した透明化ツメガエル卵の蛍光イメージング像(本学総合生命科学部の横山謙博士、京都大学の今村博臣博士、山口大学の岩尾康宏博士らとの共同研究)

本学で研究スペース(15125 実験室)を共同利用している横山謙教授・同研究室および学外の研究者との共同で、生体内 ATP イメージングプローブである ATeam タンパク質を用いた卵細胞 ATP 可視化プロジェクトの実行に着手した(上図)。現在は予備実験の段階で、次年度中に卵成熟および受精時における卵細胞 ATP 動態(上記イメージングに加えて生化学的な手法による ATP 絶対定量も並行して行う)を明らかにすることを目標としている。

### 3. Research projects and annual reports

In African clawed frog *Xenopus laevis*, an anuran amphibian species, fertilization involves a rapid and transient activation of the egg tyrosine kinase Src in the plasma membranes. Pharmacological inhibition of Src or expression of kinase-defective mutant of Src results in a failure in the occurrence of events associated with egg activation (e.g. transient  $Ca^{2+}$  release) induced by sperm or other parthenogenetic activation treatments (e.g. protease, hydrogen peroxide). Reportedly, other species such as sea urchin, starfish, zebrafish, and ascidian employ a similar Src-dependent mechanism of fertilization, whereas mammalian species and newt, a urodele amphibian species, do not. Thus, our goal is not only to elucidate the molecular detail of the Src-dependent fertilization system in *Xenopus* but also to understand how such system has been evolved and sort out during biological evolution. For the past years, we have shown that

low-density detergent-insoluble membrane microdomains (MDs) of *Xenopus* eggs may serve as a platform for gamete interaction and subsequent Src-dependent signaling. Results so far obtained in our study are: 1) disruption of the egg MDs with M $\beta$ CD results in a failure in sperm-induced egg activation, 2) tyrosine phosphorylation of Src and PLC $\gamma$ , a substrate of the activated Src that is directly important for IP $_3$  production and transient  $Ca^{2+}$  release, occurs in the egg MDs, 3) a single transmembrane protein uroplakin III (UPIII), another MD-associated protein, acts as a substrate of Src as well as a target of sperm-derived protease that acts on the egg surface at fertilization, and 4) sperm-induced Src activation can be reconstituted by the use of MD fractions prepared from unfertilized eggs (MII-MDs). Further experiments in this year 2012 demonstrate that MII-MDs, but not MDs isolated from immature ovarian oocytes (GV-MDs), augments the ability of sperm to fertilize eggs that are treated with a specific antibody to UPIII, and that sperm-induced Src activation and other egg activation events can not be reconstituted in GV-MDs. These results suggest that gamete interaction involves signaling from egg MDs to sperm and that oocyte maturation and/or ovulation is an important process for the egg MDs to acquire full competency for fertilization.

### 4. 発表論文(すべて査読あり)

- S. Kihira, J. Yoshida, Y. Kawada, Y. Hitomi, T. Asada, R. Hisatomi, A. Ohta, T. Iwasaki, A.K.M. Mahub Hasan, Y. Fukami, K. Sato: Membrane microdomain-associated uroplakin IIIa contributes to Src-dependent mechanisms of anti-apoptotic proliferation in human bladder carcinoma cells. *Biology Open* 1:1024-34 (2012)
- T.W. Ijiri, A.K.M. Mahub Hasan, K. Sato: Protein-tyrosine kinase signaling in the biological functions associated with sperm. *Journal of Signal Transduction* 2012:181560 (2012)
- A.K.M. Mahub Hasan, T. Ijiri, K. Sato: Involvement of Src in the adaptation of cancer cells under microenvironmental stresses. *Journal of Signal Transduction* 2012:483796 (2012)

### 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* pp.499-554 (On-line book published by InTech Open Access Publisher) (2012)
- 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* pp. 447-498 (On-line book published by InTech Open Access Publisher) (2012)

### 6. 招待講演、国際シンポジウム・会議等

佐藤賢一：配偶子膜マイクロドメインに焦点をあてた受精シグナル機構の解析、基礎生物学研究所共同利用共同研究・研究会「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」、東岡崎市、2012.5.14～15

K. Sato: Membrane microdomain-associated uroplakin IIIa contributes to Src-dependent anti-apoptosis in human bladder carcinoma cells. Gordon Research Conference on Cell Death, Lucca (Barga, Italy), 2012.7.15～20

A.K.M. Mahbub Hasan, S. Kushima, T. Matsumoto, A. Hashimoto, Y. Maekawa, Y. Sanda, T. Tosaka, Y. Isozaki, K. Kotera, T.W. Ijiri, and K. Sato: Membrane microdomain (MD)-mediated crosstalk in fertilization signaling of the frog *Xenopus laevis*. The International Meeting on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Joint Meeting of the 2<sup>nd</sup> Allo-authentication Meeting and the 5<sup>th</sup> Egg-coat Meeting (MCBEEC), Nagoya, 2012.11.12～16

T.W. Ijiri, J. Kishikawa, H. Imamura, Y. Iwao, K. Yokoyama, and K. Sato: ATP quantification in *Xenopus laevis* oocyte/egg during maturation and fertilization: for further ATP imaging. The International Meeting on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Joint Meeting of the 2<sup>nd</sup> Allo-authentication Meeting and the 5<sup>th</sup> Egg-coat Meeting (MCBEEC), Nagoya, 2012.11.12～16

## 7. 国内学会、研究会議など

佐藤賢一：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、下田市、2012.6.12-6.14.

佐藤賢一：卵細胞膜マイクロドメインを足場とする受精シグナル伝達機構。生殖研究ワークショップ／第5回生殖若手の会、三崎市、2012.7.26-7.28.

井尻貴之：MBL サマーコース Frontiers in Reproduction への誘い。生殖研究ワークショップ／第5回生殖若手の会、三崎市、2012.7.26-7.28.

松本尚士、玖島将太、山田力志、澤田均、佐藤賢一：試験管内再構成実験によるツメガエル卵の受精シグナル関連分子の探索。第83回日本動物学会大会、大阪市、2012.9.13-9.15.

城下歩美、志賀圭子、上野智代、佐藤賢一、岩尾康宏：マトリクスメタロプロテアーゼによる電位感受性なツメガエル受精。第83回日本動物学会大会、大阪市、2012.9.13-9.15.

佐藤賢一、深見泰夫：ヒト膀胱がん細胞の血清飢餓抵抗性増殖機構における Src および uroplakin IIIa の役割。第71回日本癌学会総会、札幌市、2012.9.19.-9.21.

吉田潤平、紀平成、人見侑里子、井尻貴之、佐藤賢一：ヒト膀胱および非膀胱がん細胞におけるウロプラキン IIIa の発現と機能。第35回日本分子生物学会年会、福岡市、2012.12.11-14.  
紀平成、吉田潤平、矢羽大基、井尻貴之、佐藤賢一：血清飢餓

培養環境下におけるヒト膀胱がん細胞の Src 依存的 MAPK 非依存的増殖機構。第35回日本分子生物学会年会、福岡市、2012.12.11-14.

マブズハサン AKM、玖島将太、松本尚士、三田勇樹、戸阪朋樹、磯崎功明、小寺啓太、井尻貴之、佐藤賢一：Membrane microdomain-mediated gamete interaction and signaling in fertilization of the frog *Xenopus laevis*. 第35回日本分子生物学会年会、福岡市、2012.12.11-14.

井尻貴之、岸川淳一、今村博臣、岩尾康宏、横山謙、佐藤賢一：ATP quantification in *Xenopus laevis* oocyte/egg during maturation and fertilization: for further ATP imaging. 第35回日本分子生物学会年会、福岡市、2012.12.11-14.

## 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

### 2. 知財権等 該当なし

### 3. 学内外の諸活動

京都産業大学パイオフォーラムを3回(2月3日、5月28日、11月19日)および生命科学セミナーを1回(4月6日)、それぞれ企画・開催した(詳細は別記シンポジウム等開催一覧を参照)。

共同主催で生殖研究ワークショップ／第5回生殖若手の会(7月26～28日、東京大学三崎臨海実験所)を企画・実施した。

### 4. 受賞等 該当なし

### 5. その他

2012年2月1日に井尻貴之博士が助教として新規参画した。



研究室写真：卒業記念アルバム用に撮影(2012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 130kDa 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) 食道がんにおける線維芽細胞増殖因子受容体 3 アイソフォーム C (FGFR3IIIc) のがん悪性化促進メカニズムの解析

食道がんは、90%以上が扁平上皮がんであり、浸潤性が高く、進行性のがんである。食道がんの治療方法は内視鏡

治療、手術的治療、放射線治療、化学療法であり、がんの進行度などにより治療方法が選択される。しかし、食道がんは胃がん、大腸がんを含む消化管のがんよりもリンパ節転移が生じやすい。胃がんのリンパ節転移は 11.9%、大腸がんは 10% に対して、食道がんは 30% 以上である。そのため、予後が極めて悪く、食道がんの手術的治療後 5 年生存率は 20% である。日本での食道がんにおける累計罹患リスク (ある年齢までにある病気に罹患するおおよその確率) は、男性は 52 人に 1 人、女性は 246 人に 1 人となっている (2005 年)。

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF) の受容体である線維芽細胞増殖因子受容体 3 (Fibroblast growth factor receptor: FGFR3) の過剰発現や変異によるがんの悪性化は膀胱がん、メラノーマ、多発性骨髄腫で報告されている。最近の研究において膀胱がん、多発性骨髄腫において FGFR3 特異的に結合する抗体、FGFR3 のチロシンキナーゼ阻害剤により、FGFR3 の過剰な活性化が阻害され、がん細胞の増殖が抑制されることが示されている。これらの結果から、FGFR3 の過剰な活性化はがん細胞の増殖などのがんの悪性化に関与しており、FGFR3 を標的としたがん治療薬の開発を期待することができる。

FGFR3 は、選択的スプライシングにより IIIb アイソフォームと IIIc アイソフォームを生じる。上皮では主に IIIb アイソフォームが発現しており、間充織では主に IIIc アイソフォームが発現している。我々の以前の研究において、約 86% の食道の扁平上皮がん患者において、がん組織で FGFR3IIIc の遺伝子発現が亢進していることを RT-PCR により見出した。この結果から、食道がんにおいて FGFR3IIIc の発現が亢進することにより、がん悪性化が促進されることが示唆された。本研究では、FGFR3IIIc の発現亢進によるがん悪性化促進のメカニズムを解析する。

#### 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

血管内皮増殖因子 (VEGF-A) は、腫瘍において腫瘍血管新生を誘導し、癌細胞の増殖と生存と転移を促進することが知られている。我々は、VEGF-A が血管内皮細胞の増殖・遊走を促進するだけではなく、オートクリンによって癌細胞の生存、増殖を促進することを、転移性のヒト皮膚扁平上皮癌由来の DJM-1 細胞を用いて示した。さらに、VEGF-A の DJM-1 細胞への効果は VEGFR 依存性ではなく、血管内皮細胞と癌細胞に発現が確認されているニューロピリン-1 (NRP1) に依存していることを示した。DJM-1 細胞において、VEGF-A は NRP1 を介して足場非依存状態でのコロニー形成を促進した。可溶化型 NRP1 (sNRP) を作成し、DJM-1 細胞に添加すると、DJM-1 細胞のコロニー形成が抑制された。また、VEGF-A による NRP1 シグナルは、GIPC1 と RhoGEF の一種である Syx の複合体形成を誘導した。細胞骨格の再編成に関わる低分子量 G タンパク質である RhoA は、VEGF-A によって活性化され、NRP1、GIPC1、Syx に依存していることを示した。さらに、RhoA の活性を RhoA 特異的な阻害剤である C3 exoenzyme によって阻害すると、DJM-1 細胞のコロニー形成が抑制された。以上の結果から、VEGF-A は NRP1 を介して GIPC1/Syx 複合体形成を誘導することで RhoA を活性化し、DJM-1 細胞のコロニー形成を促進していることが示唆された。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。

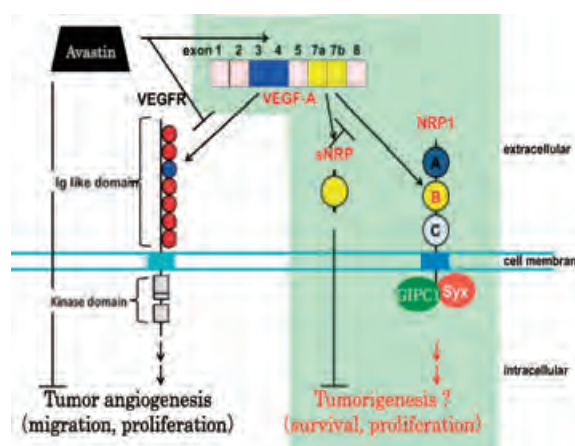


図1 可溶型 NRP1 は、悪性上皮がん細胞のコロニー形成を抑制するが、アバスタチンは抑制しない。VEGF-A のチロシンキナーゼ型レセプター VEGFR へ結合するドメイン (青色) と NRP1 に結合するドメイン (黄色) が異なっているため、VEGF-A の VEGFR と NRP1 への結合を Avastin と可溶型 NRP1 でそれぞれ特異的に抑えることが出来る。その結果、可溶型 NRP1 が悪性上皮がん細胞の増殖を抑えることが分かった。

### 2) 食道がんにおける線維芽細胞増殖因子受容体 3 アイソフォーム C (FGFR3IIIc) のがん悪性化促進メカニズムの解析

食道の扁平上皮がん患者において、がん組織由来の RNA を用いた RT-PCR によって FGFR3IIIc の発現が亢進していることを見出した。FGFR3IIIc の発現ががん細胞に由来するのか、腫瘍組織に進入した間葉系細胞に由来するのか調べるため、食道がん患者の腫瘍組織をもちいて免疫組織染色法により解析した。その結果、食道がん細胞に FGFR3IIIc の発現が認められたが、隣接する正常上皮細胞には FGFR3IIIc の発現は認められなかった (図2)。

本研究では、食道がんにおける FGFR3IIIc のがん悪性化促進メカニズムを解析するために、FGFR3IIIc の発現が低い食道がん細胞株の ECGI-10 細胞を用いて検討した。ECGI-10 細胞に FGFR3IIIc を過剰発現させて、FGFR3IIIc の発現亢進による細胞増殖能、細胞遊走能および細胞浸潤能を評価した。その結果、FGFR3IIIc を過剰発現させることにより、FGF 非依存的に細胞増殖能、細胞遊走能および細胞浸潤能が亢進した。また、FGFR3IIIc を過剰発現させることにより、FGF 非依存的な FGFR3IIIc のリン酸化が認められた。FGFR3IIIc を過剰発現させることにより、細胞表面上に存在する FGFR3IIIc の密度が高まることによって、FGF 非存在化で FGFR3IIIc の二量体化が起こり、FGFR3IIIc のリン酸化が生じたと考えられる。または、本来正常上皮細胞で

は FGFR3IIIc が発現していないが、がん化した上皮細胞に FGFR3IIIc が発現することにより未確認の FGF リガンドによるオートクリン活性化により、FGFR3IIIc がリン酸化された可能性も考えられる。

以上の結果から、食道がん組織において、FGFR3IIIc が発現亢進することにより、FGFR3IIIc がリン酸化されるため、細胞内シグナル伝達が活性化され、細胞増殖能、遊走能および浸潤能を亢進させることにより、食道がんの悪性化を促進させていることが示唆された。

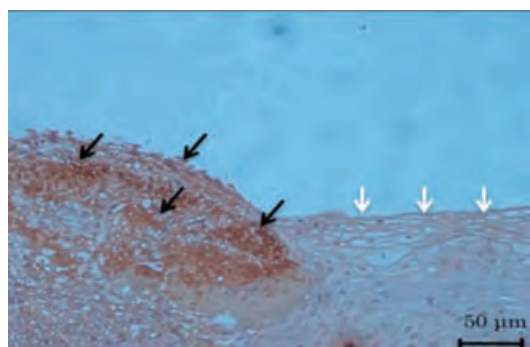
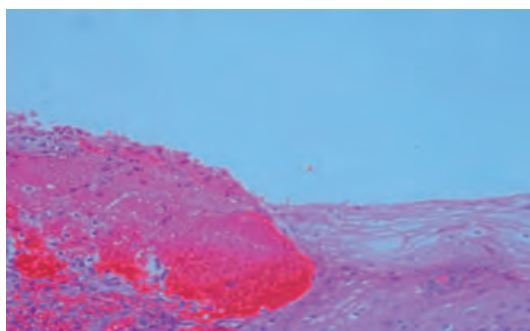


図2 食道がん組織切片における FGFR3IIIc の発現

上) H&E 染色。写真の左側が食道がん組織で、右側は正常食道上皮組織。

下) FGFR3IIIc に対する特異的抗体での染色。左側黒矢印が FGFR3IIIc を発現しているがん細胞(茶色)。右側の白矢印で示した正常上皮細胞は、FGFR3IIIc を発現していない。

### 3) 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

我々は今までの研究で、カルマン症候群原因遺伝子 *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 40% 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。

COS7 細胞に Neogenin を発現し、Alkaline Phosphate を連結した RGMa(RGMa-AP)を相互作用させ発色させたところ、COS7 細胞が青く染色され RGMa-AP の Neogenin への結合が認められた。同時に Anosmin-1 を添加すると、RGMa-AP の COS7 細胞への結合が阻害され、Anosmin-1 が RGMa-AP の Neogenin への結合を阻害していることが示された。以上の結果から、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 が中枢神経系において RGMa の神経軸索伸長の阻害作用やシナプス形成の阻害作用を抑制できないことが発症の機序になっている可能性が考えられた。

### 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 (fibroblast growth factor 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. Of the four different human FGFRs, malignant progression by enhanced expression

or variation of FGFR3 is reported for bladder cancer, melanoma and multiple myeloma. In a recent study, it has been shown that the proliferation of bladder cancer and multiple myeloma is suppressed by the inhibition of activated FGFR3 by the antibody binding to FGFR3 specifically or tyrosine kinase inhibitor to FGFR3. These results reveal the FGFR3 activation correlates with the malignant progression, indicating that FGFR3 may be an important therapeutic target in the cancer.

More than 90% of esophagus cancer is squamous cell carcinoma. The esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is an invasive and progressive cancer. The percentage of patients in which there is lymph node metastasis of ESCC is more than 30% that is quite high compared with other digestive tract cancers, for example 11.9% in gastric cancer and 10 % in sigmoid colon cancer. The ESCC is well known to show poor prognosis, and 5-year overall survival remains approximately 20% despite the use of multimodal treatments such as extensive surgery.

Previously, we have found the expression of FGFR3 IIIc isoforms in 86 % of the ESCC specimens tested by RT-PCR was enhanced. Thus, it suggests that enhanced expression of FGFR3 IIIc isoform may promote the malignant progression of ESCC. In the present study, we analyzed the mechanism of promoting malignant progression by enhanced expression of FGFR3 IIIc isoform.

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,  $1 \times 10^6$  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: Enhanced Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 IIIc Promotes Human Esophageal Cancer Malignant Progression.***

The expression of FGFR isoforms is temporally and spatially regulated in embryos and in normal adult organs. Alternative splicing of the FGFR gene has been implicated in carcinogenesis. Switch expression of FGFR to mesenchymal isoforms, enabling cells to receive signals usually restricted to the connective tissue. FGFR3 has two different transmembrane-type isoforms, FGFR3 IIIb and IIIc, which are produced by alternative splicing and have distinctive ligand-specificities. In

normal tissues, IIIb isoform is mainly expressed in the epithelium, whereas IIIc isoform is mainly expressed in the mesenchyme.

In the previous study, we found the expression of FGFR3 IIIc isoform was enhanced in the 86% of the human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) specimens analyzed by RT-PCR. However, it was unclear whether the enhanced expression of FGFR3 IIIc is due to the switch expression of FGFR3 IIIb in the cancer cells or due to increased mesenchymal cell population inflammatory infiltration to the tumor region.

To clarify this, we performed immunostaining of tumor sections and showed that FGFR3 IIIc was specifically expressed in the human ESCC but not the adjacent normal epithelial cell, suggesting that it is upregulated during tumor progression. In order to further demonstrate the effects of FGFR3 IIIc expression, we analyzed cell proliferation, migration and invasion of FGFR3 IIIc-overexpressing human ESCC, ECGI-10. The effects of FGFR3 IIIc overexpression increased cell proliferation, motility, and invasiveness. However, FGFR3 IIIc-overexpressing ECGI-10 cells were insensitive to exogenous FGF and the FGFR3 IIIc isoform expressed in the cells was autophosphorylated in FGF independent-manner. The high density of FGFR3 IIIc on cell surface may induce the dimerization of FGFR3 IIIc and induce autophosphorylation. Alternatively, an unidentified FGF ligand produced by the cancer cells may bind to the FGFR3 IIIc and induce autophosphorylation. These results indicate that the enhanced expression of FGFR3 IIIc in human ESCC increases the signals by inducing autophosphorylation of FGFR3 IIIc and may promote the cell proliferation, migration and invasion during tumor progression.

### **3: *Anosmin-1 inhibits Growth Cone Collapse induced by RGMa/Neogenin signaling.***

During neuronal development, axons extend through various sets of extracellular environments to reach their targets. Understanding how axons grow along the proper paths to find their correct target is a major aim of developmental neurobiology. Anosmin-1 is an extracellular matrix glycoprotein, which is defective in the X-linked form of Kallmann syndrome. This disease is characterized by hypogonadism due to GnRH deficiency, and a defective sense of smell related to the underdevelopment of the olfactory bulbs.

In the previous study, we have shown that anosmin-1 promotes growth cone formation in the neurites in PC12 cells.

Anosmin-1 has four contiguous fibronectin-like type III (FNIII) repeats and this motif is found in adhesion molecules such as L1, TAG/axonin-1, and F3/F11. These molecules have been demonstrated to modulate cell adhesion, neurite fasciculation and neurite growth. Anosmin-1 FNIII repeats also show 40% of homology with neogenin, which is expressed by growing nerve cells in the developing vertebrate brain and has six FNIII repeats. Neogenin is a transmembrane receptor for repulsive guidance molecule, RGMa. Binding RGMa to neogenin leads to growth cone collapse, thereby inhibiting neurite extension and synapse formation. We hypothesized that anosmin-1 acts as a soluble receptor for RGMa, thus anosmin-1 inhibits RGMa binding to neogenin, resulting to promote growth cone formation.

In this study, the role of anosmin-1 as an inhibitor for RGMa-induced growth cone collapse was tested. First, alkaline phosphatase fusion RGMa (RGMa-AP) was produced to analyze whether RGMa-AP binds neogenin-expressing COS7 cells. After the incubation, alkaline phosphatase staining was performed. Neogenin-expressing COS7 cells stain blue following incubation with RGMa-AP, indicating that RGMa-AP binds neogenin. Next, when anosmin-1 is applied to the same incubation, the binding of RGMa-AP to neogenin-expressing COS7 cells was inhibited, indicating that anosmin-1 competed to RGMa-AP binding to neogenin. These results suggest that normal anosmin-1 may act as an inhibitor for the signal of RGMa/neogenin-mediated growth cone collapse, contributing to elongation pathway of the olfactory axons and the associated migration of GnRH neuron.

## **4. 発表論文**

Shimizu A, Nakayama H, Wang P, König C, Akino T, Sandlund J, Coma S, Italiano JE Jr, Mammoto A, Bielenberg DR, Klagsbrun M. Netrin-1 Promotes Glioblastoma Cell Invasiveness and Angiogenesis by Multiple Pathways Including Activation of RhoA, Cathepsin B, and cAMP-response Element-binding Protein. *J Biol Chem.* 288(4):2210-22. (2013)

Bielenberg DR, Seth A, Shimizu A, Pelton K, Cristofaro V, Ramachandran A, Zwaans BM, Chen C, Krishnan R, Seth M, Huang L, Takashima S, Klagsbrun M, Sullivan MP, Adam RM. Increased smooth muscle contractility in mice deficient for neuropilin 2. *Am J Pathol.* 181(2):548-59. (2012)



Wong HK, Shimizu A, Kirkpatrick ND, Garkavtsev I, Chan AW, di Tomaso E, Klagsbrun M, Jain RK. Merlin/NF2 regulates angiogenesis in schwannomas through a Rac1/semaphorin 3F-dependent mechanism. *Neoplasia*. 14(2):84-94. (2012)

## 5. 著書および総説

なし

## 6. 招待講演、シンポジウム等

なし

## 7. 学会発表

吉田亜佑美、清水昭男、Michael Klagsbrun、瀬尾美鈴：Neuropilin-1 を介する血管内皮増殖因子:VEGF-A は、悪性上皮がん細胞の生存と増殖を促進する。(口頭発表、ポスター発表) 第59回日本生化学会近畿支部例会、宇治市、2012.5.19

竹内祥人、清水昭男、岡本沙矢香、瀬尾美鈴：Kallmann 症候群原因遺伝子産物の Anosmin-1 は RGMA の成長円錐崩壊作用を阻害する。(口頭発表、ポスター発表) 第59回日本生化学会近畿支部例会、宇治市、2012.5.19

吉田亜佑美、清水昭男、Michael Klagsbrun、瀬尾美鈴：VEGF-A は NRPI を介して GIPC1/SYX 複合体形成を誘導し RhoA を活性化させ、悪性上皮癌細胞の生存と増殖を促進する。第16回日本がん分子標的治療学会学術集会、北九州市、2012.6.27-29

## 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、研究代表:佐藤 直子「男子先天性中枢性性腺機能低下症患者の新しい診断法の開発と治療ガイドラインの作成」
- 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56回京都府発明等功労者表彰の審査を行った。2012年3月

### 4. 受賞等

なし

### 5. その他

- 1) 瀬尾美鈴:学会座長「生理活性物質と生体応答」  
第59回 日本生化学会近畿支部例会、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ、2012.5.19
- 2) 瀬尾美鈴:日本生化学会評議員

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 (2010.10.1-2012.9.31)
- 4) 瀬尾美鈴:京都産業大学図書館長として「大学の歴史と京都産業大学」を講義した。2012.5.21
- 5) 瀬尾美鈴:京都産業大学附属高校接続授業「iPS 細胞と再生医療への応用」を実施した。2012.10.12
- 6) 瀬尾美鈴:岡山県立岡山操山中学校生徒の京都研修のための講義「これぞ医療の大革命!!万能細胞による新しい挑戦へ」を実施した。2012.11.15



研究室写真：15号館正面にて、卒業記念アルバム用に撮影 (2012年12月8日)

# 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

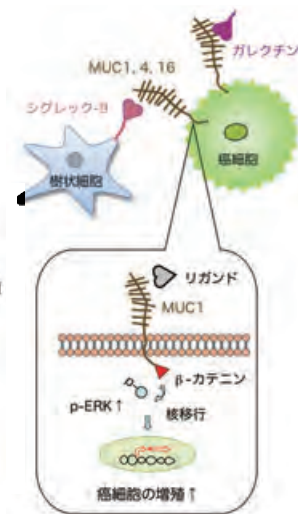
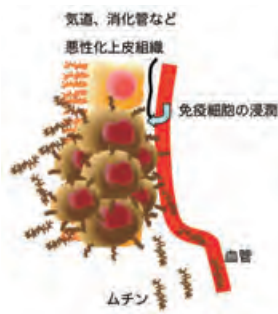


## 1. 研究概要

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。我々は、上皮細胞の悪性化と関連したムチンの機能やインフルエンザウイルスの受容体としてのムチンの可能性を検討している。ムチンは多様な糖鎖をもつことから、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンも含めて生体内の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、すなわち癌細胞の悪性化、免疫細胞の活性制御、インフルエンザウイルスの感染機構などを解析している。

### 1) 上皮性癌細胞の産生するムチンの生物学的意義

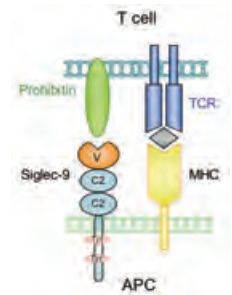
大半のがんは上皮細胞由来であることは良く知られている。正常な上皮組織では、細胞の極性が保持され、合成されたムチンは細胞のアピカル（頂端部）側に輸送されて、分泌されたり、あるいは膜タンパク質となる。癌化すると極性が無くなることにより、ムチンは細胞表面全体に輸送され、一部は癌組織全体に分泌され、血流中にも放出される。血流中に多くのムチンが存在する患者の5年生存率は低いことが知られているが、ムチンの生物学的意義はほとんど明らかにされていない。生体内には様々なレクチンが存在するが、担癌状態でその産生量が増加することが知られているガレクチンファミリーや主に免疫細胞上に発現しているレクチンであるシグレック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

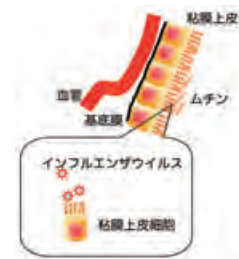
### 2) 免疫細胞上の膜結合型レクチンであるシグレックファミリーの機能解析

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。



### 3) 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、調べることで重要で、ムチンはその候補分子である。



## 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) 及びそのコントロール細胞株 (HCT116/Mock) における遺伝子レベルでの違いをDNAマイクロアレイにより検討したところ、前者において urokinase-type plasminogen activator (uPA) の発現亢進が認められた。また、タンパク質レベルについても MUC1 強制発現株において uPA の発現が亢進していることを確認した。さらに、種々のヒト癌組織を用いて、uPA と MUC1 の分布を免

疫組織化学的手法により検討したところ、両分子の共局在が観察された。従って、MUC1 の発現に伴う uPA の発現機構及び生物学的現象について検討した。

マトリゲルを用いた細胞浸潤能についても MUC1 発現細胞において上昇することが確認された。

MUC1 の強制発現と uPA の発現との因果関係を検討する目的で ChIP アッセイを行った。MUC1 発現細胞において uPA プロモーター上に MUC1-CD と p65 がリクルートされ、uPA の発現を亢進していることがわかった。これらの結果は、MUC1 の発現に伴い uPA の発現が誘導され、細胞の浸潤能の亢進に寄与していることを示している。

## 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 はマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞上に発現するレクチンであり、抗原提示時に想定される T 細胞上のトランスリガンドについて検討した。T 細胞株である Jurkat、Molt-3,4 細胞などの細胞表面にシグレック-9 組み換え体が結合することを確認した。Molt-3 の細胞表面のタンパク質をビオチンで標識後、シグレック-9 結合タンパク質を細胞溶解液より調製した。電気泳動及びウエスタンブロットイング後に解析したところ、分子量 28 及び 31kDa のタンパク質が検出された。質量分析の結果、それぞれプロヒビチン-1 と -2 であることがわかった。シグレック-9 はシアル酸非依存的にプロヒビチンに結合した。シグレック-9 の 120 番目のアミノ酸である Arg を Ala に換えた変異型シグレック-9 は結合能を消失し、両者の結合はペプチド間のイオン結合であることが示唆された。更に、マウス脾臓より調製した T 細胞を PMA や抗 CD3 抗体で活性化することによりプロヒビチンが誘導され、その発現は刺激後 48 時間でピークとなり、誘導されたプロヒビチンの多くは細胞表面に発現されることがわかった。細胞表面のプロヒビチンは、CD3 と共局在し、T 細胞のシグナル伝達に関与することが示唆された。Jurkat 細胞や活性化した T リンパ球において、シグレック-9 や抗プロヒビチン-1 または -2 抗体存在下で T 細胞シグナル伝達を解析すると ERK1/2 のリン酸化が著しく阻害されることがわかった。更に、その結果として IL-2 や IFN- $\gamma$  の産生も抑制された。これらの結果は、シグレック-9 とプロヒビチンの相互作用による新たな T 細胞制御機構を示唆している。

## 3) ヒトインフルエンザウイルス受容体の解析

肺上皮由来細胞株 A549 細胞を用いて、MUC1 強制発現株を作成し、ヒトインフルエンザウイルス(Panama, PR8)の感染

について mock 細胞と比較した。ウイルスをビオチン標識し、細胞への結合を観察するとウイルスは細胞表面に一様に結合し、双方の細胞に大きな差は認められなかった。しかしながら、細胞の抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロットイング後にビオチン標識ウイルスの膜への結合を調べると MUC1 が主要な結合タンパク質であった。また、ウイルス産生量も MUC1 強制発現株の方が多く、MUC1 が受容体として機能していることがわかった。また、ウイルスに感染した MUC1/A549 を経時的に回収し、MUC1 を電気泳動、ウエスタンブロットイング後に検出したところ、分子サイズが感染後 6 時間程度で高分子側に変化した。シアル酸の除去に伴う見掛上の変化と考えられる。この時間経過は感染後ウイルスが放出され始める時点と一致し、ウイルスの放出時の NA の作用と考えられる。また、ウイルスの感染後の情報伝達分子のリン酸化を両細胞で比較した。ERK1/2 及び p38 については、双方の細胞で差異は認められなかった。Akt のリン酸化はいずれの細胞においても感染 6 時間後より亢進し、そのレベルは mock 細胞の方が MUC1 強制発現株より高いことがわかった。Akt のリン酸化はアポトーシスに関与することが知られている。ウイルス産生量との関係及び Akt のリン酸化と MUC1 の関連性について検討中である。

## 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 tumor progression and infection of influenza virus.

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.

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.

**1: Biological significance of mucins produced by epithelial tumor cells.** Expression of mRNA in MUC1-introduced HCT116 cells (MUC1/HCT116 cells) and mock HCT116 cells was compared by DNA microarray. It is noted that expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) mRNA was elevated in MUC1/HCT116 cells. We also confirmed that level of uPA protein was elevated in MUC1/HCT116 cells. In addition, distribution of MUC1 and uPA was observed immunochemically. They were co-localized in various human tumor tissues such as colon, stomach, pancreas, and lung. Invasion assay was also performed using Matrigel. The invasion through the gel was enhanced in MUC1/HCT116 cells compared with mock HCT116 cells. To explore the detailed mechanism of uPA induction, we further examined the localization of MUC1-CD on uPA promoter region (NF- $\kappa$ B binding site). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using anti-MUC1-CD and anti-p65 antibodies demonstrated the increased occupancy of MUC1-CD and p65, suggesting that complex of MUC1-CD and p65 bound to the NF- $\kappa$ B binding site and enhanced the expression of uPA mRNA.

These results indicate that uPA is induced by expression of MUC1, leading to enhanced invasion.

**2: Functional analysis of membrane bound lectin, siglec family, expressed on immune cells.** Siglec-9 is a member of siglec family and expressed on antigen presenting cells such as macrophages and dendritic cells. We postulated that Siglec-9 might interact with glycoproteins expressed on the surface of T cells during antigen presentation. Siglec-9 recombinant protein bound to the surface of various T cell leukemia lines, Jurkat, Molt-3, and Molt-4 cells. Siglec-9 binding proteins were isolated from Molt-3 cell lysate and subjected to SDS-PAGE and Western blotting. Two proteins with molecular weights of 28 and 31 kDa were detected and identified to be prohibitin-1 and-2 by MALDI-TOF mass spectrometry. Siglec-9 bound to prohibitins in a sialic acid independent manner. Mutated Siglec-9 with Arg120 changed to Ala lost the binding activity, suggesting a specific ionic peptide-peptide interaction. Prohibitins were induced in mouse T lymphocytes in response to stimulation with PMA or anti-CD3 antibody and their expression levels were peaked at 48 h after stimulation. A considerable part of induced prohibitins were expressed on the cell surface. Prohibitins on the cell surface were colocalized with CD3, suggesting that they are relevant to TCR-mediated signaling. ERK1/2 was phosphorylated in Jurkat cells and preactivated T lymphocytes on treatment with anti-CD3 antibody immobilized beads, whereas phosphorylation of ERK1/2 was markedly diminished on treatment with anti-CD3 antibody and Siglec-9 co-immobilized beads, indicating that engagement of prohibitins with Siglec-9 inhibits ERK1/2 phosphorylation. In parallel with inhibition of the ERK cascade, IL-2 and INF- $\gamma$  production were markedly decreased in Jurkat cells and preactivated T lymphocytes, respectively. Thus, this interaction may be used as a useful immunotherapeutic target.

**3: Analysis of human influenza virus receptor.** MUC1cDNA was introduced to a human lung epithelial cell line, A549 cells (MUC1/A549 cell) and infection of human influenza virus (Panama, PR8) to MUC1/A549 cells and mock A549 cells was compared. Binding of these viruses to the cell surface was visualized using biotin-labeled viruses. Viruses bound to the cell surface uniformly and no difference was observed

apparently between these cells. Lysates of these cells were subjected to SDS-PAGE and Western blotting. Binding of viruses to the membrane was examined. It is noted that MUC1 was a major band detected with biotin-labeled viruses, and production of viruses was elevated in MUC1/A549 cells. These results indicate that MUC1 plays a role as an influenza virus receptor. Virus-infected MUC1/A549 cells were obtained at various times (1~22 h) after infection and the cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting, followed by detection of MUC1. Molecular size of MUC1 was changed to apparently higher one, probably due to removal of sialic acids expressed on MUC1, which started at about 6 h after infection. This fact was paralleled with the time schedule that produced viruses started to be released from the cell. We also investigated signal transduction after virus-infection. No difference was observed between MUC1/A549 cells and mock A549 cells with respect to the phosphorylation of ERK1/2 and p38. Phosphorylation of Akt started to be elevated at 5~6 h after infection similarly in both cells, but the level in mock A549 cells was significantly higher than that in MUC1/A549 cells. It is well-known that phosphorylation of Akt down-regulates apoptosis and the level of virus-production is relevant to apoptosis. Thus, it is under investigation about the relationship between MUC1 and phosphorylation of Akt.

#### 4. 発表論文

- N. Zamri, N. Masuda, F. Oura, Y. Yajima, H. Nakada, and Y. Fujita-Yamaguchi: Effects of two monoclonal antibodies, MLS128 against Tn-antigen and 1H7 against insulin-like growth factor-I receptor, on the growth of colon cancer cells. *Biosci. Trends.* **6**: 303-312 (2012).
- H. Kajiwara, M. Toda, T. Mine, H. Nakada, and T. Yamamoto: Isolation of fucosyltransferase-producing bacteria from marine environments. *Microbes. Environ.* **27**: 515-518 (2012)
- 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.* **420**: 275-280 (2012)
- 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.* **22**: 531-538 (2012)

- 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.* **151**: 371-381 (2012)
- 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.* **419**: 7-13 (2012)
- 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, 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.* **151**: 273-282 (2012)

#### 5. 著書および総説

- H. Nakada: Ikuo Yamashina: a pioneer who established the basis of current glycobiology. *J. Biochem.* **151**: 461-468 (2012)

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

- 秋田 薫:MUC16の血清診断による子宮内膜症と卵巣癌患者の識別、H24年度大学シーズ説明相談会、京都市、2011.9.19
- 中田 博、秋田 薫:MUC16(CA125抗原)の糖鎖修飾の差異に基づく子宮内膜症と卵巣癌の識別方法の開発、近畿バイオインダストリー振興会議、大阪市、2012.11.27

#### 7. 学会発表

- H. Nakada, Y. Mori, S. Tanida, K. Akita, A. Ishida, M. Toda, M. Interaction of MUC1 with galectin-3 enhances the proliferation of epithelial tumor cells. The 26<sup>st</sup> International Carbohydrate Symposium, Madrid (Spain), 2012.7.22-27
- 中田 博、八代正和、澤田鉄二、平川弘聖:ガレクチン-3 の MUC1 への結合に伴う癌細胞増殖促進作用. 第21回日本がん転移学会学術集会、広島市、2012.7.12-13

松本康之、章 青、浜村和紀、秋田 薫、中田 博、土田明子、岡島徹也、古川圭子、浦野 健、西野 健、古川鋼一: trimeric Tn 抗原による癌転移能亢進の分子メカニズムの解明. 第 31 回日本糖質学会年会、鹿児島市、2012.9.17-20

中田 博、石田有希子、秋田 薫、戸田宗豊、谷田周平: シグレック-3 による TLR-4 シグナル伝達の抑制. 第 31 回日本糖質学会年会、鹿児島市、2012.9.17-20

秋田 薫、田中みなみ、西尾隆男、谷田周平、戸田宗豊、井上瑞江、中田 博: MUC16 の細胞質内領域の機能解析. 第 85 回日本生化学会大会、福岡市、2012.12.14-16

森 勇伍、秋田 薫、谷田周平、石田有希子、中田 博: Galectin-3 の MUC1 への結合に伴う腫瘍増殖促進作用. 第 85 回日本生化学会大会、福岡市、2012.12.14-16

万木 肇、谷田周平、田中涼太、石田有希子、秋田 薫、中田 博: シグレック-9 とプロヒビチンの相互作用による T 細胞受容体を介したシグナル伝達の制御. 第 85 回日本生化学会大会、福岡市、2012.12.14-16

大浦史絵、Zamri Normaiza、飯島慧斗、矢島由紀子、中田 博、山口(藤田)陽子: ヒト大腸がん細胞 LS180 の細胞増殖に対する T 抗原特異的 Peanut agglutinin lectin (PNA) の効果: 抗 Tn 抗原モノクローナル抗体 MLS128 との相互作用の可能性. 第 85 回日本生化学会大会、福岡市、2012.12.14-16

## 8. その他特記事項

### 1) 外部資金

京都発革新的医療技術研究開発助成事業(京都市)

「CA125(MUC16)抗原の糖鎖修飾の差異に基づく子宮内膜症と卵巣癌の識別方法の開発と MUC16 による炎症誘導機構の解析」

研究代表者: 秋田 薫、取得年度: H24 年(1 年)

### 2) 知的財産等

なし

### 3) 学外活動

中田 博: 徳島大学非常勤講師

中田 博: 京都バイオフィォーラム幹事

中田 博: 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

中田 博: NEDO ビアレビューアー

中田 博: 日本生化学会評議員

中田 博: 日本糖質学会評議員

### 4) 受賞等

万木 肇: 鈴木紘一メモリアル賞受賞(第 85 回日本生化学会大会、福岡市、2012.12.14-16)

### 5) その他

研究室メンバーの写真(15 号館中庭にて)



# 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



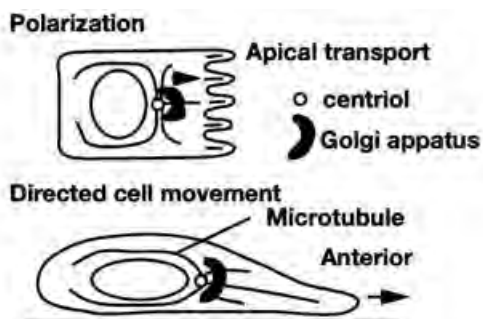
## 1. 研究概要

発生や組織形成、細胞分化の過程では、細胞が極性を持ち細胞接着因子や胚誘導因子などを細胞の特定の位置に配送することが必要である。また、細胞運動の際には、進行方向側と後方側の極性を獲得する必要がある。この細胞の極性化には、分泌経路を介したタンパク質や脂質の極性輸送が必須の役割を果たしている。さらに、極性輸送が正しく行われるためには、分泌経路の要であるゴルジ体の機能とそれを支えるゴルジ体の構造や細胞内の位置が重要である (Fig. 1)。

一方、細胞増殖が活性化するためには、分泌経路の機能も活性化する必要がある。実際に、私達の研究から、ゴルジ体が増殖刺激や細胞周期調節のシグナル伝達の標的となり、分泌経路の機能調節の場として機能していることが明らかになってきた。ゴルジ体は、ERK を介した細胞増殖シグナルや、CDK による細胞周期制御シグナルを受信して構造や位置を変化させる。逆に、ゴルジ体が細胞増殖・細胞周期調節のシグナル伝達系の足場となることで、ゴルジ体の機能状態の情報が、これらのシグナル伝達系にフィードバックしている可能性が示唆される (Fig. 2: N. Nakamura, et al., Curr Opin Cell Biol, 24, p.467, 2012)。

このように、ゴルジ体の構造と機能は細胞の極性形成や細胞運動の制御にも積極的な役割を果たしていると考えられるが、その制御機構は明らかでない。そこで私達は、ゴルジ体の構造と機能の調節機構を明らかにして、ゴルジ体による細胞分極細胞運動の制御機構を理解することを目的として研究を進めている。

特に近年は、GM130 の構造解析と、ゼブラフィッシュを用い



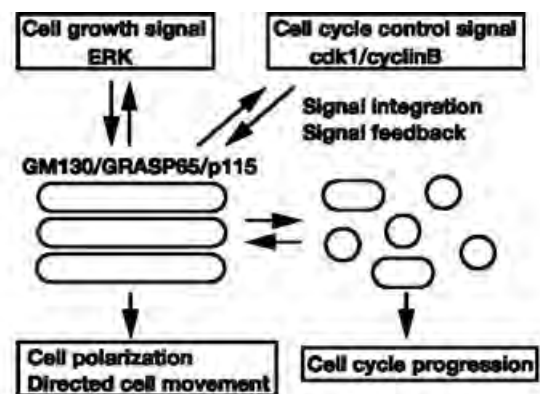
**Fig. 1 Cell polarization and the Golgi apparatus.** Golgi apparatus relocates to the apical side of polarized cell (Top panel) and anterior side of the moving cells (Bottom panel) to support the polarized transport of lipid and proteins.

た GM130 の発生物学的機能解析に重点的に取り組んでいる。GM130 は、中村が 1995 年に発見報告したゴルジ体膜の細胞質側に局在するタンパク質 (ゴルジ・マトリックスタンパク質) であり、p115 や GRASP65 などの結合因子とともにゴルジ体の層板構造の維持に機能する (N. Nakamura et al., J Cell Biol, 131, p1715, 1995)。また先に述べた細胞増殖や細胞運動、極性輸送の調節に重要な役割を果たしている。したがって、GM130 とその結合因子群の解析により、ゴルジ体の構造と機能の調節機構や、ゴルジ体による細胞機能制御機構の理解の鍵となる情報が得られることが期待される。

## 2. 本年度の研究成果

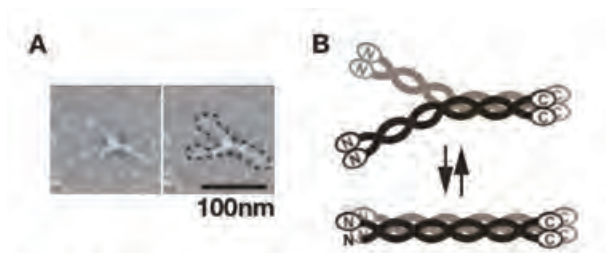
① MBP あるいは His タグを付加した GM130 をネイティブ PAGE で解析したところ、4量体であることが示唆された。異なる4種類のタグを付加した GM130 を大腸菌で共発現させて精製したところ、4種類全てのタグを持つ GM130 複合体が得られたことから、GM130 が4量体を形成することが確認された。精製された GM130 を原子間力顕微鏡及び電子顕微鏡で観察したところ、~150nm のひも状構造あるいは Y 字状構造を取ることが明らかとなった (Fig. 3)。

② ゼブラフィッシュの GM130 のオルソログである DRGM130 を同定し、その配列を決定した。得られた配列を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションで発現部位を観察したところ、But stage 胚では脊索前板に、24 時間胚では脳、尾部脊索、孵化酵素腺に多く発現していることが明らかになった



**Fig. 2. Golgi apparatus as a platform of signal transduction**

The Golgi apparatus changes its structure and localization in response to the cell growth signal and the cell cycle control signal. Conversely, the information of the structure and the function of the Golgi apparatus



**Fig. 3 GM130 forms a tetramer**

(A) A Y-shaped molecule is observed under electron microscope (Left). Outline of the molecule was marked and shown on the right. (B) Schematic representation of the two possible structure of GM130 tetramer. N-terminus can take open and close conformation.

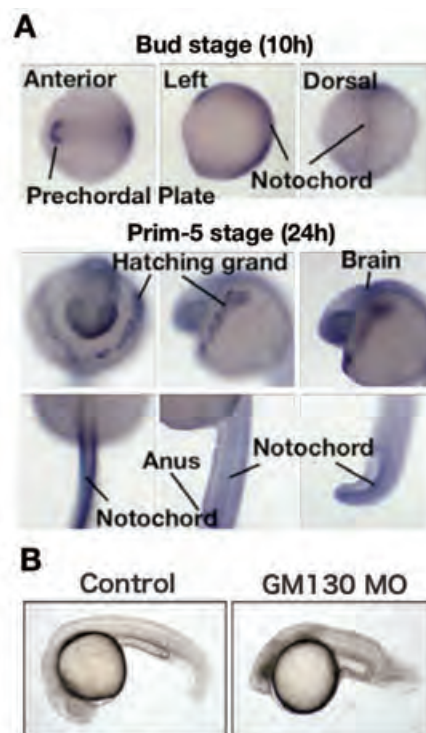
(Fig. 4A)。次に、1~8細胞期のゼブラフィッシュ胚にモルフォリノアンチセンスオリゴを微細注入してDRGM130の遺伝子の翻訳を抑制したところ、頭部の形成と尾の伸長が顕著に阻害されることが明らかとなった。このことからDRGM130が頭部や尾部の形成に重要な役割を持つことが強く示唆された(Fig. 4B)。

### 3. Research projects and annual reports

#### Research Projects

During the development of embryo or tissues, and cellular differentiation, the cell has to acquire polarity to deliver cell adhesion molecules and inducing factors to specific directions. The cell also has to acquire front and rear polarity while its directed movement. Secretory pathway plays important roles to enable the polarization of cells by regulating the delivery of proteins and lipids. The Golgi apparatus is especially important core organelle in the secretory pathway. Thus, the structure, function and location of the Golgi apparatus play essential roles to support proper polarization of the cells (Fig. 1).

The secretory pathway has to be activated to support active growth of the cells. In fact, we have shown that the Golgi apparatus is a target of the growth signal transduction and cell cycle control pathway to enable the control of the activity of the secretory pathway by the growth signal. Golgi apparatus receives the growth signal via ERK pathway and also the cell cycle control signal via CDK pathway, and changes its shape and location in the cell. Conversely, these evidence suggest that Golgi apparatus functions as a platform for the signal transduction pathway of cell growth and cell cycle control and the information of the activity of the Golgi apparatus provide feedback to the signal transduction



**Fig. 4 (A) Analysis of GM130 mRNA by in situ hybridization.** GM130 expresses ubiquitously. Higher expression was observed at indicated areas. **(B) Knockdown of GM130.** Striking defects of axial extension, development of heart, tail fin and brain were observed (right).

pathways (Fig. 2: N. Nakamura, et al., Curr. Opin. Cell Biol., 2012).

As described above, the structure and the function of the Golgi apparatus are suggested to play active roles for the regulation of the cell polarization and cell growth. However, the regulatory mechanism remains obscure. Under this circumstance, we are trying to elucidate the regulatory mechanism of the structure and the function of the Golgi apparatus to understand how Golgi apparatus control cellular polarization and movement.

Recently, we have been focusing on the structural analysis of GM130 molecule and the developmental analysis of GM130 functions using zebrafish as a model organism. GM130 is a cytoplasmic peripheral membrane protein (a Golgi matrix protein) localized at the Golgi apparatus that was found and reported by Nakamura et al. on 1995 (N. Nakamura et al. J Cell Biol, 131, p1715 1995). It binds to p115 and GRASP65 and plays essential role for the cisternal stacking. It also plays an important role in the regulation of cell growth, motility and polarization. Therefore, the analysis of GM130 and its binding proteins will provide key information to understand the regulatory mechanism of the Golgi structure



and function and also the mechanism for the regulation of cellular functions by the Golgi apparatus.

#### Annual report

- ① Native PAGE analysis of the purified recombinant GM130 tagged with MBP or His-tag suggested that GM130 forms a tetramer. This was confirmed by the result that GM130 complex with 4 different tags was purified from the E. Coli extract in which 4 differently tagged GM130 was co-expressed. By atomic force microscopy and transmission electronmicroscopy revealed that GM130 forms a rod like structure or Y-shaped structure of ~150nm length (Fig. 3).
- ② Zebrafish orthologue of GM130 (DRGM130) was identified, cloned and sequenced. In situ hybridization was performed using the obtained cDNA as a probe. GM130 was expressed ubiquitously with significantly higher expression at prechordal plate at bud stage (Fig. 4A), at brain, tail region of notochord and hatching grand at 24 hpf (Fig. 4B). When the translation of DRGM130 was inhibited by injecting antisense morpholino oligo at 1~8 cell stage embryo, strong defect in the development of head and tail region. These results strongly suggested that GM130 plays essential role in the development of head and tail region of the Zebrafish.

#### 4. 発表論文

- M. Hiyoshi, N. Takahashi-Makise, Y. Yoshidomi, N. Chutiwitoonchai, 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)
- M. Tanabe, R. Ishida, F. Izuhara, A. Komatsuda, H. Wakui, K. Sawada, M. Otaka, N. Nakamura and H. Itoh. The ATPase activity of molecular chaperone HSP60 is inhibited by immunosuppressant mizoribine. *Am J Mol Biol.* **2**: 93-102 (2012)

#### 5. 著書および総説

- N. Nakamura, J.-H. Wei and J. Seemann. Modular organization of the mammalian Golgi apparatus. *Curr Opin. Cell Biol.* **24**: 467-474 (2012)
- 中村暢宏, 石田竜一. ゴルジ体のタンパク質とその局在化機構. *生体の科学* **63**: 408-411 (2012)

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

Nobuhiro Nakamura (主催), Ryuichi Ishida, Shinichiro Yoshimura, Hye-Wong Shin, Yangzhan Wang, Cell and developmental biology mini workshop (Kyoto), Nov 12, 2012

#### 7. 学会発表

石田竜一, 中山和久, 中村暢宏. ゴルジ・マトリックスタンパク質複合体の構造解析. 第85回, 日本生化学会大会 (2012年12月14日~16日, 福岡)

#### 8. その他特記事項

##### 京都産業大学プロジェクト研究

プロジェクトポスドクとして石田竜一博士を採用 (2011~2014)

##### 学外活動

Nobuhiro Nakamura: Reduction of extracellular pH induces disassembly of the Golgi apparatus by inhibiting the Golgi to ER retrograde trafficking. Joint Seminar (CU-KSU-MUSC) in Science & Technology (Bankok, Thailand), March 14-17, 2012

##### 各種委員等

日本生化学会評議員 (2011~現在)

日本学術振興会 奨学金書類審査員 2012年8月

Thesis Examination Committee member (博士学位審査員). Ms. Chu Hong “Sorting of ER-Golgi SNAREs by the COPII Coat in *Saccharomyces cerevisiae*”, Hong Kong University of Science and Technology, Feb 24, 2012

##### 学外研究資金

文部科学省科学研究費補助金, 新学術領域研究 (上皮管腔形成) : 分泌経路のリモデリングが上皮管腔組織形成に果たす必須の役割, 研究代表者: 中村暢宏, 2012~2013

##### 試薬等供与

海外: 6件, 国内: 4件

# 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

日常、われわれが物を考えたり、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。

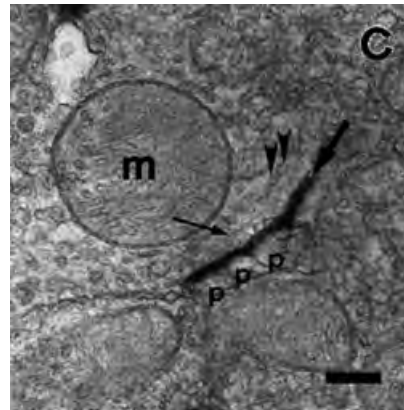
脳の機能は、多数の神経回路が協調的に作動することにより生まれる。そして微視的には、それぞれの回路を作る神経細胞が繊維を伸長させて互いに特異的に接続し、その接続部であるシナプスが正常に働く必要がある。われわれは、この回路ができあがる過程で異常が生じる遺伝子変異の解析をもとに、特にシナプス間隙の分化と神経繊維の標的を制御する機構について研究している。

### 1) シナプス間隙タンパク質群の機能の解明

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伝達を通して神経機能の中心的役割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く、これらの問題を解明していく。

#### a. Hig タンパク質のシナプス間隙における機能の解明

活動性の低下および「ふるえ」を示す変異表現型の原因遺伝子としてわれわれが同定した *hikaru genki* (*hig*) 遺伝子は、分泌性でシナプス間隙に局在する Hig タンパク質をコードする。この Hig タンパク質のシナプスにおける役割は未だ謎であり、その機能および作用機構を分子レベルで解明することを研究の目標とする。また、Hig がシナプス間隙に局在する機構について、Hig と相互作用する分子の同定を通して明らかにしていく。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。



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。

### b. 「シナプス間隙の生物学」の構築を目指して

Hig 以外のシナプス間隙に局在する分子群を同定し、シナプス間隙がもつ神経発生と機能における役割を明らかにする。その一例として、われわれは Dig タンパク質を同定してきている。これらの解析を通して「シナプス間隙の生物学」の領域を築く。

### 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。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) Hig タンパク質が局在するシナプス間隙の特異性

Hig タンパク質は中枢神経系のシナプス領域に広く分布するが、その局在するシナプスの種類については不明であった。そこで、種々のシナプスマーカーを用いて Hig が局在するシナプスを調べたところ、Hig はアセチルコリン受容体やコリンアセチルトランスフェラーゼと共局在することが判明した。一方、GABA 受容体の分布とは異なり、またグルタミン酸作動性ニューロンのシナプスにも Hig は局在していなかった。したがって Hig は少なくとも殆どの

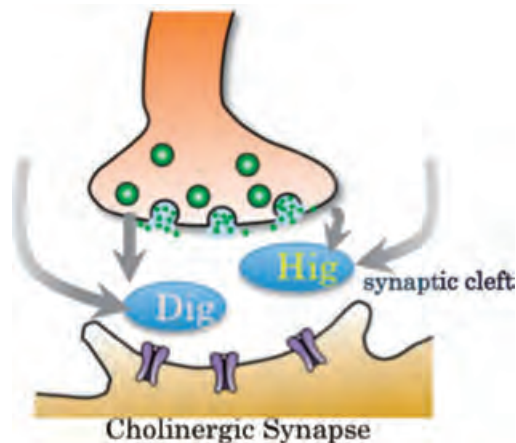
場合にコリン作動性シナプスの間隙に局在することが明らかとなった。

## 2) 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、シナプス間隙における Hig の局在なし安定性により直接的に関与していると考えられる。

この Dig にタグをつけて免疫沈降すると Hig が共沈してきた。逆に Hig にタグをつけて免疫沈降すると Dig の共沈が検出された。したがって Dig と Hig は複合体を形成していることが明らかとなった。

Hig をある神経細胞で発現させると、Hig はその細胞がつくるシナプスの間隙に局在するだけでなく、周辺に存在するシナプスの間隙にも分散していく。このような分散



は Dig についても同様に観察された。そこで次のようなモデルを考える事ができる(図参照)。すなわち、神経細胞から分泌された Dig は、何らかの機構によりコリン作動性シナプスの間隙にトラップされ、次に Hig は Dig と複合体を形成することを必要条件としてコリン作動性シナプス間隙に局在するようになる。

## 3. Research projects and annual reports

How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We are studying molecular mechanisms underlying specific neuronal events that occur during and after 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 the 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, antenna lobe, 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: Hig localizes to the clefts of cholinergic synapses.

Hig distributes broadly in the synaptic region, but it has not been clear whether Hig localizes to a specific type of synapses. To approach this problem, we have examined the distribution of several synaptic markers including acetylcholine receptors, choline acetyltransferase and GABA receptor, and found that

Hig preferentially localized to the clefts of cholinergic synapses in the brain.

1-2: A possible mechanism by which Hig localizes to the clefts of cholinergic synapses.

Hig is predicted to form a complex with other proteins because Hig contains several CCP (Complement Control Protein) domains implicated in protein-protein interactions. 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 observed for *hig* mutants, and found two mutants named *dig* and *higl*. Notably, Hig disappeared in the synaptic regions when *dig* was mutated. This indicates that Dig is required for Hig localization to 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. Immunoprecipitation experiments indicate that Hig and Dig certainly form a protein complex. The fact that Hig in the process of transport is normally present 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.

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 the synaptic clefts. Dig is also diffused to the surrounding synaptic regions. In addition, the localization of Dig to synapses was not altered in the *hig* mutants, which indicates that roles for Hig and Dig are not reciprocal, and Hig is not essential for the Dig localization to synapses. Collectively, we propose that Dig is first anchored to the clefts of cholinergic synapses by unknown mechanism, and Hig protein interacts with scaffold components including Dig to localize to the synaptic clefts

#### 4. 発表論文

H. Ito, K. Sato, M. Koganezawa, M. Ote, K. Matsumoto, C. Hama and D. Yamamoto: Fruitless recruits two antagonistic chromatin factors to establish single-neuron sexual dimorphism. *Cell* **149**(6):1327-1338 (2012).

S. Maruyama, N. Ohkita, M. Nakayama, E. Akaboshi, T. Shibata, E. Funakoshi, K. Takeuchi, F. Ito and K. Kawasaki: RecQ5 interacts with

Rad51 and is involved in resistance of *Drosophila* to cisplatin treatment.

*Biol Pharm Bull.* **35** (11):2017-2022 (2012).

#### 5. 総説

中山 実、松野 健治: Zellweger 症候群のショウジョウバエモデルが明らかにするペルオキシソームの新たな役割. 生体の科学, **63**(5):464-467 (2012)

#### 6. 学会発表

A Novel Synaptic Protein Dig Regulates the Localization of Hig to the Synaptic Clefts in *Drosophila*. M. Nakayama, Emiko Suzuki and C. Hama 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012. 12. 11-14

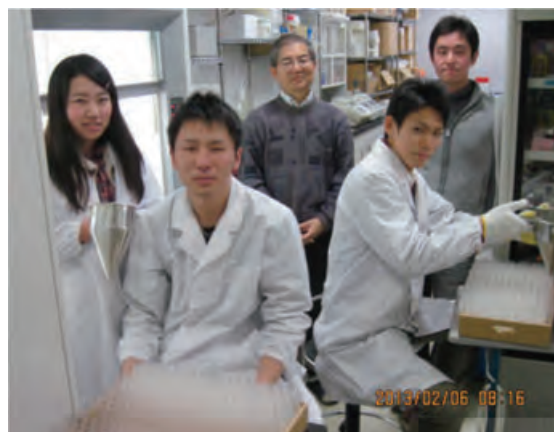
#### 7. その他特記事項

##### 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. その他

理化学研究所客員主管研究員



日高誠、梶省中

写真撮影：高沢大樹

# 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ト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、ポリラクトサミン鎖の発現量の減少とがよく一致した。そこで、ポリラクト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、ポリラクト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、主要なポリラクト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ト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、ポリラクトサミン鎖の発現量が少なかったことが明らかとなった。

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

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

そこで現在は、1) 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) ポリラクトサミン鎖以外に、CD24 分子上には様々な糖鎖が結合している。それら糖鎖の役割を追及するために、CD24 から分離した糖鎖をネオグライコリピド化し、糖鎖マイクロアレイ法に應用して、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、特にポリラクト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、 $\alpha$ 2,3 結合や  $\alpha$ 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) ニワトリ白血球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。5) 糖鎖結合の特異性の探索を目的として、糖鎖の還元末端に蛍光試薬 AlexaFluor を効率よく結合させる方法を見出した。

## 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- $\beta$ -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 were different from 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. Recently I could develop the efficient method to conjugate oligosaccharides with AlexaFluor 350.

## 4. 論文

1. S.Mizumoto, S.Murakoshi, K. Kalayanamitra, S. S. Deepa, S.Fukui, P.Kongtawelert, S.Yamada, and K.Sugahara ; Highly sulfated hexasaccharide sequence isolated from chondroitin sulfate of shark fin cartilage: Insights into the sugar sequence with bioactivities. *Glycobiology*, , 23(2), 155-168 (2012)

## 5. 学会発表

なし

## 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

## 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。ATP合成酵素は、呼吸鎖酵素群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)。一方で、V-ATPase や多くの一次輸送体は ATP を使ってイオンや輸送基質を輸送する。ATP 分解による回転力発生仕組みは、構造生物学と1分子観察という手法によりだいたい明らかになった。しかし、プロトン駆動力で回転する仕組みや、回転力を伝達する回転棒や固定子が剛体なのか、可塑性を持ち回転力をねじれとして蓄えられるのか、については議論がわかれている。我々は、構造生物学、1分子観察、生化学の手法を用いて、プロトン駆動力による回転の仕組み、およびエネルギーを使ってイオンや基質を輸送する膜輸送体の仕組みの解明に取り組んでいる。

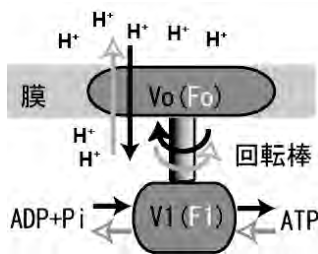


図1 回転分子モーターの模式図。回転運動を介して水素イオンの輸送と化学反応を結びつけている。

一方で、生命がエネルギーを変換して利用する過程は、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。生体エネルギー学の視点から老化・寿命の問題に取り組んでいる。

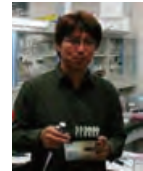
以上の研究背景に基づき、本研究室では下記の点について研究を展開している。

### 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

教授 横山 謙

Prof. Ken Yokoyama, Ph.D



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) 複雑な膜輸送体の構造機能解析

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) V1-ATPase が回転する際に頻りに観察される<停滞>が二種類あり、一つが ADP 阻害と呼ばれる現象であることを明らかにした (発表論文2)。また、磁気ピンセットによる分子マニピュレーションにより、回転角度と ATP に対する親和性の変化の相関を明らかにした (発表論文4)。これらの成果は、ATP 合成・分解と回転運動とのエネルギー変換機構を理解するうえで必要な情報を提供する。この研究は東京大学野地研究室と共同で実施された。

2) V-ATPase などの回転分子モーターでは、回転子タンパク質が強固な回転子複合体をつくり、これが分子の骨格を成すと予想されてきた。注意深く V-ATPase の構成タンパク質を混ぜあわせると、驚くべきことに回転子タンパク質の一部がない状態でも V-ATPase の基本構造が組み立てられた。回転分子モーターの組立原理における

従来の常識を覆し、V-ATPase の構築に固定子が必須であることを明らかにした(発表論文 3)。

### 3) 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(発表論文 1)。

## 3. Research projects and annual reports

### 1. Rotary mechanism of V-ATPase

V type rotary H<sup>+</sup>-ATPase/synthase (V<sub>o</sub>V<sub>1</sub>) from *Thermus thermophilus*, composed of nine subunits, A, B, D, F, C, E, G, I, and L, has been reconstituted from individually isolated V<sub>1</sub> (A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>DF) and V<sub>o</sub> (C<sub>1</sub>E<sub>2</sub>G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) subcomplexes *in vitro*. A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>D and A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> also reconstituted with V<sub>o</sub>, resulting in a holoenzyme-like complexes. However, A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>D-V<sub>o</sub> and A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>-V<sub>o</sub> did not show ATP synthesis and DCCD sensitive ATPase activity. The reconstitution process was monitored in real time by fluorescence resonance energy transfer (FRET) between an acceptor dye attached to subunit F or D in V<sub>1</sub> or A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>D, and a donor dye attached to subunit C in V<sub>o</sub>. The estimated dissociation constants K<sub>d</sub> for V-ATPase and A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>D-V<sub>o</sub> were ~0.3 nM and ~1 nM at 25°C, respectively. These results suggest that the A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> domain tightly associated with the two EG peripheral stalks of V<sub>o</sub>, even in the absence of the central shaft subunits. In addition, F subunit is essential for coupling of ATP hydrolysis and proton translocation and has a key role in the stability of whole complex. However the contribution of the F subunit to the association of A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> with V<sub>o</sub> is much lower than that of the EG peripheral stalks.

### 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

1. 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.** Vol.75(1), pp15-19
2. Uner NE., Nishikawa Y., Okuno D., Nakano M., Yokoyama K., Noji H. Single-molecule analysis of inhibitory pausing states of V<sub>1</sub>-ATPase. **J. Biol. Chem.** Vol. 287(34), pp28327-28335
3. Kishikawa J., Yokoyama K. Reconstitution of Vacuolar type rotary H<sup>+</sup>-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. **J. Biol. Chem.** Vol. 287(29), pp24597-24603
4. Tritom NE., Okuno D., Nakano M., Yokoyama K., \*Noji H., Mechanical Modulation of ATP-Binding Affinity of V<sub>1</sub>-ATPase. **J. Biol. Chem.** 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: 膜輸送体研究の新展開. 第4回 膜輸送体研究会、(富良野市、12/29)

### 7. 学会発表

J. Kishikawa, K. Yokoyama: Reconstitution of Vacuolar type rotary H<sup>+</sup>-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. The 17th European Bioenergetic conference: The Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Germany, 2012. 9. 15-20

岸川淳一, 中西温子, 横山謙: ドメインキメラを用いた V-ATPase の ADP 阻害機構の解明, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012. 12. 14-16

横山謙, 中西温子, 岸川淳一: ねじれによる回転分子モーターのエネルギー伝達機構の可能性, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012. 12. 14-16

岸川淳一, 中西温子, 横山謙: 好熱菌 V-ATPase の再構成とドメインキメラ V<sub>1</sub> を用いた ATP 合成/分解反応, 日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会, 岡山市, 2012. 12. 22-24



中西温子, 岸川淳一, 横山謙: 好熱菌 V-ATPase の回転力伝達におけるドライバー様構造の役割, 日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会, 岡山市, 2012. 12. 22-24

#### 8. その他特記事項

##### 1. 外部資金の新規採択

科学研究補助金基盤研究 B「構造・機能解析による回転分子モーターの起源の解明」 研究代表者: 横山 謙

##### 2. 2012 JBC best paper

発表論文 3 が The Journal of Biological Chemistry 誌において 2012 年の best paper に選ばれた。

##### 3. 新学術領域提案型応募課題のヒアリング採択

領域代表者として応募した新学術領域提案型応募課題がヒアリングに採択された。ヒアリング後の審査の結果、採択には至らなかった。

# タンパク質バイोजェネシス研究室

Laboratory of Protein Biogenesis

教授 伊藤 維昭

Prof. Koreaki Ito

助教 千葉 志信

Assist. Prof. Shinobu Chiba



## 1. 研究概要

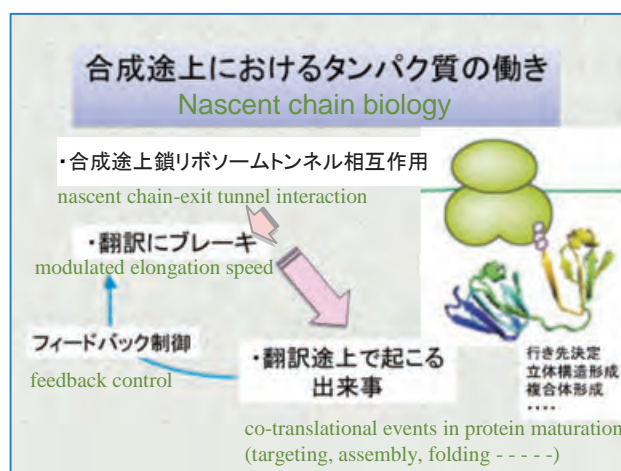
タンパク質バイोजェネシス研究室では、新たな研究分野「合成途上鎖の分子生物学」の開拓と推進を行っている。生命活動を進行させる中心的な生体分子であるタンパク質は、DNA に書き込まれ mRNA に写し取られた遺伝情報に従った順番でアミノ酸が順次結合することによって作られる。ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に変換して、具体的な生命活動を引き起こす「翻訳」はセントラルドグマのキーとなる過程である。この過程、はリボソームの内部において進行する。そこでは、デコーディング (情報処理) とペプチド結合形成 (ケミストリー) が行われ、タンパク質の鎖がペプチド転移活性中心において生成されていく。合成途上鎖 (polypeptidyl-tRNA) 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、緩急の制御を伴って進行するものであるということを示し、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。また翻訳スピードが緩急の制御を受けることは、新生ポリペプチド鎖が機能分子に「成熟」していくプロセス (フォールディングや局在化) が的確に起こるための重要な要素ではないかと考えている。

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

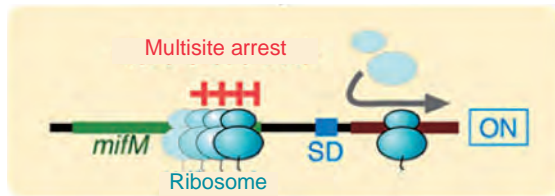
追求している。合成途上鎖はタンパク質の運命決定を微調整していると一般化することもできそうだ。このような問題意識の下で、細胞に於ける合成途上鎖 (未だ tRNA 分子に結合しているポリペプチド鎖) に注目した研究を展開している。



## 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、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示してきた。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。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り、連続した4箇所ほどの複数の箇所翻訳伸長アレストを起こしていることを見だし、このアレストには、以前に同定したトンネル狭窄部位付近と相互作用するアミノ酸残基に加えて、リボソーム活性中心に近く配置される酸性アミノ酸の連なりが必要とされることを示した。合成途上鎖はアミノ酸が1残基付加される毎にリボソームトンネル内を動くため、リボソームのペプチド転移活性を阻害するような相互作用は伸長の特定のステージで一回しか起こらないと考えられてきた。しかし、MifM の翻訳が何回も立ち止まることがわかり、トンネルの中での polypeptidyl-tRNA は直鎖状に伸びた状態にあるとは限らない可能性などが浮上した。MifM を翻訳するリボソームが立ち止まることによって mRNA の二次構造がほぐれ、下流の膜組込み因子 YidC2 の翻訳が促されるのだが、MifM は立ち止まりを何回も起こすことによ

て、YidC2 が翻訳される時間を確保しているものと考えられる。



2) 翻訳アレストの解除に関わるエレメント: MifM と同様に SecM は翻訳伸長アレストを起こすことによって、タンパク質分泌駆動因子 SecA の翻訳調節を行う。SecM 自体がシグナル配列をもつ分泌タンパク質であり、その合成途上鎖が Sec 装置による膜透過反応を受けるとアレストが解除され SecA の翻訳低下をもたらす。Sec 装置の活性が低下するとアレストが持続し、SecA の翻訳上昇をもたらす。SecM の翻訳アレストが膜透過反応に伴い解除される機構は、この制御の焦点である。分泌装置による「引っ張り力」がアレスト解除に関与するとの説があるが、我々は SecM のアレスト解除には引っ張り力に加えて、SecM 自体が持つ特異的のアミノ酸配列が関与することを見だし、解析を進めている。

3) タンパク質合成の実像: 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 メンバーが tRNA を共有結合していることを利用した合成途上鎖の選択的検出方法を開発した。大腸菌の個々のプロテオームメンバーが辿る合成途上状態のことを“sub-nascentome”と名付け、パルスチェイス in vivo 実験と精製因子を用いる in vitro 翻訳によって、各タンパク質がどのような合成途上状態を示すのかを調べる取り組みを始動した。既に、一時的な pausing を伴って翻訳されるタンパク質が予想以上に多数存在することを突きとめつつある。

### 3. Research projects and annual reports

We intend to develop a new area of research, which might be called “nascent chain biology” by addressing a concept that translation elongation speed is fine-tuned by intra-ribosomal part of amino acid sequences of the translation product as well as by dynamic behaviors of the extra-ribosomal part of the same nascent chain. We found that some of cellular factors that facilitate secretory protein export and membrane protein insertion are controlled by regulatory nascent polypeptides that function in accordance 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, obligatory 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 that somehow lead to elongation arrest at multiple, consecutive sites.

Whereas physical pulling force has been suggested to trigger translocation-dependent release from the arrest, we found that SecM contains a segment required for the arrest release. Thus, regulatory nascent polypeptides appear to contain a specific arrest release element that functions in conjunction with both the arrest sequence and the N-terminal localization determinant.

2. Although polypeptidyl-tRNAs are important components of translation, they have not been profiled in cellular contexts. We developed experimental methods to detect nascent polypeptides termed “nascentome”, making use of the fact that they have covalently attached tRNA at the end. We have started to profile *E. coli* proteome members with respect to their translation elongation. Our approaches include in vivo pulse-chase “sub-nascentome” analysis and in vitro translation of each cloned ORF of the *E. coli* genome. Results so far indicate that translation of a significant fraction of them undergoes pausing, strong or weak.

### 4. 発表論文

Chiba, S. and Ito, K. (2012) Multisite ribosomal stalling: a unique mode of regulatory nascent chain action revealed for MifM. *Mol. Cell* 47, 863-872

Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K. and Abo T. (2012) ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 86, 37-50

## 5. 著書および総説

Ito, K. and Chiba, S. (2013) Arrest peptides: *cis*-acting modulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.** 82, in press

Akiyama, Y., and Ito, K. (2013) HtpX peptidase. pp. 683-685, **Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed.** (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Academic Press

Hizukuri, Y., Ito, K., and Akiyama, Y. (2013) RseP Peptidase. pp. 1545-1550, **Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed.** (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Academic Press

千葉志信, 伊藤維昭 (2012) 枯草菌MifMの解析から明らかにされた翻訳の途上にあるポリペプチド鎖によるユニークな翻訳伸長の停止. ライフサイエンス 新着論文レビュー <http://first.lifesciencedb.jp/archives/5534>

## 6. 招待講演、シンポジウム等

伊藤維昭: 合成途上鎖のバイオロジー, 九州大学グローバルCOEプログラム 理医連携特別講演会“独創的研究の世界発信を続ける「七人の侍」”, 2012. 2. 29, 福岡市

Ito, K.: Analysis of nascentome, cellular polypeptidyl-tRNAs, CECAM Workshop “Ribosome-associated protein folding: Translation, auxiliary factors, and translocation”, May 29-31, 2012, Lausanne, Switzerland

千葉志信, 伊藤維昭: 合成途上鎖の働きと運命, 第12回蛋白質科学学会年会 ワークショップ “in vivo蛋白質科学:構造形成と分解”, 2012. 6. 20-22, 名古屋市

Ito, K.: Analysis of cellular polypeptidyl-tRNAs, SFB594 3rd International Symposium “Molecular Machines in Protein Folding and Translocation”, July 23-25, 2012, Munich, Germany

伊藤維昭: 翻訳のスピード制御について, 独創的発想に富む科学者育成プログラム「出る杭を伸ばさずヘリックスプロジェクト」採択事業 七人の侍による記念講演会, 2012. 10.24 秋田市

## 7. 学会発表

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MifM によるタンパク質膜組込のモニタリング, 第1回 RIBOSOME MEETING, 2012. 3. 15-16, 東広島市

伊藤維昭, 茶谷悠平, 中森健太, 千葉志信, 秋山芳展, 阿保達彦: Nascentome: 合成途上鎖の解析, 第1回 RIBOSOME MEETING, 2012. 3. 15-16, 東広島市

伊藤維昭, 茶谷悠平, 中森健太, 千葉志信, 秋山芳展, 阿保達彦: Nascentome: 合成途上鎖の解析, 第9回 21世紀大腸菌研究会, 2012. 6. 21-22, 長浜市

茶谷悠平, 伊藤維昭, 杵掛和弘, 阿保達彦: 大腸菌で見出された新規リボソーム解放機構とその生理学的意義, 第9回 21世紀大腸菌研究会, 2012. 6. 21-22, 長浜市

中森健太, 千葉志信, 伊藤維昭: 翻訳アレストの解除に関わるSecM 部位の同定, 第9回 21世紀大腸菌研究会, 2012. 6. 21-22, 長浜市

千葉志信, 伊藤維昭: 枯草菌膜組込モニターMifMのユニークな翻訳アレスト機構, グラム陽性菌ゲノム機能会議, 2012. 8. 31-9.1 焼津市

## 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 挑戦的萌芽研究 「新しい機能を持つ翻訳途上鎖の探求」 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

茶谷悠平博士(日本学術振興会特別研究員)が仁科賞を受賞した(岡山大学大学院での研究に対して)。

京都新聞(1月20日付け)で当研究室の合成途上ポリペプチド鎖(nascentome)を検出する研究手法が紹介された。

# 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

本研究室では、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と眼、ニワトリ胚およびアフリカツメガエルの心臓である。

### （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。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、間充織からは平滑筋が分化する。平滑筋は器官ごとに固有の配置を取る。2012年には、平滑筋の配置が上皮によって制御される機構の解明に取り組んだ。

### （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、小腸幹細胞の特異的のマーカ遺伝子である Lgr5 の発現を、発生過程を追って観察した。

### （3）心臓の発生に関する研究

心臓全体に酸素と栄養分を供給する冠動脈は、心外膜原基（proepicardium; PE）と呼ばれる突起状の細胞集団が、心臓の外から新たに付け加わることによって生じる。In vitro 組織培養法を用い、心外膜原基が心臓と融合する機構を解析した。加えて、明瞭な冠動脈を持たないアフリカツメガエルの心臓における心外膜原基の移動、分化を解析するために有用なマーカ遺伝子を単離した。

## 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

昨年、平滑筋特異的のアクチンに対する抗体を用いた研究で、消化器官固有の平滑筋の配置は、孵卵 10 日頃には確立することを明らかにした。2012 年には、in vitro 器官培養法と、in ovo 上皮移植法を用いて、上皮が平滑筋の配置に影響を与えるかどうかを検討された。上皮の配置に特徴のある小腸と前胃を用いて、それぞれの上皮と間充織を組み合わせさせて培養し、また、前胃上皮を予定小腸域に移植して、平滑筋の配置が変更されるかどうかを調べた。in ovo 移植にはウズラの上皮を用いた。in vitro 培養では、平滑筋のパターンが必ずしも維持されず、明瞭な結果は得られなかった。in ovo 移植の実験では、小

腸上皮を予定胃領域に移植することに成功し、現在筋肉の分化を検討している。

### （2）消化器官幹細胞に関する研究

Lgr5 遺伝子のプローブを作成し、In situ hybridization によって小腸の発生過程における Lgr5 陽性細胞の局在を調べた。胚発生の後期（孵卵 15 日以後）には、絨毛の基部に陽性細胞が検出された。孵化直前に一過性に発現が低下し、孵化後には陰窩に陽性細胞が局在した(図 1)。また、小腸幹細胞のマーカといわれる Hairy1 の発現も検討したところ、Hairy1 陽性細胞は Lgr5 陽性細胞より早くに出現し、初期には絨毛上部にも見られた。このことから、小腸幹細胞は Hairy1 陽性細胞のうち、絨毛基部に局在する細胞から分化するという仮説を得て、現在その検証を行っている。

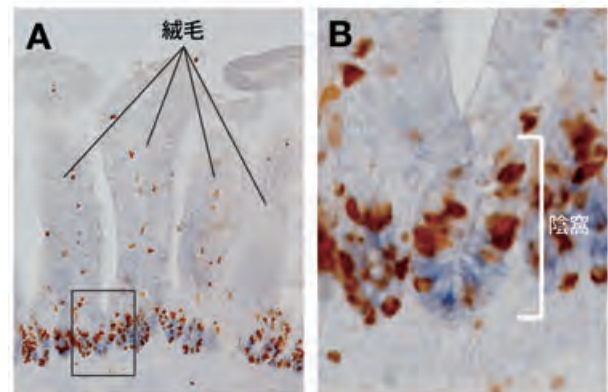


図1 孵化後3日目ヒヨコ小腸における増殖細胞の局在とLgr5遺伝子の発現。(B)は(A)の四角で囲った部分を拡大したもの。絨毛の基部にある陰窩で、細胞増殖を示すBrdU取り込み活性(褐色)と腸幹細胞マーカ遺伝子Lgr5の発現(青紫色)が検出された。

### （3）心臓の発生に関する研究

心外膜原基は、心房と心室の間に位置する房室接合部への融合を経て心臓へと進入する(図 2A)。心外膜原基の融合が常に房室接合部でのみ起こる仕組みを明らかにするため、2011年に確立した in vitro 組織培養法を用いて、心外膜原基を房室接合部または心房と接触した状態で培養した(図 2B)。培養 8 時間後には心外膜原基の心臓への融合が、心外膜原基表面を覆う中皮組織の開口として容易に同定できた(図 2C)。融合は、心房との共培養よりも房室接合部との共培養でより高頻度に認められた(図 2C, D)。これらの結果は、接触を介した組織間相互作用

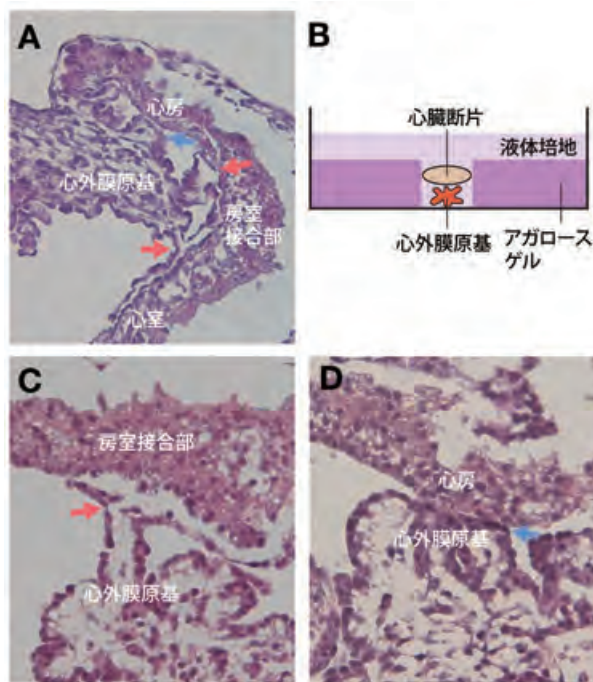


図2 接触を介した組織間相互作用が心外膜原基の進入経路を制御する。(A) 心外膜原基の心臓への進入。心外膜原基は、その表面を覆う上皮組織の開口を経て心臓の房室接合部と融合する(赤矢印)。開口は心房に接する部位には見られない(青矢印)。(B) In vitro組織培養による組織間相互作用の解析。(C,D) In vitro培養系における心外膜原基の心臓断片への融合。房室接合部との共培養(C)では、心房との共培養(D)よりも高い頻度で融合が見られた。

用が心外膜原基の進入経路を制御することを示唆する初めての実験生物学的証拠である。加えて、アフリカツメガエル cDNA から心外膜原基マーカー遺伝子 Tbx18, Wt1 および血管内皮マーカー遺伝子 Flk1 を単離し、今後の比較発生学的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 and heart of the chicken and *Xenopus* embryos.

#### (1) Smooth muscle layers of the digestive organs

Digestive organs in the vertebrates, the esophagus, stomach, small and large intestines, have specifically arranged smooth muscle layers important for the transport of food through the gut. We are analyzing the effect of the epithelium on the arrangement of smooth muscle layers in the embryonic development.

#### (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 study the expression of stem cell-specific markers, *Lgr5* and *Hairy1* genes, during the small intestinal development.

#### (3) Heart

Development of coronary arteries, which supply oxygen and nutrients through the heart, depends on the entry of an extracardiac rudiment called the proepicardium (PE) to the primitive heart tube. We study mechanisms underlying the entry of the PE to the heart, using an in vitro tissue culture system. We also isolated PE marker genes, *Tbx18* and *Wt1*, and an endothelial marker gene *Flk1* to study PE development in *Xenopus*, which lacks coronary arteries.

### Results

#### (1) Smooth muscle layers of the digestive organs

We analyzed the effect of the epithelium on the arrangements of smooth muscle layers by cultivating in vitro the heterologous epithelial-mesenchymal recombinations. However, the arrangement of the layers was not maintained in in vitro culture. We also implanted in ovo the intestinal epithelium into the presumptive stomach region. The epithelium successfully differentiated in the heterologous region, and now we are analyzing the pattern of smooth muscle layers.

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

We cloned chicken *Lgr5* and *Hairy1* genes and made specific probes for these genes. In situ hybridization revealed that *Lgr5*-positive cells first appeared on day 15 of incubation at the base of the villi. The expression became weak just before hatching, and after hatching, the positive cells were localized definitively in the crypt of the villi (Fig.1). *Hairy1*-positive cells appeared earlier than *Lgr5*-positive cells and distributed also in the upper parts of villi. We are now testing the possibility that intestinal stem cells differentiate from the *Hairy1*-positive cells located at the base of villi.

#### (3) Heart

The proepicardium (PE) enters the heart through its fusion to the atrioventricular junction (AVJ) of the heart. To study mechanisms that restrict the PE entry site to the AVJ we co-cultured PEs either with the AVJ or with the sinoatrium

(SA), maintaining their direct contact (Fig.2). After 8 hours of culture, the fusion of the PE to the heart segment, as detected by the opening of the surface mesothelial tissue, was observed at the site of contact. Importantly, the PE fused more frequently with the AVJ than the SA. The results provide the first experimental evidence that the entry site of the PE is regulated by contact-dependent interactions with the heart. We also identified

#### 4. 発表論文 なし

#### 5. 著書および総説

石井泰雄、三川隆：冠動脈発生の分子メカニズム，Annual Review 2012循環器，中外医学社，6-14，2012.1.25

八杉貞雄：細胞 (Allen, T. & Cowling, G. 著)，東京化学同人，2012.12.3.

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

Ishii, Y., Garriock, R., Navetta, A. Coughlin, L., Yasugi, S. and Mikawa, T.: Guidance and attachment of Coronary and epicardial progenitor cells to the embryonic heart. Joint Seminar (CU-KSU-MUSC) in Science & Technology, Bangkok, Thailand, 2012.3.15

八杉貞雄 (2012) 新しい理科指導要領について. 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, 2012.10.6.

#### 7. 学会発表

石井泰雄、ヨウ・テンテン、八杉貞雄：眼の形態形成に異常を示すニワトリモデル胚の作製. 日本動物学会近畿支部研究発表会. 奈良, 2012.5.12.

Ishii, Y., Yang, T. and Yasugi, S.: A new model system to study eye morphogenesis in the chick embryo. 日本発生生物学学会第45回大会, 神戸, 2012.5.27.

石井泰雄、ヨウ・テンテン、八杉貞雄：低温条件下におけるニワトリ胚眼原基の陥入不全. 日仏生物学学会第176回例会、東京、2012.6.9.

Ishii, Y., Yang, T. and Yasugi, S.: A new model for studying organ morphogenesis. AFLAS 2012 “A healthier future through laboratory animal research”, Bangkok, Thailand, 2012.10.10-12.

Ishii, Y., Yang, T. and Yasugi, S.: A new method to generate chick embryo model for studying eye morphogenesis. 7th

Chick Meeting, Nagoya, 2012.11.18

中村卓哉, 石井泰雄、八杉貞雄：消化器官幹細胞の起原を求めて. 日仏生物学学会第177回例会、京都、2012.12.8.

藤本聖恵, 八杉貞雄、石井泰雄：ニワトリ胚期消化器官における Eph/ephrin ファミリーの発現. 日仏生物学学会第177回例会、京都、2012.12.8.

#### 8. その他特記事項

##### 1. 外部資金

科学研究補助金・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 (5年)

##### 2. 知財産権等 なし

##### 3. 学外活動

八杉貞雄、石井泰雄：「高校生物教職員研修会 発生生物学リカレント講座」講師、神戸市、2012.10.6-7.

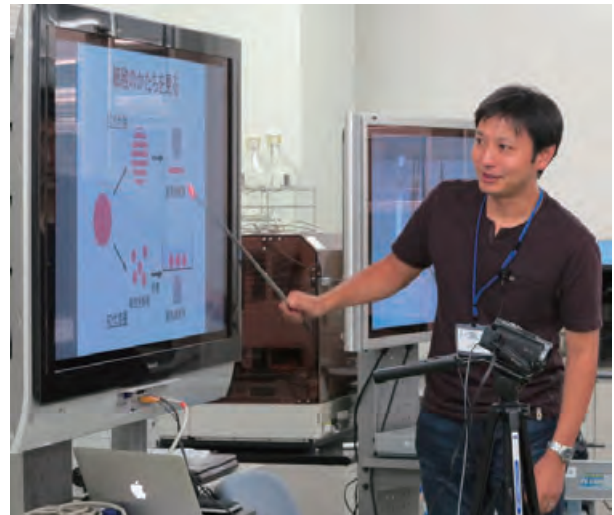
八杉貞雄：日仏生物学学会会長

八杉貞雄：日本発生生物学学会機関誌編集委員

八杉貞雄：日本学術振興会専門委員

八杉貞雄：日本生物学オリンピック委員

##### 4. 受賞等 なし



高校生物教職員研修会にて

## 生命資源環境学科

生命資源環境学科は、生物と環境との相互作用の視点から様々な生命現象を探求しており、その研究成果を生物資源の効果的な活用に結びつけることをめざしている。すなわち、生物はこの地球上に単独で生存しているわけではなく、それを取りまく他の生物ならびに非生物的環境とのかかわり合いのなかで、その限りある生命を全うしている。生命資源環境学科では、植物や昆虫をはじめ、生物が環境に応じてどのような振る舞いをみせるのか、またそれはその生物の生存戦略とどのように結びついているのかを研究している。また生物は、時間とともにその有り様を変化させる存在であり、細胞内の生体分子ひとつをとってみても、その構造には機能を最大限に発揮させるような進化的背景があるはずである。このような観点から当学科ではタンパク質の構造と機能の解析も行っている。

生命資源環境学科は、分子や細胞レベルの生物学に加えて、いわゆるマクロな視点を備えた生物学を教育・研究の根本に据えているところに特色がある。これらの生物学の分野で扱われるのは、遺伝、進化、生態、植物生理、環境応答、共生など、生命とその活動を理解するうえでの本質的な部分であり、これらの考え方を共有できる研究・開発・教育分野の人材育成をめざしている。また、当学科では、これまで地球の豊かな資源を享受することで繁栄してきた人類が、近い将来に直面するであろう、資源の枯渇と地球環境の悪化という大きな問題の解決方法を探る研究も推進している。ゲノム情報を駆使し、植物・動物の品種改良や、集団遺伝学、バイオインフォマティクス、生体分子機能学などの分野の研究を進めており、新たな生命資源の開発と既存の資源の有効利用の方策を探ることで、将来の食、医療、環境への貢献をめざしている。



# 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研究にいたるまで、植物オルガネラ遺伝学分野の広範な研究に取り組んでいる。その中で、ここ数年は、以下の3つのプロジェクトを重点的に進めてきた。

- 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

この中で、1)と2)のプロジェクトは、同名の研究課題名でそれぞれ採択されている外部資金で実施されてきたが(8. その他特記事項の欄を参照)、いずれも平成24年度に最終年度を迎えた。現在、その成果を論文にまとめるべく、実験結果を精査しているところである。

このうち1)のプロジェクトでは、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大きな目標に、葉緑体の遺伝子組換え実験を行ってきた。戦略的に、まずモデル植物の栽培タバコを用いて、葉緑体の形質転換体を作成し、どのような遺伝子を導入すれば、最も目的にかなう植物が得られるかを検証し、続いてタバコで得た実験ノウハウをパンコムギ、レタス、トマトなど他の植物種(作物)へ適用しようとしている。とりわけ、葉緑体の遺伝子組換えで非生物学的ストレスに強い植物を育成できないか検討する実験は大規模に展開しており、異なる遺伝子を持つ様々な組換え体を作成後、強光や除草剤への耐性を調査した。具体的に、葉緑体のアスコルビン酸/グルタチオンサイクルを構成する酵素(GR, SOD, APX, MDAR 及び DHAR)の遺伝子を単独、あるいはオペロンとして葉緑体ゲノムに導入し、有害な活性酸素分子種(ROS)を効率的に消去させようとした。閉鎖系温室で一度に栽培できるタバコの個体数には限りがあるので、組換え体の一部は現在も自殖による世代更新を進めているところであるが、これまで上記5つの遺伝子を単独で、あるいは複数持つ10種類の組換え体(25系統)を得ることができた。その結果、これらの組換え体は、種類によって程度の差はあるものの、いずれも導入された遺伝子にコードされた酵素の活性が上昇し、ROSを発生させる除草剤への耐性が高まることが示されている。

また、上記2)のプロジェクトでは、ダイコンを材料に、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メカニズムを包括的に研究している。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稔性回復遺伝子(Rf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。

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

1)のプロジェクトでは、以前の研究との関連で、前述したサイクルの基質の1つであるグルタチオンの濃度を高める実験を行った。グルタチオンは葉緑体に局在する酵素(GSH1, GS)で合成されるトリペプチドであり、細胞内の還元力の供給に重要な働きをするばかりではなく、重金属をキレートするフイトキレーションの前駆物質としても知られている(図1)。



図1. グルタチオンの合成経路

今年度の実験では、GSH1及びGS遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換え体を、それぞれ3系統及び5系統得ることに成功した。これらの系統を用いて、葉に含まれるグルタチオン量を測定したところ、GSH1系統では野生型と比べて酸化型/還元型のいずれもが大幅に増加していたが、GS系統では野生

型と差が認められなかった(図 2)。このことから、葉緑体におけるグルタチオン合成は GSH1 が律速になっていることが示唆された。今後、ストレス耐性の調査など GSH1 系統の特徴付けを行う予定である。

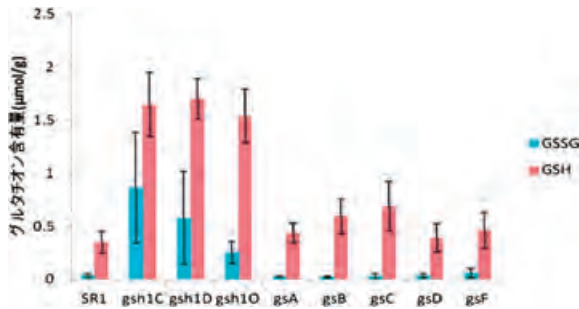


図2. GSH1 及び GS 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換え系統のグルタチオン含有量

葉緑体の遺伝子組換え技術をより広範な植物に適用しようという1)のプロジェクトのコンセプトに沿って、今年度は栽培タバコ以外の植物で葉緑体の形質転換体を得ることに注力した。当然のことながら、植物の種類が異なれば、遺伝子導入に必要な外植片の培養方法や個体への再分化条件は異なる。また、ボンバードメントの条件も大きく異なる。さらに材料を安定して実験に供するためには、植物自体の栽培・管理も最適化せねばならない。そのため今年度は、国内の共同利用・共同研究拠点が募集する、共同研究課題に積極的に応募し、栽培施設を借用したり(パンコムギ)、遺伝資源や培養・再分化のノウハウを移植したり(トマト)した。具体的にパンコムギは鳥取大学乾燥地研究センターでパンコムギのアカダルマ及び Bob White 両品種を栽培してもらい、形質転換実験に使用する外植片(開花後 2 週間の未熟胚)を 11 月~12 月に入手できるシステムを構築した。またトマトは、筑波大学の遺伝子実験センターの形質転換植物デザイン研究拠点から MicroTom という特殊な系統を入手し、子葉を出発材料とする効率の良い培養・再分化系を移植した。さらに、栽培タバコの近縁種で植物分子生物学のモデル植物となるベンサミアナタバコと、レタスについて、外植片の培養から、再分化個体の栽培と採種まで、ライフサイクルを完結させるシステムを完成させた。その上で、これら 4 種の植物を対象に、葉緑体の遺伝子組換え実験を実施した。その結果、パンコムギとトマトについては組換え体を得られなかったものの、ベンサミアナタバコとレタスについては、それぞれ *apx* 遺伝子とフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換え体を、当研究室で初めて得ることができた。特にレタスは、有用物質生産系の確立に好都合な材料であり、それ自身、葉物野菜の機能性向上の実証実験に使用できるので、今後の実験の進展が大いに期待される。

今年度、上記2)のプロジェクトの一環として、全国 12 地域から採集したハマダイコンの可稔 490 個体及び雄性不稔 84 個体から DNA を調製し、ミトコンドリアの *orf138/orf125* 遺伝子の有無を PCR 法で調査した。この *orf138/orf125* 遺伝子は、それぞれオグラ型/コセナ型細胞質の雄性不稔原因遺伝子で、この研究はオグラ型/コセナ型以外の新規雄性不稔細胞質の探索を目的としている。調査の結果、不稔個体はすべて *orf138* 遺伝子を持っており、既知のオグラ型細胞質を持つと判定された。一方、三重県から採集された可稔個体の中に、コセナ型細胞質に特有な *orf125* 遺伝子を持つものが認められた。塩基配列を調べたところ、既知の *orf125* (タイプ F) と 2 カ所で塩基置換が認められ、タイプ L と命名した(図 3)。*orf125* は *orf138* に存在する 3 コピーの 39 塩基リピートの 1 つが欠失することで生じると推察されている。図 3 の結果は、*orf125* が異なるタイプの *orf138* から多能的に生じたことを示しており、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子の進化の観点から興味深い。

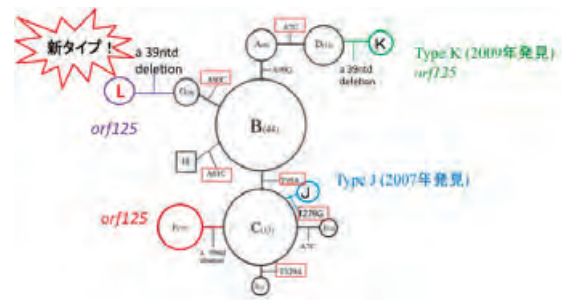


図3. ダイコンのミトコンドリア *orf138/125* 遺伝子のタイプ間の系統関係

雄性不稔/稔性回復の核側の研究では、既知の *orf687* とは異なる機構で稔性を回復する *Rft* 遺伝子を単離する実験が、総合生命科学部特約講師の安本博士により進行中であり、近々結果が得られるものと予想している。

なお、3)のプロジェクトについては、今年度 *Titicum timopheevi*, *Aegilops speltoides*, *Ae. caudata*, *Ae. umbellulata*, 及び *Ae. ovata* の細胞質を持つ置換コムギ 6 系統について、mtDNA を精製し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列データを取得した。現在、その内容を解析中であり、次年度中にゲノム解読を終える予定である。

### 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 *Triticum* and *Aegilops* 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 tomato, 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 *Triticum* and *Aegilops* species. It is known that the mitochondrial genome of some species in the genera 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 have been determined using the next-generation sequencer.

#### 4. 発表論文

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

A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC genomics* **13**: 352, doi: 10.1186/1471-2164-13-352. (2012).

S. Katayama, Y. Sugiyama, N. Hatano, T. Terachi, N. Sueyoshi and I. Kameshita: PKL01, an *Ndr* kinase homologue in plant, shows tyrosine kinase activity. *J Biochem* **152**: 347-353 (2012).

S. Nakayama, S. Shi, M. Tateno, M. Shimada, K.R. Takahasi: Mutation accumulation in a selfing population: consequences of different mutation rates between selfers and outcrossers. *PLoS ONE* **7**: e33541 (2012).

#### 5. 著書および総説

田中義行・辻村朋彦・寺地徹: ベンサミアナタバコの葉緑体形質転換プロトコール 形質転換プロトコールー植物編一、田部井豊(編)、化学同人、京都、pp. 402-408 (2012).

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

寺地徹: ダイコンのミトコンドリアゲノムの多様性とミトコンドリアと相互作用する核遺伝子の進化 日本育種学会第122回講演会、ワークショップ「ミトコンドリアは従順なオルガネラかー核・ミトコンドリア相互作用の背景ー」、京都市、2012.9.14

寺地徹: 葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物の作出 玉川大学農学研究科セミナー、町田市、2011.10.1

高橋亮: Selection & evolution in a polygenic setting. 日本遺伝学会、第84回大会ワークショップ「ゲノム時代における理論集団遺伝学」、福岡市、2012.9.24

#### 7. 学会発表

福永明日美、辻村朋彦、須頭智世、植村香織、寺地徹: グルタチオン合成酵素(GS)の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出と特徴づけ。日本育種学会第122回講演会、京都市、2012.9.23-24

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

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

## 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)

挑戦的萌芽研究「葉緑体の遺伝子組換えによるストレス耐性パニコムギの育成」(代表)

#### 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」

#### 鳥取大学 乾燥地研究センター 共同研究

「葉緑体の形質転換技術を用いたストレス耐性コムギの作出」

#### 筑波大学 遺伝子実験センター 形質転換植物デザイン拠点 共同

#### 研究

「トマトにおける効率的な葉緑体形質転換技術の開発」

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:

日本学術振興会 科研費審査委員

Gene & Genetic Systems editor

Breeding Science editor

他大学講師:京都市立大学大学院「植物バイオテクノロジー特論」

高橋亮:

Gene & Genetic Systems editor

他大学講師:筑波大学生命環境学群生物学類「理論集団遺伝学」

### 4) 受賞等

無し

### 5) その他

寺地徹、高橋亮:

日本育種学会第122回講演会運営委員会委員  
(講演会は2012.9.13-15に京都産業大学で開催された)

# 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、家畜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

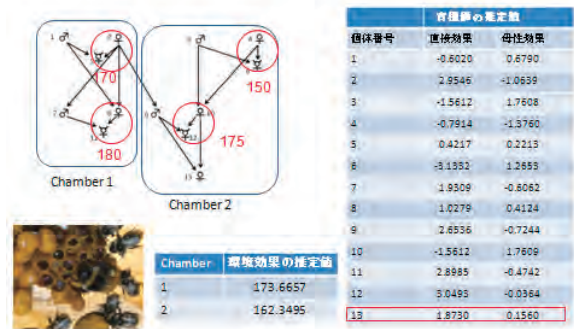
ニホンミツバチやマルハナバチなどの多くの社会性膜翅目昆虫には、女王に加えてワーカーも雄を生産を行うものがある。ワーカーによる雄の生産が集団の有効な大きさ( $N_e$ )に及ぼす影響を評価するために、中立遺伝子の頻度に生じる機会的変動を基準として、 $N_e$ の一般式を導いた。得られた式の妥当性をコンピュータシミュレーションによって評価したところ、得られた式からの予測値は、広範な条件下でシミュレーション値とよく一致した。数値計算の結果、ワーカーによる雄の生産は、一般には集団の有効な大きさを減少させることが明らかになった。その減少は、マルハナバチのように性比が1あるいは雌に偏った集団でとくに著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

### 2) ミツバチおよびマルハナバチの育種へのBLUP法による選抜の導入

BLUP法は家畜の育種において用いられている個体の遺伝的メリット(育種価)を推定するための統計的手法である。この手法を半倍數性の性決定様式を持つミツバチやマルハナバチの育種への適用を試みた。

●数値例: 母性効果モデルのBLUP法によるマルハナバチのコロニーサイズの遺伝的評価



## 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: Application of BLUP selection to honeybee and bumblebee breeding

Artificial selection on the Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) of breeding value has been widely practiced in animal breeding. In this study, we extended this selection method to apply honeybee and bumblebee breeding by taking the haplo-diploid sex determination system into account. The extension was illustrated with a small example of bumblebee breeding.

#### 4. 発表論文

T. Nomura and J. Takahashi (2012). Effective population size in eusocial Hymenoptera with worker produced males. *Heredity*, 109:261-268.

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.*, 129: 226-233.

#### 5. 著書および総説

野村哲郎 (2012). 遺伝的多様性の確保. ”牛疫学(第3版)“ 近代出版 (印刷中).

野村哲郎(2012), 牛の育種 “牛の科学“ 朝倉書店.(印刷中).

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

野村哲郎 (2012) 黒毛和種集団の遺伝的多様性の評価と維持. 日本動物遺伝育種学会・在来家畜研究会 合同シンポジウム. 名古屋大学. 2012. 3. 27.

野村哲郎 (2012) 和牛の遺伝的多様性とその維持に向けた取り組み. 第10回全国和牛能力共進会長崎大会消費者セミナー. 島原復興アリーナ. 2012. 10. 26.

#### 7. 学会発表

野村哲郎・高橋純一(2012)BLUP 法を用いた選抜計画のミツバチ育種への導入. 日本昆虫学会第72回大会. 玉川大学. 2012.9.17.

#### 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

全国和牛登録協会 育種推進委員

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

## 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な不可欠なものとなりつつある。我々はX線結晶構造解析を主要な手段として、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。この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。鳥で感染したウィ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。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  
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。

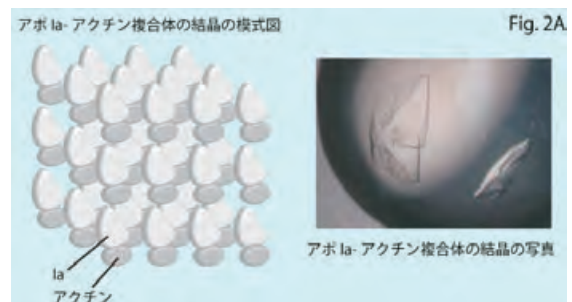
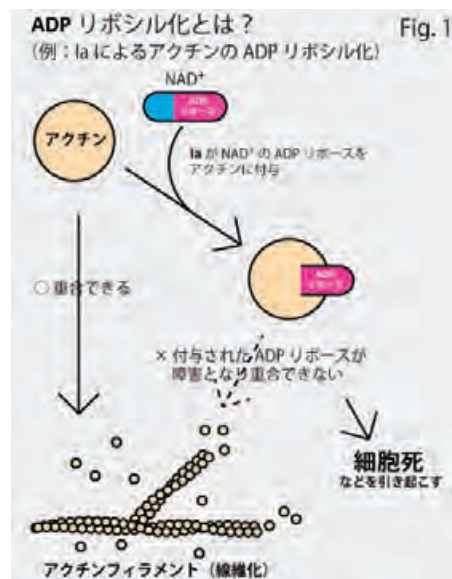
## 2. 本年度の研究成果

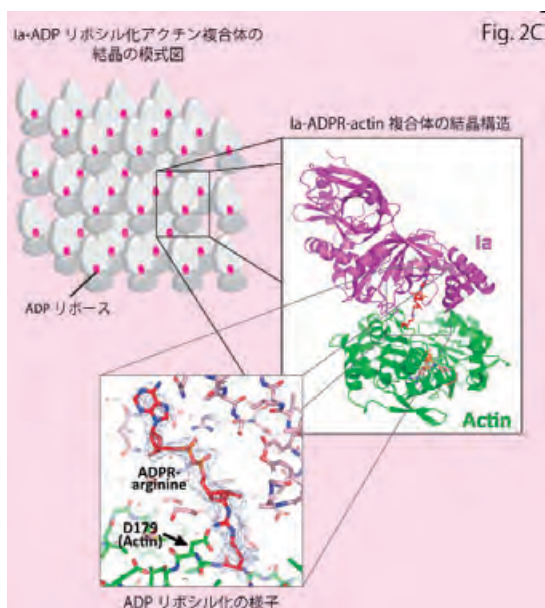
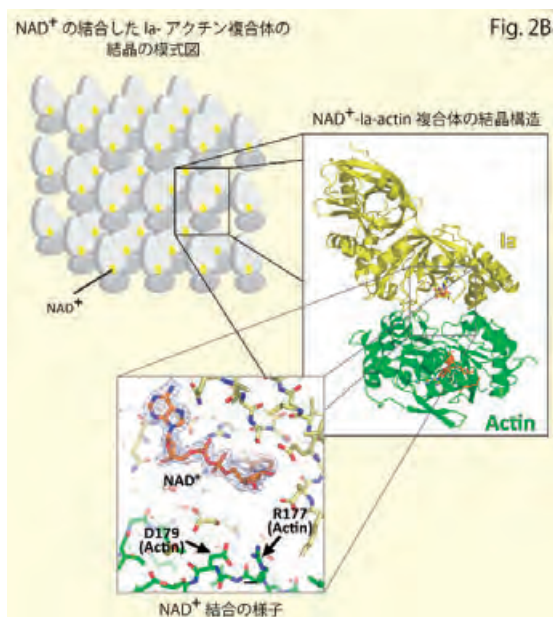
(1)初めてのアルギニン ADP リボシル化反応を捉える。  
ウェルシュ菌のアクチン特異的モノ ADP リボシル化毒素である Ia はアクチンのアルギニン 177 を特異的に ADP リボシル化する(Fig.1)。ADP リボシル化の反応機構を知るためには、毒素と基質タンパク質複合体の構造を知る事は重要である。非水解性の NAD アナログ  $\beta$  TAD を用いた、 $\beta$  TAD-Ia-actin の結晶構造のみが知られていたが、本来の基質である NAD<sup>+</sup> および反応後の ADP リボシル化された構造についてはわかっていなかった。今回、アポ Ia-actin の結晶を作成し、これへ

教授 津下 英明  
Prof. Hideaki Tsuge, Ph.D  
助教 鶴村 俊治  
Assit. Prof. Toshiharu Tsurumura



のソーキングから NAD<sup>+</sup>-Ia-actin と Ia-ADP-ribosylated (ADPR)-actin の結晶構造を高い分解能で明らかにした(Fig.2A,B, and C)。これは、ADP リボシル化反応の前と後の構造となる。その反応機構は我々が以前に提唱した strain-alleviation (緊張と緩和) model をさらに、裏づける結果となった。すなわち、NAD<sup>+</sup> から S n1 反応により、ニコチンアミドが切断したオキソカルベニウムカチオン中間体ができ、Ia にその ADP 部分を保持されたまま N リボース部分の回転移動が起こり第2の中間体を経て、アクチンのアルギニン 177 に近づくと考えられる。これにより ADP リボシル化の修飾反応が起きると考えられる。この ADP リボシル化反応機構は、アクチンを標的とした毒素以外でも RhoA を標的とした毒素 C3、さらにはヒトのモノ ADP リボシル化酵素およびポリ ADP リボシル化酵素(PARP)でも見られるかもしれないと考えている。この結果は論文として受理された (PNAS, in press)。





(2) インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの発現系の検討特に、PB2のサブユニットで発現系を検討している。既に構造解析を行っている、E627Kの変異を含む、C末端ドメインに続き、H1N1型のミドルドメインで発現、結晶化に成功した。

(3) ポリADPリボシル基分解酵素の構造と機能の解析  
 ポリADPリボシル化は、高等動物で重要なシグナル伝達のための修飾である。ポリADPリボシル化酵素PARPはDNAの損傷に伴い、自身およびヒストンをポリADPリボシル化する。これに対してポリADPリボシル基分解酵素(PARG)はポリADPリボシル基を分解する。PARPと同様にPARGも、抗がん

剤の標的と考えられ、その構造解析が期待されている。ヒトPARGの活性ドメインの発現に成功し、結晶を得た。結晶解析できるか、検討中である。

(4) 徳島文理大学との共同研究により、スフィンゴミエリナーゼのサイドエッジのマグネシウム結合が膜結合に重要な知見を得た。また東京工業大学、日本女子大学との共同研究により、新規ペルオキシダーゼDyPの基質結合の結晶構造を明らかにした。

### 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) Actin ADP-ribosylating toxin (ADPRT) such as iota toxin from *C.perfringens* ADP-ribosylates Arg-177 of  $\alpha$ -Actin, inhibits actin polymerization and induce cell rounding. Recently we resolved the first crystal structure of Ia in complex with actin and the non-hydrolyzable NAD<sup>+</sup> analog  $\beta$ TAD; however, the structures of the NAD<sup>+</sup> bound form (NAD<sup>+</sup>-Ia-actin) and the ADP-ribosylated form (Ia-ADP-ribosylated (ADPR)-actin) remain uncertain. We found that ethylene glycol as cryo-protectant inhibits ADP-ribosylation and then successfully captured NAD<sup>+</sup>-Ia-actin in crystal. We revealed high-resolution structures of NAD<sup>+</sup>-Ia-actin and Ia-ADPR-actin obtained by soaking apo-Ia-actin crystal with NAD<sup>+</sup> under different conditions. The structures of NAD<sup>+</sup>-Ia-actin and Ia-ADPR-actin respectively represent the pre- and post-reaction states. Considering all the structures in each reaction step including  $\beta$ TAD-Ia-actin as a transition state, the strain-alleviation model of ADP-ribosylation, which we proposed previously, is experimentally confirmed and improved. Moreover, this reaction mechanism appears to be applicable not only to Ia but also to other ADP-ribosyltransferases.

(2) We got crystals and collected the new diffraction data of the PB2 middle domain (H1N1) in RNA-polymerase from influenza A virus. The structural refinement is going on.

(3) In sphingomyelinase, we reported the relationship of the membrane binding and the magnesium binding at side-edge site. We also reported the cofactor binding of novel peroxidase DyP.

### 4. 発表論文

Yoshida T, Tsuge H, Hisabori T, Sugano Y. Crystal structures of dye-decolorizing peroxidase with ascorbic acid and



2,6-dimethoxyphenol.

*FEBS Lett.* **586**(24):4351-6. (2012)

Oda M, Hashimoto M, Takahashi M, Ohmae Y, Seike S, Kato R, Fujita A, Tsuge H, Nagahama M, Ochi S, Sasahara T, Hayashi S, Hirai Y, Sakurai J. Role of sphingomyelinase in infectious diseases caused by *Bacillus cereus*. *PLoS One.* **7**(6):e38054. (2012)

Oda M, Takahashi M, Tsuge H, Nagahama M, Sakurai J. Role of side-edge site of sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Biochem Biophys Res Commun.* **422**(1):128-32. (2012)

## 5. 著書および総説

Kuzuhara T, Tsuge H. The tertiary structures of the domains of influenza RNA polymerase. *Seikagaku.* 2012 Sep;84(9):780-5. Japanese.

## 6. 招待講演、シンポジウム等

なし

## 7. 学会発表

鶴村俊治、津守耶良、秋こう、津下英明

アクチン ADP リボシル化反応に伴う酵素の構造変化  
タンパク質科学会 2012. 6

Hideaki Tsuge, Toshiharu Tsurumura, Masataka Oda, Masahiro Nagahama Actin Recognition and ADP-ribosylation of *C. perfringens* iota-toxin The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2012. 9. 13

津下英明 アルギニン ADP リボシル化初めての可視化  
ビタミンB研究協議会, 京都国際交流会館, 2012. 11. 17

鶴村俊治、津下英明

モノアシルグリセロールリパーゼの二量体形成はその機能に重要か? 生化学会 2012. 12

秋こう、鶴村俊治、畠山大、葛原隆、津下英明

インフルエンザウィルスRNAポリメラーゼPB2のX線結晶構造解析 生化学会 2012. 12

## 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」 主担  
厚生労働省科学研究費 「がん幹細胞を標的とした化学療法及び放射線療法の PARC 阻害剤による効果増強法の実用化研究」 分担  
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」 分担  
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」 分担

### 2. 知的権等

なし

### 3. 学外活動

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

研究会開催: ビタミンB研究委員会 第430回研究協議会 (京都大学 楽友会館、11/27)

# 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F<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>育種においては、確実かつ効率的にF<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>採種を可能にする植物の遺伝的特性として細胞質雄性不稔性があり、実際にこの特性が多くくの作物のF<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>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

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は、多くの栽培・野生ダイコンに分布することが明らかになっている。そのうち、中国の栽培ダイコンから *orf687* がクローニングされたが、これとは異なる稔性回復遺伝子が日本に自生するハマダイコンに存在することが明らかになり、*Rft* と名づけられた。一方、これら2つの遺伝子を持たないにもかかわらず、稔性回復機能を有するダイコンが複数発見された。このうち、ヨーロッパの栽培ダイコンである「クロダイコン」が持つ稔性回復遺伝子の構造について詳細な解明がなされた。遺伝解析の結果、クロダイコンは単一で優性の稔性回復遺伝子を持つことが明らかになり、この遺伝子は転写レベル

でなく、翻訳レベルで雄性不稔遺伝子の発現を抑制することが示された。

この稔性回復遺伝子とその近傍の構造を調査したところ、クロダイコンの稔性回復遺伝子は *orf690* であると推定された。さらにこの *orf690* は、すでに単離された *orf687* が座乗する染色体上の位置に存在することが明らかになった。*orf687* の近傍には、*orf687* と類似した塩基配列を有するものの、稔性回復機能を持たない *ppr* 遺伝子の *pprA* および *pprC* がタンデムに存在している。これらが存在する領域の配列とクロダイコンの *orf690* およびその周辺の塩基配列とを比較したところ、クロダイコンの稔性回復遺伝子は、*pprA*, *orf687*, *pprC* が存在する領域における複雑な遺伝的組み換えが頻繁に起こった結果、生じたものであることが明らかになった。

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

シロイヌナズナとキャベツの間で作出した雄性不稔性の体細胞雑種を用いて、戻し交雑第4世代 ( $BC_4$ ) までを獲得した。体細胞雑種とその後代のミトコンドリアの遺伝子についてサザン解析を行ったところ、9 遺伝子が両親種のバンドをあわせ持つパターンを示し、7 遺伝子が体細胞雑種特有のバンドパターンを示していた。さらにこのようなミトコンドリア遺伝子の構造は戻し交雑を経ても、安定して後代に伝達されていることが明らかになった。その一方で、 $BC_3$  世代について花粉稔性を観察したところ、安定して雄性不稔を示す個体と、部分的に稔性を回復する個体が認められた。このような、部分可稔化の原因を調査するとともに、さらに戻し交雑を進めて、実用的な雄性不稔系統を開発しようとしている。

また、上記の体細胞雑種とその後代に特有のミトコンドリアゲノムの構造を、他のアブラナ科植物のミトコンドリアと比較するために、多くのアブラナ科植物でミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した。すなわち、体細胞雑種の一方向の親であるキャベツに加えて、ハクサイ、クロガラシおよびダイコン (4 品種) についてミトコンドリアのゲノム解析を行った。

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

ナスの細胞質雄性不稔のうち、花粉形成不全型の雄性不稔に対する稔性回復遺伝子の DNA マーカーを開発した。すでに得られているマーカーは、低率ながら組換え個体を生じるものであった。そこで、これらのマーカーよりさらに稔性回復遺伝子と強く連鎖した DNA マーカーを検索したところ、全調査 165 個体において全く組換え個体が観察されない DNA マーカーが発見された。そこでこのマーカーの STS 化を進めた。

一方、現在までの研究で、ナスの栽培種および野生種においては、ミトコンドリア遺伝子のサザン解析および *atp1* 遺伝子周辺の塩基配列の解析によって、3 タイプの細胞質が識別されている。そこでこれら3タイプのミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定している。

### 3. Research projects and annual reports

In the field of plant breeding,  $F_1$  hybrids have many genetic advantages and contribute to the increase of worldwide crop production. For the efficient and stable  $F_1$  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*. Whereas, we found that various wild and cultivated radishes possess fertility restoring genes for Ogura CMS. Hitherto, two fertility restoring genes were known. One is *orf687* in a Chinese variety, and another is *Rft* distributed in Japanese wild radishes. We observed that a European radish cultivar, 'Kurodaikon', has a fertility restoring gene different from both of *orf687* and *Rft*. We, thus, determined the DNA sequence of this new gene. From the results we estimated the genetic processes in which the fertility restoring gene of 'Kurodaikon' was produced.

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 obtained by successive back-crosses with *B. oleracea*. So far, the pollen fertility was investigated in the  $BC_3$  progenies. The  $BC_3$  progenies were segregated into completely male sterile plants and partially fertile plants. However, all the  $BC_3$  progeny plants had the identical structure of mitochondrial genome. Further

back-crosses and observation of pollen fertility are now undertaken.

### 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

Y. Tanaka, M. Tsuda, K. Yasumoto, H. Yamagishi, T. Terachi: A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics*. Published online: 13 July 2012.

M. Yoshimi, Y. Kitamura, S. Isshiki, T. Saito, K. Yasumoto, T. Terachi, H. Yamagishi: Variations in the structure and transcription of the mitochondrial *atp* and *cox* genes in wild *Solanum* species that induce male sterility in eggplant (*S. melongena*). *Theoretical and Applied Genetics* in press 2013.

## 5. 著書および総説

なし

## 6. 招待講演、シンポジウム等

山岸博：オルガネラゲノム工学による細胞質雄性不稔の開発。  
日本育種学会 第122回講演会第54回シンポジウム、京都市、  
2012.9.13-16

山岸博：スゲキナが生み出す上賀茂の風景と文化。日本育種  
学会 第122回講演会 市民公開シンポジウム、京都市、  
2012.9.13-16

山岸博：ダイコン属植物における細胞質の分化および栽培  
ダイコンの起源。第3回総合生命科学部シンポジウム「植物バ  
イオテクノロジーと細胞質ゲノム研究の未来」、京都市、  
2013.3.8

山岸博：シロイヌナズナとキャベツの細胞融合による雄性不  
稔の開発、京都市、2012.3.9

山岸博：オルガネラゲノム工学による細胞質雄性不稔の開発、  
東京都千代田区、2013.3.14

## 7. 学会発表

辻村真衣、森直樹、山岸博、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 2. *Aegilops speltoides* 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123回講演会、東京都、2013.3.27-28

安本景太、高木宏樹、寺内良平、寺地徹、山岸博：オグラ型雄  
性不稔ダイコンの稔性回復に関わる *Rft* 遺伝子座の構造解析。  
日本育種学会第123回講演会、東京都、2013.3.27-28

## 8. その他特記事項

### 1. 外部資金（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」

### 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

日本育種学会幹事

日本育種学会第122回講演会運営委員会委員長

### 3. その他

副学長（2010年10月～）

# 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。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

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 のゲノム塩基配列完全解読を進めている。ドラフトゲノム配列を基に予備的なゲノム比較解析を行なった。*B. elkanii* USDA61 株は、1926年に米国ノースカロライナ州で栽培されたダイズ根粒より分離された菌株であり、*rjlrj1* 保有ダイズに窒素固定能を持つ根粒を形成させる一方で、窒素固定のエネルギー再利用を促すヒドロゲナーゼ活性は検出されず、さらに *Rj4* 保有ダイズに有効根粒を形成できないなどの特徴をもつ。ダイズ根粒菌では、*B. japonicum* の2菌株 USDA110とUSDA6について、ゲノム解読の完了により全遺伝子情報が公開されている。ところが、*B. elkanii* の *B. japonicum* との共生特性の違いは明らかであるものの、比較に十分な *B. elkanii* ゲノム情報は公開されておらず、*B. japonicum* USDA110 とのゲノムレベルでの違いを検討することは困難な状況にある。そこで、*B. elkanii* USDA61 株の全遺伝子情報の解明を目指したうえで、*B. japonicum* との遺伝子構成の比較により、上記特性の分子遺伝学的な違いを明らかにすることを目的として本研究を進めている。ダイズ根粒菌の共生アイランド内には、主要な共生窒素固定関連の遺伝子クラスターが存在する。また、共生

アイランド領域は、染色体全体と比べて GC 含量が低く、tRNA 遺伝子に隣接する特徴を持つ。これは共生アイランドが外来性因子であり、tRNA 遺伝子に挿入されていることを示唆している。*B. japonicum* USDA110 の場合、バリン tRNA 遺伝子への挿入であるが、*B. elkanii* USDA61 のドラフトゲノム配列を検討したところ、843 kb の共生アイランドがグルタミン酸 tRNA 遺伝子へ挿入されていることが推測された(図1)。次に、*B. elkanii* USDA61 ドラフトゲノムから、全タンパク質遺伝子(9024 遺伝子)を予測した。共生アイランド領域には 736 遺伝子が予測され、それぞれを *B. japonicum* USDA110 と比較したところ、類似性の高い遺伝子には共生関連遺伝子の *nod*, *nif*, *fix*, *rhc* の大部分が含まれていた。ところが、共生アイランド遺伝子間で類似する遺伝子数の比率はゲノム全体の比率に比べて低いことが示された。つまり、同じ *Bradyrhizobium* 属のゲノムに挿入されているものの、これらの共生アイランドは分子系統的に離れていることが予測される。

## 3. Research projects and annual reports

Diversified microorganisms are able to colonize the intercellular, and sometimes also intracellular, spaces of plant tissues, without causing apparent damage to the host plant. Bacterial endophytes and rhizobia have been isolated from several tissues in numerous plant species. Many bacterial strains have beneficial effects on plant growth and health. Some beneficial strains of them are studied in terms of the molecular mechanisms of establishment inside plants and their functions well. We reported the full genome sequences of such bacteria, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, and *Azospirillum* sp. B510. The genomic information provided valuable insights into the life of the bacteria, including information about interactions with host plants. We examine the nucleotide sequences of the other related endophytic bacterial strains genomes and deduce the symbiotic functional gene repertoire in their genomes. Comparative genomics of naturally occurring plant-associated bacteria have a potential for providing information that can be used to develop enhanced plant-microbe interaction.

*Bradyrhizobium elkanii* USDA61 is a strain isolated from a nodule of soybean cultivated in North Carolina, United States. USDA61 is able to nodulate having nitrogen fixation ability to a soybean cultivar genotype *rjlrj1*, while it has a feature of forming very few nodules to the genotype *Rj4*, and the hydrogenase activity promoting nitrogen fixing energy has not

been detected. Two *B. japonicum* strains, USDA110 and USDA6, has been completed the genome analyses, and all their genetic information are available. Although some symbiosis properties of *B. elkanii* are different from ones of *B. japonicum*, it is difficult to examine the differences at the genomic level between them, because the *B. elkanii* genome information is not shown sufficiently. Therefore we started the genome sequencing of *B. elkanii* USDA61. The draft genome sequence consisted of two circular replicons of 8747987 and 101809 bp long. A symbiosis island 843 kb in length was identified. Seven hundred thirty-six putative protein-coding genes were assigned in this region, and the genes including those related to symbiotic nitrogen fixation were deduced.

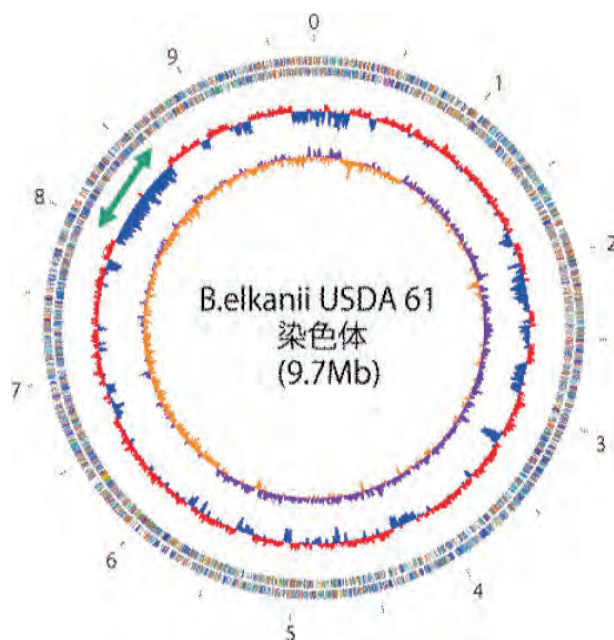


図1 ドラフトゲノム配列を基に作成したダイズ根粒菌ゲノム地図(緑色の矢印部分が予測された共生アイランド領域を示す。)

#### 4. 発表論文

Kuno S, Yoshida T, Kaneko T, Sako Y. Intricate interactions between the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and foreign genetic elements, revealed by diversified clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) signatures. *Appl Environ Microbiol.* 2012 78(15):5353-5360.

#### 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, 宮澤幸樹, 飛弾英伸, 平川英樹, 渡辺安希子, 田畑哲之, 佐藤修正:ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* のゲノム構造解析 第6回日本ゲノム微生物学会年会、豊島区、2012.3.10-12

Takakazu Kaneko, Nobukazu Uchiike, Hiroko Maita, Hideki Hirakawa, Kiwamu Minamisawa, Akiko Watanabe and Shusei Sato: *Bradyrhizobium japonicum* Character Predicted from Genomic Comparison of Two Strains. The XV Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, 2012.7.30-8.2

宮澤幸樹、飛弾英伸、太田公平、佐藤修正、平川英樹、田畑哲之、岡崎伸、佐伯和彦、金子貴一:ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 のゲノム構造解析 第22回植物微生物研究交流会、神戸市、2012.9.25-27

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

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

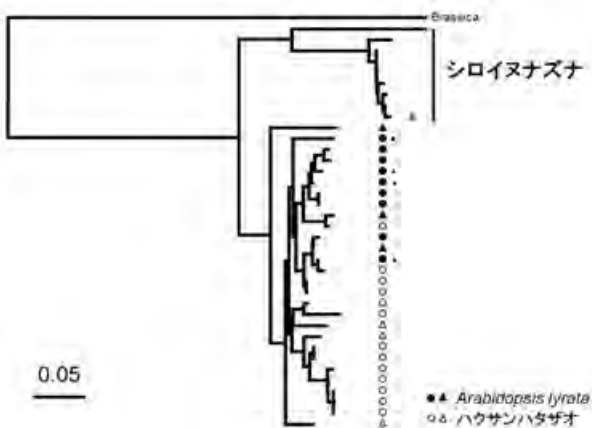


図1 ONS EN転移因子の系統関係

本研究分野では具体的に次の3点について研究を進めている。

### 1) 動原体領域の進化機構

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

### 2) 転移因子の進化パターンの解析

転移因子は多くの生物でゲノムの大部分を占めるなど染色体の構造を考える上で非常に重要な要素である。転移因子が生存上重要な遺伝子に挿入することで生物に有害な効果をもたらすことも有り、多くの生物で転移因子を不活化する機構が進化している。現在、シロイヌナズナで最近明らかになった転移活性を持つ転移因子について、アブラナ科の中での進化パターンを解析することでどのようにコピー数を増やし不活化をま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の交配から得られた F1 個体に親系統もしくは別系統を交配し、染色体ごとの伝達

率と動原体の構成の関係を調査している。転移因子については熱により活性化されるONSEN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(図1)。ONSEN類似配列はアブラナ科に広く存在し、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を確認した。この結果は転移因子が熱による活性化機構を持っていることで、変動環境に対する適応に寄与している可能性を示唆するものである。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、またインプリンティング遺伝子の進化が他の遺伝子とは異なることを見出した。現在、その進化機構について仮説を検証中である。さらに本年度から核ゲノムに移行した細胞質ゲノム断片の進化パターンの解析をおこなっている(図2)。細胞質ゲノム断片は核ゲノムに移行したのちエピジェネティックな制御を受けることが示唆されているが、移行後の維持・消失パターンの一般法則の検証は多くなされていなかった。葉緑体ゲノムを対象としてゲノム配列の決定されている種を網羅的に解析することで植物では移行後すぐにほとんどの配列が除去されていること、維持されている断片は転移因子の多い領域に存在していることなどがわかってきた。

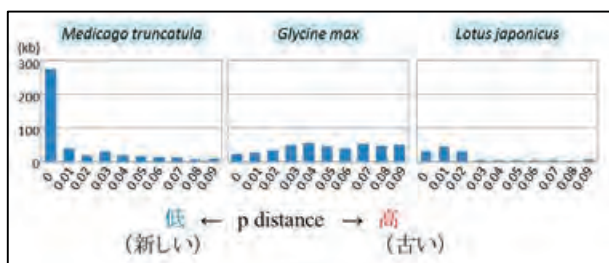


図2 NUPTの存在パターンの例(マメ科3種)

### 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 effect of different centromeric sequences on the segregation ratio. We made F2 plants with different centromere organization patterns to analyse transmission rate of each chromosome.

#### 2) Patterns of Transposable Element Evolution

In Arabidopsis thaliana, several transposable element families were identified to have active transposability. We analysed evolution of ONSEN family transposons. We found wide distribution of ONSEN family and conservation of heat activation among Brassicaceae.

#### 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. We detected differences in duplication numbers and conservation of gene structure between epigenetically regulated and non-epigenetically regulated loci.

#### 4) Evolution of nuclear transferred cytoplasmic genome DNAs

We analysed patterns of nuclear plastid DNA-like sequences (NUPT) in several plant species. We found age dependent degradation patterns and biased distribution of NUPTs among species. The findings will contribute understanding of general maintenance mechanisms about evolution of cytoplasmic genome fragment after transferred to nuclear genome.

## 4. 発表論文

Tsukahara S#, Kawabe A#, Kobayashi A, Ito T, Aizu T, Shin-i T, Toyoda A, Fujiyama A, Tarutani Y, Kakutani T. Centromere-targeted de novo integrations of an LTR retrotransposon of Arabidopsis lyrata. *Genes & Development* 26: 705-13 (2012) #These authors contributed equally to this work

## 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

降旗 初佳、吉田 貴徳、河邊 昭、葉緑体ゲノム断片の核移行パターン、日本遺伝学会第84回大会、福岡、2012年9月24日

吉田 貴徳、河邊 昭、ゲノムインプリンティングされる type I MADS-box 遺伝子の分子進化、日本遺伝学会第84回大会、福岡、2012年9月24日

河邊 昭、降旗 初佳、吉田 貴徳、動原体特異性を持つ転移因子 COPIA93/20 ファミリーのアブラナ科植物での存在様式、日本遺伝学会第84回大会、福岡、2012年9月26日



水野信之、河邊昭、E. Evtushenko、A. Houben、遠藤隆、那須田周平、コムギ祖先種における2タイプのセントロメア特異的ヒストンH3のDNA変異解析、日本育種学会第121回講演会、栃木、2012年3月30日

## 8. その他特記事項

### 1) 外部資金

科研費新学術領域公募研究 (代表)

科研費新学術領域計画研究 (分担)

### 2) 知財権等

なし

### 3) 学外活動

Genetica, Associate Editor

第122回日本育種学会講演会、大会実行委員

### 4) 受賞など

日本遺伝学会第84回大会 Best Papers 賞

降旗初佳：葉緑体ゲノム断片の核移行パターン

### 5) その他

野外での植物採集風景



# 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

植物分子発生生物学研究室では、「植物の形の多様性」や「植物と環境の関係」に興味を持ち、研究を進めている。具体的には以下の4つの研究を展開している。

### (1) 葉の形態の表現型可塑性の研究

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応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。ニューベキアの示す葉の形態の表現型可塑性は、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 右: 水中の形態

### (2) 葉の形態の多様性の進化発生的研究

自然界にはさまざまな形の植物がいる。その中でも葉の形は大きな変化に富み、植物の形を特徴づけているといっている。本研究室では、このような葉の形態の多様性が進化の過程でどのように生み出されているのかを、発生メカニズムの違いに着目することで明らかにしようとしている。

### (3) 植物がゲノムを守るしくみの研究

DNAの複製修復機構や、細胞周期のチェックポイント機構は、ゲノムを安定に維持複製し、次世代に正確に伝えるため

に必須のプロセスである。植物は光合成のために紫外線を含む太陽光を浴びる必要があるため、そのゲノムは常に障害を受けていると考えられる。本研究では、植物の核ゲノムおよびオルガネラゲノムの複製修復機構や、細胞周期のチェックポイント機構を解明することで、植物が紫外線や放射線からゲノムを守るしくみを明らかにしようとしている。

### (4) 次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析の手法開発とその応用

最近、次世代シーケンスが転写産物(mRNA)の解析(トランスクリプトーム解析)にも応用され、ゲノムワイドな遺伝子発現解析などが行われるようになってきた。本研究では、ハイスループットで安価な次世代シーケンス用ライブラリーの作成法の開発や、ゲノム情報のない非モデル植物でゲノムワイドな遺伝子発現解析を行う方法の開発を行っている。また、トマトの種間の比較トランスクリプトーム解析により、トマトの種間で観察される環境応答反応の解析を進めている。

## 2. 本年度の研究成果

### (1) 葉の形態の表現型可塑性の研究

1. ニューベキアの分子系統解析: ニューベキアは、アブラナ科の中のニューベキア属に1属1種として分類されていた。しかしながら、この分類の根拠となった分子系統解析では、近縁のイヌガラシ属との類縁関係がはっきりとしていなかった。そこで、イヌガラシ属の植物を多数集めて分子系統解析を行った。*rbcL*やITSの配列をもとにして系統樹を作成したところ、ニューベキアはイヌガラシ属の中に含まれることがわかった。したがって、これまで使われていた学名*Neobeckia aquatica*は、*Rorippa aquatica*とするのが正しいと結論づけた。

2. 複葉の発生に関わる遺伝子の時空間遺伝子発現解析: これまでの行った発生学的な観察から、ニューベキアは、複葉と単葉を生育環境に応じて作り分けていることが示唆されていた。そこで、*in situ*ハイブリダイゼーションおよびQRT-PCRにより、複葉の発生に関係していることが知られている*KNOX*遺伝子や*CUC*遺伝子の時空間遺伝子発現解析を行った。その結果、生育環境に応答して、これらの遺伝子の発現パターンやレベルが大きく変化しており、単葉と複葉発生のメカニズムが遺伝子発現レベルで切り替わっていることが明らかとなった。

3. ニューベキアの葉形変化の数理モデル解析: ニューベキアの葉が単葉から複葉まで連続的に変化していることに注目し、葉形変化を数理モデルで再現する研究を進めている。葉

縁の長さを反応拡散機構を用いて測定し、それに基づいて突起(複葉の小葉)を成長させるモデルを作成したところ、ニューベキアの発生過程でみられる構造を再現することができた(図2)。

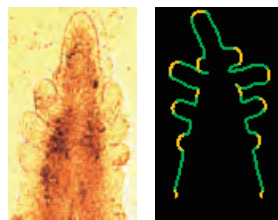


図2 数理モデル解析  
左: 実際の葉(葉原基)  
右: シミュレーションの結果

## (2) 葉の形態の多様性の進化発生学的研究

京野菜は変わった形のものが多い。鍋物によく使われるミズナ(水菜)の葉はギザギザである。一方、漬け物にされるミブナ(壬生菜)の葉は丸い。ミズナとミブナは、葉の形態からはまったく関係ない植物のように見えるが、1800年代にミズナの変異種として壬生地方で栽培されはじめたものがミブナだといわれている。ミズナとミブナをモデルにすることで、葉の形態の進化について新しい知見が得られると考え、葉形変異の遺伝学的な解析を進めている。

ミズナのミブナのF<sub>1</sub>を作成したところ、葉の形態は中間形質を示した。また、F<sub>2</sub>では形質が分離せずに連続的に分布した。以上のことから、ミズナとミブナの葉の形態の差の発現には複数の遺伝子座が関与していると考えられた。

## (3) 植物がゲノムを守るしくみの研究

細胞周期のチェックポイントは、DNA障害などの異常を監視して細胞周期を停止させたり、細胞死を誘導する機構である。動物ではガン抑制遺伝子のp53がマスターレギュレーターとして重要な働きをしているが、植物でp53のホモログは見つかっておらず、チェックポイント機構の全体像は明らかとなっていなかった。SOG1は、ガンマ線照射後の細胞周期の停止に必要な植物独自のチェックポイント因子である。SOG1の機能解析を進めたところ、DNA障害のセンサー蛋白質であるATMによりリン酸化されることで活性化することなどが明らかとなった。SOG1とp53のアミノ酸配列は全く異なるものの、p53もATMによりリン酸化されるが知られており、両者の機能はよく似ていることがわかった。これらのことから、SOG1はp53のカウンターパートである事が示唆された。

## (4) 次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析の手法開発とその応用

1. トマトの比較トランスクリプトーム解析: トマトの組織間および種間の比較トランスクリプトーム解析を行った。また、それを病原抵抗性遺伝子の単離に応用した。

2. ハイスループットな次世代シーケンス用ライブラリー作成法の開発: ライブラリーを作成コストが高いことが大規模なトランスクリプトーム解析を行う際の問題となっていた。そこで、RNAの抽出方法などを検討し、96穴プレート上で効率的かつ安価にmRNA-seqライブラリーを作成する方法を開発した。

3. 次世代シーケンスを用いた根寄生植物と宿主植物の間のsRNA移行の解析: 根寄生植物のネナシカズラ属の植物は、吸器と呼ばれる器官を伸ばして根に吸い付くことで寄生することが知られている。低分子RNAが、宿主植物から寄生植物に吸器の篩管を通じて移動していることを次世代シーケンス解析(sRNA-seq)により明らかにした。吸器の発生にはKNOXというホメオボックス遺伝子が必要であるが、宿主植物に、寄生植物のKNOX遺伝子と相補的なdsRNAを発現させてやることで、寄生を阻害できることも見いだした。

## 3. Research projects and annual reports

We are interested in plant development and environmental interactions. Currently, we have been focusing on the following four major projects.

### (1) Analysis of Phenotypic Plasticity of Leaf shape of Lake cress

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 aquatic*, shows heterophylly, phenotypic plasticity on leaf shape. Typical habitat of lake cress is at shores of ponds, slow-moving streams and other quiet waters. 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 heterophylly 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 aquatic*.

In this academic year, we performed molecular phylogenetic study of the lake cress because the taxonomic status of the lake cress have been uncertain. Comparison of DNA sequences such as *rbcL* and *ITS* from various species in genera of *Neobeckia* and *Rorippa* clearly showed that lake cress belongs to genus *Rorippa*. We concluded that lake cress should be merged with *Rorippa*, and *Rorippa aquatic* should be used as a binomial name instead of *Neobeckia aquatic*.

To understand the mechanism of the heterophylly, we performed expression analysis of genes involved in compound leaf development by qRT-PCR and *in situ* hybridization. We showed that the expression level and patterns of these genes

(*STM* and *CUC*) changed in response to varying environments, suggesting that these genes are involved in the mechanisms.

We generated very simple mathematical model which measure length of leaf margin by using Turing pattern to reflect in the leaf morphogenesis. We could reproduced the branch structure of developing leaves of Lake cress.

(2) The evolutionary-developmental study on leaf shape

One of the most striking example of plant diversity is variation in leaf shape. Kyoto is famous for breeding vegetables, and some of the Kyo-Yasai (Traditional vegetables in Kyoto) have weird shapes. Mizuna (*Brassia rapa* var. nipponsinica) is one of the typical Kyo-Yasai, and has deeply lobed leaves, while Mibuna (*B. rapa* var. *laciniifolia*), which is developed from Mizuna by breeding in 19th century, has entire leaves with smooth margin. We are interested in genetic basis of leaf shape variation between Mizuna and Mibuna.

Mizuna and Mibuna were crossed, resulting in heterozygous F<sub>1</sub> individuals. F<sub>1</sub> plant showed intermediate phenotype on leaf shape. F<sub>2</sub> population, which is derived from the F<sub>1</sub>, showed a continuous range of variation in leaf shape, suggesting that multiple genes are involved in determining leaf shape of Mizuna and Mibuna. We are now developing molecular makers that distinguish between Mizuna and Mibuna to perform QTL analysis.

(3) Analysis of genome maintenance mechanisms of plants

*Arabidopsis* SOG1, which is unique to plants, is a master transcriptional regulator of the DNA damage response. We found that SOG1 is hyperphosphorylated in an ATM-dependent manner, and this hyperphosphorylation is crucial for the transcriptional response, arrest of cell cycle and programmed cell death after induction of DNA damages.

(4) Transcriptome analysis using next generation sequencing

Recent progress of in RNA sequencing technology (RNA-seq) have provided a means for rapid characterization and qualification of transcriptome. We developed a cost-effective and high-throughput protocol for preparing RNA-seq library.

We performed transcriptome analysis of tomato and wild tomato relatives. The *RXopJ4* resistance locus from the wild tomato accession *Solanum pennellii* LA716 confers resistance to bacterial spot disease. The transcriptome data was used for fine-mapping and identification of candidate genes for *RXopJ4* locus.

#### 4. 発表論文

Molly Sharlach, Douglas Dahlbeck, Lily Liu, Joshua Chiu, José M. Jiménez-Gómez, Seisuke Kimura, Daniel Koenig, Julin N. Maloof, Neelima Sinha, Gerald V. Minsavage, Jeffrey B. Jones, Robert E. Stall, Brian J. Staskawicz: Fine genetic mapping of *RXopJ4*, a bacterial spot disease resistance locus from *Solanum pennellii* LA716. *Theoretical and Applied Genetics* DOI 10.1007/s00122-012-2004-6 (2012)

Ravi Kumar, Yasunori Ichihashi, Seisuke Kimura, Daniel H. Chitwood, Lauren R. Headland, Jie Peng, Julin N. Maloof, Neelima R. Sinha: A high-throughput method for Illumina RNA-seq library prep. *Frontiers in Plant Genetics and Genomics* 3: 1-10 (2012)

Amos Alakonya\*, Ravi Kumar\*, Daniel Koenig\*, Seisuke Kimura\*, Brad Townsley\*, Steven Runo, Helena M Garces, Julie Kang, Andrea Yanez, Rakafet David-Schwartz, Jesse Machuka, and Neelima Sinha (\*These authors contributed equally to this work): Interspecific RNAi of *STM* disrupts *Cuscuta pentagona* plant parasitism. *Plant Cell* 24: 3153-3166 (2012)

Naomi Nakayama, Richard Smith, Therese Mandel, Sarah Robinson, Seisuke Kimura, Arezki Boudaoud, Cris Kuhlemeier: Mechanical regulation of auxin-mediated growth. *Current Biology* 22: 1468-1476 (2012)

Nakayama H, Yamaguchi T, and Tsukaya H.: Cladodes, leaf-like organs in *Asparagus*, show the significance of co-option of pre-existing genetic regulatory circuit for morphological diversity of plants. *Plant Sig. Behavior* 7: 964-969 (2012)

Nakayama H, Yamaguchi T, and Tsukaya H.: An Evolutionary Developmental Model for the Acquisition and Diversification of Cladodes: Leaf-like Organs in the Genus *Asparagus*. *Plant Cell* 24:929-940 (2012)

Fukuda T, Song I, Ito T, Nakayama H, Hayakawa H, Minamiya Y, Arakawa R, Kanno A, and Yokoyama J. : Comparing with phylogenetic trees inferred from cpDNA, ITS sequences and RAPD analysis in the genus *Asparagus* (*Asparagaceae*). *Environ. Cont. in Biol.* 50: 13-18 (2012)

#### 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.* 24: 57-63 (2012)

中山北斗: 遺伝子の段階的な進化が生む新しい植物の形, 「編む」生命誌年刊号 (vol. 65-68), JT 生命誌研究館発行、

新曜社 (2012)

## 6. 招待講演、シンポジウム等

茎が平らになるとき -Asparagus属の仮葉枝を例に-, 中山北斗、山口貴大、塚谷裕一, 第53回日本生理学会年会、京都産業大学、2012. 3. 16-18

Genetic mechanisms of adaptation of Asparagus cladodes and other plant shoot forms, Hirokazu Tsukaya, Hokuto Nakayama and Takahiro Yamaguchi, Environmental Adaptation and Speciation of Plants and Fungi, Tsukuba, 2012.10

## 7. 学会発表

植物の複葉の分岐パターンに見られる非対称性のモデリング (A modeling for asymmetries of branching patterns in plant compound (lobed) leaves)、中益明子、木村成介、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012.12.11-14

Modeling and analysis of branching patterns in compound leaves, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J Suematsu, Seisuke Kimura, 2012 International Conference on Modeling, Analysis and Simulation, Meiji University, Tokyo, 2012. 11. 6-9

環境に応じて葉の形態を変える植物ニューベキア (*Neobeckia aquatica*)を用いた異形葉性制御メカニズムの解析、中山北斗、木村成介、日本植物学会第76回大会、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、2012.9.15-17

外部環境変化に対するニューベキアの葉の表現型可塑性の解析とモデリング、中益明子、末松J信彦、木村成介、日本植物学会第76回大会、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、2012.9.15-17

Mechanical regulation of auxin-mediated growth, Naomi Nakayama, Richard Smith, Therese Mandel, Sarah Robinson, Seisuke Kimura, Arezki Boudaoud, Cris Kuhlemeier, 7<sup>th</sup> Plant Biomechanics International Conference, Clermont-Ferrand, France, 2012. 8.20-24

Reproduction of fractal structures of *Neobeckia* leaves by using the Turing mechanism, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J Suematsu, Seisuke Kimura, Gordon Research Conference, Oscillations & Dynamic Instabilities in Chemical Systems, Colby College, Waterville, ME, USA, 2012. 7. 15-20

The relation of a periodic pattern formation to iterative protrusion structures in *Neobeckia* leaves, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J Suematsu, Seisuke Kimura, Joint Meeting of the 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of

Developmental Biologist & the 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe, Japan, 2012. 5. 28-31

Modeling and analysis for iterative protrusion on *Neobeckia* leaf, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J Suematsu, Seisuke Kimura, CBS symposium 2012, Quantitative Developmental Biology, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan, 2012. 3. 26-28

環境に応じて単葉と複葉をつくり分ける植物ニューベキア (*Neobeckia aquatica*)を用いた葉の表現型可塑性の研究、中山北斗、木村成介、第53回日本生理学会年会、京都産業大学、2012. 3. 16-18

## 8. その他特記事項

1) 外部資金  
科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金 (若手研究 (B) )

課題名: 葉の形態の表現型可塑性の分子基盤の解明: 環境に応じて葉形を変化させる植物の研究

研究代表者: 木村成介、取得年度: H24-26年 (3年)

京都産業大学特定課題研究

課題名: 「植物の TWINKLE 蛋白質は葉緑体 DNA 複製に関わる DNA プライマーゼか?」

研究代表者: 木村成介、取得年度: H24-25年 (2年)

「形質転換植物デザイン研究拠点」共同理由・共同研究

課題名: トマトの効率的な葉緑体形質転換技術の開発

研究分担者: 木村成介、取得年度: H24 (1年)

2) 知的財産等

なし

3) 学外活動

なし

4) 受賞等

Poster Award for Excellence, (Akiko Nakamasu, Nobuhiko J Suematsu, Seisuke Kimura) International Conference on Modeling Analysis and Simulation, 2012.11.12

日本植物学会平瀬賞 (中山北斗), 2012, 9.14

5) その他



研究室メンバーの写真

# 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

昆虫や動物を研究対象として、動物の社会における社会性進化、植物との共進化、種分化のメカニズムの解明を目的に分子生態学的研究を行っている。さらにミツバチやマルハナバチの農業利用を目的とした応用生態学的研究、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。

## 2. 研究成果

ダーウインの「種の起源」の最終段落に、「絡み合った堤」という比喻が出ている。これは、生物は多様な種との複雑な関わり合いの中で生活し、子孫を残し、進化してきたという考え方を表したものである。しかしこれまで、実際に検証することの困難さから、自然界の種の多様さと関わり合いの複雑さが種の進化にどのように作用するのかはほとんど謎のままであった。私たちは、植物の上に生活する昆虫類に注目し、この難問に取り組んだ。陸上の植物は多様な昆虫に攻撃されるが、動くことができないため身を守る手段を発達させている。たとえば、葉がかじられたという信号を受けとった時、防衛に役立つ化学物質を増産したり、急激に枝を伸ばして食べられた分を補ったり、と柔軟にその状態を変化させる応答で対抗する(被食応答)。この応答の仕方はさまざま、食べた昆虫種によって異なる。そのため、地域間の昆虫種の組成の違いが、この被食応答を介して植物の状態に反映されると予測している。さらに、植物の被食応答は、同じ植物を食べる他の昆虫の繁殖にも強く影響を与えるため、それらの昆虫がこのような植物の状態に地域ごとに適応進化してきた可能性があるかと予測した。これらを通して、周りの多様な種の組成が間接的に特定の種の性質を多様に進化させるという仮説を立て、これを検証した。

ヤナギとヤナギを利用する昆虫種をモデルとした。ヤナギの仲間は、葉を食べられた後、食われて失った分を補う再生長反応を示す(図1)。日本国内とフィンランド内のさまざまな地

図1. 葉を食べられた後のヤナギの再生長(先端がそのままでも新しい枝が急激に横から伸長する: 矢印)



域(図2)で、ヤナギ上で

生活する昆虫種の組成とヤナギの再生長の状態を調べあげた結果、その組成が違くとヤナギの再生長レベルが異なることが分かった。この全調査地域に唯一共通して分布し、年間に何度も繁殖を行うヤナギリハムシという昆虫がいる。この種を各

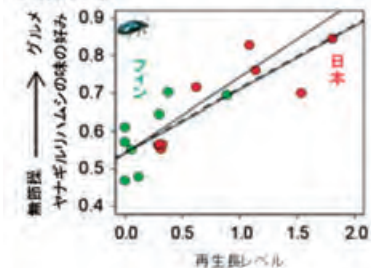
図2. 調査地マップ

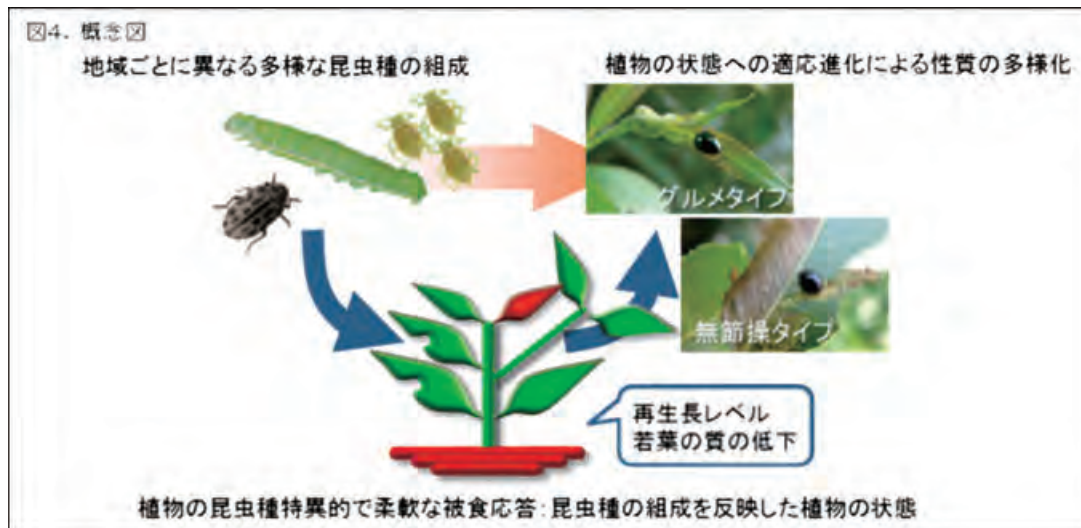


実験室で“味の好み”をエサ選択実験によって測定したところ、グルメタイプ(ごく若い葉のみを極端に選択して食べ、無ければ何も食べないタイプ)から無節操タイプ(若葉も成熟葉も選ばず、あるものを食べるタイプ)まで連続的に変異があり、その変異のパターンは地域の再生長レベルとよく一致することが明らかになった(図3)注1。再生長が盛んな場所では若葉が季節を通して常に生産されるため、グルメタイプがより有利になり、再生長が弱く若葉が枯渇しやすい場所ほど、無節操タイプがより有利になるためだと考えられる。また、ミトコンドリア遺伝子解析の結果から、ヤナギリハムシは地域間で遺伝的な交流が少ないことが分かり、それぞれの地域で独立に進化が生じる可能性を支持した。最後に、ヤナギと複数の昆虫種からなる人工生態系を作り、その中にヤナギリハムシを導入して適応度注2を計測した進化実験によって、この進化のプロセスを検証した。

その結果、野外で得られたパターンを再現でき、再生長を誘導する昆虫種がいればいるほどグルメタイプが進化し、別の種組成で再生長が弱い場

図3. 再生長レベルが高いほどグルメタイプが優ち、日本、フィンランドそれぞれでも、両者合わせても再生長レベルでよく説明される。





合には無節操タイプが進化することが証明された。興味深いことに、再生長の作用とは逆の方向に進化的な作用をもつアブラムシの影響も検出された。このアブラムシは若葉にコロニーを形成する種で、若葉の質を低下させるために、グルメタイプを阻害し、無節操タイプに利すると推測される。このアブラムシは国内のどの地域にも広く分布するため、“味の好み”の進化は、地域ごとに異なる再生長を誘導する昆虫種の数と、どの地域にも普遍的なアブラムシの影響のバランスによって決定されていると結論づけることができた。

これまで、ランドマークとなる種や希少種の絶滅、および、種の絶滅によって強固で密接な関係性を持っている種間関係(たとえば植物と送粉者)の崩壊が危惧されてきた。しかし本研究は、直接的なつながりを持たないような種間において、一方が見取るに足らない種であったとしても、地域の生物相から失われるだけでその地域に生息する他方の種の進化にまで間接的に重大な影響を及ぼすことを示している。それは、これまでに見過ごされてきた、ある遺伝子が地域から失われるプロセスである可能性もある。今後は、絶滅を含む、地域の生物相における種の組成の変化速度と、進化の速度を明らかにすることによって、進化の視点を組み込んだより適切な生態系の保護管理の提案に貢献できるものと期待される。また、実際に保全の対象となっている種や生態系においても同様のプロセスを検証する必要があると考えている。

注1: “味の好み”の量的な変異は遺伝する。

注2: 「一生に親1個体が残した子のうち、繁殖可能齢にまで成長した子の数」を適応度と言う。一生を追跡することはほぼ不可能であるため、一定の期間あたりに親が生んだ子の中で成虫になった子の数、を適応度として測定した。集団中で相対的に適応度が高いほど、自然選択によってその性質が集団に広まるようになり、このプロセスによって駆動される進化を適応進化と呼ぶ。

### 3. Research projects and annual reports

#### 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: *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  $d_{15}N$  and  $d_{13}C$  values were measured. The  $d_{15}N$  and  $d_{13}C$  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  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ . 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  $\delta^{15}\text{N}$  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.

### 3: *Herbivore community promotes trait evolution in a leaf beetle via induced plant response.*

Several recent studies have emphasised that community composition alters species trait evolution. Here, we demonstrate that differences in composition of local herbivore communities lead to divergent trait evolution of the leaf beetle *Plagioderia versicolora* through plant-mediated indirect interactions. Our field surveys, genetic analyses and community-manipulation experiments show that herbivore community composition determines the degree of herbivore-induced regrowth of willows (Salicaceae), which in turn, promotes the divergent evolution of feeding preference in the leaf beetle from exclusive preference for new leaves to a lack of preference among leaf-age types. Regrowth intensity depends both on the differential response of willows to different herbivore species and the integration of those herbivore species in the community. Because herbivore-induced regrowth involves phenological changes in new leaf production, leaf beetle populations develop divergent feeding preferences according to local regrowth intensity. Therefore, herbivore community composition shapes the selection regime for leaf beetle evolution through trait-mediated indirect interactions.

### 4. 発表論文

Nomura, T. and Takahashi, J. (2012) Effective population size in eusocial Hymenoptera with worker-produced males. *Heredity*. 109:261-268.

S. Ohba, Takahashi, J. and Okuda, N. 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. DOI: 10.1111/j.1752-4598.2012.00198.x

Utsumi, S., Ando, Y., Roininen, H., Takahashi, J. and Ohgushi, T. Herbivore community promotes trait evolution in a leaf beetle via induced plant response. *Ecology Letters*. inpress. DOI:10.1111/ele.12051

### 5. 招待講演、シンポジウム等

高橋純一：招待講演、岐阜県養蜂組合連合会、岐阜市、2012.1.20

高橋純一：招待講演、東海地区養蜂組合若手ブロック会議、名古屋市、2012.1.31

高橋純一：招待講演、京都府養蜂組合総会、綾部市、2012.2.9

高橋純一：招待講演、都市から農業フォーラム・ミツバチプロジェクト祭、銀座、2012.2.11

高橋純一：招待講演、名古屋学院大学ミツバチプロジェクト、名古屋市、2012.2.18

高橋純一：招待講演、和歌山県養蜂組合総会、白浜、2012.2.23

高橋純一：招待講演、熊本県養蜂組合総会、八代市、2012.4.6

高橋純一：招待講演、大阪府立伯太高等学校SPP 講師、和泉府中市、2012.6.21

高橋純一：招待講演、ファーム・エイド銀座ミツバチフォーラム、銀座、2012.7.21

高橋純一：招待講演、8チャンネルオフ会、倉敷市、2012.9.10

高橋純一：招待講演、大阪市立自然史博物館自然史オープンセミナー、大阪市、2012.9.22

高橋純一：招待講演、大阪府立伯太高校サイエンスカフェ、和泉府中市、2012.10.8

高橋純一：招待講演、名古屋学院大学ミツバチプロジェクト、名古屋市、2012.11.27

高橋純一：招待講演、岐阜薬科大学機能性健康食品研究会、岐阜市、2012.12.1

高橋純一：招待講演、四国地区養蜂研究会、高松市、2012.12.8

高橋純一：招待講演、東海地区養蜂研究会、岐阜市、2012.12.15

### 6. その他特記事項

#### 1) 外部資金

科学研究費補助金・若手研究B

研究代表者：高橋純一、取得年度：H24-26年(2年)

環境省環境総合研究推進費

研究代表者：高橋純一、取得年度：H24-26年(3年)



科学研究費補助金・基盤研究 B

研究代表者：椿宜高（京都大学）

研究分担者：高橋純一、取得年度：H22-24 年(3 年)

科学研究費補助金・基盤研究 B

研究代表者：土田浩治（岐阜大学）

研究分担者：高橋純一、取得年度：H24-26 年(3 年)

科学研究費補助金・基盤研究 B

研究代表者：野村哲郎（京都産業大学）

研究分担者：高橋純一、取得年度：H24-26 年(3 年)

霧多布湿原研究助成基金

研究代表者：高橋純一、取得年度：H24（1 年）

委託研究・株式会社日本配合飼料

研究代表者：高橋純一、取得年度：H24（1 年）

委託研究・株式会社クニムネ

研究代表者：高橋純一、取得年度：H24（1 年）

委託研究・株式会社サラヤ

研究代表者：高橋純一、取得年度：H24（1 年）

## 2) 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：みつばち協議会委員

高橋純一：京都府養蜂組合顧問

# 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

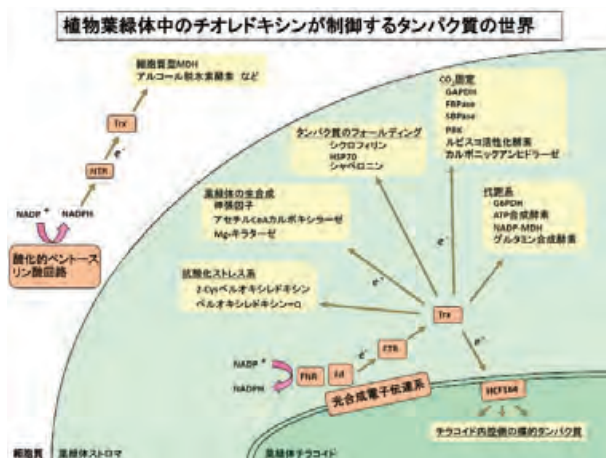


## 1. 研究概要

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、CO<sub>2</sub> 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、チオレドキシシンファミリータンパク質の生理学的機能の解析を中心として、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

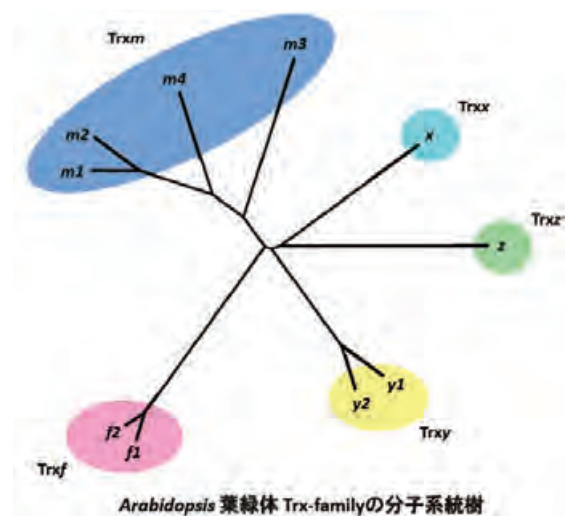
の異なる多くの標的タンパク質を、チオレドキシシンはどのように見分け、葉緑体内で混乱することなく相手タンパク質を認識し、必要な還元力(つまり電子)を供給しているのか、明らかにする。また、葉緑体中に複数のアイソフォームを持つチオレドキシシンファミリータンパク質が植物葉緑体内でどのように使い分けられているのか、その分子機構、生理学的意義を明らかにする。

### 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





this year, we have started the physiological analysis of the *ccdA* deficient T-DNA insertion lines in *Arabidopsis thaliana*.

#### 4. 発表論文

K. Yoshida, K. Noguchi, K. Motohashi, T. Hisabori: Systematic Exploration of Thioredoxin Target Proteins in Plant Mitochondria. *Plant Cell Physiol.* in press

Y. Nishikawa, H. Yamamoto, Y. Okegawa, S. Wada, N. Sato, Y. Taira, K. Sugimoto, A. Makino and T. Shikanai: PGR5-Dependent Cyclic Electron Transport Around PSI Contributes to the Redox Homeostasis in Chloroplasts Rather Than CO<sub>2</sub> Fixation and Biomass Production in Rice. *Plant Cell Physiol.* **53**: 2117-2126 (2012)

#### 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

桶川友季、本橋健:葉緑体ストロマにおける *m*-type チオレドキシンの機能解析、第 85 回日本生化学会、福岡市、2012.12.14-16

桶川友季、本橋健:葉緑体ストロマにおける *m*-type チオレドキシンの生理機能の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、岡山市、2013.3.21-23

#### 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、取得年度: H22-24 年度 (3 年)

私立大学教育研究活性化設備整備事業

課題名: タンパク質検出システム導入による生体エネルギー変換教育の充実

代表者: 本橋 健、取得年度: H24 年度 (1 年)

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、取得年度: H23-24 年度 (2 年)

#### 2) 知財権等

なし

#### 3) 学外活動

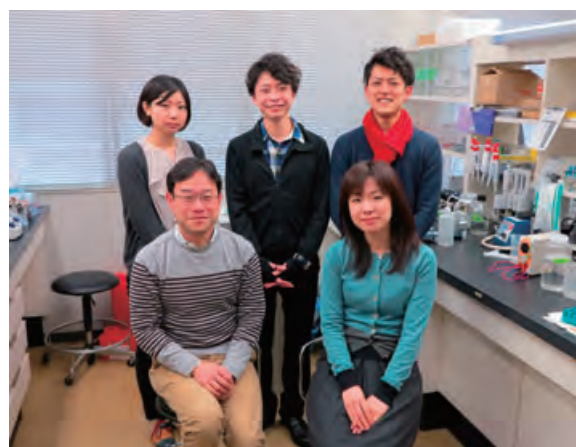
本橋 健: 第 53 回日本植物生理学会年会委員 (京都産業大学: 京都市)

桶川友季: 第 53 回日本植物生理学会年会委員 (京都産業大学: 京都市)

#### 4) 受賞等

なし

#### 5) その他 研究室メンバーの写真



# 動物生命医科学科

Department of Medical Animal Sciences

学科主任 大槻 公一

## 1. 特筆すべき教育成果

### (1) 鳥取大学及び岐阜大学との連携教育

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、採択された「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」の実施が軌道に乗っている。鳥取と岐阜の獣医系大学とその周辺領域をカバーする本学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。

平成25年度に共同獣医学科が設立され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、本学も平成23年度から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を始めた。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)として発展している。

本教育プロジェクトは後6年間続行する。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発展に大きな希望をもたらす。

### (2) 大阪府立大学との学術交流協定による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・経営概論」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、これまでセミナー及び特別講義を実施しており、実質的な交流が進展している。

## 2. 特筆すべき研究成果

### 京都市との学術交流

平成24年度も、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、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・研究を継続している。

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、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・学術的な情報交換を実施している。

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。

#### (1) 2012年連携研究活動

①「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結果、マダニから紅斑熱群リッケチアを検出した(第154回日本獣医学会学術集会共同発表)。

②「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ている。

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ウイルスおよびリッケチアの感染疫学調査を実施している。

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ている。

#### (2) 共同シンポジウムの実施

平成24年12月9日京産大むすびわざ館において、京都市環境衛生研究所との共同シンポジウムを実施

した。京都市民の感染症への意識向上を目的としたシンポジウムである。これまで両機関で実施した共同研究の一部を紹介し、私たちの身近なところにある病原体に感染するリスクを下げるためにはどのような対策を払うべきか、その方策を提案した(資料)。本共同シンポジウムには、藤岡一郎学長はじめ柿野欽吾理事長に出席いただき、京都市側からも門川大作市長も来られ、盛況で大変有意義なシンポジウムとなった。

### 3. 特筆すべき教育成果

平成24年4月に3年目になった本学科1期生の学生の中で、かなりの数の学生が、10月に実施される、公益社団法人日本実験動物協会の認定試験である実験動物1級技術者認定試験に挑戦したいという希望を表明した。元々、実験動物1級技術者資格試験を在学中に受験できる学科カリキュラムと施設を備え、実験動物技術者養成を本学科では、教育目標の一つにあげていた。

そこで、関係教員一丸となって希望学生の教育に取り組んだ。希望学生のために、実験動物解剖のために用いる器具器材を用意し、空いている時間帯に学生を集め、手技の熟達のために鋭意指導した。また、実験動物協会からも講師の派遣も得て、教育の充実をはかった。学生も熱心に取り組んだ。

その結果、10月に実施された学科試験では、本学科より受験した11名中7名が合格した。11月に実施された実技試験では、受験者6名中4名が合格した。合格者2名は、成績優秀につき表彰された。

以上の様に、難関とされる本資格試験に予想以上の数の学生が好成績で合格し、同期生及び後輩に大変良い刺激を与えた。次年度以降更に多くの本学科学生が挑戦する機運が生じた。本資格は、就職に有利な資格であるため、さらに、努力を重ねて多くの学生に資格を取らせたい。

### 4. 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。

# これを聞けば安心!

～京都市と京都産業大学による感染症対策～

2012.12.9(日) 京都産業大学 むすびわさ館

- 開会挨拶
  - 第1部
  - 第2部
  - 閉会挨拶
- 【基調講演】
- 外観
  - 第2部
  - 総会報告
  - 総会討論

## 市民の感染症への意識を高めるため共同研究の成果を報告

京都市と京都産業大学による共同シンポジウム「これを聞けば安心!～京都市と京都産業大学による感染症対策～」が、2012年12月9日 本学むすびわさ館で開催されました。今回のシンポジウムは、2011年3月に締結された学術協定「感染症及び食品の安全の研究」に係る相互連携に関する協定」を機にスタートした、総合生命科学部および鳥インフルエンザ研究センターと京都市衛生環境研究所との共同研究の成果を報告すると共に、市民の感染症対策に対する意識を高めるきっかけになることを目的としており、2015年に迎える本学設立50周年の記念事業のひとつとして位置づけられています。

京都市には鴨川など渡り鳥が飛来する場所があり、まわりを囲む山々など感染症の病原体を保有する昆虫などが生息できる自然環境が残っています。また世界的な観光都市で人や物の流れが多く、国境を越えて病原体が移動するリスクがあるため、今回のシンポジウムは関係者だけでなく市民からも注目され多くの方にご参加いただきました。

## 国内および世界における感染症の現状とその対抗策

シンポジウムは「門川大作 京都市長、本学 藤岡一郎 学長の開会挨拶によって始まり、両氏は国際観光都市である京都における感染症対策の重要性を指摘され、京都市と本学との共同研究によって遂行される京都市及びその周辺の人の健康をそこの病源の分布解明、感染症発生リスクの評価、その予防策の確立への期待を述べられました。

### 鳥インフルエンザの解明はヒトのインフルエンザ撲滅の第一歩

第1部では、まず鳥インフルエンザ研究センター長 大槻公一教授が基調講演として「身近に潜む危険な病原体への対抗策」をテーマに講演。日本では1957年以降発生していないものの、世界中で頻りに発生している狂犬病を例に挙げ、発症した場合ヒトや動物に預れる症状、アライグマやコウモリなど犬以外の狂犬病媒介動物、海外旅行の際の予防策などを紹介。参加者は「遠い存在だと思っていた狂犬病」と思っていた狂犬病などという話に緊張感を持って聞き入っていました。

話題はインフルエンザに移り、中国や台湾をはじめ世界における近年の発生状況を交えながら、鳥インフルエンザがすべてのインフルエンザのルーツであり、鳥インフルエンザを解明することがヒトのインフルエンザの撲滅



京都産業大学 総合生命科学部  
鳥インフルエンザ研究センター長  
大槻 公一



京都市衛生環境研究所  
食肉検査部門  
部長 良之



京都産業大学 総合生命科学部  
教授 前田 俊徳

につながることが期待されました。

大槻教授の基調講演に続き、「今年のトピックス」として京都市衛生環境研究所 食肉検査部門の男成良之氏が、食肉衛生の健全な食生活を営む上での重要性を解説した後、食肉を安全に提供するための流通と検査内容を紹介し、さらに現在注目されている生レバーなど生食用食肉の規制や食中毒の予防策について話されました。

## 京都市と本学の共同研究の成果を報告

第2部は調査研究報告として、最初に「かゆいだけじゃない蚊と病気の微妙な関係」というテーマに沿って、総合生命科学部の前田俊彦教授、京都市衛生環境研究所 衛生部門の池永充宏氏、伏見区役所 保健衛生課の近野真由美氏による講演が行われました。

### 身近にいる蚊と感染症の関係に迫る

前田教授は、感染症の病原体を伝播する蚊と病気の関係について講演。蚊が伝播する代表的な感染症として日本脳炎、デング熱、チクングニア熱、マラリア、フィリア症を取り上げ、媒介する蚊やウイルスの種類、症状の紹介に加え、ワクチン接種や外出時の服装など蚊による感染の対処策をレクチャーしました。

池永氏は蚊の生態や種類の他、現在取り組んでいる京都市に生息する蚊を調査研究するための捕獲活動について話され、近年ではデング熱やチクングニア熱を伝播するヒトスジジマカが多くなっていることを説明し、参加者から高い関心を寄せられました。

近野氏は京都に生息する蚊が持つ病原体と病原体検出の検査方法を紹介しますと共に、2011年と2012年に実施された京都市内で捕集したヒトスジジマカのデングウイルス、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルスの検査結果を報告（ウイルスは検出されず）。

このように共通のテーマに沿って3名が講演する形式によってそれぞれの専門性を活かし、分かりやすく蚊と感染症の関係について参加者に伝えられました。

### 鳥インフルエンザの感染メカニズムを解説

続いて鳥インフルエンザ研究センターの高桑弘樹教授が「インフルエンザウイルス 知られざる真実」というテーマで講演。インフルエンザウイルスは、構成するHA（ヘマグルチニン）とNA（ナイラミニダーゼ）の性質の違いによってHAは1～16、NAは1～9の亜型に分類され、144種類のウイルスがあり、カモはすべてのウイルスに感染する動物であることを紹介。カモの場合は感染しても症状が出ない低病原性鳥インフルエンザであるため広範囲に移動（渡り）することができ、何らかのかたからヒトに感染し、ヒト同士で感染を繰り返すうちに病原性の高い高病原性鳥インフルエンザに変わり、他の動物やヒトに感染するようになるメカニズムを解説しました。

そして、国内での高病原性鳥インフルエンザの発生事例や感染経路、今後高病原性鳥インフルエンザに変わる可能性がある低病原性鳥インフルエンザの発生状況、東南アジアにおけるワクチン接種の事情などを交えながら鳥インフルエンザの感染の実態に迫っていただきました。

講演の後、参加者から寄せられた感染症に関する質問に講演者が答える総会討論会を実施。一般の方々が感じる疑問や不安に分かりやすく回答することで、インフルエンザをはじめとする感染症予防対策についての具体的な知識、たとえば抗インフルエンザウイルス作用機能を持つマズクの有効性あるいは石鹸での手洗い、うがい、インフルエンザ感染予防に役立つことを参加者は習得することができました。今回のシンポジウムは、市民の方々に感染症に関する正確な情報を伝えることで感染症に対する意識を高め、効果的な予防対策につなげる意義のある交流の場となりました。



京都市衛生環境研究所  
衛生部門  
担当 佐藤 池永 充宏



伏見区役所保健衛生課  
主任 近野 真由美



京都産業大学 総合生命科学部  
准教授 高桑 弘樹

## 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、藪田淑予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、学术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、尾崎弘一准教授、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藪田淑予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生命システム学科中田 博教授グループ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. 著書

大槻公一 インフルエンザの最新知識Q&A 2012  
ーパンデミック H1N1 2009 の終焉を迎えてー. 「ブ  
タインフルエンザの歴史は?」の項目を執筆、 鈴  
木 宏、松本慶三編、医薬ジャーナル社、大阪、2012.

#### 5. 論文

Takakuwa, H., Yamashiro, T., Le, M. Q., Phuong, L. S.,  
Ozaki, H., Tsunekuni, R., Usui, T., Ito, H., Morimatsu, M.,  
Tomioka, Y., Yamaguchi, T., Ito, T., Murase, T., Ono, E.  
and Otsuki, K. Molecular epidemiology of avian influenza  
viruses circulating among healthy poultry flocks in farms  
in northern Vietnam. *Prev. Vet. Med.* 103, 192-200, 2012.

Hotta, K., Takakuwa, H., Le, Q. M. T., Phuong, L. S.,  
Murase, T., Ono, E., Ito, T., Otsuki, K., Yamashiro, T.  
Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian  
influenza viruses from Ducks in Hanoi, Vietnam. *Virus  
Res.*, 163: 448-453, 2012.

#### 6. 総説及び解説文

大槻公一. 鳥インフルエンザ大発生. 感染拡大の可  
可能性. ペストコントロール, No. 158, 4-9, 2012.

大槻公一、高桑弘樹、井上瑞江、常國良太、藪田淑  
予. 赤血球凝集素に変異を加えた H5N1 亜型鳥イン  
フルエンザウイルスがほ乳類への感染性を獲得した  
画期的な河岡義裕教授らの論文について —デュア  
ルコースが懸念された事例—. 京都産業大学先端科  
学技術研究所所報, No. 11, 31-39, 2012.

大槻公一、高桑弘樹、藪田淑予、山岡敏之. 特集/  
新型インフルエンザは再びおこるか. 鳥インフル  
エンザの現況. 臨床と研究, 89, 1676-16. 86, 2012

#### 7. 招待講演、シンポジウム等

大槻公一：世界は鳥インフルエンザの強毒性変異  
にどう立ち向かうのか、第5回熱帯医学・寄生虫  
病学セミナー 順天堂大学主催 東京都 順天堂  
大学医学部 2012年5月8日.

大槻公一：人獣共通感染症の先回り予防策. 第2

回バイオセキュリティワークショップ「バイオデ  
ィフェンスに資する日米科学技術協力の新たな可  
能性」長崎大学国際連携研究戦略本部主催 東京  
都 三田 NN ホール 2012年7月21日

#### 8. 学会発表

堀田こずえ、高桑弘樹、藪田淑予、大槻公一、伊藤  
壽啓、山城 哲、村瀬敏之：ベトナムの市場で販売  
されるアヒル卵中の抗鳥インフルエンザウイルス抗  
体調査. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪  
2012年11月13-15

#### 9. 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)

農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業

研究課題：家畜伝染病発生時におけるまん延防止の  
ための殺処分家畜等輸送技術の確立

研究代表機関：太陽工業株式会社

取得年度：H24～H25(2年)

日本学術振興会二国間交流事業(タイ)との共同研究

研究課題：変異を克服した抗インフルエンザ活性を持  
つ RNAi(RNA 干渉)システムの構築

研究代表者：鈴木康夫、取得年度：H24～H26(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 (H18 年より)

公益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)

関西広域防災計画策定委員会委員 鳥インフルエンザ・口蹄疫等対策専門部会部会長 (H24 年より)

農林水産省・農林水産業・食品産業科学研究推進事業 (実用技術開発ステージ) 審査専門評価委員 (H24 年より)

#### 社会貢献 (講演)

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

大槻公一：世界は鳥インフルエンザの強毒性変異にどう立ち向かうのか。平成 24 年度科学研究費補助金 (基盤 (B) 一般研究) 新型インフルエンザ対策セミナー 東京都文京区 2012 年 5 月 7 日

大槻公一：鳥インフルエンザウイルスから新型インフルエンザウイルスが生まれるか？社団法人滋賀

県薬剤師会主催 新型インフルエンザ及び大規模災害対策研修会 滋賀県草津市 2012 年 5 月 13 日

大槻公一：人獣共通感染症の先回り予防策。長崎大学国際連携研究戦略本部主催 第 2 回バイオセキュリティワークショップ「バイオディフィエンスに資する日米科学技術協力の新たな可能性」東京都港区 2012 年 7 月 21 日

大槻公一：人の生活と動物の病気。京都府農林水産部畜産課主催 知って安心！家畜の健康 京都市 2012 年 9 月 17 日

大槻公一：ヒトへの脅威となるおそれのある動物由来のインフルエンザウイルスの現状について。愛知県健康福祉部健康対策課主催 新型インフルエンザ対策研修会 名古屋市 2012 年 10 月 24 日

大槻公一：最近の動物インフルエンザについてー鳥インフルエンザを中心にー。全国食肉衛生検査所協議会近畿ブロック事務局主催 平成 24 年度全国食肉衛生検査所協議会近畿ブロック会議及び技術研修会 2012 年 10 月 31 日

大槻公一：鳥インフルエンザの最近の話題。社団法人日本ペストコントロール協会主催 平成 24 年度感染症指導者講習会 東京都墨田区 2012 年 11 月 13 日

#### 社会貢献 (報道関係記事等)

##### ○新聞記事

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 10 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

Laboratory for Immunopathology



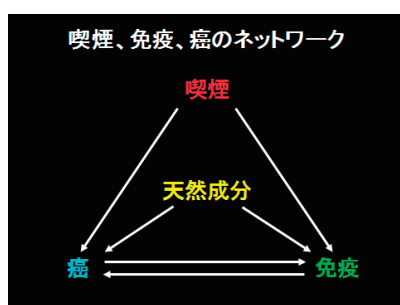
教授 竹内 実

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、気管支肺泡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子への影響について研究している。

## 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。

### 3) 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はなく、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、火傷などの創傷治癒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 adansonii 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。また、日本産ハチミツの免疫機能への影響についても、特にマクロファージ系細胞、好中球へ影響を in vitro, ex vivo 及び in

vivo 系を用いて研究を開始している。

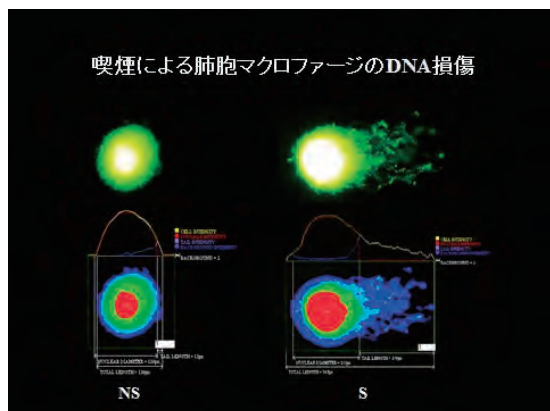
## ②アガリクス茸

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200km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。

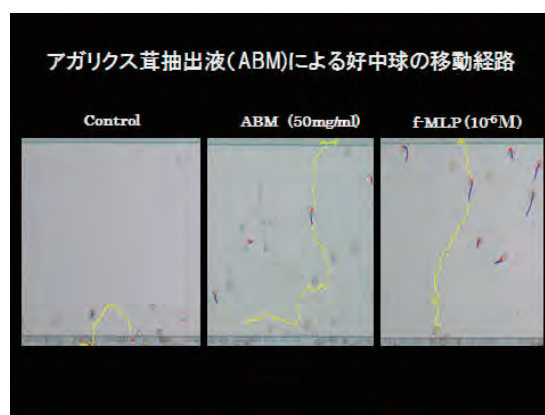


## 2. 本年度の研究成果

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**

Sakura, Masaaki; Chiba, Yoichi; Kamiya, Emi; Furukawa, Ayako; Kawamura, Noriko; Niwa, Masanao; Takeuchi, Minoru; Hosokawa, Masanori. Spontaneous occurrence of photoaging-like phenotypes in the dorsal skin of old SAMP1 mice, an oxidative stress model. *Experimental Dermatology*, in press.

Mayuko Miyagawa, Yuriko Hirono, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Masahito Nose, Masaaki Sakura, K.E. Pinkerton and Minoru Takeuchi. Effect of Hot Water Extract from Agaricus Blazei Murill on Chemotaxis of Neutrophils. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, in press.

重吉瑛里、竹内実 ジャングルハニーによる抗体産生機能への影響とその機構について 京都産業大学論集 自然系列 印刷中

Yuriko Hirono, Ayaka Kawazoe, Masahiko Nose, Masaaki Sakura, and Minoru Takeuchi. Cigarette Smoke Induce Alteration of Structure and Function in Alveolar Macrophages. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, in press.

## **5. 著書および総説**

なし

## **6. 招待講演、シンポジウム等**

Minoru Takeuchi : Effect of cigarette tobacco smoke as environment factor on the cellular internal structures and immune functions in alveolar macrophage. Seminar in Center for Health and the Environment, University of California Davis (UCD), CA, USA. 2012. 8.13.

竹内実 : 「タバコ喫煙と免疫低下及び蜂蜜（ジャングルハニー）

の免疫増強作用について」 愛蜂家基礎講座・初級 兵庫県立人と自然の博物館、三田、兵庫、2012.12.22.

## 7. 学会発表

Y Hirono, M Nose, A Kawazoe, E Shigeyoshi, K Sasaki, Y Tanahashi, M Sakura, M Takeyoshi, F Saito, Y Akahori, N Imatanaka, M Takeuchi : Effects of cyclophosphamide as immunosuppressive drug on Alveolar Macrophages by oral administration in rats. The 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Hong Kong, 2012.12.14-16

M Nose, A Kawazoe, E Shigeyoshi, K Sasaki, Y Hirono, Y Tanahashi, M Sakura, M Takeuchi : Effect of cigarette smoke on primary immune response to Cryptomeria Japonica pollen in the lung. The 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Hong Kong, 2012.12.14-16

HIRONO Yuriko, NOSE Masahito, KAWAZOE Ayaka, SHIGEYOSHI Eri, SASAKI Kazuma, TANAHASHI Yasuyuki, SAKURA Masaaki, TAKEYOSHI Masahiro, SAITO Fumiyo, AKAHORI Yumi, IMATANAKA Nobuya, TAKEUCHI Minoru : Immunotoxic effects by oral gavage of cyclophosphamide or cyclosporine A as immunosuppressive drug in Rats. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸（兵庫）、2012.12.5-7

NOSE Masahito, KAWAZOE Ayaka, SHIGEYOSHI Eri, SASAKI kazuma, HIRONO Yuriko, TANAHASHI Yasuyuki, SAKURA Masaaki, TAKEUCHI Minoru : Effect of cigarette smoke and Cryptomeria Japonica Pollen on immune cells in the lung. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸（兵庫）、2012.12.5-7

SASAKI Kazuma, KAWAZOE Ayaka, HIRONO Yuriko, NOSE Masahito, SHIGEYOSHI Eri, TANAHASHI Yasuyuki, SAKURA Masaaki, TAKEUCHI Minoru : Effect of cigarette smoking on infiltration of neutrophils to pulmonary by LPS. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸（兵庫）、2012.12.5-7

M. Takeuchi, M. Miyagawa, Y. Hirono, M. Sakura, Y. Tanahashi, H. Takakuwa, K. Outsuki, K.E. Pinkerton : CHEMOTACTIC ACTIVITY FOR NEUTROPHILS BY HOT WATER EXTRACT FROM AGARICUS BLAZEI MURILL. International Symposium The Neutrophil in Immunity 2012, Québec (Canada), 2012.6.9-12

X. Li, M. Xue, J. Evans, F. Hayes, H. Aaron, M. Takeuchi, S. Inaga, J. Zink, S. Risbud, K.E. Pinkerton : Delivery Of Nano-Drug Vectors To The Lung: Aerosolization, Fate And Pulmonary Toxicity Of Mesoporous Silica Nanocages. ATS 2012 International Conference, San Francisco (U.S.A.), 2012.5.18-23

M. Takeuchi, S. Inoue, Y. Hirono, A. Kawazoe, E. Shigeyoshi, M. Nose, S. Inaga, K.E. Pinkerton : Effect Of Side-Stream Tobacco Smoke (STS) On Immune Functions And DNA Damage In Alveolar Macrophage (AM). ATS 2012 International Conference, San

Francisco (U.S.A.), 2012.5.18-23

M. Takeuchi, S. Inoue, Y. Hirono, A. Kawazoe, E. Shigeyoshi, M. Nose : Inhibition of Immune Functions and Induction of DNA Damage in Alveolar Macrophage (AM) by Side-stream Tobacco Smoke. 15th WCTOH (WORLD CONFERENCE ON TOBACCO OR HEALTH), Singapore, 2012.3.20-24

## 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) 研究代表者  
戦略的研究基盤形成支援事業 研究分担者  
経済産業省化学物質評価研究機構 研究代表者

### 2) 知材権等 なし

### 3) 学外活動

日本学術振興会科学研究費審査委員  
京都府獣医師会京都支部長、役員  
京都府府民公開事業推進委員  
Pulmonology 編集委員、  
WJR 編集委員など。

### 4) 受賞等 なし

### 5) その他

兵庫県立神戸鈴蘭台高等学校で模擬授業、2012年11月14日

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！



ホームページアドレス：<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~mtakex/>  
研究室メンバー



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



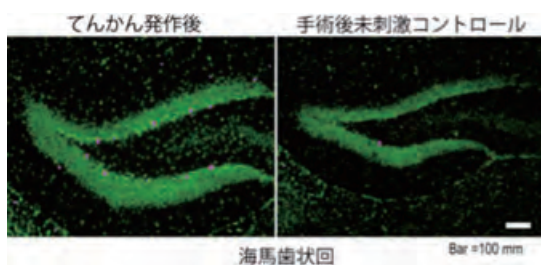
## 1. 研究概要

「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。これまで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ていた。



図：下顆粒細胞層上で、てんかん発作に伴い Ki67 陽性細胞数の亢進が見られた（ピンク）。Ki67 は細胞増殖マーカーとして知られており、成長ホルモンが細胞増殖に関わる知見が知られている事から、下顆粒細胞層における神経前駆体細胞の増殖と成長ホルモン発現との関連性を調べる必要がある。

さらに、成長ホルモンシグナル系の下流の遺伝子産物が、てんかん発症だけでなく、情動系の行動に影響する知見を得た。今後は、成長ホルモンシグナル系の抑制がどのように不安を惹起するのかについて、下流の遺伝子産物による作用も含め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出したところ、このマウスは、うつ・不安障害、環境適応不全、睡眠障害、さらには、ホルモン恒常性障害 (成長阻害や性行動不全) を発症するストレス性情動系障害モデルであった。シアル酸修飾を受ける基質を探索し、シアル酸化がどのようにてんかんやストレス性情動系障害に関わるのかについて研究を進めている。

### 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、マウスは興奮の増強や、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と相関性を示した。さらには、脳内の脂質組成の変化にも影響した。血中の成長ホルモンは、肝臓

で Igf1 の発現分泌を促進し、脂質代謝に関わる事が知られている。一方で、てんかん発作に伴い発現上昇を示す脳成長ホルモンは、脳内では、Igf1 の発現に影響を与えなかったことから、末梢とは異なる脂質代謝系の存在が示唆された。

#### 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。さらにシアル酸転移酵素を欠損したマウスは、大脳皮質に存在する成長ホルモンと Igf1 の発現量を低下したことから、シアル酸転移酵素によるてんかんや、うつ・不安障害にみられる情動系バランスの制御に成長ホルモン-Igf1 シグナル系の存在が明らかとなった。成長ホルモンは受容体との結合がベル型に推移する事が知られている。てんかん発作により著しく発現が亢進した成長ホルモンは受容体には結合しない可能性があり、うつ・不安障害に伴い減少した脳成長ホルモン-Igf1 シグナル系とは異なるカスケードを示す可能性があり、新たな受容体の存在が示唆された。現在論文を作成中である。

#### 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」に採択された後、現在も研究を進めている。うつ・不安障害を示す ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスに、脂肪酸の異なる 3 種の油脂を含む特殊飼料を離乳後与え続けると、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。異なる油脂の摂食による代謝の差が、マウスの行動に影響する事が示唆され、現在論文作成中である。

#### 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。本年度は末しょう神経から中枢神経系へのボツリヌス毒素の軸索輸送についての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 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 mouse shows symptom which 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. We identified that growth hormone and Igf1 mRNAs were down-regulated in the brain of alpha 2,3-sialyltransferase gene-deficient mice, in contrast with tremendous



up-regulation of growth hormone following epileptic seizures. It promoted that ST3Gal IV regulates growth hormone-Igf1 signaling in epilepsy and anxiogenic-like behaviors.

### 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 lipid 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

Akaike N, Shin MC, Wakita M, Torii Y, Harakawa T, Ginnaga A, Kato K, Kaji R, Kozaki S. (2012) Transynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. J Physiol. (2012.242131.Epub 2012 Oct 29)

## 5. 著書および総説

なし。

## 6. 招待講演、シンポジウム等

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 イノベーション・ジャパン2012 2012.9.27 東京国際フォーラム ホールB5 口頭, ポスター

## 7. 学会発表

1. Kato K., Srimontri P., Endo S., Hirabayashi Y. Impaired limbic system in alpha 2,3-sialyltransferase (ST3Gal IV)

deficient mice. AFLAS meeting Bangkok 2012, 10/10, 国際会議場 (poster).

2. Srimontri P., Okuma S., Okada T., Tamada H., Hirabayashi Y., Kato K. Effect of sialylation on sexual behavior. AFLAS meeting Bangkok 2012, 10/10, 国際会議場 (poster).

## 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)

共同研究「DHA含有リン脂質の機能評価」 (研究代表者: 加藤啓子)

### 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](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。

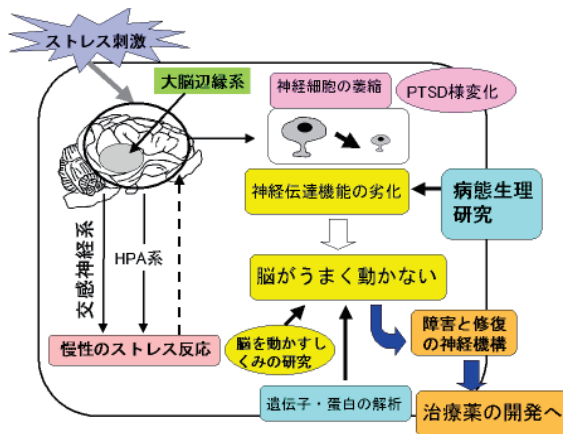


図 1. 本研究の概略

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。

これまで自由行動下での神経活動変化を測定する技術開発を進めてきたが、対象となる神経系の活動をとらえるバイオセンサーと汎用性の高い測定系を構築することを目標としている。

- 2) 脳内のストレス反応に関与する新たな情報伝達物質の探索と脳内調節系の解析

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、それらの障害をもたらす脳内物質を明らかにするため、現在、その候補となる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利用したものである。本年度は、昨年に引き続き、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センサーの検証を行った。

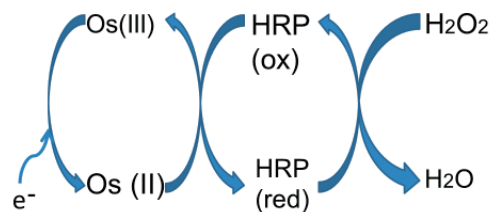


図 2. バイオセンサーの最終反応を示した模式図

- 2) ストレス反応に伴う脳神経細胞の変化を評価するため、神経細胞レベルで細胞変性の有無をリアルタイムで測定するための技術を検証している。現在、神経細胞の変性の程度を電気的に測定する試みを進めているが、細胞を in

in vitro で維持する条件を見極める必要があり、これからの検討課題となった。今後、これらの評価系を利用して、脳内ストレス反応調節系にかかわる候補因子(アラキドン酸誘導体等)の検証を行うとともに、昨年に得られたポリクローナル抗体の性状を調べていく予定である。

3) ストレス反応調節にかかわる脳内部位を特定する、また、ストレスによって障害を受けた脳の部位を特定する上で、対象となる動物の脳地図が必要となる。これまで発表されている脳地図はいわゆる脳定位固定装置を利用して作成されたものが多い。一方、大型の実験動物であるブタでは脳座標の定め方が確立していない。これまでの技術的な検証ではブタ(ミニブタを含む)においては脳定位固定装置を利用した脳座標の設定は難しいことがわかった。そこで、脳定位固定装置を使わずにブタの脳座標を定めるため、フレームレスナビゲーション法を検証した。この方法を用いることにより、ミニブタの大脳皮質一次体性感覚野において再現性のある座標を定めることが可能となった(自治医科大学との共同研究)。

### 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 biosensors**

We are now making and developing biosensors to measure intrinsic changes in 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.

##### **2) Estimation of neural degeneration in *in vitro* experiments**

To examine how neurons are degenerated under stressful conditions, we tested electrical detection technique in *in vitro* conditions using isolated neural cells. However, this technique has not always issued data reproducible, which shows further studies are required to improve our technique.

In another study using histological techniques, one possible marker has been found which reflects degeneration of neurons. From now on, we would investigate if this marker may reflect neural degeneration caused by stress hormones. Besides, regulatory roles of arachidonic acid derivatives need to be examined in the stress response of the brain.

##### **3) Examination of frameless stereotaxic method in the porcine 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 no practical map for the porcine brain established. Since we have found difficulty to make the framed-based porcine brain map, on

the basis of the external skull landmarks, we examined frameless stereotaxic technique in the brain using the pig (miniature pigs). By using the frameless technique, we have successfully obtained coordinates for location of recording somatic evoked potentials on the surface of the primary sensory cortex in the animals. The frameless stereotaxic method is useful for setting the stereotaxic coordinates in the porcine brain (Joint research with Jichi Medical University).

#### 4. 発表論文

Toshiyuki Saito, Minako Uga, Daisuke Tsuzuki, Hidenori Yokota, Keiji Oguro, Tsuyoshi Yamamoto, Ippeita Dan, Eiju Watanabe  
Evoked potential mapping of the rostral region by frameless navigation system in Mexican hairless pig. **Journal of Neuroscience Methods** (in press)

#### 5. 著書および総説 なし

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

齋藤敏之・渡辺英寿:ミニブタを用いた脳の高次機能解析とヒト中枢神経メカニズム・病態解明への応用」自治医大ビッグセンターシンポジウム (6月11日、東京秋葉原コンベンションセンター)

#### 7. 学会発表

Minako Uga, Toshiyuki Saito, Daisuke Tsuzuki, Hidenori Yokota, Keiji Oguro, Tsuyoshi Yamamoto, Ippeita Dan, Eiju Watanabe  
Application of frameless navigation method for evoked potential mapping in the brain of Mexican hairless pig.  
8<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012.7.15-17

齋藤敏之、宇賀美奈子、續木大介、横田英典、小黒恵司、山本剛、檀一平太、渡辺英寿:ミニブタにおける frameless stereotaxy の検証。第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学、盛岡市、2012.9.14-16

宇賀美奈子、齋藤敏之、續木大介、横田英典、小黒恵司、山本剛、檀一平太、渡辺英寿:頭蓋骨上の基準点に基づくフレームレスナビゲーションシステムを用いたミニブタの脳座標の決定。第 35 回

日本神経科学大会、名古屋国際会議場、名古屋市、2012.9.18-21

#### 8. その他の特記事項

##### 1)外部資金

科学研究費(一般) 基盤研究 C 研究代表者  
特定課題研究 (C1203) 研究代表者

##### 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

齋藤敏之:京都府獣医師会産業部会研修会講師

齋藤敏之:生涯学習講座 市民教養講座講師

##### 4)受賞等 なし

##### 5)その他

(学内)図書館委員会・委員

(学科)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

# 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。その中には、いろいろな動植物やヒトに感染して病気を引き起こすものもあれば、そうでないものもある。また、腸内細菌のように動物の腸内で食物の消化を助けるものや、恐らくは動植物の進化の過程で重要な役割を担っているであろうものまで存在する。この様に、私たちの周りに存在する微生物は動物や植物と相互に影響し合って、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

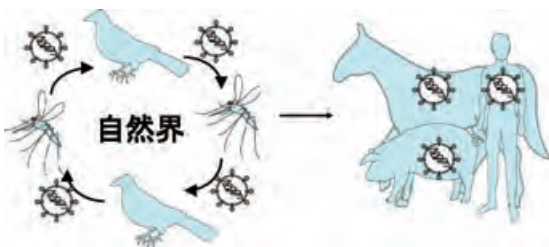


図1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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. 京都市での蚊の調査

京都市衛生研究所および立命館大学と共同で、蚊の採集を行っている。採集した蚊はラボに持ち帰り、種を同定するとともに病原体の保有状況を調べている。本年度も、市内各所で蚊の採集を行った。

## 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デング熱の中国・広東省での調査を行っている。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 Dr. 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池永、近野、杉江・研究員および立命館大学の中谷・准教授と同大大学院2年生の米島、麻生大学の二瓶・客員研究員との共同研究として行っている。蚊は様々な感染症を動物から人に媒介するが、蚊種により媒介する感染症には特異性がある。したがって、蚊の生息環境中での蚊種の割合は、当該地での感染症の流行に影響するものと考えられる。そこで、本年度は、京都市内で蚊を採取し、蚊種の調査を行った。特に形態学的に鑑別が困難なアカイエカとチカイエカについて、PCR 法を用いて鑑別検討した。

### (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・同定を行っている(第1回学部研究交流会にて当研究室の大学院生、イゴール君がポスター発表した)。

#### (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および本学総合生命科学部の染谷・助教と共同で研究している。京都市内の複数の定点においてダニを捕獲し、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。

### 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:

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 the

directors of Guangdong CDC, China, and with Dr. Jiang Shu.

#### (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 observation points in Kyoto-City, Japan. Although, we then tried to detect the pathogens within mosquitoes, we did not get any signs of infection of the pathogens. In this study, we collaborated with Mr. Ikenaga, Miss Konno, Miss Sugie, the Kyoto City Institute of Health and environmental Sciences, Dr. Nakaya and Miss Yoneshima, Ritsumeikan University, and Dr. Nihei, Asabu University. To establish the Mosquito-borne pathogen Alert system, it is important to know the composition of mosquito species in the environment. Because, a mosquito has specific pathogens, in general. Therefore, in this year, we confirmed the composition of mosquito species in Kyoto city, especially *Culex pipiens pallens* and *Culex pipiens molestus*, by using molecular technique. These mosquitoes are resemble in morphology (It is hard to distinguish each other). Therefore, we should differentiate these two mosquito species by other system like PCR.

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

Flaviviruses infection to the 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 envelope protein, E, which locates at the host cellular surface. Mr. Igor presented his results in this summer meeting of our Department.

#### (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 Rickettsia spp., which cause a tick-borne disease, by a standard PCR protocol.

### 4. 発表論文

Tag-El-din-Hassan, Hassan T., Sasaki, N., Moritoh, K., Toriogoe, D., Maeda, A., and Takashi, A. The chicken 2-5 oligoadenylate synthetase A inhibits the replication of West Nile Virus. Jap. J. Vet. Res. 60: 95-103, 2012.

Maeda, A., and Maeda, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. Vet. J.

195: 33-40, 2013

## 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

染谷梓、池永充宏、大西修、近野真由美、杉江真理子、Igor Velado Fernandez、西野佳以、前田秋彦。京都市における紅斑熱群リケッチアの検出。第 154 回日本獣医学会(岩手), 2012.9.16

米島万有子、大西修、渡辺護、二瓶直子、津田良夫、小林睦生、前田秋彦、中谷友樹。京都市市街地の住宅における疾病蚊密度の場所間変動—密度調査と環境分析。第 64 回日本衛生動物学会(松本), 2012.3.29

## 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」

文部科学省科学研究費補助金(学術研究助成基金助成金) 挑戦的萌芽研究「フラビウイルスの感染臓器特異性に関する研究」

厚生労働科研費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 「病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究」

京都産業大学 第2次総合研究支援制度 「特定課題研究」 「京都市の感染症の疫学的解析と感染症マップの作成」に関する研究

### 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, 人獣共通感染症学など。

#### 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  
高大連携授業など

#### 5-3) その他、特記事項

昨年度スタートした様々なプロジェクトは、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の共同研究として行っている。

# 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発展させ、新たに食・飼料中のメラミン汚染の影響について研究を進めている。具体的には、近年、乳製品やペットフードへの混入汚染によって大きな社会的影響や不安を与えたメラミン類を対象にして、次の諸点について研究を展開する。

### 1) メラミン障害作用の仕組みの解明

実験動物を通して、メラミン給与あるいは投与による肝腎機能を主対象にした機能障害機序を解明する。

### 2) 簡単/安価/迅速なメラミンスクリーニング法の確立

生産・流通あるいは消費現場でも簡単・安価かつ素早く行えるスクリーニング検出法の確立を目指す。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) メラミン障害作用の仕組み

メラミンが、類似構造体の一つであるシアヌル酸と反応して腎臓で結石化し、腎障害をもたらすことが既に報告されている。その反応生成物メラミンシアヌレートは *in vitro* 下で針状構造をとるが、実際の発症例 (*in vivo*) 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、昨年度に続き、さらに検討を進めた。

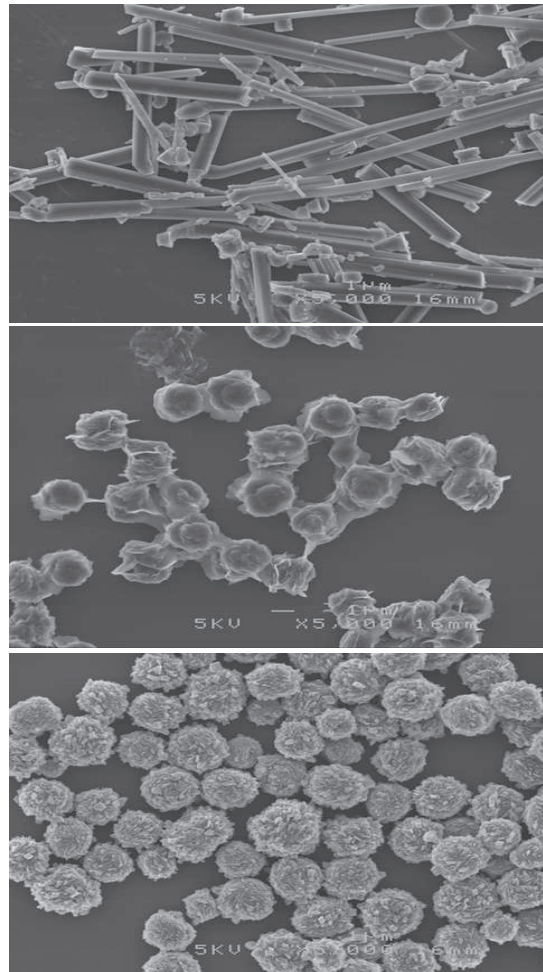
なお、昨年度までに我々が明らかにした主な知見は2点、すなわち、①pH 水準(4~8間)は生成物の形状に影響しないこと、②幾つかの血漿タンパク質(すなわち、代表的な血漿タンパク成分であるアルブミン(ウシ由来)とガンマグロブリン(ウシ由来)、及び腎機能の診断マーカーである  $\beta$ 2ミクログロブリン(ヒト由来))が反応物の生成時に存在した場合に、それらが生成物の形状に影響すること、である。

今年度は、人工的な高分子物質がメラミンシアヌレート生成時に存在した場合、その形状に影響を与えるか否か、について、光学および電子顕微鏡観察により解析した。

その結果、高分子物質ポリビニルピロリドン(PVP)が、血漿タンパク質と同様に、メラミンシアヌレート形状を球状に変化さ

せることを新たに見出した。また、PVP 存在下で生成したメラミンシアヌレートは、血清タンパク質(アルブミン)下で生成するものよりもさらに複雑な球状構造を示した(図1)。今回の現象の機序の解明や、実際の腎臓の結石生成に与える意義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針状と球状結晶の違い



上段: 針状メラミンシアヌレート: 高分子物質が介在しない環境下で生成

中段: 球状メラミンシアヌレート: 血清アルブミンの存在下で生成

下段: 球状メラミンシアヌレート: PVP の存在下で生成

### 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*

The morphology of melamine cyanurate (MC) crystals in vivo differs from that in vitro, being rounded in the former case but needle-like in the latter. Last year we have found that serum proteins, such as bovine serum albumin (BSA), can contribute to in vitro formation of rounded MC crystals. In addition to the previous knowledge, we confirmed this year that, like BSA, polyvinylpyrrolidone (PVP), a synthetic macromolecule, can alter the crystal morphology to a spherical form. Further details of the mechanism and clinical implications of the present findings remain to be elucidated.

*2: Development of a melamine screening method*

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

#### 4. 発表論文

S. Taksinoros, H. Murata.: Effects of serum protein on in vitro melamine-cyanurate crystal formation. *J. Vet. Med. Sci.*, **74**:1569-1573 (2012)

S. Taksinoros, H. Murata.: Effects of polyvinylpyrrolidone on in vitro melamine cyanurate crystal formation: An electron microscopy study. *J. Vet. Med. Sci.*, in press

#### 5. 著書および総説

村田英雄：飼料中マイコトキシンの除毒・除染について  
*臨床獣医* 30(11): 20-22 (2012)

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

本年度はなし

#### 7. 学会発表

S. Taksinoros, H. Murata.: A possible model of melamine-cyanurate crystal formation in the kidney: An in vitro study. AFLAS 2012 (The Asia Pacific Veterinary Conference), 10-12 October 2012, Bangkok, Thailand

#### 8. その他特記事項

##### 1. 新聞報道等

「飼料中のカビ毒 紫外線で9割減」農研機構と京産大  
日経産業新聞 2012. 5. 11 付け 10 面

##### 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)



# 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

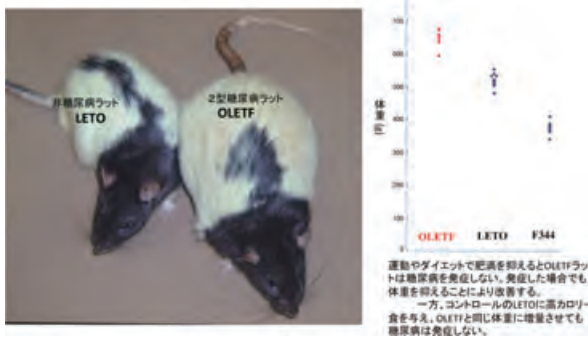


## 1. 研究概要

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F344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F344ラットも肥満ベースのF344ラットとするため、肥満遺伝子を導入したコンジ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。肥満コントロールラットは、F344ラットに比較して50mg/dL程度高い血糖値を示し、肥満による影響を確認した。一方、その肥満ラットにNidd2糖尿病遺伝子を導入したダブルコンジュニックラットは肥満コントロールラットよりさらに100mg/dLも高い血糖値を示し、さらに120分血糖値は200mg/dLを超えており、明らかな糖尿病状態を示した。このことから、Nidd2遺伝子座領域には肥満に伴い血糖値を異常に上昇させる遺伝子が存在することが確認された。

その原因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130遺伝子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(2012 年度分)

1. 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 17, 636-645, 2012
2. Genetic dissection of complex genetic factor involved in NIDDM of OLETF rat. Yamada, T., Kose, H., Ohta, T., and Matsumoto, K. Exp. Diabetes Res. Vol 2012, 1-6, Article ID 582546, doi:10.1155/2012/582546
3. Single diabetic QTL derived from OLETF rat is a sufficient agent for severe diabetic phenotype in combination with leptin signaling deficiency. Kose, H., Yamada, T., and Matsumoto, K. Exp. Diabetes Res. Vo. 2012. 1-5, Article ID 858121 doi:10.1155/2012/858121
4. Alterations in activity and energy expenditure contribute to lean phenotype in Fischer 344 rats lacking the cholecystokinin-1 receptor gene. James Blevins, Moralejo, D., Wolden-Hanson, T., Thatcher, T., Ho, J., Kaiyala, K. and Matsumoto, K. American J Physiol.-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology USA 303, R1231-R1240, 2012

### 5. 著書および総説(2012 年度分)

無し

### 6. 招待講演、シンポジウム等(2012 年度分)

無し

### 7. 学会発表(2012年度分)

1. ラットとショウジョウバエを用いた2型糖尿病遺伝解析: Imp は OLETF ラットの糖尿病原因遺伝子の1つである。小瀬博之、山田小和加、川崎紅、山田宜永、松本耕三、第59回日本実験動物学会 2012. 5. 24-26

### 8. その他特記事項

実験動物1級技術者資格取得のため、3回生へ特別講義、特別実技研修会を実施。6名が学科合格。4名が難関の実技にも合格す。

# 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、人を含む動物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) 鳥インフルエンザウイルスなどの病原体の自然界での存続と進化および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.*, 103: 192-200 (2012)

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.*, 163: 448-453 (2012)

## 5. 著書および総説

なし

## 6. 招待講演、シンポジウム等

高桑弘樹: ベトナムにおける鳥インフルエンザウイルスの浸潤状況. 第2回総合生命科学部シンポジウム. 2012.2.23

高桑弘樹: インフルエンザウイルス 知られざる真実. 第1回京都市・京都産業大学共同シンポジウム. 2012.12.9

## 7. 学会発表

H. Takakuwa, T. Usui, K. Hotta, L.Q. Mai, L.S. Phuong, R. Tsunekuni, H. Ozaki, H. Ito, M. Morimatsu, Y. Tomioka, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, E. Ono, T. Yamashiro, and K. Otsuki: Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy duck flocks in farms in northern Vietnam during year 2006-2010. Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe (Japan), 2012.1.11-12

K. Hotta, T. Usui, H. Takakuwa, T. Yamaguchi, L.Q. Mai, K. Otsuki, T. Ito, and T. Yamashiro.: Pathogenic analysis of H6N1 influenza viruses isolated in northern Vietnam, Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe (Japan), 2012.1.11-12

G. Uechi, L.Q. Mai, K. Ozaki, H. Takakuwa, E. Ono, and T. Yamashiro.: Isolation and characterization of anti-Influenza A subtype H5N1 neutralizing human monoclonal Fab by phage display system, Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe (Japan), 2012.1.11-12

T. Usui, K. Hotta, K. Soda, H. Takakuwa, L.Q. Mai, L.S. Phuong, H. Ito, H. Ozaki, R. Tsunekuni, E. Ono, T. Murase, T. Yamaguchi, K. Otsuki, T. Yamashiro, and T. Ito.: Avian influenza virus surveillance in duck farms and live-bird markets in northern Vietnam, Asia-Africa Research Forum

on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe (Japan), 2012.1.11-12

M. Takeuchi, M. Miyagawa, Y. Hirono, M. Sakura, Y. Tanahashi, H. Takakuwa, K. Otuki, and K.E. Pinkerton.: Chemotactic Activity for Neutrophils by Hot Water Extract from Agaricus Blazei Murill. International Symposium The Neutrophil in Immunity 2012, Québec QC (Canada), 2012.6.9-12,

Y. Fujimoto, K. Ozaki, H. Takakuwa, H. Ito, T. Usui, H. Ozaki, T. Murase, T. Yamaguchi, K. Otsuki, T. Ito, H. Kida, and E. Ono.: Antiviral effects of anti-PB2 monoclonal intrabody inhibiting the viral RNA transcription on influenza virus infections. 9th international congress of veterinary virology, Madrid (Spain), 2012.9.4-7

H. Takakuwa, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, H. Ozaki, R. Tsunekuni, T. Usui, H. Ito, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, E. Ono, and K. Otsuki: Characterization of Low Pathogenic Avian Influenza Viruses Isolated from Wild Birds in Northern Vietnam during Year 2006-2009. The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Association Congress, Bangkok (Thailand), 2012.10.10-12

堀田こずえ、高桑弘樹、藪田淑予、大槻公一、伊藤壽啓、山城哲、村瀬敏之: ベトナムの市場で販売されるアヒル卵中の抗鳥インフルエンザウイルス抗体調査, 第60回ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012年11月13-15日

## 8. その他特記事項

### 1. 外部資金

基盤研究(C)「鳥インフルエンザウイルスの鶏への感染性獲得メカニズムの解析」(代表者)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「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」

# ウイルス学研究室

Laboratory of Virology

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino, DVM, Ph.D



## 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が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り研究を行ってきた。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いない。ヒトを含むほとんどの動物において主たる伝播経路は明らかではない。特にヒトでは病原性すら明らかになっていない。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。

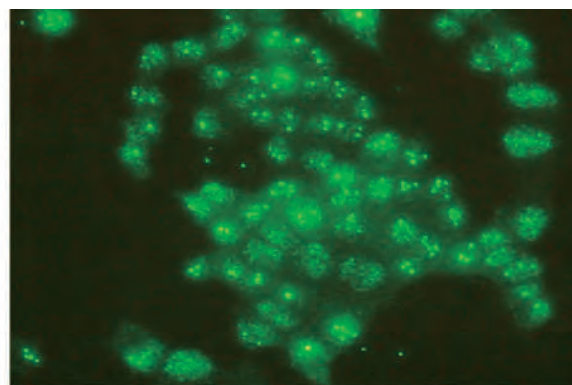
- 1) ウイルスゲノムにおける病原性関連遺伝子の同定と、ラットおよびマウスにおける病態のウイルス学的、病理学的、行動学的解析
- 2) 脳・神経系細胞における TGF- $\beta$  関連遺伝子の発現とウイルス病原性との関連性について
- 3) ウイルスが宿主動物に馴化する際のウイルスゲノムの変異機構について
- 4) ボルナ病発症に関与する宿主因子と環境因子について
- 5) ウイルス蛋白質の細胞内局在機構と病原性との関連性について
- 6) 家畜におけるボルナ病ウイルス感染症疫学調査
- 7) 抗ウイルス活性物質の解析

## 2. 本年度の研究成果

### 「牛におけるボルナ病ウイルス血清疫学調査」

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脊髄炎をおこす。その症状は、運動障害、行動学的異常、感覚異常など多岐にわたり、また、動物種・系統、感染時年齢、免疫応答性などの宿主要因により病態は多様であり、感染によりどのような神経症状が現れるのかは明らかではない。ウシはBDV感染により神経症状を現すことが知られているが、馬や羊に比べ症状は軽度で、多くが不顕性である。日本では乳牛と肉用牛の双方においてBDV感染調査がされており、感染例が報告されている。それによると、地域性や畜産家により感染率の差があり、その実態は不明な点が多い。昨年、乳牛においてBDV感染と繁殖障害の関連についての報告があり、ウシにおけるボルナ病は従来他の動物で知られていた運動障害や行動学的異常だけではない可能性が示された。そこで、ウシにおける感染の実態を把握する足がかりとして、京都市で食肉に供されるウシにおけるBDV感染血清疫学調査を行った。

H23年からH24年にかけて、京都市食肉検査部門に搬入された約100検体の黒毛和種(肉用牛)から採血し、その血漿中の抗BDV抗体をBDV持続感染MDCK細胞を抗原とした間接蛍光抗体法により検出を試みた。その結果、現在、約70検体の血漿を診断したが、いずれも抗体は検出されなかった。今後は、さらに検体数を増やし調査すると同時に、何らかの症状を呈している牛群についても調査を進めたい。尚、本研究は、京都市衛生環境研究所食肉検査部門との共同研究である。



BDV持続感染MDCK細胞におけるBDVウイルス抗原。BDV感染Lewisラット血清を用いた間接蛍光抗体法による染色。ウイルス抗原は、主に核内にドット状、あるいは点状に認められる。

## 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- $\beta$  family and viral pathogenesis, and 3) mechanism of changes in virus genome with adaptation to host.

#### 4. 発表論文

Murakami, M., Shirai, M., Oishi, R., Tsuburaya, A., Asai, K., Hashimoto, O., Ogawa, K., Nishino, Y., and Funaba, M. Expression of activin receptor-like kinase 7 in adipose tissues. *Biochemical Genetics*, 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

染谷梓、池永充宏、大西修、近野真由美、杉江真理子、Velado

Fernandez Igor、西野佳以、前田秋彦：京都市における紅斑熱群リケッチアの検出。第 154 回日本獣医学会、岩手、2012. 9.16

#### 8. その他特記事項

##### 8-1 外部資金

京都産業大学「特定課題研究」

課題名：ストレス性脳機能障害におけるウイルス持続感染の影響  
研究分担者：西野佳以（研究代表者：齋藤敏之）、取得年度：H24-25 年（2 年）

委託研究

課題名：カシスの抗ウイルス作用

研究代表者：西野佳以、取得年度：H24（1 年）

##### 8-2 知財権等

「カシスの抗ウイルス作用」について 本学への知的財産権の承継が決定した。

##### 8-3 学外活動

日本ボルナウイルス研究会 副会長

獣医学共用試験委員会 vetCBT 問題内容検討部会・科目委員  
科学研究費委員会専門委員

##### 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 12 回）  
生理学遠隔模擬講義（鳥取大学、浅野淳准教授による「血糖調節と糖尿病」、2012. 6. 25）のコーディネート  
オープンキャンパスにおける模擬実験（2012.8.5）



研究室に配属した3年生。ウイルスを扱うために、無菌操作や細胞培養の練習をしています。

# 実験動物医学研究室

Laboratory of Laboratory Animal Medical Science

## 1. 研究概要

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

助教 今野 兼次郎

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



内ステントの開発ではそれらを留置する心臓や脚の動脈に注目してきました。その流れを汲み、学外においては、国立循環器病研究センター研究所において、CTやMRIなどの医療用イメージング機器とミニブタを用いた研究に参加しています。

また、学内においては、ヒアルロン酸の専門家で脈管系の研究を展開していらっしゃ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

K. Konno, Nakanishi, K. S. Hishikawa, H. Tanaka, N.

Yoshikawa, Y. Yasuda, E. Kobayashi, A. Lefo :

Cryo-preserved porcine kidneys are feasible for teaching and training renal biopsy: "the bento kidney".

Transplantation research 1(1):1-5 (2012)

今野兼次郎, 小川哲平, 畠山美香, 板野直樹 : 内視鏡システムを用いたマウス吸入麻酔とそのモニタリング  
先端科学技術研究所 11号:7-20 (2012)



## 5. 著書および総説

なし

## 6. 招待講演、シンポジウム等

今野兼次郎：ミニブタに関する最近の話題（外科手術トレーニングを含む） 日本実験動物医学会シンポジウム「実験動物としてのブタ」 日本実験動物学会，別府，2012. 5. 23

## 7. 学会発表

今野兼次郎，小川哲平，畠山美香，塩谷恭子：内視鏡プローブを用いたマウスへの気管チューブ挿管と吸入麻酔，第154回日本獣医学会学術総会，盛岡，2012. 9. 14～16

今野兼次郎，小川哲平，畠山美香，塩谷恭子：内視鏡システムを用いたマウスへの気管チューブ挿管と吸入麻酔，第116回関西実験動物研究会，京都，2012. 12. 14

## 8. その他特記事項

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24年7月31日(火)～3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。

# 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

マダニやノミなどの吸血性の節足動物は、ヒトと動物の双方に寄生することから、さまざまな人獣共通感染症を媒介する可能性がある。このように節足動物に媒介される病原体のひとつに紅斑熱群リケッチアがある。*Rickettsia japonica* による日本紅斑熱は、発熱、発疹等を主徴とするダニ媒介性の疾患で、全数報告が必要となる4類感染症に指定されている。京都市におけるマダニの分布状況や、マダニの病原体の保有状況は不明であることから、本研究室は京都市衛生環境研究所と共同で、京都市におけるマダニの分布調査およびリケッチアをはじめとする病原体の保有状況を調査した。その結果、京都市のマダニは高頻度に紅斑熱群リケッチアを保有していることが明らかになった。また、イノシシなどの野生動物が、これらリケッチアの保菌動物となっている可能性も示唆された。京都市で検出されるリケッチア種の人および動物への病原性は不明であるが、今後、紅斑熱群リケッチアによる感染症の動向に注意が必要と考えられる。



環境中のマダニの分布調査

助教 染谷 梓

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



## 3. Research projects and annual reports

The microorganism exists in all places, and might threaten human and animal health. Zoonotic and food poisoning microorganism which can infect both animals and humans cause concern for public health in the contemporary society where relationships between humans and animals are various.

Arthropods can transmit zoonotic pathogens such as spotted fever group rickettsiae. *Rickettsia japonica*, the etiological agent of Japanese spotted fever is also associated with arthropod vector, mainly ticks. Therefore, the prevalence of rickettsia present in ticks collected from Kyoto city were investigated for the presence of the rickettsial DNA. Rickettsial DNA was frequently detected from ticks collected from Kyoto city and phylogenetic analysis suggests these rickettsiae are related to spotted fever group rickettsia although their pathogenicity is still unclear.



吸血したマダニ

## 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

染谷梓、池永充宏、大西修、近野真由美、杉江真理子、

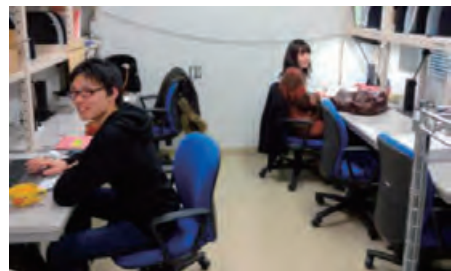
Velado-Fernandez Igor、西野佳以、前田秋彦:京都市における紅斑熱群リケッチアの検出。第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012.9.16

## 8. その他特記事項

京都産業大学・特定課題研究(分担)

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



学生が分属され、にぎやかになってきました

# 薬理学研究室

Laboratory of Pharmacology

## 1. 研究概要

当研究室では、以下のテーマについて研究を行っている。

### (1) 腸管の運動調節機構

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M<sub>1</sub>からM<sub>5</sub>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M<sub>2</sub>とM<sub>3</sub>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Ca<sup>2+</sup>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(Figure 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、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>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のか等の詳細なメカニズムについては明らかにされていない。そこで、本研究では、近年開発されたM<sub>2</sub>またはM<sub>3</sub>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を用いて、上記の未解決問題に取り組んでいる。

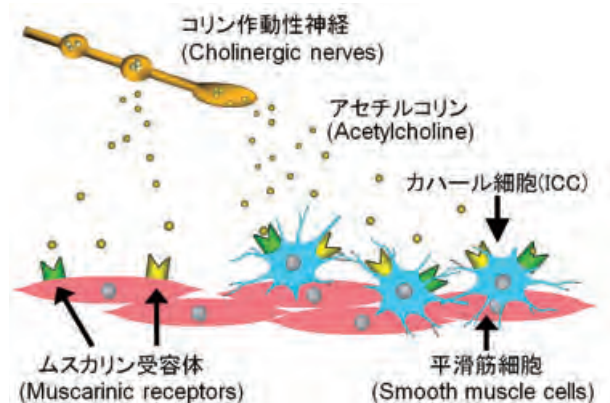


Figure 1. Regulation of gut motility by cholinergic nerves

### (2) 喫煙による気管支平滑筋収縮機能への影響

世界保健機関(WHO)の報告によると、全世界における喫煙者の割合は総人口の22%にも及び、毎年、約600万人の人がタバコ煙の暴露に関連した原因により死亡している。喫煙は慢性閉塞性肺疾患(COPD)および喘息などのリスク因子として広く知られている。喫煙がこれらの疾患を誘発する原因の一つとして、喫煙により気管支平滑筋の収縮過敏が惹起され、その結果、気道が狭窄することが仮説として提唱されている。しかし、喫煙がどのようなメカニズムにより気管支平滑筋の収縮過敏を引き起こすのかについては、いまだ十

助教 棚橋 靖行

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



分に明らかにされていない。そこで、本研究では、自動喫煙装置(Figure 2)を用いマウスにタバコ煙を暴露することにより作製した喫煙モデルマウスを用い、上記の未解決問題に取り組んでいる。本研究により得られる情報は、喫煙によって引き起こされるCOPD および喘息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。この研究は、京都産業大学免疫病理学研究室との共同研究として行っている。



Figure 2. Hamburg II smoking machine

## 2. 本年度の研究成果

### (1) 腸管の運動調節機構

本年度は、腸管平滑筋の収縮調節におけるATP感受性カリウムチャンネルの役割に焦点を当てて研究を行った。具体的には、マウス腸管平滑筋標本において、同チャンネルの開口薬及び遮断薬による膜電流反応、膜電位反応、収縮反応についてそれぞれ解析を行った。その結果、ATP感受性カリウムチャンネルは平滑筋の静止膜電位の形成に関与し、筋の興奮性を調節していることが明らかとなった。これらの結果は、第154回日本獣医学会にて公表し、奨励賞を受賞した。

### (2) 喫煙による気管支平滑筋収縮機能への影響

マウス気管支平滑筋リング標本を用いた張力測定法を確立し、高カリウム溶液により誘発される収縮反応を記録することに成功した。現在、本格的な実験に着手している。

## 3. Research projects and annual reports

### (1) Regulation of gut motility

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 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> and M<sub>5</sub>. In gastrointestinal smooth muscles, two subtypes of muscarinic receptor, M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub>, are found with no measurable quantities of other subtypes. As shown in Figure 1, stimulation of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> receptors by ACh increases in the intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup>, 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 M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> receptors and ICC in regulating the gut motility by ACh remain to be elucidated in detail. Therefore, we are addressing the above issue using the M<sub>2</sub> and/or M<sub>3</sub> muscarinic receptor knockout (KO) mice and ICC deficient mice.

In 2012, we focused on roles of ATP sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels expressed in the intestinal smooth muscles in regulation of gut motility. We recorded changes of electrical and mechanical activities in response to the K<sub>ATP</sub> channel opener or blocker in mouse single ileal myocytes and ileal segment preparations. Our results indicated that K<sub>ATP</sub> channels are constitutively active and contribute to the setting of resting membrane potential in mouse intestinal smooth muscle cells. These works were presented in the 154th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science.

(2) Effects of cigarette smoke exposure on contractility of bronchial smooth muscle

The World Health Organization (WHO) reported that 22 % of the world's population aged over 15 are smokers, and nearly 6 million people die from exposure to cigarette smoke each year. It is well known that cigarette smoke is an important factor for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. It has been suggested that cigarette smoke exposure can cause airway hyperreactivity, which is involved in airway narrowing in patients with the diseases. However, little is known about underlying mechanisms of the hyperreactivity induced by cigarette smoke. Therefore, we are addressing the above issue using the mice that are exposed to cigarette smoke. Our studies may provide useful information to elucidate the pathophysiological conditions of COPD and asthma induced by cigarette smoking, leading to development of a novel effective medicine for the diseases. In this study, we collaborated with Laboratory of Immunopathology in Kyoto Sangyo University.

In this year, we tried to record changes of mechanical activity in mouse bronchial ring preparations. We successfully recorded contractions induced by isotonic 70mM K<sup>+</sup> in the preparations.

#### 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

棚橋靖行、海野年弘、松山勇人、北澤多喜雄、山田真久、Jurgen Wess、小森成一: マウス小腸平滑筋細胞における ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャネルのムスカリン作動性調節機構、第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡市、2012.9.14-16 (日本薬理学・毒性学会奨励賞受賞)

Kazuma Sasaki, Ayaka Kawazoe, Yuriko Hirono, Masahito Nose, Eri Shigeyoshi, Yasuyuki Tanahashi, Masaaki Sakura, Minoru Takeuchi : Effect of cigarette smoking on infiltration of neutrophils to pulmonary by LPS., 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012.12.5-7

Masahito Nose, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Kazuma Sasaki, Yuriko Hirono, Yasuyuki Tanahashi, Masaaki Sakura, Minoru Takeuchi : Effect of cigarette smoke and Cryptomeria Japonica Pollen on immune cells in the lung., 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012.12.5-7

Yuriko Hirono, Masahito Nose, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Kazuma Sasaki, Yasuyuki Tanahashi, Masaaki Sakura, Masahiro Takeyoshi, Fumiyo Saito, Yumi Akahori, Nobuya Imatanaka, Minoru Takeuchi : Immunotoxic effects by oral gavage of cyclophosphamide or cyclosporine A as immunosuppressive drug in rats., 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012.12.5-7

Yuriko Hirono, Masahito Nose, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Kazuma Sasaki, Yasuyuki Tanahashi, Masaaki Sakura, Masahiro Takeyoshi, Fumiyo Saito, Yumi Akahori, Nobuya Imatanaka, Minoru Takeuchi : Effects of cyclophosphamide as immunosuppressive drug on Alveolar Macrophages by oral administration in rats., The 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), Hong Kong, 2012.12.14-16

Masahito Nose, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Kazuma Sasaki, Yuriko Hirono, Yasuyuki Tanahashi, Masaaki Sakura, Minoru Takeuchi : Effect of cigarette smoke on primary immune response to Cryptomeria Japonica pollen in the lung. The 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), Hong Kong, 2012.12.14-16

#### 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 B (研究分担者)  
京都産業大学 特定研究課題 (研究代表者)

##### 2) 受賞等:

第 154 回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会奨励賞を受賞

##### 3) 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、基礎特別研究
- ii. 京都産業大学オープンキャンパス動物生命医科学科模擬実験: 腸の運動メカニズムを探る(2012.8.18)

## 年報第3号発刊にあたって～総合生命科学部事務室から～

平成22年4月に本学で9番目の学部として開設しました総合生命科学部も、本誌発刊の際には、全年次の学生が在学する完成年度を迎えることができましたこと、関係各位の皆さま方に対し厚く御礼申し上げます。

総合生命科学部は、「生命システム学科（入学定員45名）」「生命資源環境学科（同35名）」「動物生命医科学科（同35名）」の3学科から構成されています。本学部は、自然と人間が調和し発展する社会の実現を目指し、そのために必要な教育研究環境を整備し、最先端の研究を行うとともに、高度な専門知識と技術、応用力を持ち、社会に貢献できる人材育成のための教育を行っています。

また、本学部では「徹底した少人数教育」を実現しています。教授25名、准教授7名、講師3名、助教15名（以上、平成25年4月1日現在）の計50名にも及ぶ専任教員が協力して、充実した教育及び研究を展開しています。

さらに、総合生命科学部では、平成22年度の学部開設と同時に、本学では初の試みとなる「プロジェクト研究支援制度」を導入し、若手研究者を雇用して学部における教育研究活動を支援しています。本制度のもと、教員はレベルの高い教育を行うとともに、研究面においては、先端的な研究を行い外部資金等を獲得するなどの実績をあげています。

前述のとおり、平成25年には完成年度を迎え、総合生命科学部として最初の卒業生を送り出すこととなりますが、学生の進路支援に関しては、学部教職員はもとより、関係部署との連携を図りながら取り組む事が重要な使命であり、またその事が、本学部の充実及び将来の発展に寄与するものであると確信し、取り組みを進めていきます。

総合生命科学部長補佐 椎 清二

### 平成24年 総合生命科学部の主な取り組み

#### 第1回 総合生命科学部 研究交流会の開催

8月8日・9日の2日間、15号館（総合生命科学部棟）を会場として、研究交流会を開催し、専任教員35名が口頭発表を行いました。また、プロジェクト助教、特約講師、大学院生等のポスター発表も55件行われ、連日、学生・教職員合わせて約100名の参加がありました。

#### 大学院生命科学研究科 設置構想案の策定

平成26年4月の開設を目指し、総合生命科学部を基礎とした大学院生命科学研究科（修士課程）の設置構想案の策定に着手しました。策定に関しては、研究科設置準備委員会を設置し、教員組織・カリキュラム案の検討を行い、設置準備を進めています。

#### 総合生命科学部事務室スタッフ

後列（左から） 鈴木 増岡 椎  
前列（左から） 平元 加藤 横野



## 総合生命科学部プロジェクト研究支援制度研究成果中間報告書

- 【支援制度成果目標】 1. プロジェクト毎に4報（又は3報）以上の論文掲載  
2. プロジェクト毎で競争的資金に新規1件以上の採択

【成果目標達成度】 ほぼ達成できる見込み

【研究目標達成度に対する自己点検・評価及び今後の改善点】

別紙各研究者からの報告に見られるように、本プロジェクト研究に参加しているすべての研究は順調に進捗している。それぞれが当初の研究目標に向かって、研究成果を出しつつあり、また当初想定していた以上の成果に結び付けているグループもある。

論文発表については、欧文誌発表のみを見ても、平成22年発足以来、最大24報を発表したグループを初め、すでに6グループが8報以上を公表し、総計126報となっている。この中には、*Nature*, *Science*, *Nature Communication*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *Mol. Cell*, *Develop. Cell*, *EMBO J.* などをはじめとする、生命科学分野の文字通り国際的にトップジャーナルと呼ばれる雑誌も含まれており、量だけでなく、質的にも当初想定以上の成果に結びついているとすることができる。新聞紙上にも数件の論文発表が記事になっており、京都産業大学総合生命科学部の認知度は一般にも大きくなっていることを実感する。

競争的資金についても、1グループを除き、すべてのグループが外部資金を獲得している。このままの状態を維持し、更なる向上をめざしたい。

## 総合生命科学部プロジェクト研究支援制度中間報告評価

活動期間：平成22年4月～平成24年6月

【全体評価】

〔評価コメント〕

学部長記載の本研究支援制度への参加学科全体のまとめにあるように、参加教員の研究進捗状況は、極めて良好である。それを反映して、本支援制度発足の平成22年以来、査読制度の整備された専門誌への発表が8報以上のグループが6グループに達し、原著論文数の総計が121報となっている。量的多さに加えて、*impact factor* の非常に高い欧文誌 (*Nature*, *Science*, *Cell* 等) への発表も含まれており、本学部の研究の質の高さが如実に示されている。

研究状況を反映して、競争的研究資金の獲得も概ね順調である。本全体評価、及び個々の教員の報告書において、プロジェクト助教の役割内容とその効果、学部及び大学院教育への影響（教育効果）について、次回の報告では、明記願いたい。

第1回 総合生命科学部 研究交流会 口頭発表演題一覧

No	8月8日(水)	発表者	演題
1	9:50～10:02	山岸 博	シロイヌナズナとキヤベツの体細胞雑種後代における雄性不稔性
2	10:02～10:14	大槻 公一	抗鳥インフルエンザウイルス作用を有す素材の検証
3	10:14～10:26	中田 博	レクチンによる免疫制御と腫瘍組織における膜結合型ムチンのカウンターセプターとしての機能
4	10:26～10:38	今野 兼次郎	内視鏡システムを用いたマウス吸入麻醉とその応用
5	10:38～10:50	金子 貴一	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
10:50～11:05 休 憩			
6	11:05～11:17	板野 直樹	癌幹細胞の選択的増幅を制御する癌微小環境の形成機構解明
7	11:17～11:29	高桑 弘樹	ベトナムの野鳥における鳥インフルエンザウイルス浸潤状況
8	11:29～11:41	横山 謙	ねじれによる回転分子モーターのエネルギー伝達機構
9	11:41～11:53	津下 英明	感染症の構造生物学
11:53～13:00 昼 食			
13:00～14:30 ポスター発表			
10	14:30～14:42	寺地 徹	SCARマーカーが示唆するエンマコーコムギ及びパパンコムギにおける葉緑体とミトコンドリアゲノムタイプの不一致
11	14:42～14:54	西野 佳以	ボルナ病の新たな発症機序
12	14:54～15:06	伊藤 維昭	合成途上鎖の分子生物学
13	15:06～15:18	齋藤 敏之	ストレス脳障害部位検出に向けた画像診断素材技術の開発
14	15:18～15:30	八杉 貞雄	消化器官の形態形成、細胞分化と幹細胞
15:30～15:45 休 憩			
15	15:45～15:57	松本 耕三	肥満による2型糖尿病発症原因遺伝子探索
16	15:57～16:09	黒坂 光	神経発生におけるムチン型糖鎖の機能解析
17	16:09～16:21	野村 哲郎	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
18	16:21～16:33	福井 成行	PC12細胞の主要ポリラクトサミン鎖含有糖タンパク質、CD24の糖鎖構造



No	8月9日(木)	発表者	演題
19	9:50～10:02	佐藤 賢一	膜マイクロドメインに焦点をあてた卵細胞およびがん細胞の生物学的機能の解析
20	10:02～10:14	加藤 啓子	情動系神経回路の応答機構の解明
21	10:14～10:26	河邊 昭	エピジェネティック制御機構に関する分子集団遺伝
22	10:26～10:38	棚橋 靖行	マウス小腸平滑筋細胞におけるATP感受性K <sup>+</sup> チャネルのムスカリン作動性調節機構
23	10:38～10:50	浜 千尋	シナプス間隙タンパク質による神経回路形成の調節機構
	10:50～11:05		休憩
24	11:05～11:17	嶋本 伸雄	大腸菌の死と延命の機構：tmRNA回路とClpXP回路の発見
25	11:17～11:29	村田 英雄	メラニン障害作用、特に腎臓結石形成、のしくみの解明
26	11:29～11:41	吉田 賢右	シヤペロンの研究およびATP合成酵素の研究
27	11:41～11:53	木村 成介	植物の葉の形態の表現型可塑性の研究
	11:53～13:00		昼食
	13:00～14:30		ポスター発表
28	14:30～14:42	瀬尾 美鈴	神経系疾患とがんの分子メカニズムの解明と創薬に向けて
29	14:42～14:54	前田 秋彦	節足動物媒介(性)感染症の発生因子および原因病原体の感染因子に関する研究
30	14:54～15:06	高橋 純一	日本におけるミツバチ大量死の原因となる病原性微生物同定の試み
31	15:06～15:18	竹内 実	タバコ煙による肺胞マクロファージの免疫機能への影響と発ガンについて
32	15:18～15:30	中村 暢宏	ゴルジマトリックスタンパク質GM130の構造と機能
	15:30～15:45		休憩
33	15:45～15:57	染谷 梓	京都市における節足動物媒介性病原体の分布状況に関する研究
34	15:57～16:09	本橋 健	葉緑体の機能制御 ～葉緑体レドックス制御機構～
35	16:09～16:21	永田 和宏	小胞体におけるタンパク質品質管理機構の研究

第1回 総合生命科学部 研究交流会 ポスター発表演題一覧  
 ポスター発表開催日時：13:00~14:30 (奇数番号)；8月8日(水)、偶数番号：8月9日(木)に発表

No.	演題	発表者	研究室名
1	tmRNAの定常期適応における役割	中山 秀喜 プロジェクト助教	鳴本伸雄 ナノバイオロジー研究室
2	環境に反応して葉形が変化する植物ニューベキアを用いた葉の表現型可塑性メカニズムの解明	中山 北斗 プロジェクトPD	木村成介 植物分子発生生物学研究室
3	マルチサイト翻訳アレストへ膜組込モニター-MiFMによる「ちりも積もれば山となる」戦略	千葉 志信 プロジェクト助教	伊藤雅昭 タンパク質バイオジェネシス研究室
4	植物が独自に獲得したDNAチェックポイント因子SOG1の機能解析	岡本 郁 PD	木村成介 植物分子発生生物学研究室
5	Effects of serum proteins on in vitro melamine-cyanurate crystal formation (インビトロ下のメラミンシアヌレート結晶形成に対する血清蛋白質の影響)	サラウート タクシノロス 院：博士後期	村田英雄 栄養衛生学研究室
6	Reconstitution of Vacuolar type rotary H <sup>+</sup> -ATPase/synthase from Thermus thermophilus (V型ATP合成酵素は中心回転軸がなくても再構成する)	岸川 淳一 PD	横山謙研究室 膜生体エネルギー研究室
7	ゴルジ体膜表在タンパク質複合体によるゴルジ体の動態制御機構の解明	石田 竜一 プロジェクトPD	中村暢宏研究室 発生細胞生物学研究室
8	IDENTIFICATION OF HOST PROTEINS THAT INTERACT WITH FLAVIVIRUS MEMBRANE PROTEIN (フラビウイルスの膜タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の同定)	ベイト・フェルデナス・イゴール 院：博士後期	前田秋彦 環境衛生学研究室
9	バクテリア1細胞へのナノ針による電気的ナノインジェクション法の開発	シエルバコローワ キセニア 院：博士後期	鳴本伸雄 ナノバイオロジー研究室
10	ゼブラフィッシュにおけるN-acetylgalactosaminyltransferase-Like 4の機能解析	金田 鋭一 院：博士前期	黒坂光 神経糖鎖生物学研究室
11	ADPリボシル化毒素と基質タンパク質複合体のX線結晶構造解析	鶴村 俊治 プロジェクト助教	津下英明 タンパク質構造生物学研究室
12	ツメガエルの卵成熟および受精におけるAIP1/メージングと卵細胞膜タンパク質の同定	井尻 貴之 プロジェクト助教	佐藤賢一 発生情報学研究室
13	葉緑体チオレドキシンのストロマでの役割	桶川 友季 プロジェクト助教	本橋健 植物生理学研究室
14	ダイコンのオグラ型と正常型のミトコンドリアゲノムの構造解析	田中 義行 客員研究員(学振特別研究員)	寺地徹 植物分子遺伝学研究室
15	心臓発生における冠動脈幹細胞の動態	石井 泰雄 プロジェクト助教	八杉貞雄 発生システム研究室
16	ニワトリ胚期消化器官におけるDpp/ephrinファミリー遺伝子の発現	藤本 聖恵 嘱託職員	八杉貞雄 発生システム研究室
17	消化器官の平滑筋および神経叢の形成過程	芦田 航 院：博士前期	八杉貞雄 発生システム研究室
18	眼の形態形成および網膜分化の分子機構	飯田 英明 院：博士前期	八杉貞雄 発生システム研究室
19	発生過程における消化器官幹細胞の検出	中村 卓哉 院：博士前期	八杉貞雄 発生システム研究室
20	コムギ葉緑体への遺伝子導入技術の開発	辻村 真衣 TR	寺地徹 植物分子遺伝学研究室
21	細胞質雌性不稔ナスに対する稔性回復遺伝子のSTSマーカー	吉見 麻衣子 TR	寺地徹 植物分子遺伝学研究室
22	ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素8b、8eの機能解析	川合 多美子 院：博士前期	黒坂光 神経糖鎖生物学研究室
23	Effect of Jungle Honey on Antibody Production and its Mechanism (ジャングルハニーの免疫作用とその機構について)	重吉 珠里 嘱託職員	動物生命医科学科嘱託職員
24	Effect of cigarette smoke and Cryptomeria Japonica Pollen on immune cells in the lung (タバコ煙と日本スギ花粉による肺の免疫細胞に及ぼす影響について)	野瀬 雅仁 院：博士前期	竹内実 免疫病理学研究室
25	Cigarette Smoke Induces DNA Damage but not Apoptosis in Alveolar Macrophages (タバコ煙は肺胞マクロファージのDNA損傷を誘導するがアポトーシスを誘導しない)	廣野 由里子 嘱託職員	竹内実 免疫病理学研究室
26	Effect of silylation on sexual behaviors (シリアル酸修飾が関与する性行動機構)	シモトリー・ハイトウ 院：博士後期	加藤啓子 動物神経解剖学研究室
27	MUC16の生物学的機能的解析とMUC16を用いた子宮内腺症と卵巣癌の識別方法の開発	秋田 薫 プロジェクト助教	中田博 免疫糖鎖生物学研究室

28	シグレック-3によるTLR-4シグナル伝達の制御機構		石田 有希子 特約講師	中田博 免疫糖鎖生物学研究室
29	シグレック-9とプロヒピチンの相互作用によるTCRシグナル伝達の制御		万木 肇 院：博士後期	中田博 免疫糖鎖生物学研究室
30	シグレック-9の結合に伴うMUC1を介したシグナル伝達		谷田 周平 嘱託職員	中田博 免疫糖鎖生物学研究室
31	ガレクチン-3のMUC1への結合に伴う腫瘍増殖促進作用		森 勇伍 院：博士後期	中田博 免疫糖鎖生物学研究室
32	シヨウジョウバエ中枢神経シナプス間隙タンパク質Hlgの局在を制御する新規因子の解析		中山 実 プロジェクト助教	浜千尋 神経回路発生研究室
33	KaIImann症候群原因遺伝子産物のAnosmin-1は、RGMaの成長促進作用を阻害する		竹内 祥人 院：博士前期	瀬尾美鈴 血管・神経生物学研究室
34	VEGF-A/NRP1 signaling induced GIPC1/Syx complexes resulting in RhoA activation to promote survival and growth of human malignant skin cancer cells. (VEGF-Aはニューロピリン1 (NRP1) を介してGIPC1/SYX複合体形成を誘導しRhoAを活性化させ、悪性上皮癌細胞の生存と増殖を促進する)		吉田 亜佑美 院：博士後期	瀬尾美鈴 血管・神経生物学研究室
35	ダイコンのオグラ型細胞質雌性不稔に対する新規総性回復遺伝子の分子遺伝学的解析		安本 景太 特約講師	山岸博 植物育種学研究室
36	Mitochondrial genome variation in male-fertile and male-sterile alloplasmic wheat lines with <i>degllops mutica</i> cytoplasm. (エキロブス・ムティカ細胞質を持つ細胞質置換コムギ系統に置けるミトコンドリアゲノムのバリエーション)		ギヤワリ・ヤダフ・ブラサド P D	寺地徹 植物分子遺伝学研究室
37	Possible nuclear localization of uroplakin III in human non-urothelial carcinoma cells (ヒト膀胱がんおよび非膀胱がんにおけるウロプラキンIIIの発現および細胞内局在)		吉田 潤平 院：博士前期	佐藤賢一 発生情報学研究室
38	Src-dependent and MAPK-independent survival and proliferation of human bladder carcinoma cells under serum-deprived conditions (血清飢餓環境におけるヒト膀胱がん細胞のSrc依存性/MAPK非依存性増殖機構)		紀平 成 院：博士前期	佐藤賢一 発生情報学研究室
39	小胞体還元酵素ERQ15を介した小胞体恒常性維持機構の解明		潮田 亮 プロジェクト助教	水田和宏 分子細胞生物学研究室
40	モヤモヤ病タンパク質ミステリンは巨大なドーナツ型分子エンジンとして、血管新生を制御する		森戸 大介 P D	水田和宏 分子細胞生物学研究室
41	Hsp47 KO in hepatic stellate cell leads to accumulation of type I collagen and disruption of ECM (肝星細胞におけるHsp47ノックアウトはコラーゲンの細胞内蓄積とECMの崩壊を引き起こす)		川崎 邦人 委託生 (院：博士後期)	水田和宏 分子細胞生物学研究室
42	線維化疾患治療を目指したコラーゲン特異的分子シャペロンHsp47阻害剤の探索		伊藤 進也 委託生 (院：博士後期)	水田和宏 分子細胞生物学研究室
43	小胞体酸化酵素Ero1・Prx4のダイミツクな局在制御機構		垣花 大一 委託生 (院：博士後期)	水田和宏 分子細胞生物学研究室
44	膵ユビキチン化酵素によるモヤモヤ病関連タンパク質Wysterinの機能制御		小谷 友理 院：博士後期	水田和宏 分子細胞生物学研究室
45	熱ショック時におけるTDP-43局在変化		浅野 慶太 院：博士前期	水田和宏 分子細胞生物学研究室
46	シャペロニンによるタンパク質フォールディング経路の変更		元島 史尋 プロジェクト助教	吉田賢右 タンパク質機能研究室
47	大腸菌Hsp90の基質タンパク質の探索		元島 優子 P D	吉田賢右 タンパク質機能研究室
48	シャペロニン空洞内に閉じ込められたタンパク質の熱変性		藤井 克弥 院：博士前期	吉田賢右 タンパク質機能研究室
49	ノダイコン総性回復遺伝子領域の配列多型と機能分化		高橋 亮 プロジェクト助教	寺地徹 植物分子遺伝学研究室 山岸博 植物育種学研究室
50	A putative GalNAc-transferase, ppGalNAc-T17/WBSCR17 regulates endocytosis in HEK293T cells. (GalNAc-T様遺伝子WBSCR17はエンドサイトーシス経路を調節する)		中山 喜明 プロジェクト助教	黒坂光 神経糖鎖生物学研究室
51	ゼブラフィッシュ後脳発生におけるムチン型糖鎖の機能解析		中村 直介 特約講師	黒坂光 神経糖鎖生物学研究室
52	単層培養条件下におけるマウス胚性腫瘍由来P19細胞の神経分化誘導		和田 あゆみ 院：博士前期	黒坂光 神経糖鎖生物学研究室
53	ゲノムインプリンティングがtype I MADS遺伝子の分子進化に及ぼす影響		吉田 真徳 プロジェクトP D	河邊昭 集団遺伝学研究室
54	VoV1 結晶の改善の試み		中西 温子 プロジェクトニシヤン	横山謙研究室 膜生体エネルギー研究室
55	【技術紹介】 Ligaseを使わない高効率プラスミド作製法		中山秀喜プロジェクト助教・千葉志信プロジェクト助教・渋谷悠平客員研究員(学振特別研究員)・鶴村俊治プロジェクト助教	鳴本・伊藤・津下研究室共同でのテクニカルレポート

2012年 総合生命科学部主催シンポジウム等一覧

1	講師	北村 浩 准教授(名古屋市立大学大学院病態医学講座 病態モデル医学分野)
	演題	ゲノミクスのこれまでとこれから
	世話人	加藤 啓子 教授
	日時等	【2012年 1月11日 13:15~14:15 バイオフォーラム】
2	講師	中屋 隆明 教授(京都府立医科大学 医学研究科 感染病態学教室)
	演題	次世代シーケンサーが切り拓く感染症のメタゲノム学
	世話人	西野 佳以 准教授
	日時等	【2012年 1月16日 15:00~16:00 バイオフォーラム】
3	講師	Mariano G. Buffone 博士(National Research Council of Argentina (CONICET))
	演題	NEW CONCEPTS OF THE MOUSE SPERM ACROSOMAL EXOCYTOSIS
	世話人	佐藤 賢一 教授
	日時等	【2012年 2月3日 16:30~17:30 バイオフォーラム】
4	講師	山崎 正幸 白眉プロジェクト特定准教授(京都大学次世代研究者育成センター)
	演題	$\alpha$ 1-Antitrypsinの小胞体内における凝集、フォールディングについて考える
	世話人	永田 和宏 教授
	日時等	【2012年 2月21日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
5	講師	由良 隆 博士(京都産業大学客員研究員 京都大学名誉教授)
	演題	大腸菌熱ショック応答の制御機構: 細胞が蛋白質の恒常性維持(品質管理)に関わる基本ストラテジー
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2012年 2月22日 16:00~17:30 生命科学セミナー】
6	講師①	村瀬 敏之 教授(鳥取大学 農学部)
	演題	細菌感染と食中毒
	講師②	小崎 俊司 教授(大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科)
	演題	ボツリヌス毒素の作用機序と多様性について
	講師③	横山 隆 領域長補佐(動物衛生研究所 プリオン病研究センター)
	演題	牛海綿状脳症(BSE)と食の安全
	講師④	高桑 弘樹 准教授(総合生命科学部 動物生命医科学科)
	演題	ベトナムにおける鳥インフルエンザウイルスの浸潤状況
	世話人	大槻 公一 教授
日時等	【2012年 2月23日 13:30~17:30 第2回 総合生命科学部シンポジウム】	

7	講師	Dipankar Chatterji 博士 (Indian Institute of Science (IIS), Bangalore, India)
	演題	リファンピシン耐性の仕組み
	世話人	嶋本 伸雄 教授
	日時等	【2012年3月2日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
8	講師	阿保 達彦 准教授 (岡山大学大学院 自然科学研究科)
	演題	大腸菌 ArfA, ArfB による終止コドン非依存的翻訳終結
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2012年3月5日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
9	講師	柳谷 耕太 特任助教 (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	小胞体膜上で起こるスプライシングの巧妙な仕組み
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2012年3月8日 14:00~15:00 生命科学セミナー】
10	講師	門倉 広 国際リサーチフェロー (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	哺乳動物細胞小胞体内におけるジスルフィド結合形成を解析する為の新規アッセイ系の作製
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2012年3月8日 15:00~16:00 生命科学セミナー】
11	講師	黒川 学 博士 (Duke University Medical Center, USA)
	演題	Regulation of Apoptosis and Chemoresistance in Cancer
	世話人	佐藤 賢一 教授
	日時等	【2012年4月6日 15:00~16:30 生命科学セミナー】
12	講師	妹尾 充敏 博士 (国立感染症研究所)
	演題	生きているが培養できない (VBNC) コレラ菌
	世話人	中山 秀喜 助教
	日時等	【2012年4月11日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
13	講師	今清水 正彦 博士 (米国国立癌研究所 (NCI- Frederick))
	演題	Retrofiring RNA polymerase, role of PPI and pause
	世話人	嶋本 伸雄 教授
	日時等	【2012年5月22日 16:30~17:30 生命科学セミナー】
14	講師	小山 時隆 准教授 (京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻植物学教室)
	演題	概日時計の転写出力システムについて—シアノバクテリアの転写概日リズム制御機構—
	世話人	木村 成介 准教授
	日時等	【2012年5月23日 15:30~16:30 バイオフォーラム】

15	講師	岩尾 康宏 教授 (山口大学大学院 医学系研究科 応用分子生命科学系専攻)
	演題	脊椎動物の卵付活の分子機構とその多様性
	世話人	佐藤 賢一 教授
	日時等	【2012年5月28日 16:00~17:30 バイオフォーラム】
16	講師	Alejandro Ferrando博士 (Instituto de Biología Molecular Celular de Plantas,CSIC/Universidad Politécnica de Valencia)
	演題	eIF5A: a primitive and polyamine-dependent translation factor
	世話人	寺地 徹 教授
	日時等	【2012年5月29日 16:00~17:00 生命科学セミナー】
17	講師	打田 直行 博士 (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	植物の形作りにおける未解明の細胞間コミュニケーションを探求する
	世話人	木村 成介 准教授
	日時等	【2012年6月6日 15:00~16:00 生命科学セミナー】
18	講師	Anthony T. Tu (杜 祖健) 博士 (コロラド州立大学名誉教授、順天堂大学客員教授)
	演題	日本の化学サリンテロとアメリカの生物炭疽菌テロ事件
	世話人	大槻 公一 教授
	日時等	【2012年6月12日 13:15~14:30 バイオフォーラム】
19	講師	岩田 忠久 教授 (東京大学大学院 農学生命科学研究科 生物材料科学専攻 高分子材料科学研究室)
	演題	未来を拓け! 環境にやさしいプラスチック
	世話人	村田 英雄 教授
	日時等	【2012年6月14日 16:00~17:00 バイオフォーラム】
20	講師	島村 達郎 講師 (京都大学 医学研究科)
	演題	ヒト由来Gタンパク質共役型受容体の構造解析
	世話人	横山 謙 教授
	日時等	【2012年6月15日 11:00~12:00 生命科学セミナー】
21	講師	福島 健児 日本学術振興会特別研究員 (総合研究大学院大学生命科学研究科 (基礎生物学研究所))
	演題	食虫植物における新奇形質の進化: 消化酵素と捕虫葉形態
	世話人	木村 成介 准教授
	日時等	【2012年6月22日 15:00~16:00 生命科学セミナー】
22	講師	今村 博臣 准教授 (京都大学 白眉センター)
	演題	ATPを通して生命現象を眺める
	世話人	横山 謙 教授
	日時等	【2012年6月29日 11:00~12:00 生命科学セミナー】

23	講師	Michael Ionescu 博士(カルフォルニア州立大学バークレー校)
	演題	Control of Pierce's Disease by Methods Involving Pathogen Confusion
	世話人	嶋本 伸雄 教授
	日時等	【2012年8月2日 16:30~17:30 生命科学セミナー】
24	講師	諸橋 賢吾 博士(オハイオ州立大学)
	演題	包括的ゲノムワイド解析によるトウモロコシ転写因子Pericarp Color1 (P1)が制御する遺伝子群の同定
	世話人	木村 成介 准教授
	日時等	【2012年10月16日 16:30~17:30 生命科学セミナー】
25	講師	笹井 紀明 博士(英国医学研究機構 国立医学研究所, London, UK)
	演題	脊椎動物の脊髄神経発生における転写因子のネットワークとパターン形成
	世話人	永田 和宏 教授
	日時等	【2012年11月13日 15:30~16:30 生命科学セミナー】
26	講師	野地 博行 教授(東京大学大学院工学研究科)
	演題	ATP合成酵素の1分子生物物理研究と、そこから派生した応用研究(デジタルELISA)
	世話人	横山 謙 教授
	日時等	【2012年11月16日 16:00~17:00 バイオフォーラム】
27	講師	George L.Gerton 博士(アメリカ ペンシルベニア大学医学部)
	演題	「Where do we go with what we have learned?」(精子構造のプロテオミクス解析)
	世話人	佐藤 賢一 教授
	日時等	【2012年11月19日 16:00~17:30 バイオフォーラム】
28	講師①	石田 竜一 博士(総合生命科学部 プロジェクトポストドクター)
	演題	Structure and function of GM130-GRASP65 complex
	講師②	吉村 信一郎 助教(大阪大学大学院 医学系研究科)
	演題	Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors
	講師③	申 惠媛 (Hye-Won Shin) 准教授(京都大学大学院 薬学研究科)
	演題	Interplay of lipids and proteins in intracellular membrane traffic
	講師④	Yangzhuang Wang 准教授(ミシガン大学 分子細胞発生生物学)
	演題	Golgi Biogenesis, Function, and Defects in Diseases
世話人	中村 暢宏 教授	
日時等	【2012年11月21日 16:30~18:30 生命科学セミナー】	
29	講師	本田 知之 博士(京都大学ウイルス研究所 ヒトがんウイルス研究分野)
	演題	ボルナウイルスと宿主細胞との核内における攻防
	世話人	西野 佳以 准教授
	日時等	【2012年11月28日 16:00~17:00 生命科学セミナー】

30	講師	菅沼 雅美 主席主幹(埼玉県立がんセンター)
	演題	ピロリ菌の分泌タンパク質Tip $\alpha$ によるヒト胃がんの発症機構とTip $\alpha$ の結晶構造
	世話人	津下 英明 教授
	日時等	【2012年12月10日 15:00~16:00 生命科学セミナー】
31	講師	杉本 直己 教授(甲南大学先端生命工学研究所(FIBER)所長、 フロンティアサイエンス学部(FIRST))
	演題	脱二重らせんの発想から生まれる新しい機能性核酸の発見
	世話人	伊藤 維昭 教授
	日時等	【2012年12月17日 16:00~17:30 バイオフォーラム】



# 「未完成」タンパク質判別

## 京産大教授ら手法開発

タンパク質の「完成品」と「未完成品」を見分ける手法を、京都産業大総合生命科学部の伊藤維昭教授らのグループが開発した。タンパク質の合成や廃棄の異常が原因となる病気のメカニズム解明にもつながる成果とい

完成するまでアミノ酸と結合したままで、完成するとはずれることに着目。電気泳動で質量の差を見ることで、「完成品」と「未完成品」を区別することに成功した。

伊藤教授は「タンパク質の一部には、未完成で

**病気の仕組み解明期待**

タンパク質は、細胞内にあるリボソームで合成されており、完成するとリボソームから切り離される。グループは、タンパク質を構成するアミノ酸を運ぶRNA（運搬RNA）が、タンパク質が

リボソームについたまま他のタンパク質合成を調節するものもある。細胞は「未完成品」の異常な蓄積を防ぐシステムも備えており、今回の手法を使って、その実像に迫りたい」と話している。

(松尾浩道)

# 鳥インフルエンザ 農家厳戒

無敵に殺詰めされた鶏の死骸、雪のよこに農場を覆う消毒用石灰…。養鶏、養豚農家にとって「悪夢」を思い起こさせる鳥インフルエンザのシーズンを迎えた。昨年発生した愛知県豊橋市や新城市では、各農場が野鳥や小動物の侵入を防ぐネットを厳重に張るなど例年以上の対策を講じ、神経をたがらせている。

## 昨年被害の豊橋、新城

「やれるだけのことではやらが起きる」だけに豊橋市養鶏など。豊橋市の鶏卵集出荷業者協会の富田弘組合長は「発生しないよう神到したトラックのタイヤに」に折るしかない」と苦しい胸を吐き、消毒液を入念にかけながら、の内の明かす。

市内の各農場は鶏舎の開口と一一年二回の、鳥インフルが発生。昨年、組合に加入部分全てネットを張り、関係者以外立ち入り禁止に。た照する養鶏農家三千戸のうちが、さまざまなルートで感染。二戸が廃業した。九戸はその

### 豊橋市の鳥インフルエンザ対策

2009年2月、豊橋市のウズラ飼育施設で中部地方で初めて感染を。7農家の160万羽が殺処分され、ウズラ卵の国内最大の生産地に深刻な被害を与えた。11年1月27日に豊橋市、2月14日に新城市の養鶏場で確認され、計16万羽の鶏が処分された。卵が搬入された豊川市のふ化場の卵とひなも焼却された。県は3月10日に終息宣言。

## 「やれることはやる」 徹底消毒 ネット、鳥防

後、より目の細かい防鳥ネットを百万〜五百万円で購入。鶏舎や出入りする車の消毒に年間四十万〜六百万円かけて対策を徹底した。農場の従業員は鶏舎を移動するたび、替えをしている。

農林水産省によると、鳥インフルは一〇年十一月以降、国内の九県二十四農場で発生し、百八十三万羽の鶏が殺処分された。

鳥インフルウイルスはもともと、渡り鳥の力王が持っているといわれる。中国大陸から越冬のため日本に飛来し、在来の野鳥が感染。野鳥の死骸や野鳥のふんを食べたネズミやハエが鶏舎に侵入し、ウイルスを運んだことが考えられている。

今季は二十五日現在、国内で発生していない。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「鳥インフルウイルスを持つカモなどの渡り鳥に接触した野鳥が免疫を持ったため、感染が



鶏卵集出荷場に入るトラックのタイヤを消毒する業者＝愛知県豊橋市で

抑制されているのでは」と分ットや出入りする車や鶏舎折。その上で「免疫を持ったに消毒薬をまく噴霧器(一台野鳥が世代交代で姿を消せ 三千万〜百万円)の購入費をば、再び感染が起きる。今後 国と共同で補助している。新も警戒が必要」と注意を呼び 城市も同様の対策に取り組む。

豊橋市では昨年、焼却施設を強化している。豊橋市は昨の市資源化センターが定期整備中だったため、鶏を焼却処分できなかった。今季は定期整備を前倒しして終え、受けが免疫を持ったため、感染が石灰を配布したり、防鳥ネットを整備を整えた。

# 飼育再開へチャンス

## 全殺処分回避へ国指針



公園再生に  
向けて

【中】

は農林水産省、野鳥は環境省が受け持つが、公園などの飼育鳥は施設や自治体が自主判断するしかなく、日本動物園水族館協会（東京）が国に法整備を求めている。

環境省動物愛護管理室の

教羽が感染しただけで全

部を殺処分しなければならなかったのか……。市民の間にはこんな疑問が今もくすぶるだけに、新たな基準に、宇部市関係者や市民は注目した。市の幹部は「大量の鳥を1羽ずつ管理するのは困難。指針は管理ができる範囲を前提としている」と話す。

「リスクはあるが、飼育チャンスが出てきた」。昨年6月に発足した常盤湖を考える市民委員会の11月の会合は、国の指針を受け、

それまでの2回の論議とは打って変わり、ハクチョウの飼育再開へ向けて前向きな意見が相次いだ。

市も、国の指針に準じて独自の対応マニュアルを作成。不必要な処分につながらないようにした。

「感染した鳥と同じ場所にいた鳥は、隔離して経過観察する」。ただちに殺処分を求めたものではなかった。

それまでの鳥インフルエンザ対策は、鶏などの家禽

消毒用に大量にまかれた消石灰。観光地としてのイメージが損なわれるとして、新たなマニュアルでは液体に変えた。昨年3月5日、宇部市の常盤公園



消毒用に大量にまかれた消石灰。観光地としてのイメージが損なわれるとして、新たなマニュアルでは液体に変えた。昨年3月5日、宇部市の常盤公園

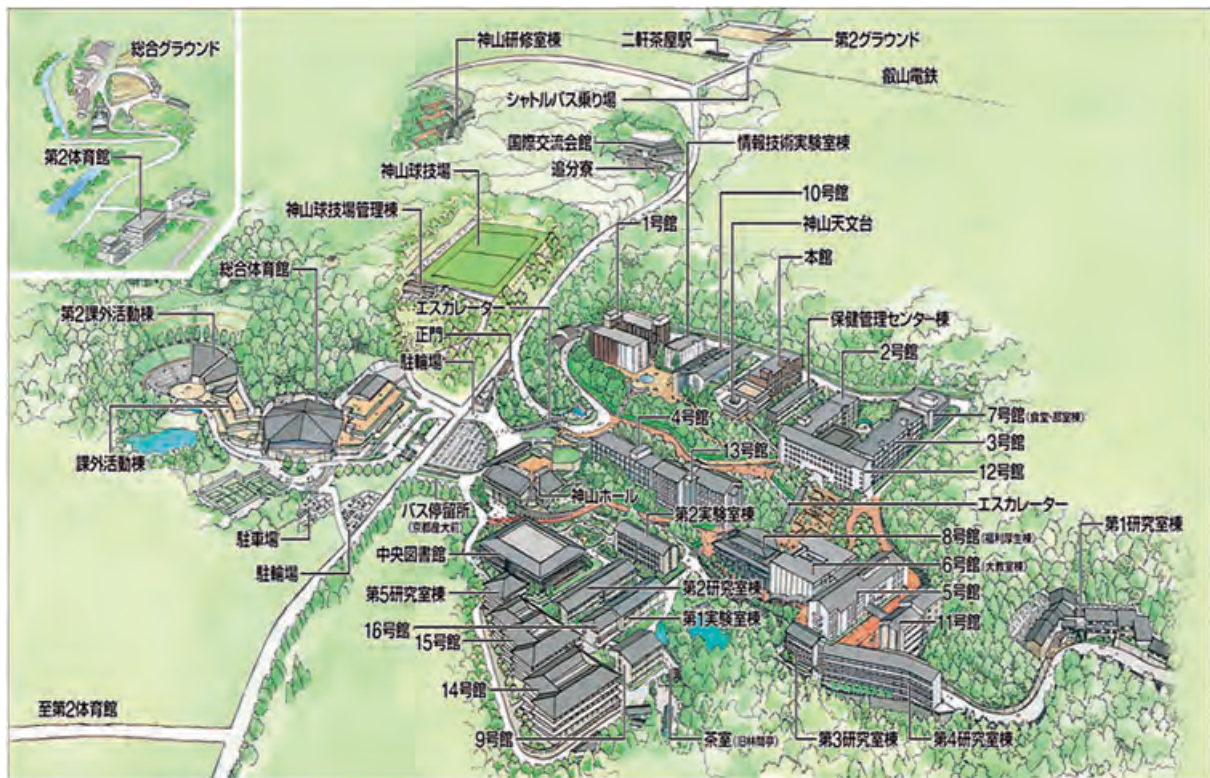


常盤公園の鳥インフルエンザ対応マニュアル

飼っている鳥の感染の有無にかかわらず、感染リスクの高い季節は、放し飼いは原則中止し、防鳥ネットや網で覆った場所で飼育。感染が確認されたら殺処分し、同じ場所にいた鳥は隔離して経過観察する。

（呉志堅直）

## 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 3 号 2 0 1 2 (平成 2 4 年)

発 行 日 2 0 1 3 (平成 2 5) 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/>