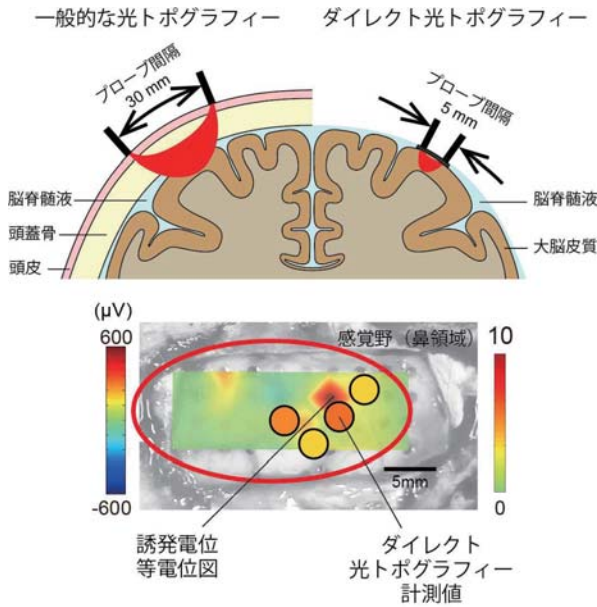


京都産業大学総合生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences
Kyoto Sangyo University



《第4号》

2013
平成25年

脳表面から光で直接脳血流変化を計測する新技術

これまで、頭の表面に複数の光源と受光センサーを配置し、センサーの情報をもとに脳血流の変化を脳表面上の分布として2次元画像として表示する「光トポグラフィー」という技術は実用化されていましたが、空間解像度が2cm程度で（3cm格子状プローブ配置の場合）、脳以外の皮膚組織などから信号が混入する可能性がありました。

今回、世界に先駆け、麻酔したミニブタを用いて大脳皮質表面からダイレクトに光で脳の血流反応を計測し、脳活動を高精度の2次元マップとして表現する手法の開発に成功しました。この「ダイレクト光トポグラフィー法」により、脳の表面に複数の光源と受光センサーを5mm間隔で配置し、約3mmの高精度で、異なる位置の脳活動を分離することが可能になりました。

今後、ミニブタによる基礎実験を進め、ヒトの脳神経外科手術中の脳機能モニタリングへの臨床応用実現を目指していきます。

なお、この成果は自治医科大学、中央大学、京都産業大学らのグループによる共同研究で得られたものです。

(Uga M. et al., <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.12.062>)

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	
2013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	5
	板野直樹教授	7
	伊藤維昭客員教授	10
	黒坂光教授(学部長)	13
	佐藤賢一教授(学科主任)	16
	嶋本伸雄客員教授	19
	瀬尾美鈴教授	22
	中田博教授	26
	永田和宏客員教授	29
	中村暢宏教授	35
	浜千尋教授	38
	福井成行教授	41
	八杉貞雄客員教授	43
	横山謙教授(副学科主任)	49
	吉田賢右客員教授	52
生命資源環境学科	生命資源環境学科の教育研究活動	57
	金子貴一准教授	59
	河邊昭准教授	61
	木村成介准教授	64
	高橋純一准教授	68
	津下英明教授	72
	寺地徹教授(学科主任)	75
	野村哲郎教授(副学科主任)	78
	本橋健准教授	80
	山岸博教授	83
動物生命医科学科	動物生命医科学科の教育研究活動	87
	大槻公一客員教授	89
	加藤啓子教授	91
	今野兼次郎助教	95
	齋藤敏之教授	99
	染谷梓助教	102
	高桑弘樹准教授	103
	竹内実教授(学科主任)	105
	棚橋靖行助教	108
	西野佳以准教授	111
	前田秋彦教授(副学科主任)	114
	松本耕三客員教授	117
	村田英雄教授(副学部長)	120
2013年 総合生命科学部	研究トピックス	123

巻 頭 言

総合生命科学部長
黒 坂 光

総合生命科学部は、平成22年に開設された本学では最も新しい学部です。初代学部長の永田和宏教授の学部長退任を受け、昨年4月に私が次期学部長を拝命しました。浅学非才の私には、専任教員35名、プロジェクト助教12名に加え、ポスドク、客員研究員などの多くの構成員を抱える総合生命科学部の舵取りは荷が重く、学部運営に不安を感じましたが、何とかこの激動の1年を乗り切ることができました。これもひとえに皆様のご協力とご理解によるものと感謝の気持ちで一杯です。

平成25年度をもって4年間の学部完成年度を終える総合生命科学部では、1年をかけて教育・研究全体を検証しました。教育面ではカリキュラムを改訂し、より効率的なものを作成しました。また本年度から、文部科学省採択の理系グローバル人材育成事業が本格的に始まり、充実した英語教育が実施されます。研究面では、本学部独自の研究支援制度であるプロジェクト研究支援制度について議論を重ねてきました。また、総合生命科学部を基礎学部として、大学院生命科学研究科（修士課程）を申請しておりましたが、文部科学省より認可を受け、晴れてこの4月から新研究科を開設することができました。これをもって、学部から大学院まで一貫して教育・研究に取り組む環境が整備されました。

この3月に初めての卒業生を送り出したことは、本学部にとって大変嬉しいことでした。幸いにも就職は順調で、就職内定率は非常に高いものでした。また、大学院にも多くの学生が進学し、新研究科にも定員を上回る内部進学者がありました。卒業生の皆さんは、それぞれ進路は異なりますが、大学で培ってきたことを十分発揮してご活躍されることを願っています。皆さんの足跡が後輩達の歩むべき道となっていきます。

また、平成25年度をもって5名の教員（生命システム学科からは伊藤、福井、八杉、吉田各教授、動物生命医科学科からは大槻教授）が退職されました。先生方には、学部の設立から今日に至るまで学部を牽引していただきました。本学部が予想を上回る順調なスタートを切ることができたのも、先生方のご尽力のたまものと感謝致します。一方、新規教員採用人事も併せて行い、4月には新しく4名の教員をお迎えしました。これからは新しい先生方と力を合わせて、より素晴らしい学部にしていかなければなりません。

このように、学部完成年度を終えた総合生命科学部は、次のステージに向かってスタートを切りました。さらに今年度には、生命科学研究科博士後期課程の設置申請の準備をはじめます。博士後期課程を開設して高いレベルの教育・研究活動を行い、最初の学位取得者を送り出してはじめて一人前の学部・研究科といえるのでしょうか。それまでたゆまぬ前進が必要です。

学部として胸突き八丁の大変な時期を向かえておりますが、教育・研究の手を決して緩めるわけには行きません。本学部は自らの活動を検証するために、学部独自の取り組みとして年報を発行しています。今年の年報を手にとった皆さまには、激動の学部運営の中、学部構成員が懸命になって教育・研究に取り組んできた証しを感じ取っていただければ幸いです。

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	研究員 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		教授	板野直樹			Theerawut Chanmee		
		客員教授	伊藤維昭	千葉志信		千葉直美	茶谷悠平	
	学部長	教授	黒坂光	中山喜明			肥塚靖彦	高橋由衣
	学科主任	教授	佐藤賢一	井尻貴之				横山朋子
		客員教授	嶋本伸雄	中山秀喜			奈良重俊 黒川洋一	
		教授	瀬尾美鈴		浅野弘嗣		上野信洋	清水昭男
		教授	中田博	秋田薫			河野正孝 村上希平 石田有周	
		客員教授	永田和宏	潮田亮		伊藤進也 森大介 山本洋美 石田竜一	Shoshana Bar-Nun	福田泰子
		教授	中村暢宏					
		教授	浜千尋	中山実				
		教授	福井成行					
		客員教授	八杉貞雄	石井泰雄				角田羊平
	副学科主任	教授	横山謙			岸川淳一		中西温子 中嶋晶子 中村純一 中田純一 鈴星照
	客員教授	吉田賢右	元島史尋			菅原佳奈 鈴木俊治 税元英一 元島優子	由良隆	
生命資源環境		准教授	金子貴一					
		准教授	河邊昭			吉田貴徳 吉田初佳		
		准教授	木村成介				岡本郁子 中益朗斗 奥山北永 竹内卓剛 藤内卓矢	上ノ山華織
		准教授	高橋純一					
		教授	津下英明	鶴村俊治			吉田徹	秋浩 津守耶良
	学科主任	教授	寺地徹	高橋亮		塚谷真衣 GyawaliYadavPrasad	山本真紀	植村香織
	副学科主任	教授	野村哲郎					小原真美
		准教授	本橋健	桶川友季			泉井桂	
	教授	山岸博	高橋亮	安本景太	久堀麻衣子		山下陽子	
動物生命医科		客員教授	大槻公一			藪田淑予	池永充宏 伊藤藤江 泉江邊 杉北崎 田川渡辺	
		教授	加藤啓子					渡邊裕子
		助教	今野兼次郎					
		教授	齋藤敏之					
		助教	染谷梓					
		准教授	高桑弘樹					
	学科主任	教授	竹内実				石田喬裕 佐倉正明	廣野由里子 野中美子
		助教	棚橋靖行					川原瑞穂
	副学科主任	准教授	西野佳以				萩原克郎	
	教授	前田秋彦				米嶋万有子		
	客員教授	松本耕三						
	副学部長	教授	村田英雄					

総合生命科学部事務室スタッフ名簿

スタッフ等名簿	
大学院生	その他
Ontong Pawaraid (D1)	
中森健太 (M2) 齋藤隆康 (M2)	
Ksenia Pavlovna Shcherbakova (D3)	
吉田亜佑美 (D2) 竹内祥人 (M2)	
森田勇伍 (D2) 田中みなみ (M2) 西尾隆男 (M2) 田中涼太 (M1)	佐々木 綾 (大学院委託生) 永原 秀剛 (大学院委託生)
小谷友理 (D2)	川崎邦人 (大学院委託生) 垣花太一 (大学院委託生)
Jeerawat Soonthornsit (D1)	
芦田航 (M2) 飯田英明 (M2) 中村卓哉 (M2)	
藤井克弥 (M2)	
内池伸和 (M2) 宮澤幸樹 (M2)	
川勝弥一 (D1)	
大矢悠貴 (M2) 福永明日美 (M2) 井上理恵子 (M2) 岡部真弥 (M1) 辻 雅之 (M1)	
柴田幸平 (M2)	
山本一皓 (M1)	
Srimontri Paitoon (D2)	
佐々木大樹 (D1) 佐々木一馬 (M2)	
Velado Fernandes Igor (D3)	
Sarawat Taksinoros (D3)	

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)	島部知美
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)	伊原和美
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)	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)	久富利恵
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	村木直子
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	吉田哲治
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	若竹麻耶
教学センター特定職員 (R I 業務担当)	碓山菜々子

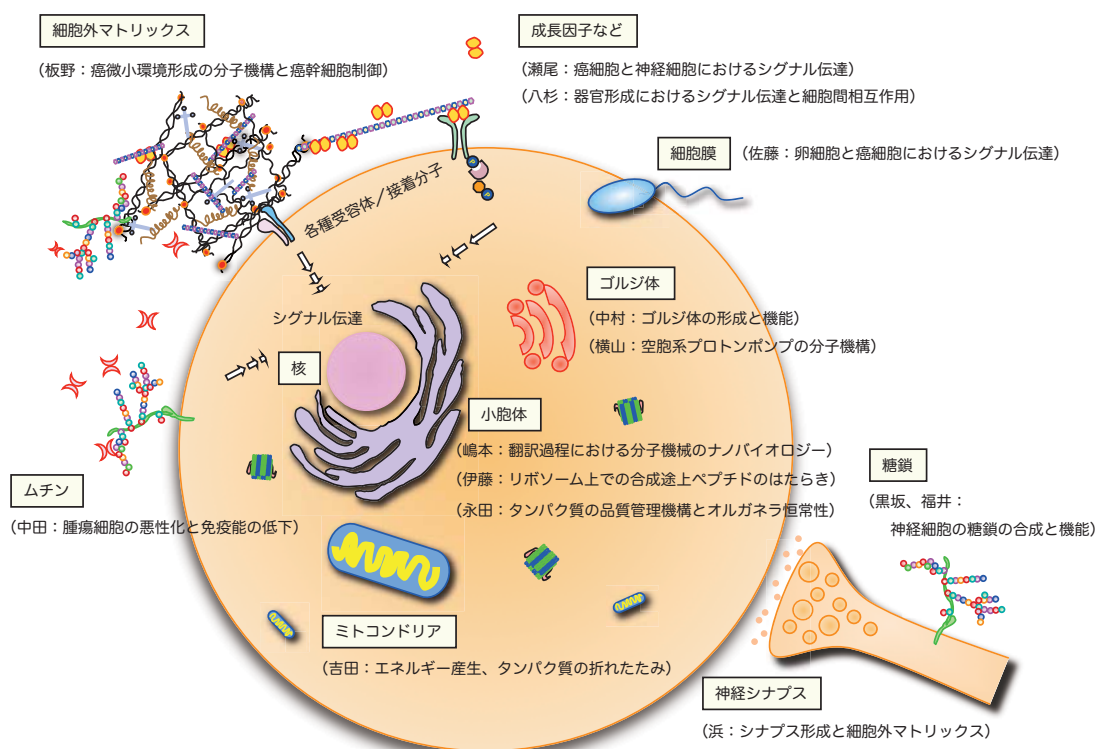
全学委員会等委員名簿

委員会等名称	委員氏名
全学共通カリキュラム委員会	黒坂光
全学共通カリキュラム推進委員会	村田英雄
人権センター運営委員会	西野佳以
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	津下英明
交通対策委員会	河邊昭
省エネルギー推進委員会	今野兼次郎
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 FD/SD 推進ワーキンググループ	村田英雄
大学院 FD/SD 推進ワーキンググループ	浜千尋
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	高桑弘樹
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
AO入試委員会	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
学術リポジトリ運営委員会	齋藤敏之
国際交流推進委員会	板野直樹
GSC (グローバルサイエンスコース) ワーキンググループ	中村暢宏
留学アドバイザー	染谷梓
大学院委員会	浜千尋
教職課程教育センター運営委員会	瀬尾美鈴 木村成介
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	野村哲郎

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、細胞表層受容体分子の機能、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(次のページ)は、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 名の専任教員が入学から卒業までの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3年秋学期以降の基礎および応用特別研究では、

教員1名が学生3～4名を指導する。カリキュラム全体の構成は次の通りである。入学直後に生物学と化学の基礎を、2年次までに生物化学、分子生物学、細胞生物学、生物学・化学実験などの基礎専門科目を、その後、より専門性の高い遺伝子工学、発生生物学、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年秋学期から研究室に所属して卒業研究に取り組む。また、専門科目としての英語や演習にも多くの時間を割いている。卒業後の進路については大学院進学を強く推奨し、就職とあわせたキャリア形成を進路センターとの連携によるガイダンスの実施等で支援している。今年度は第1期生の卒業年度であり、その進路決定状況に注目している。

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。)

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。

1-1: ヒアルロン酸生成機構の解明とアンチエイジング技術への展開

関節機能の低下が原因で寝たきりになる高齢者が増えている。この要因として、関節でクッションや潤滑の役割をするヒアルロン酸の減少がある。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcA)が、 β -1,3と β -1,4結合で交互に連結した2糖ユニットの繰り返し構造からなる高分子多糖であり、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(図1)。私達は、世界に先駆けて、動物のヒアルロン酸合成酵素を見出し、ヒアルロン酸合成機構の解明に取り組んできた。そして、合成酵素遺伝子組換えタンパク質を用いた試験管内ヒアルロン酸合成システムの開発に成功し、酵素を活性化する化合物の探索を始めている。今後、ヒアルロン酸生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。

1-2: 癌微小環境形成の分子機構と癌幹細胞ニッチを標的とした治療の基盤研究

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

教授 板野 直樹

Prof. Naoki Itano, Ph.D.



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。

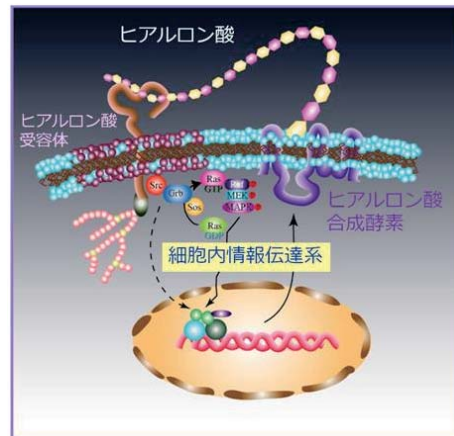


図1. ヒアルロン酸合成とシグナル伝達

2. 本年度の研究成果

我々はこれまでに、ヒアルロン酸を過剰産生する乳癌発症モデルマウスを作製し、乳癌におけるヒアルロン酸産生の増加が、乳癌の進展を加速することを明らかにしてきた。この結果に基づいて、癌細胞におけるヒアルロン酸の過剰な産生が、癌発生過程において、癌幹細胞を増幅して癌進展を促進するという仮説を立て、その証明を行った。ヒアルロン酸を過剰産生する乳癌発症モデルマウスと対照マウスに発生した乳癌から乳癌細胞を樹立し、細胞表面における CD44 と CD24 の発現について FACS 解析を行った。そして、ヒアルロン酸を過剰産生する乳癌では、対照に比して CD44^{high}/CD24^{low} 癌幹細胞様細胞が増幅していることを明らかにした(図2)。さらに、Hoechst 33342 色素の排除能を指標に Side population (SP)細胞と非 SP 細胞を分離した。FACS 解析の結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌由来の SP 細胞中には、CD44^{high}/CD24^{low} 癌幹細胞様細胞が濃縮されていること

を明らかにした。また、ヒアルロン酸過剰産生乳癌由来のSP細胞は、mammosphere形成能や造腫瘍能といった癌幹細胞の特徴を示すことを明らかにした。

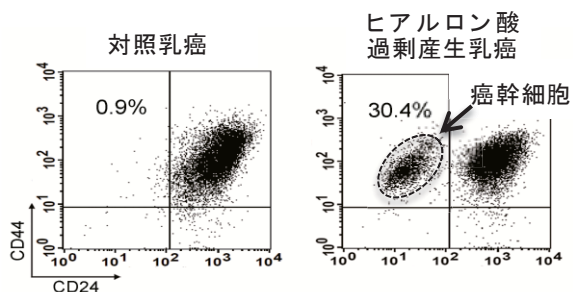


図2. ヒアルロン酸過剰産生乳癌における癌幹細胞の増幅

3. Research projects and annual reports

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

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

1-2. 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.

2. Our previous studies using a hyaluronan synthase 2 (Has2) transgenic mouse model demonstrated that hyaluronan overproduction by cancer cells caused rapid development of aggressive breast carcinoma at a high incidence. Thus, we hypothesize that Has2 overexpression and hyaluronan overproduction may accelerate cancer progression by expanding CSC subpopulations during cancer development. Primary cancer cells were established from mammary tumors developed in transgenic mice and subjected to the flow cytometric analysis. Flow cytometric analysis demonstrated the enrichment of CD44^{high}/CD24^{low} CSC-like cells in Has2-overexpressing cancer cells (Figure 2). Hoechst 33342 dye exclusion assay was then performed to sort side population (SP) from non-side population (non-SP) cells. The SP fraction of Has2-overexpressing cancer cells contained more CD44^{high}/CD24^{low} CSC-like cells than that of control cells. We found that this subpopulation exhibited several characteristics that were similar to CSCs, including cancer-initiating and mammosphere-forming abilities.

4. 論文, 著書など

- P. Ontong, Y. Hatada, S. Taniguchi, I. Kakizaki, N. Itano: Effect of a cholesterol-rich lipid environment on the enzymatic activity of reconstituted hyaluronan synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 666-671
- Y. Kashima, M. Takahashi, Y. Shiba, N. Itano, A. Izawa, J. Koyama, J. Nakayama, S. Taniguchi, K. Kimata, U. Ikeda: Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. *PLoS One.* **8**, e58760
- T. Ikuta, Y. Kobayashi, M. Kitazawa, K. Shiizaki, N. Itano, T. Noda, S. Pettersson, L. Poellinger, Y. Fujii-Kuriyama, S. Taniguchi, K. Kawajiri: ASC-associated inflammation promotes cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Carcinogenesis.* **34**, 1620-1627
- 望月信利, 板野直樹: 一糖鎖と疾患- 癌進展におけるヒアルロン酸腫瘍微小環境の役割. *病理と臨床* **31**, 875-882 (総説)

5. 学会発表など

- N. Itano: Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer progression. International Society for Hyaluronan Sciences 9th International Conference (Hyaluronan 2013), Oklahoma City, OK, USA 2013.7.6 (招待講演)
- T. Chanmee, K. Konno, P. Kongtawelert, N. Itano: Hyperproduction of hyaluronan generate cancer stem-like cells. International Society for Hyaluronan Sciences 9th International Conference (Hyaluronan 2013), Oklahoma City, OK, USA 2013.7.7
- T. Chanmee, N. Itano: Hyaluronan production regulates self-renewal of cancer stem cells. 第22回日本がん転移学会 学術集会・総会, 松本市, 2013.7.11
- 板野直樹: ヒアルロン酸合成異常と癌の進展. 第32回日本糖質学会年会, 大阪市, 2013.8.6 (シンポジウム)

6. 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)

共同研究経費(SBIファーマ株式会社)

課題名: 5-アミノレブリン酸(5-ALA)が各種培養細胞の細胞外マトリックス構築へ及ぼす影響についての研究

研究代表者: 板野直樹, 取得年度: H22-26年 (5年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動 板野直樹: 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委員

日本がん転移学会評議委員

プロテオグリカンフォーラム世話人

日本学術振興会

科学研究費委員会専門委員

4) 受賞等 なし

5) その他

岡山大学平成25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25年9月2日～11月29日

ホームページ:

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~itanon/index2.html>



研究室メンバー

タンパク質バイオジェネシス研究室

Laboratory of Protein Biogenesis

教授 伊藤 維昭

Prof. Koreaki Ito

助教 千葉 志信

Assist. Prof. Shinobu Chiba



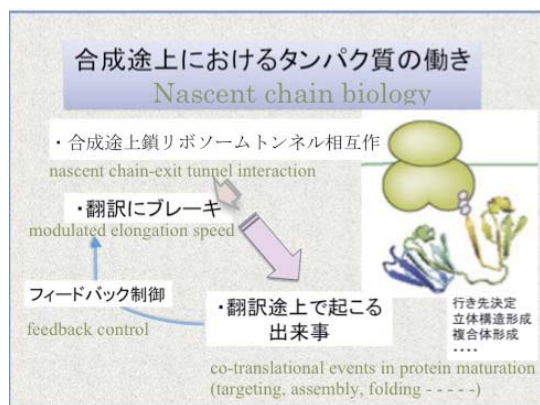
1. 研究概要

当研究室では、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。生命活動を担うタンパク質は、DNA に書き込まれ、mRNA に写し取られた遺伝情報に従った順番でアミノ酸が順次結合することによって作られる。この「翻訳」はセントラルドグマのキーとなる過程であり、リボソームにおいてデコーディング(情報処理)とペプチド結合形成(ケミストリー)が行われることにより進行する。ペプチド転移活性中心において生成される合成途上鎖(polypeptidyl-tRNA)は、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鎖が相互作用しつつ、緩急の制御を伴って進行するものであることを示し、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、タンパク質の細胞表層への局在化を監視して膜透過駆動因子 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。

Regulatory nascent polypeptide と呼ばれ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、N末端近くの「センサー」部分はタンパク質局在化装置の働きを受け、それらの活性に呼応して翻訳にブレーキをかける時間を決めている。このように 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。また翻訳スピードの緩急制御は、新生ポリペプチド鎖のフォールディングや局在化などの「成熟プロセス」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。

SecM や MifM の発見により示した「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」という現象の分子機構や生物学的意義を解明し、翻訳スピードの微調整が、一般的に新生タンパク質の「運命決定」を促進している可能性を追求する。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) MifM を利用したタンパク質膜挿入因子 YidC の構造と機能の解析: 枯草菌の MifM は膜貫通配列となる疎水性領域を N 末端にもち、膜タンパク質を膜に挿入させる YidC 経路によって膜に挿入される。枯草菌に存在する二つの YidC 因子のうち、SpoIIIJ が主要な因子として働いているが、SpoIIIJ の活性が低下すると、第2の因子である YidC2 が誘導されて働く。MifM は YidC 経路の活性をモニターして、活性低下時に YidC2 の翻訳を誘導する制御因子であり、*yidC2* 遺伝子の上流 ORF によってコードされる。MifM の C 末端近くにはリボソームトンネルと相互作用することによって自らの翻訳伸長アレストを引き起こすアミノ酸配列(アレスト配列)がある。この伸長アレストは連続した4つのコドンで複数回繰り返される。この間、立ち止まったリボソームによって mRNA の二次構造がほぐれ、下流遺伝子 *yidC2* の翻訳が可能となる。すなわち、アレストの時間が長いほど YidC2 の発現量が上昇する。アレストは MifM 合成途上鎖が SpoIIIJ による膜組込み反応を受けると解除されるため、SpoIIIJ 活性と YidC2 発現量が逆相関を示す。このフィードバック機構を実験ツールとして利用すると、直接的な測定が困難な細胞内の SpoIIIJ (YidC) の活性を、LacZ 酵素活性から容易に、かつ定量的に見積もることができる。このようなレポーターである *mifM-yidC2'-lacZ* を活用して、YidC タンパク質の構造と機能の詳細な解析を進めている。本年度は、東京大学濡木研究室、奈良先端科学技術大学院大学塚崎研究室などとの共同研究により、新たに決定された YidC の結晶構造に基づく機能解析を行った。その結果、YidC の活性に重要なアミノ酸残基を同定した。そして、YidC はポリペプチド透過チャンネルによらず、膜内部に親水性環境を作り出すことによって、タンパク質の膜組込みを促進すると、新たなメカニズムを提唱した。

2) 翻訳アレストの解除機構: 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 は、それ自身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

ストが解除されるというフィードバック制御を受ける。SecM の翻訳アレストが膜透過反応に伴い解除される機構に、SecM 合成途上鎖のうち、リボソームの外でリボソームに近接した部位にある 10 残基のアミノ酸配列が必要とされることを見出した。アレストの制御にはシグナル配列とアレスト配列以外に SecM の中央領域が関与することが明らかとなった。

3) 翻訳伸長プロファイリング: 翻訳伸長における減速や一時停止がどの程度一般的に起こっているのかを明らかにするため、合成途上鎖 (“nascentome”と呼ぶことを提唱) が末端に共有結合で連結した tRNA をもつことを利用した実験方法を開発し、網羅的解析を行っている。既に、大腸菌の遺伝子 1,000 個以上の翻訳を、パルスチェイス in vivo 実験と精製因子を用いる in vitro 翻訳実験で同時並行的に調べた。その結果、多くのタンパク質の合成が合計 4000 箇所近くに及ぶ部位で減速するという予想外の事実が明らかになった。In vivo と in vitro での違いや共通性からそれらを分類し、翻訳減速の原因を探っている。

4) 熱ショック転写因子 σ^{32} の制御機構: 客員研究員の由良博士が中心となった日米共同研究により、大腸菌において熱ショック(ストレス)応答遺伝子の転写を司る σ^{32} タンパク質が、SRP 経路によって細胞膜に局在化すること、そのことがタンパク質恒常性 (proteostasis) の維持に重要であることを見出した。

3. Research projects and annual reports

We intend to develop a new area of research, which might be called “nascent chain biology” by addressing a concept that translation elongation speed is fine-tuned by intra-ribosomal part of amino acid sequences of the translation product as well as by dynamic behaviors of the extra-ribosomal part of the same nascent chain. We found that some of cellular factors that facilitate secretory protein export and membrane protein insertion are controlled by regulatory nascent polypeptides that function in accordance with this principle. We are studying molecular mechanisms and physiological outcomes of the regulation. Also, we have developed experimental methods that enable us to study cellular polypeptidyl-tRNAs, obligatory but poorly studied intermediates in translation, which we proposed to call collectively “a nascentome”. We are combining these approaches to uncover still unknown principles and details that accompany the processes of genetic information transformation into biological outputs.

This year’s accomplishments:

1. Analysis of the membrane protein insertase YidC using MifM. YidC is an evolutionarily conserved membrane protein that facilitates insertion of a class of cellular proteins into the membrane. *B. subtilis* MifM up-regulates translation of the *cis*-located target gene that encodes a YidC homolog (YidC2) by undergoing translational elongation arrest. This system operates when the activity of the main YidC homolog is lowered. We used this MifM-mediated YidC monitoring mechanism as a research tool. A *lacZ* translational fusion, *mifM-yidC2-lacZ*, can report the cellular activity of the YidC pathway, which otherwise is difficult to assess directly. In collaboration with the Nureki (University of Tokyo) and the Tsukazaki (Nara Institute of Science and Technology) laboratories, we carried out functional dissection of YidC that was based on its newly solved crystal structure. Our results suggest that YidC mediates membrane protein insertion by providing a hydrophilic platform within the membrane interior, instead of forming a polypeptide-conducting channel.

2. Arrest release mechanisms of SecM. *E. coli* SecM is a secretory protein encoded by an upstream open reading frame of *secA*. It controls the expression of SecA, the export-driving ATPase, by undergoing translational elongation arrest, which is in turn subject to export-coupled release. We found that a sequence of 10 amino acids, which resides just upstream of the polypeptide region embraced by the exit port of the ribosome, participates in the event of arrest release. Thus, not only the signal peptide and the arrest motif but also the segment flanked by them is important for the regulatory function of SecM.

3. Profiling translational elongation of *E. coli* proteins. We examined the generality of the occurrence of translational pausing by detecting nascent chain intermediates in the biosynthesis of *E. coli* proteins, using methods based on the presence of a covalently attached tRNA at the end of each nascent chain. Combined approaches by in vivo pulse-chase labeling and cell-free translation revealed that a majority of the ~1,000 proteins examined underwent one or multiple events of pausing either in vitro, in vivo or both. A variety of mechanisms can be considered that account for the pausing and we are in the process of elucidating them.

4. Involvement of membrane localization in the regulation of the heat shock transcription factor σ^{32} . A collaborative study coordinated by Dr. Yura, a prominent guest scientist in this laboratory, revealed that the transcription factor σ^{32} of *E. coli* is localized to the cytoplasmic membrane.

This unexpected property of σ^{32} has been shown to be important for the feedback regulation of its activity and, hence, for the maintenance of proteostasis both in the cytosol and the membrane.

4. 論文, 著書など

Kumazaki, K*, Chiba, S*, Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A.D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T. and Nureki, O. (2014) Structural basis for Sec-independent membrane protein insertion by YidC.

Nature, in press (*These authors contributed equally to this work)

Mio, K., Tsukazaki, T., Mori, H., Kawata, M., Moriya, T., Sasaki, Y., Ishitani, R., Ito, K., Nureki, O. and Sato, C. (2013) Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF. **J. Struct. Funct. Genomics**, 10.1007/s10969-013-9168-4

Lim, B., Miyazaki, R., Neher, S., Siegele, D.A., Ito, K., Walter, P., Akiyama, Y*, Yura, T* and Gross, C.A*. (2013) Heat shock transcription factor σ^{32} co-opts the signal recognition particle to regulate protein homeostasis in *E. coli*. **PLoS Biol.** 11(12), e1001735. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001735 (*Corresponding authors)

Ito, K. and Chiba, S. (2013) Arrest peptides: *cis*-acting modulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.** 82, 171–202 (Review)

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 (Review)

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 (Review)

5. 学会発表など

千葉志信、伊藤維昭: 枯草菌 MifM によるユニークな翻訳アレト様式を利用した蛋白質膜組込のモニタリング. 第2回 RIBOSOME MEETING, 東京農工大学, 2013. 3. 28-29

Ito, K. and Chiba, S.: Regulation of membrane translocation and integration systems by ribosome stalling. Biophysical Society Meeting "Membrane Protein Folding". Seoul, Korea, May 19-22, 2013 (招待講演)

千葉志信、伊藤維昭: 枯草菌 MifM によるユニークな翻訳アレトと蛋白質膜組込因子の制御. 第10回 21世紀大腸菌研究会, 静岡県修善寺, 2013, 6.20-21

茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭: 合成途上鎖の解析による翻訳伸長過程の全容解明に向けて. 第10回 21世紀大腸菌研究会, 静岡県修善寺, 2013. 6. 20-21

三登 一八、町田 裕紀子、塚崎 智也、伊藤維昭、秋山 芳展、森

博幸: 部位特異的 in vivo 光架橋法によるタンパク質膜透過促進因子 SecDF の基質結合部位の探索. 第10回 21世紀大腸菌研究会, 静岡県修善寺, 2013. 6. 20-21

Chadani, Y., Chiba, S. and Ito, K. Profiling polypeptidyl-tRNAs to reveal real pictures of translation elongation. Ribosomes Conference 2013, Napa Valley, California, USA, July 9-12, 2013

Chiba, S. and Ito, K.: MifM induces multisite ribosome stalling in monitoring membrane protein biogenesis. Ribosomes Conference 2013, Napa Valley, California, USA, July 9-12, 2013

Chadani, Y., Ono, K., Ito, K., Kusukake, K. and Abo, T.: ArfA (YhdL)/RF2 and ArfB (YaeJ)-mediated alternative ribosome rescue systems in *Escherichia coli*. Ribosomes Conference 2013, Napa Valley, California, USA, July 9-12, 2013

千葉志信、伊藤維昭: 翻訳アレトを介した枯草菌 MifM による蛋白質膜組込因子 YidC の制御. グラム陽性菌ゲノム機能会議, 筑波, 2013. 9. 7-9

千葉志信、伊藤維昭: 枯草菌 MifM は、ユニークな翻訳アレトを介して蛋白質膜組込因子の発現量を調節する. 第7回細菌学若手コロッセウム, 広島市, 2013. 8. 7-9

茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭: 合成途上鎖の解析による翻訳伸長過程の全容解明に向けて. 第7回細菌学若手コロッセウム, 広島市, 2013. 8. 7-9

茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭: 大腸菌翻訳途上鎖の網羅的解析. 日本遺伝学会第85回大会, 慶應義塾大・日吉キャンパス, 2013. 9. 19-21

6. 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: タンパク質局在化をモニターする翻訳途上鎖の分子機
研究代表者: 千葉志信, 取得年度: H25-27 年 (3年)

科学研究費補助金・挑戦的萌芽

課題名: 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, 取得年度: H24-25 年 (2年)

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

4. 受賞等

茶谷悠平博士が日本遺伝学会第85回大会 Best Papers 賞を受賞した。

神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

1. 研究概要

糖鎖の付加反応は重要な翻訳後修飾反応の一つであり、その構造は、いくつかのタイプに分類される。我々はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、マンノース(Man)、あるいはN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とタンパク質中のセリン、トレオニン残基のヒドロキシル基との間に形成されるO-グリコシド型結合(GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr, Man α 1 \rightarrow Ser/Thr, GlcNAc β 1 \rightarrow Ser/Thr)を持つ糖鎖に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。この中でGalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thrの糖鎖は、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。我々はこれまでに、神経特異的に発現するGalNAc-T9, -T17を単離した。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に変異を持ち、in vitroでの酵素活性がほとんど検出できない、サブファミリーに属する。我々は、O-グリコシド型糖鎖、およびその合成酵素の主に脳における機能解析を目的として、次のような課題に取り組んでいる。

1) 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、神経分化に関わること、また培養細胞を用いた実験ではGalNAc-T17がエンドサイトーシス経路を調節している可能性も見いだした。本年度は、GalNAc-T17の遺伝子欠損マウスを作製してその機能を解析した。

2) ゼブラフィッシュを用いたGalNAc-Tファミリーの機能解析

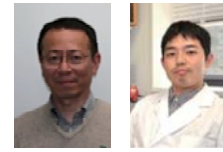
酵素活性が検出できず生化学的な解析が困難なサブファミリーを主なターゲットとして、ゼブラフィッシュを用いて発現解析、および機能阻害実験を行ってきた。本年度は、ゲノム編集技術であるTALEN法やCRISPR/Casシステムを用いて、変異体作製を試みた。

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

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中山 喜明

Assist. Prof. Yoshiaki Nakayama, Ph. D.

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。

4) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

ムチン型糖鎖の解析に加えて、我々は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。

2. 本年度の研究成果

1) GalNAc-T17 遺伝子欠損マウスの解析

我々はGalNAc-T17の機能解明のため、GalNAc-T17遺伝子欠損マウスを作製した。この遺伝子欠損マウスは体重減少の症状を示し、野生型マウスと比較して摂食量が減少していた。この遺伝子の発現領域の詳細な解析を行ったところ、記憶を司る海馬や扁桃体領域に強い発現が認められた他に、満腹中枢として働く視床下部の腹内側核で発現していた(Fig. 1)。これらの結果から、GalNAc-T17が満腹中枢において摂食行動を正に制御していることが示唆された。

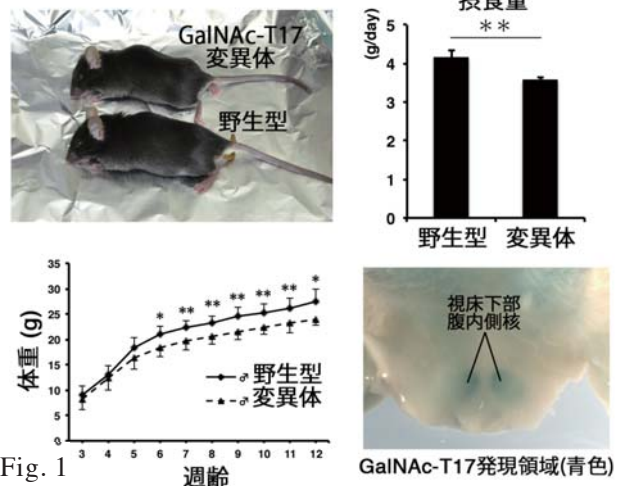


Fig. 1

2) TALEN, CRISPR/Casシステムを用いたゼブラフィッシュGalNAc-Tファミリー変異体の作製

我々がこれまでに単離・同定したゼブラフィッシュGalNAc-Tアイソザイムのうちで、特にその機能が分かっていないGalNAc-Tについて、ゲノム編集技術である

TALEN 法や CRISPR/Cas システムを用いて、その変異体作製を試みた。これまでに GalNAc-T9 や-T18 に対する TALEN ベクター、CRISPR ベクターを構築し、ゼブラフィッシュ受精卵に一過性に発現させたところ、標的配列に変異を導入することに成功している。

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。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、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単層培養する、(ii) インスリンやトランスフェリン等の神経分化因子を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とり入れた。その結果、分化誘導開始後 3~4 日目に神経突起の形成、6 日目にはより活発な突起伸張が観察された。免疫染色やカルシウムイメージングなどによる解析により、6 日目で自律的な神経活動を有した成熟神経細胞への分化が認められる一方で、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

We have been investigating roles of O-linked sugar chains with the linkage structures, GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr), Man α 1 \rightarrow Ser(Thr), or GlcNAc β 1 \rightarrow Ser(Thr). O-GalNAc-type sugar chains are called mucin-type carbohydrates and their biosynthesis is initiated by a group of enzymes, UDP-GalNAc: polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferases (GalNAc-Ts). GalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in humans. Interestingly, GalNAc-T8, -T9, -T17, and

-T18 are catalytically inactive, while GalNAc-T9 and -T17, which were identified by us, are brain-specific and 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) Analysis of mice defective of a GalNAc-T17 gene

We found that GalNAc-T17 KO mice showed decreased body weight compared with wild-type mice (Fig. 1). Analysis of GalNAc-T17 expression demonstrated that it was expressed not only in hippocampus and amygdala, but in ventromedial nucleus of hypothalamus, which is known as satiety center. GalNAc-T17 may therefore positively regulate feeding behavior.

2) Production of zebrafish GalNAc-T mutants

To produce zebrafish mutants defective of GalNAc-T genes, we employed recently developed genome-editing technology, TALEN and CRISPR/Cas systems. We found that mutations were successfully introduced at the target sites in the zebrafish embryos using TALEN and CRISPR/Cas vectors for GalNAc-T9 and -T18.

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

We revised a novel method to efficiently differentiate P19 cells into neurons by an adherent culture in laminin-coated dish in the presence of several reagents to induce neural differentiation and suppress growth of non-neural cells. The new method induced neurons within 4 days without gliogenesis. The mature neurons obtained were responsive to several neurotransmitters with functional neuronal networks.

4) Analysis of extracellular O-glycosylation

We investigated the function of a glycosyltransferase in zebrafish, which catalyzes extracellular novel O-glycosylation. We found that it was strongly expressed in the brain of zebrafish embryos, and its suppression caused alterations in the brain development.

4. 論文, 著書など

Y. Nakayama, A. Wada, R. Inoue, K. Terasawa, I. Kimura, N. Nakamura, A. Kurosaka: A Rapid and Efficient Method for Neuronal Induction of the P19 Embryonic Carcinoma Cell Line. *Journal of Neuroscience Methods*, in press.

M. Ogawa, N. Nakamura, Y. Nakayama, A. Kurosaka, H. Many, M. Kanagawa, T. Endo, K. Furukawa, T. Okajima: GTDC2 modifies O-mannosylated α -dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl-glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 440(1), 88-93

I. Kimura, Y. Nakayama, Y. Zhao, M. Konishi, N. Itoh: Neurotrophic effects of neudesine in the central nervous system. (2013) *Front Neurosci* 7 (article111), 1-5

Y. Nakayama, N. Nakamura, D. Tsuji, K. Itoh, A. Kurosaka: Genetic diseases associated with protein glycosylation disorders in mammals. pp. 244-269 in *Genetic Disorders*, Maria Puiu (Ed.), ISBN: 978-953-51-08866-3, InTech.

5. 学会発表など

中山喜明, 和田あゆみ, 中村直介, 黒坂光: P19マウス胚性腫瘍細胞株を用いた迅速かつ効率の良い神経誘導法の確立. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2013.12.3-6

Y. Nakayama, K. Kato, N. Nakamura, A. Kurosaka: The roles of a putative polypeptide GalNAc-transferase/Wbscr17. International Symposium on Glyco-Neuroscience, Awaji city (Japan) 2014.1.9-11

6. その他特記事項

1) 外部資金

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: H25年(1年)

学術研究助成基金助成金・挑戦的萌芽研究

課題名: モデル生物を活用した先天性脳疾患関連オーファン糖転移酵素の機能解明

研究分担者: 黒坂光, 取得年度: H25-26年(2年)

科学研究費補助金・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)

学術研究助成基金助成金・若手研究(B)

課題名: 低栄養環境下の腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシスの機能解析

研究代表者: 中山喜明, 取得年度: H25-26年(2年)

2) 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

3) その他

黒坂光: KSU サイエンスコース(京都産業大学附属高校生徒にGFPの発現と精製実験を行った。) (2013.7.26).



ラボメンバー 15号館裏にて

発生情報学研究室

Laboratory of Cell Signaling and Development

1. 研究概要

発がんウイルスが世界ではじめて発見されたのは、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)の研究による。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(別名: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。わたしたちの研究室では、アフリカツメガエルの卵や初期胚、およびいくつかの種類のヒト培養がん細胞を実験モデルとして、それらの細胞機能におけるSrcおよびその周辺ではたらくシグナル伝達分子群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 Src の活性化と生理機能
- 2) 卵細胞膜微小領域(膜マイクロドメイン)の機能
- 3) 卵細胞膜マイクロドメインの構築と機能獲得

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) Src 活性と細胞死回避メカニズムの関係
- 2) がん細胞膜マイクロドメインの機能
- 3) 細胞膜機能と核機能のクロストーク

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、学科4年生3名(西川裕貴、古市まどか、三宅彩加)および同3年生4名(岡慎也、嘉門未紗、菊地志朗、轟真伍)を含むチーム体制で取り組んでいる。

2. 本年度の研究成果

昨年につづき、がん細胞プロジェクトのほうで総説論文を1報発表した(Sato et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2013)。この論文では上皮成長因子受容体EGFRの845番目のチロシン残基(チロシン845)のリン酸化に焦点をあて、そのリン酸化責任酵素であるSrcとの関係や当該チロシン残基

教授 佐藤 賢一

Prof. Ken-ichi Sato, Ph.D.

助教 井尻 貴之

Assist. Prof. Takashi Ijiri, Ph.D.



がリン酸化されたEGFRの生理機能などをこれまでに報告された200近い学術論文の引用をもとに総括した。わたしたちが取り組んでいるヒト膀胱がん細胞の血清飢餓環境下におけるSrc依存的な抗アポトーシス機構においてEGFRのリン酸化と活性化が重要な役割を担っていることが示唆されている。そこで今年度は血清飢餓環境下でのEGFRのリン酸化(特にチロシン845リン酸化)状態の生化学的手法および間接蛍光抗体法による解析に着手した。その結果、免疫沈降法により濃縮精製したEGFRにおいて血清飢餓応答性のチロシンリン酸化が検出可能であることがわかったため(図1)、今後そのリン酸化アミノ酸残基番号の特定などをおこなう予定である。

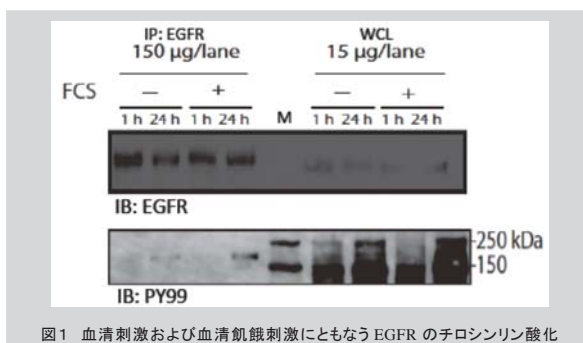


図1 血清刺激および血清飢餓刺激にともなうEGFRのチロシンリン酸化

卵細胞プロジェクトのほうでは、前年度に報告した卵細胞膜マイクロドメインの機能に関する研究成果をまとめた学術論文を投稿した。現在は修正原稿の投稿準備中である(平成25年12月末現在)。そのほかの研究の進捗としては次の2点がある。1つは卵細胞膜成分を抗原として作成したラットモノクローナル抗体ライブラリの性状解析である(図2)。今年度は抗体クローンの中に卵細胞膜マイクロドメインタンパク質にのみ反応性を示すもの、非マ

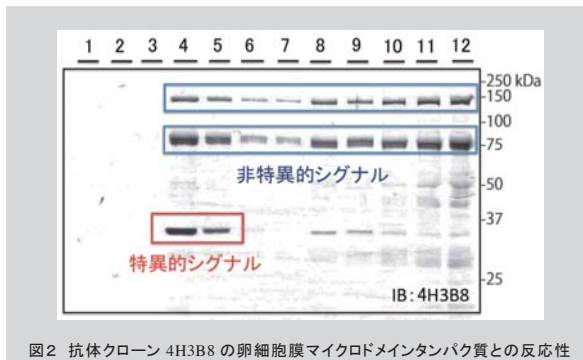
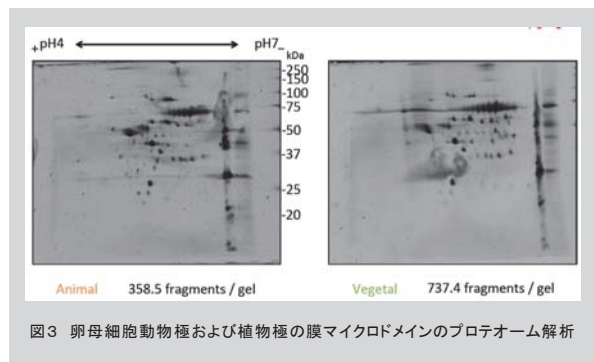


図2 抗体クローン4H3B8の卵細胞膜マイクロドメインタンパク質との反応性

イクロドメイン性の卵細胞膜タンパク質にのみ反応性を示すもの、そして両分画タンパク質に反応性を示すもの

少なくとも3種類が存在することを明らかにした。現在のこの3クローンの標的タンパク質の分子同定を試みている。もう1つは、卵細胞を動物極と植物極の二つに等分割し、それぞれから膜マイクロドメインを調製してタンパク質の



存在状態を比較するという研究である。これはアフリカツメガエルの受精における精子侵入点が動物極側表層に偏在することから、両極の表層構造すなわち膜タンパク質の組成に違いがあるのではないかという仮説を立て、その検証を試みるものである。これまで3,000個以上の卵細胞(卵巣内にある未成熟卵母細胞)から試料を調製し、二次元電気泳動法によるタンパク質の分離とマスマスペクトロメトリ解析をおこなった(名古屋大学大学院理学研究科付属臨海実験所との共同研究)。その結果、両極の表層構造すなわち膜タンパク質の組成に共通点と相違点があることが明らかとなった(図3)。今後はこのデータを元にして、卵成熟及び受精に伴う卵細胞膜マイクロドメインの受精機能獲得や発生開始機構との関わりを調べていく予定である。

3. Research projects and annual reports

Research in our laboratory focuses on the physiological function of the tyrosine kinase Src and its interacting signaling proteins in oocyte/egg of the African clawed frog *Xenopus laevis* and in human bladder carcinoma cells (e.g. 5637 cells). In the study of *Xenopus* oocyte/egg, which we call *Egg Project*, we are currently examining whether animal and vegetal hemispheres are different with each other in their compositions of membrane-associated proteins. To this end, we have prepared low density, detergent-insoluble membrane fractions (membrane microdomains) from both animal and vegetal halves of immature ovarian *Xenopus* oocytes, performed two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry of proteins. Results obtained so far show that there are indeed common as well as distinct protein compositions in these samples. Further study will aim to

identify a change(s) in the proteome compositions during hormone-induced oocyte maturation and subsequent sperm-induced egg activation. Other on-going subjects in the *Egg Project* include characterization of rat monoclonal antibodies that were raised against membrane proteins of unfertilized *Xenopus* eggs, live cell-imaging of ATP in *Xenopus* oocytes and eggs by the use of ATeam, a FRET-based probe for ATP visualization and quantification (in collaboration with Drs. Ken Yokoyama and Jun-ichi Kishikawa, Kyoto Sangyo University; Yasuhiro Iwao, Yamaguchi University; and Hiromi Imamura, Kyoto University) and analysis of stomatin-like protein 2 as a newly identified tyrosine kinase substrate that localizes to membrane microdomains and mitochondria in *Xenopus* eggs (in collaboration with Drs. Hitoshi Sawada and Lixy Yamada, Nagoya University). In the study of human bladder carcinoma cells, which we call *Cancer Cell Project*, we are now investigating phosphorylation state of the epidermal growth factor receptor/kinase (EGFR) in 5637 cells that are cultured under serum-containing or serum-deprived conditions. Results obtained demonstrate that EGFR is tyrosine-phosphorylated in serum-deprived 5637 cells, where sustained Src activation has been shown to occur and to play an important role in the anti-apoptotic growth of the cells under these culture conditions. Our special interest is to determine the occurrence of phosphorylation of Tyr-845 of the EGFR, a Src-dependent phosphorylation site, and to evaluate its physiological function.

4. 論文, 著書など

- Sato, K.: Cellular functions regulated by phosphorylation of EGFR on Tyr845. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 10761-10790, 2013.
- Ijiri, T.W., Vадnais, M.L., Huang, A.P., Lin, A.M., Levin, L.R., Buck, J., Gerton, G.L.: Thiol changes during epididymal maturation: a link to flagellar angulation in mouse spermatozoa? *Andrology* in press (2013年12月末現在) .
- Ijiri, T.W., Vадnais, M.L., Lin, A.M., Huang, A.P., Cao, W., Merdushev, T., Gerton, G.L.: Male mice express spermatogenic cell-specific triosephosphate isomerase isozymes. *Molecular Reproduction and Development* **80**, 862-870, 2013.
- Sato, K., Mahbub Hasan, A.K.M., Ijiri, T.W.: Focused proteomics on egg membrane microdomains to elucidate the cellular and molecular mechanisms of fertilization in the frog *Xenopus*

laevis. In *Sexual Reproduction of Animals and Plants* in press. (Springer)

Ijiri, T.W., Kishikawa, J., Imamura, H., Iwao, Y., Yokoyama, K., Sato, K.: ATP imaging in *Xenopus laevis* oocytes. In *Sexual Reproduction of Animals and Plants* in press. (Springer)

佐藤賢一: スター生物学(東京化学同人、八杉貞雄監訳、チャプター翻訳担当), 2013.

5. 学会発表など

井尻貴之、岸川淳一、今村博臣、崎家真穂、上野秀一、岩尾康宏、横山謙、佐藤賢一: ATP quantification and live-imaging in *Xenopus laevis* oocyte. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2013.12.3-6

井尻貴之、岸川淳一、今村博臣、崎家真穂、上野秀一、岩尾康宏、横山謙、佐藤賢一: アフリカツメガエル卵母細胞における全ATP量の測定とATPライブイメージング. 第51回日本生物物理学会年会, 京都市, 2013.10.28-30

佐藤賢一、マブブハサンAKM、井尻貴之、玖島将太、松本尚士、橋本亜樹: ツメガエル卵成熟に伴う膜マイクロドメインUPIII-Srcシステムの機能変化. 第84回日本動物学会大会, 岡山市, 2013.9.26-28

井尻貴之、今村博臣、岩尾康宏、横山謙、佐藤賢一: アフリカツメガエル卵母細胞における全ATP量の測定とATPイメージング. 第84回日本動物学会大会, 岡山市, 2013.9.26-28

崎家真穂、城下歩美、上野智代、佐藤賢一、岩尾康宏: ツメガエルの卵成熟過程における受精と卵付活能の獲得. 第84回日本動物学会大会, 岡山市, 2013.9.26-28

佐藤賢一: 卵細胞膜マイクロドメインに局在するuroplakin III (UPIII)-Srcシステムの構築と生理機能. 日本ツメガエル研究会, 美祿市, 2013.9.23-25

井尻貴之、岸川淳一、今村博臣、崎家真穂、上野秀一、岩尾康宏、横山謙、佐藤賢一: アフリカツメガエル卵母細胞における全ATP量の測定とATPイメージング. 日本ツメガエル研究会, 美祿市, 2013.9.23-25

Sato, K.: A possible membrane maturation mechanism in oocytes of the frog *Xenopus laevis*. ゴードン研究会議「受精と発生の活性化」, プリマス(アメリカ), 2013.7.14-19

Ijiri, T.W., Kishikawa, J., Imamura, H., Sakiie, M., Ueno, S., Iwao, Y., Yokoyama, K., Sato, K.: ATP quantification and ATP imaging in *Xenopus laevis* oocyte. ゴードン研究会議「受精と発生の活性化」, プリマス(アメリカ), 2013.7.14-19

Sato, K.: A possible membrane maturation mechanism in oocytes of the frog *Xenopus laevis*. EMBOワークショップ, バニユルス(フランス), 2013.6.11-15

Ijiri, T.W., Kishikawa, J., Imamura, H., Sakiie, M., Ueno, S., Iwao, Y., Yokoyama, K., Sato, K.: ATP quantification and ATP imaging in *Xenopus laevis* oocyte. FIRシンポジウム, ウッズホール(アメリカ), 2013.6.6-8

佐藤賢一: UPIII-Src signaling system in egg membrane microdomains of the frog *Xenopus laevis* is required for fertilization, can be reconstituted in HEK293-overexpression system, and becomes functional after oocyte maturation. 新学術領域研究アロ認証領域会議, 松江市, 2013.6.1-3

6. 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(公募研究)

課題名: 細胞膜マイクロドメインを足場とする配偶子間相互作用と膜融合の分子機構

研究代表者: 佐藤賢一, 取得年度: H24-25年(2年)

京都産業大学新規研究課題挑戦支援プログラム

課題名: 卵母細胞の形成と成熟に伴う膜マイクロドメインの機能構築

研究代表者: 佐藤賢一, 取得年度: H25年(1年)

2) 学外メディアにおける研究評価

前年度に発表した学術論文(Ijiri et al. *J. Signal Transd.* 2012)が研究者コミュニティサイト Global Medical Discovery の Key Scientific Articles の一つとして紹介された。参考URL: <http://globalmedicaldiscovery.com/category/key-scientific-articles/>



15号館テラスにて(2013年8月撮影)



14号館前にて(2013年11月撮影)

ナノバイオロジー研究室

Laboratory of Nanobiology

1. 研究概要

現代生物学では、生体の働きをタンパク質などで出来た微小な機械の働きとして理解する。この機械の大きさは、1-100nm であり、その作用機構と生理的意義を、分子機械の動きや形の変化として理解することがナノバイオロジーだ。本研究室は遺伝子発現のナノバイオロジーを研究しており、バクテリアの生存戦略と RNA polymerase を対象として研究を行った。その過程で、現在の多くの GFP に取って代わりうる顕著な特徴をもつ B-maggio を発明した。

2. 本年度の研究成果

1) 超抗退色性 GFP B-maggio の発明

GFP を利用した 1 細胞生物学の研究中に、いくつかの GFP 変異体を作製したところ、偶然、光退色が今までの GFP より、百倍以上遅い GFP が出来ていた(客員研究員の所属する堀場製作所と共同で特許申請中)。明るさは従来の最高水準の GFPuv4 と同程度であり、多く発現されるタンパク質では染色体での gfp fusion で画像化が可能である。最大の長所は、光退色が Venus に比べて、in vitro で 110 倍 in vivo で 250 倍遅いことである。本命画像で焦点合わせが出来る様になり、1 分子の追跡は数分可能となった。また、多量体化で蛍光が赤色に変化する特徴がある。

2) 大腸菌の生存戦略のナノバイオロジー

大腸菌も他の生物と同様、培養し続けると死ぬ。このような死に抗して出来るだけ生存できたものが、現在生存している種である。しかし、この死/生存の機構は、全く研究されたことがない。多くの遺伝子の機能が関連する細胞生物学の複雑現象だからである。大腸菌では 2/3 の遺伝子の機能が推定出来る現在、我々は tmRNA の研究を手がかりにして、この問題に挑戦した。合成致死性を用いた遺伝学の結果、幸運なことに、生存を維持する機構には tmRNA を必須因子として含むものが発見された。また、最低もう1つ並行する経路があり、少なくとも9つの protease/chaperon が必須であることが発見できた。驚いたことに、これらの致死性は、栄養レベルの 20 アミノ酸で相補された。各々の遺伝子の単独欠損株の死滅経過曲線から、可能な機構を絞り込むことが出来る。意外なことに短命にする protease 遺伝子も発見され、この遺伝子が進化上保存されて居るのは、集団としての生存機

教授 嶋本 伸雄

Prof. Nobuo Shimamoto

助教 中山 秀喜

Assist. Prof. Hideki Nakayama.



構かという興味深い問題に発展している。さらなる発展には、1細胞生物学が必要であり、大腸菌1細胞へのタンパク質のナノインジェクション技術の実用化を並行して進めていたことが成功につながりつつある。

3) 転写のナノバイオロジー

RNA ポリメラーゼには、あらゆる物理的、化学的、生物学的分析手段が試みられた分子機械である。大きな未解決問題は次の通りである。(1)プロモーターとの結合のジレンマ:結合エネルギーは、転写開始時に2本鎖DNAをほどく強く無ければならないにも関わらず、RNA 伸長時には下流に移動できるほど弱くなければならない。(2)Abortive 転写の意義:転写開始時に短いRNAを多量に作るエネルギーの浪費をするのか?(3)多くの生化学的手段では、転写開始因子シグマ 70 がポリメラーゼから解離することが示されるのに、FRET はなぜ異なる解釈がなされているのか。(4)プロモーターを長大な染色体 DNA からどのように探し出すことへの DNA sliding の寄与。

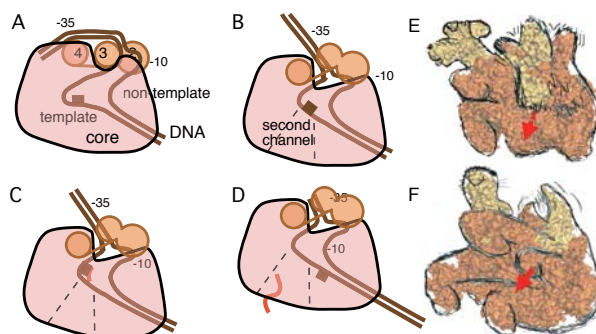


図1. A-D 多くの矛盾を解決する Abortive 転写のモデル, E,F RNA polymerase の最新モデル(肥満したスコッチテリアである)と Abortive 転写物の出口。

今回の論文では 200 近い文献を引用して整理し、混乱の主因は、ブランド雑誌に掲載された1分子 FRET 等の”有名実験”で、実験手段の適用限界を超えたり、過剰に単純化したモデルを導入した誤った解釈であることを明らかにした。その上で、実験的証拠で裏付けをもつ abortive 転写の新機構として、backtracking model を提唱した。この model は、1-3 の問題の解答を与え得る。また、ブラウン運動に、速度論や遷移状態理論を導入することの誤りを明確にして、正確な物理学の上に解釈を行うべきことを指摘した(Chem Rev)。また、この考えを発展させ、米国 NCI の M.Kashlev のグループと共同して、転写の pause とその生理的意義を論じた(Transcription)。

3. Research projects and annual reports

Nanobiology is a biology in which physiological changes are described in terms of the movements of biological molecules. We push nanobiology in the fields of transcription and survival strategy of bacteria.

1) B-maggio: a new GFP resistant to photobleaching

We have invented a new GFP which may replace conventional GFPs now used for most purposes. It emits a green fluorescent with a peak at 512 nm with the excitation maximum at 493 nm as strong as GFPuv4, which is supposed to be the brightest in *E. coli*.

Therefore, abundant proteins can be easily visualized by fusing *gfp* with their genes in chromosome. Its most distinct merit is the resistance against photobleaching, which is 250-fold and 110-fold stronger than Venus *in vitro* and *in vivo*, respectively. This simplifies the focus adjustment in imaging, and a big improvement in the tracing single fusion molecules.

2) Survival strategy of *E. coli* cells

Bacteria can survive in non-growing conditions. In evolutionary selection, this survival is as important as their growth, but the underlying mechanism is poorly understood because of the complexity of the problem. Since cell must degrade their used proteins to salvage amino acids for their survival, we at first focused on the relationship between this protein turnover and tmRNA. The tmRNA (*ssrA*) and SmpB induce the degradation of nascent polypeptide by *ssrA*-tagging in response to a reduced level of amino acids in stationary phase. We prepared the disruptants of genes relating to the tmRNA system as well as major chaperons and AAA+proteases. Unexpectedly and probably fortunately, most examined protease/chaperon genes are synthetic lethal with Δ *ssrA* or Δ *smpB*, demonstrating that there are two parallel pathways in the surviving mechanism. One is dependent on the tmRNA system, and the other on *clpA*, *clpP*, *clpX*, *dnaJ*, *hslU*, *hslV*, *htpG*, *prc*, and *sspB*, at least. Among the examined genes, non-synthetic-lethal genes were only *clpB* and *lon*, which could be thus involved the tmRNA pathway. Another conclusion is that the tmRNA-dependent degradation is not contributing to the protein turnover, because the main proteases in the system, ClpXP, ClpAP, and Prc(Tsp), are synthetic lethal.

3) Nanobiology of RNA polymerase

Among the enzymes, RNA polymerase is one of the earliest to which new physical and chemical techniques have been applied in mechanistic study. However, the following four problems are left contradictory. (1) Dilemma on the binding to a promoter sequence: It must be strong enough to make a DNA bubble, while it must be weak enough to allow the promoter clearance in elongation. (2) What is the significance of abortive transcription, which seems to waste a lot of energy. (3) Is sigma-70 released during transcription initiation. (4) The contribution of the sliding along DNA in promoter search. I have cited about 200 papers to examine the contradictions. I found some contradictions are due to ignorance of the technical limit of FRET, and the others are due to the confusion between abortive initiation and productive initiation with excluded NTP substrates. Reconsideration of published results enabled me to propose a more consistent model for abortive initiation where abortive transcripts are released by backtracking. In this model, RNA polymerase can stock enough energy as the form of DNA squencing to clear the promoter and release sigma-70 during early transcription in productive conformation. The polymerase can alternatively form another conformation with less contacts with sigma-70, which allow itself to backtrack to release abortive transcript but inhibits sigma-70 release and promoter clearance. This model provides the answers of the problems (1)~(3). In addition, I pointed out the confusion of Brownian motion and the transition-state theory. Therefore, the two-pawl ratchet mechanism of elongation is still possible to be non-Brownian. This misunderstanding led several wrong conclusion on the existence of sliding even in the recent papers (Chem Rev). This more strict understanding of chemical reaction enabled the reconsideration of a pausing phenomenon (Transcription, 2013).

4. 論文, 著書など

Shimamoto N. Nanobiology of RNA polymerase: Biological Consequence of Inhomogeneity in Reactant, **Chem. Rev.** **113**, 8400-22

Imashimizu M, Shimamoto N., Oshima T, Kashlev, M.

Transcription elongation: Heterogenous tracking of RNA

polymerase and biological Implications. **Transcription** 5,

嶋本伸雄、10章 タンパク質 (訳) Cell Biology: A Short Course, 3rd ed. Bolsover, S.R., Shephard, E.A., White, H.A., Hyams, J.S. John Wiley & Sons Inc. 基礎コース、細胞生物学、永田恭介監訳、東京化学同人

嶋本伸雄、”リボソーム”, ”タンパク質とは“ 遺伝子図鑑 2013 悠書館

中山秀喜、”トランスレーション” 遺伝子図鑑 2013 悠書館

嶋本伸雄 4章 ナノマシンとしてのRNAポリメラーゼ,英語論文セミナー 21世紀の分子生物学 渡辺公綱、桂勲編 2013 講談社サイエンティフィク

5. 学会発表など

Nobuo Shimamoto: E. coli to be or not to be, 1st Singapore-Japan-India Joint Symposium on Protein-DNA Interactions in Prokaryotic Nucleoid and Eukariotic Chromatin, Singapore National University, Singapore, 2013. 7. 22-23

嶋本伸雄: タンパク質-DNA の分子認識における動態現象 I, II. 生体機能動態に関するワークショップ, 北海道大学電子科学研究所 2013. 3. 4-5

嶋本伸雄: 生物学でみる、化学法則の物理的基盤. 奈良女子大学 2013. 6. 7

中山秀喜、吉田秀司、嶋本伸雄: in vivo 100S ribosome 測定法の開発. 第10回 21世紀大腸菌研究会、伊豆市、2013.6.20-21

シェルバコーワ・キセニア、中山秀喜、嶋本伸雄: 大腸菌古い(セルサイクルにおけるライボソームの分布の変化). 第10回 21世紀大腸菌研究会、伊豆市、2013. 6. 20-21

吉田秀司、島田友裕 2, 中山秀喜、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田千恵子、嶋本伸雄、和田明、石浜明: 100S リボソーム形成遺伝子 *rmf* の cAMP-CRP による転写制御. 第15回 日本 RNA 学会年会、松山市、2013. 7. 24-26

中山秀喜、嶋本伸雄: +AAA proteases と tmRNA: 定常期適応における役割. 第15回 日本 RNA 学会年会、松山市、2013. 7. 24-26

シェルバコーワ・キセニア、中山秀喜、嶋本伸雄: バクテリア 1細胞へのタンパク質ナノインジェクション. 第7回 細菌学若手コロッセウム、三原市、2013. 8. 7-9

中山秀喜、嶋本伸雄: +AAA proteases と tmRNA □定常期適応における役割. 第7回 細菌学若手コロッセウム、三原市、2013. 8. 7-9

中山秀喜、吉田秀司、嶋本伸雄: in vivo 100S ribosome リボソーム形成の測定法の開発. 第36回日本分子生物学会年会、神戸市、2013. 12. 3-6

シェルバコーワ・キセニア、中山秀喜、嶋本伸雄: 100Sライボソームによる大腸菌の定常期での viability の維持. 第36回日本分子生物学会年会、神戸市、2013.12. 3-6

6. その他特記事項

1) 外部資金

共同研究オリンパス(株) H22-26

課題名: オリンパスカンチレバーを利用したバクテリア細胞に対する物質導入法の開発

戦略的研究基盤形成支援事業

課題名:「タンパク質の生成と管理」

2) 知財権等

中山秀喜、高橋麻矢子、嶋本伸雄 特許出願 新規蛍光タンパク質 出願番号:特願2013-246642 2013年11月28日

3) 学外活動

Shimamoto N.: Asian and Oceanian Conference of Transcription, International Board

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

中山秀喜:細菌学会若手コロッセウムWG委員

図2 15号館前にて

下から嶋本、特研生寺本沙貴、特研生高澤大樹、顔が引きつっている京産大猿と猿に迷惑をかけている明るい京産大犬のタベストリー



血管と神経生物学研究室

Laboratory of Vascular and Neuronal Biology

1. 研究概要

細胞増殖因子や神経軸索ガイダンス分子は細胞外シグナル分子として細胞膜受容体に結合し、細胞内シグナル伝達系を作動させ、動物細胞の増殖、分化、運動、形態の制御に深く関与している。細胞増殖因子の受容体は、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) や血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) をはじめとするチロシンキナーゼ型受容体であるが、神経軸索ガイダンス分子の受容体はチロシンキナーゼ構造を持たない受容体である。これらの受容体にリガンドである細胞増殖因子や軸索ガイダンス分子が結合すると標的細胞内のシグナル伝達を活性化し、神経回路や血管の形成などの生体応答を決定する。受容体が介するシグナル伝達が異常をきたすと、がんや神経系疾患、その他の多くの病気を引き起こす。

本研究室では、このような細胞内シグナル伝達の異常による病気の発症メカニズムを解明し、新たな分子標的薬を開発することを目標としている。

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、転移を促進する。我々は、VEGF-A が血管内皮細胞だけではなく、癌細胞の増殖と生存を促進すること、そして、その促進効果は血管内皮細胞と癌細胞に発現するニューロピリン-1(NRP1)を介するシグナル伝達に依存することを示した。転移性ヒト皮膚扁平上皮癌由来の DJM-1 細胞は、VEGF-A を発現し VEGF-A は NRP1 を介して DJM-1 細胞を増殖させ、足場非依存状態のコロニー形成を促進した。NRP1 の shRNA を導入し、NRP1 の発現を抑制した DJM-1 細胞ではコロニー形成が抑制され、同じ細胞に NRP1 を強制発現させると回復した。しかし、NRP1 の細胞内領域を欠損させた変異体を強制発現させてもコロニー形成は回復しなかった。これらの結果から、NRP1 の細胞内領域は、DJM-1 細胞においてコロニー形成促進シグナルを伝達するために必須であることが明らかにされた。さらに、NRP1 の細胞内領域は足場タンパク質である GIPC1 と、RhoGEF である Syx と結合し、GIPC1/Syx 複合体形成を誘導することを示した。加えて、GIPC1/Syx 複合体は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 を活性化することを明らかにした。また、

教授 瀬尾 美鈴

Prof. Misuzu Seo, Ph. D.



恒常活性化型の RhoA を強制発現させると、NRP1 発現を抑制された DJM-1 細胞のコロニー形成が回復した。以上の結果から、新規抗がん剤として NRP1 あるいはそのシグナルの下流に存在する分子を治療の標的とすることは有効であると考えられる。

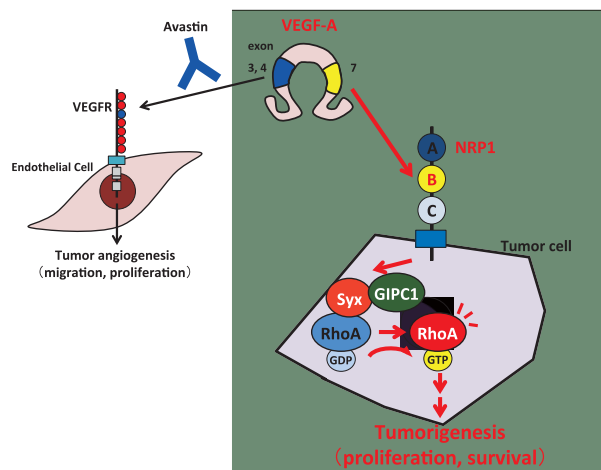


図1 VEGF-A 結合による NRP1 の下流シグナルは、悪性上皮がん細胞の増殖と生存を促進する。VEGF-A は、がん細胞上に発現が亢進する NRP1 を介して、細胞内で GIPC1/Syx 複合体の形成を誘導し、細胞内骨格を制御する RhoA を活性化させる。RhoA の活性化が、なぜ悪性がん細胞の増殖と生存を促進するのか、まだ明らかではないが、RhoA の活性化を阻害することが、新たな抗がん治療剤 (分子標的薬) の開発に有効であると考えられる。

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

以前の研究で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。また、FGFR3IIIc の発現が認められたがん細胞において細胞増殖マーカーである Ki67 が染色されたことから、FGFR3IIIc の発現ががん細胞の増殖を亢進していることが示唆された。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を用いて検討した。ECGI-10細胞にFGFR3IIIcを過剰発現させることにより、細胞増殖能の亢進が認められた。FGFR3IIIcのチロシンリン酸化が認められたことから、FGFR3IIIcが活性化され、食道がん細胞の増殖シグナルが活性化していることが示唆された。さらに、FGFR3IIIc発現 ECGI-10細胞では、FGF18刺激によりさらに細胞増殖能の亢進が認められた。FGF18の発現は食道がん組織内の線維芽細胞で高くなっていることが報告されていることから、線維芽細胞から分泌されたFGF18に食道がん細胞のFGFR3IIIcが反応することにより、食道がん細胞の増殖能が亢進していることが示唆された。以上の結果から、食道がんにおいて、FGFR3IIIc発現が上昇することにより、食道がんの悪性化が促進していることが示唆された。

3) カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 は Netrin-1 による成長円錐崩壊を阻害する。

カルマン症候群は、嗅球形成および嗅索伸長の異常と中枢性性腺機能低下症を伴う先天性疾患であるが、その分子基盤についてはほとんど明らかにされていない。我々は、タンパク質ホモロジー探索によりカルマン症候群原因遺伝子 *KAL-1* の遺伝子産物である Anosmin-1 が嗅索形成を制御する Netrin-1 シグナルの受容体 Neogenin および DCC と高い相同性があることを見出し、Anosmin-1 が細胞外で Netrin-1 と相互作用していることを示した。免疫沈降法を用いた実験から、Anosmin-1 と Netrin-1 が直接的に結合することを明らかにした。また Netrin-1 の生物学的活性へ及ぼす Anosmin-1 の影響を検討した。神経系細胞株である PC12 を分化誘導し神経軸索先端の成長円錐を形成させた後、Netrin-1 単独または Netrin-1 と Anosmin-1 を同時添加した。その結果、Netrin-1 単独では成長円錐細胞表面に発現する Netrin 受容体に作用し、成長円錐を崩壊させたが、Anosmin-1 を Netrin-1 と同時に添加すると成長円錐の崩壊が見られなかった。この結果から、Anosmin-1 は Netrin-1 の成長円錐崩壊の細胞内シグナル伝達を阻害していることが明らかになった。以上の結果をまとめると、Anosmin-1 が Netrin-1 と直接的に結合することにより、Netrin-1 シグナルを阻害していることが示唆された。更なる分子メカニズムを解明する予定である。

3. Research projects and annual reports

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

In 2004, the U.S. FDA approved the first anti-angiogenic drug for the treatment of metastatic colon cancer, bevacizumab (Avastin, Genentech) based on Judah Folkman's hypothesis that tumor growth is angiogenesis-dependent and that its inhibition might be therapeutic. Avastin is a humanized monoclonal antibody that neutralizes the vascular endothelial growth factor (VEGF-A). Malignant tumors express VEGF-A which recruits blood vessels, thereby supplying tumors with oxygen and nutrients that promote tumor cell migration proliferation, survival, and metastasis. VEGF-A signals via a tyrosine kinase receptor, VEGFR2, are blocked by Avastin to suppress tumor angiogenesis. However the impact on overall survival is not well documented and in fact some tumors are no longer being treated with Avastin. Neuropilin-1 (NRP1), a 130kDa transmembrane protein known as another VEGF-A receptor expressed in some malignant cancer cells. Therefore, it has been thought that NRP1 may induce tumor proliferation, migration and survival, but its mechanisms remain to be fully elucidated.

In this study, we showed that NRP1 indeed acts as VEGF-A receptor in tumor cells to transduce proliferation signaling into the cells. Actually, VEGF-A binding to tumor expressing NRP1 activated RhoA activity through the complex formation with GIPC1 and Syx that are expressed in the cells with the NRP1 cytoplasmic domain, thereby inducing a proliferative and survival signal in the tumor cells. DJM-1 cell, malignant skin cancer cell line, expresses VEGF-A and NRP1 endogenously. The malignant cancer cells can proliferate well in anchorage-independent manner. Silencing VEGF-A or NRP1 expression by siRNA treatment in the cells inhibited the cancer cell proliferation in 3D agar culture condition. However, Avastin did not inhibited colony formation, suggesting that NRP1 mediates VEGF-A signals. Lentiviral expression of NRP1 cytoplasmic deletion mutants in DJM-1 cells where endogenous NRP1 expression was abrogated with NRP1 shRNA did not restore the colony formation, while lentiviral expression of wild type NRP1 did. Co-immunoprecipitation experiments showed that two proteins, GIPC1 and Syx interacted with the NRP1 cytoplasmic region. Knock down of either GIPC1 or Syx expression in DJM-1 cells, as well as VEGF-A or NRP1 siRNA treatment of the cells, inhibited tumor colony

formation. These results suggest that the NRP1 cytoplasmic region requires interaction with GIPC1 and Syx to induce tumor proliferative and survival signals. Pull-down assay of active RhoA showed that siVEGF-A, NRP1, GIPC1 or Syx treatment inactivated RhoA activity. These results indicate that the NRP1 signal activates RhoA to promote DJM-1 cell proliferation.

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 FGFR3IIIc isoform was upregulated 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 cancer cells or to increased mesenchymal cell population to the tumor region by inflammatory infiltration.

To clarify this, we performed immunostaining of tumor sections obtained from esophageal cancer patients and showed that FGFR3IIIc was specifically expressed in the human ESCC but not the adjacent normal epithelial cell, suggesting that it is upregulated during tumor progression. Moreover, the expression of FGFR3IIIc in ESCC was consistent with expression of Ki67 by immunostaining, suggesting that the expression of FGFR3IIIc in ESCC enhances cell proliferation.

In order to further demonstrate the effects of FGFR3 IIIc expression, we analyzed cell proliferation of FGFR3 IIIc-overexpressing human ESCC, ECGI-10. The effects of FGFR3IIIc overexpression increased cell proliferation by autophosphorylation of FGFR3IIIc in no addition of FGFs. Moreover, reactivity of FGFR3IIIc to FGF18 in FGFR3IIIc-overexpressed ECGI-10 cells was upregulated by cell proliferation assay. It was reported

that expression of FGF18 was upregulated in fibroblast of esophageal cancer. Therefore, cell proliferation of esophageal carcinoma may be enhanced by FGFR3IIIc binding to FGF18 from fibroblast in esophageal carcinoma. These results indicate that the upregulated expression of FGFR3 IIIc in human ESCC enhances cell proliferation and may promote tumor progression.

3: Anosmin-1 inhibits Netrin-1-induced growth cone collapse.

Kallmann syndrome is characterized by hypogonadism due to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency, and a defective sense of smell related to the defective development of the olfactory bulbs and olfactory tracts. This syndrome is caused by mutations affecting the *KALI* gene, which codes for the extracellular protein anosmin-1. However, the molecular pathogenesis is poorly understood. In the previous study, we show that Anosmin-1 FNIII repeats also show 40% of homology with Netrin-1 receptors DCC and Neogenin, which are expressed by growing nerve cells in the developing vertebrate brain. In addition, the Netrin-1 Knock-out mouse shows defective of the olfactory tracts and the migration of GnRH neuron. We hypothesized that Anosmin-1 acts as a soluble receptor for Netrin-1, thus Anosmin-1 inhibits axon guidance cue of Netrin-1.

In this study, the role of Anosmin-1 as an inhibitor for Netrin-1-induced growth cone collapse was tested. First, we tested whether Anosmin-1 and Netrin-1 bind directly by immunoprecipitation assay using condition medium of Anosmin-1-Myc- and Netrin-1-V5-expressing HEK293T cells. The result showed that Anosmin-1 directly bound to Netrin-1. Next, to determine Anosmin-1 regulate biological activity of Netrin-1, we performed the growth cone collapse assay. As a result, Netrin-1 alone induced growth cone collapse. In contrast, co-treatment of growth cones with Netrin-1 and Anosmin-1 did not induce the collapse. These results suggest that normal Anosmin-1 may act as an inhibitor for the signal of Netrin-1-mediated growth cone collapse in the developmental process of the central nervous system, contributing to an elongation pathway of the olfactory axons and the associated migration of GnRH neuron.

4. 論文, 著書など

M. Fukami, M. Iso, N. Sato, M. Igarashi, M. Seo, I. Kazukawa, E. Kinoshita, S. Dateki, T. Ogata: Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocrine J.* 60(8):1013-1020 (2013.5)

A. Shimizu, H. Nakayama, P. Wang, C. Konig, T. Akino, J. Sandlund, S. Coma, JE. Jr. Italiano, A. Mammoto, DR. Bielenberg, M. Klagsbrun: 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): 2210-2222 (2013)

C. Waga, H. Asano, T. Sanagi, E. Suzuki, Y. Nakamura, A. Tsuchiya, M. Itoh, Y. Goto, S. Kohsaka, S. Uchino, Identification of two novel Shank3 transcripts in the developing mouse neocortex. *J. Neurochem.* **128**(2): 280-93 (2014)

5. 学会発表など

M. Seo, A. Yoshida, A. Shimizu, VEGF-A/NRP1 signaling induces GIPC1/Syx complexes, resulting in RhoA activation to promote survival and growth of human malignant skin cancer cells. Vascular Biology Program, Prof. Klagsbrun's invitation, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, Boston, U.S. A. 2013.4.11 (招待講演)

吉田亜佑美、清水昭男、Michael Klagsbrun、瀬尾美鈴 : VEGF-A/NRP1 シグナルは、ヒト悪性皮膚癌細胞の増殖を促進する。第60回日本生化学会近畿支部例会、吹田市、2013.5.18 (口頭発表、ポスター発表)

竹内祥人、清水昭男、岡本沙矢香、瀬尾美鈴 : Anosmin-1 による RGMA の成長円錐崩壊作用の阻害機構の解明。第60回日本生化学会近畿支部例会、吹田市、2013.5.18. (口頭発表、ポスター発表)

吉田亜佑美、清水昭男、Michael Klagsbrun、瀬尾美鈴 : VEGF-A/NRP1シグナルは、ヒト悪性上皮がん細胞の増殖をオートクリンによって促進する。第17回日本がん分子標的治療学会学術集会、京都市、2013.6.12-14 (ワークショップ)

浅野弘嗣: マウス大脳皮質発達過程における自閉症関連分子 *Shank3* のバリエーション発現解析。バイオフォーラム2013、京都産業大学総合生命科学部、2013.7.19 (招待講演)

竹内祥人、浅野弘嗣、清水昭男、瀬尾美鈴 : カルマン症候群原因遺伝子産物Anosmin-1は軸索反発因子RGMAとNetrin-1の成長円錐の崩壊作用を阻害する。第36回日本分子生物学会年会、神戸市、2013.12.5 (ポスター発表)

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤(C)

課題名: 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

研究分担者: 瀬尾美鈴, 取得年度: H24-26年 (3年)

共同研究・インタープロテイン株式会社

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 研究分担者: 瀬尾美鈴, 取得年度: H19-25年 (7年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動 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~)、

日本生化学会近畿支部幹事 (2011.10.1~)

瀬尾美鈴: 京都府発明等功労者表彰審査委員

4) 受賞等 なし

5) その他

1) 瀬尾美鈴: 京都府発明等功労者表彰審査委員として、第57回京都府発明等功労者の審査を行った。2013年3月

2) 瀬尾美鈴: 学会座長 「細胞増殖・分裂・がん」第60回 日本生化学会近畿支部例会、大阪大学吹田キャンパス 医学部・銀杏会館、2013.5.18

3) 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。2013.10.114

4) 瀬尾美鈴と瀬尾研究室: 岡山県立岡山操山中学校生徒の京都研修のための講義「日本の最先端医療」「分子標的薬について」他を実施した。2013.11.14



研究室写真: 15号館西側にて、卒業記念アルバム用に撮影 (2013年9月27日)

免疫糖鎖生物学研究室

Laboratory of Immunoglycobiology

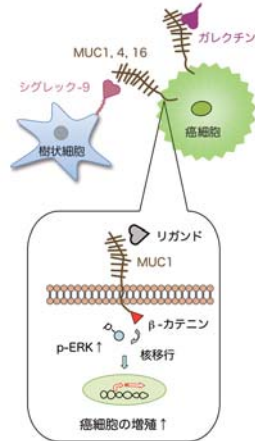
1. 研究概要

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。ムチンは分泌型と膜結合型ムチンに大別され、生体内に広く分布している。癌化に伴う細胞の変化については、まず、上皮組織の崩壊が挙げられる。正常な上皮細胞では、細胞の極性が維持され、タイトジャンクションを境にして、細胞表面はアピカル側とバソラテラル側に仕切られている。癌化に伴いタイトジャンクションをはじめとした細胞接着機構が崩壊し、ムチンのような、本来アピカル側に輸送される糖タンパク質も細胞表層全体に輸送される。担癌状態において、分泌されたムチンは血流やリンパ液中及び癌組織微小環境に存在し、正常な上皮組織では、接触が不可能な分子との相互作用が可能となる。また、癌細胞膜上の膜結合型ムチンも癌組織微小環境中の因子あるいは間質に存在する細胞の細胞膜タンパク質との相互作用が可能となる。このように、癌組織微小環境では、ムチンを中心とした新たな分子間相互作用が生じ、癌細胞の進展や免疫細胞の抑制をもたらす分子的背景となっている。

2. 本年度の研究成果

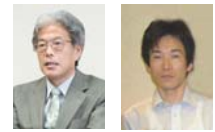
1) 上皮性癌細胞の産生する膜結合型ムチン MUC1 の生物学的機能

MUC1 は上皮性癌細胞に普遍的に発現する膜結合型ムチンで、シグレックファミリーに結合する可能性のある多様なシアログリカンを発現している。プレートアッセイやプルダウンアッセイによりシグレック 9 が最も強く MUC1 と結合することがわかった。ヒト癌組織を抗シグレック 9 抗体と抗 MUC1 抗体を用いて免疫染色すると両分子の共局在が観察された。MUC1cDNA をマウス 3T3 細胞やヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞に導入し、可溶性シグレック 9 の結合に伴う β -カテニンと MUC1-CD の共沈について検討した。その結果、 β -カテニンは、シグレック 9 の濃度依存的に MUC1-CD にリクルートされた。その後、 β -カテニンと



教授 中田 博

Prof. Hiroshi Nakada, Ph.D.



助教 秋田 薫

Assist. Prof. Kaoru Akita, Ph.D.

MUC1-CD 複合体は核に輸送され、c-myc の発現亢進をもたらし、結果として細胞増殖を促進した。この結果については、MUC1 発現細胞とシグレック 9 発現細胞との共培養によっても同様の現象が認められた。従来、MUC1 は近傍に発現する EGF や FGF 受容体からのシグナルを中継、増幅する機能を担うとされてきたが、本研究はもう1つの MUC1 シグナル伝達経路を明らかにしたことになる。一方、癌組織微小環境には、可溶性のレクチンも多く存在し、MUC1 との相互作用が想定される。ガレクチン-3 の結合とシグナル伝達についても検討し、同様にガレクチン-3 の結合に伴って β -カテニンが MUC1 へのリクルートされることがわかった。

2) シグレック 3 と CD14 の相互作用による TLR-4 情報伝達の抑制

単球由来未熟樹状細胞(imDC)を抗シグレック-3 抗体の存在下で LPS 処理した場合、IL-12 の産生や NF- κ B のリン酸化が抑制されることがわかった。imDC の細胞表面のタンパク質を架橋試薬で処理し、細胞を可溶化後、シグレック-3 と架橋された分子を検索したところ、CD14 が検出された。抗シグレック-3 抗体と抗 CD14 抗体を用いた Proximity ligation assay によっても有意の結果が得られた。シグレック-3 と CD14 の組み換え体を用いたプレートアッセイによっても両分子の結合を確認するとともに、シアリダーゼ処理した CD14 では結合能が消失することからシアリ酸に依存した結合であることが確認された。HEK293T に LPS 受容体複合体 (TLR-4, MD2, CD14) を強制発現した細胞 (TLR4) を用い、さらに野生型シグレック 3 (TLR/SigWT) あるいはシアリ酸との結合能を欠失した変異型シグレック 3 (TLR/SigRA) を導入した細胞を調製した。これの細胞を用いて、LPS 刺激後、細胞の可溶化物を調製し、NF- κ B のリン酸化を比較したところ、TLR/SigWT で細胞では抑制され、TLR/SigRA 細胞では TLR 細胞に近いレベルに回復した。シグレック-3 の CD14 への結合が、TLR4 情報伝達を抑制することがわかった。その機構については、シグレック-3 による CD14 から TLR-4 への LPS の移行の抑制が示唆された。

3. Research projects and annual reports

Mucins are major components covering the luminal surfaces of the epithelial respiratory, gastrointestinal,

and reproductive tracts, and are high molecular weight glycoproteins with a number of O-glycans.

We have been studying on the function of these mucins with respect to tumor progression. 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.

In tumor microenvironments, soluble lectins and mucins may be ligands for membrane-bound mucins and lectins, respectively. Membrane bound mucins may be counter receptors for membrane-bound lectins. Binding of 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. These mutual interactions may facilitate the tumor progression.

1: Biological function of membrane-bound mucin, MUC1, produced by epithelial cancer cells. Because MUC1 carries a variety of sialoglycans that are possibly recognized by the siglec family, we found that Siglec-9 prominently bound to MUC1. An immunochemical study showed that Siglec-9-positive immune cells were associated with MUC1-positive cells in human colon, pancreas, and breast tumor tissues. When mouse 3T3 fibroblast cells and a human colon cancer cell line, HCT116, stably transfected with MUC1cDNA were ligated with recombinant soluble Siglec-9, β -catenin was recruited to the MUC1 C-terminal domain, which was enhanced on stimulation with soluble Siglec-9 in dose- and time-dependent manners. A co-culture model of MUC1-expressing cells and Siglec-9-expressing cells mimicking the interaction between MUC1-expressing malignant cells, and Siglec-9-expressing immune cells in a tumor microenvironment was designed. Brief co-incubation of Siglec-9-expressing HEK293 cells, but not mock HEK293 cells, with MUC1-expressing cells similarly enhanced the recruitment of β -catenin to the

MUC1 C-terminal domain. The recruited β -catenin was thereafter transported to the nucleus, leading to cell growth. These findings suggest that Siglec-9 expressed on immune cells may play a role as a potential counterreceptor for MUC1 and that this signaling may be another MUC1-mediated pathway and function in parallel with a growth factor-dependent pathway.

In addition, soluble lectins may be present in tumor microenvironment. We performed a similar experiment using MUC1-expressing 3T3 cells and recombinant galectin-3. It is revealed that galectin-3 binds to MUC1-N-terminal domain and thereby initiates similar MUC1-mediated signaling.

2: Negative regulation of TLR-4 mediated signaling through ligation of CD14 with Siglec-3. When monocyte-derived immature dendritic cells (imDCs) were stimulated with LPS in the presence of anti-Siglec-3/CD33 mAb, the production of IL-12 and phosphorylation of NF- κ B decreased significantly. The cell surface proteins of imDCs were chemically cross-linked, and Siglec-3-linked proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. It was CD14 that was found to be cross-linked with Siglec-3. Sialic acid-dependent binding of Siglec-3 to CD14 was confirmed by plate assay using recombinant Siglec-3 and CD14. Three types of cells: HEK293T cells expressing the LPS receptor complex (TLR cells), and the LPS receptor complex plus either wild-type Siglec-3 (TLR/SigWT cells) or mutated Siglec-3 without sialic acid-binding activity (TLR/SigRA cells) were prepared, and then the binding and uptake of LPS and phosphorylation of NF- κ B were investigated. It is revealed that wild-type Siglec-3 but not mutated Siglec-3 significantly reduced the phosphorylation of NF- κ B, due to inhibitory effect on the presentation of LPS from CD14 to TLR4 through ligation of CD14 with Siglec-3.

4. 論文, 著書など

- H. Yurugi, S. Tanida, K. Akita, A. Ishida, M. Toda, H. Nakada. Prohibitins function as endogenous ligands for Siglec-9 and negatively regulate TCR signaling upon ligation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434(2): 376-381 (2013)
- Y. Matsumoto, Q. Zhang, K. Akita, H. Nakada, K. Hamamura, A. Tsuchida, T. Okajima, K. Furukawa, T. Urano. Trimeric Tn antigen on syndecan 1 produced by ppGalNAc-T13

enhances cancer metastasis via a complex formation with integrin alpha5beta1 and matrix metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.* 288(33): 24264-24276 (2013)

S. Tanida, K. Akita, A. Ishida, Y. Mori, M. Toda, M. Inoue, M. Ohta, M. Yashiro, T. Sawada, K. Hirakawa, H. Nakada. Binding of the sialic acid binding lectin, Siglec-9, to the membrane mucin, MUC1, induces recruitment of beta-catenin and subsequent cell growth. *J. Biol. Chem.* 288(44): 31842-31852 (2013)

N. Zamri, N. Masuda, F. Oura, K. Kabayama, Y. Yajima, H. Nakada, K. Yamamoto, Y. Fujita-Yamaguchi. Characterization of anti-Tn-antigen MLS128 binding proteins involved in inhibiting the growth of human colorectal cancer cells. *Biosci. Trends.* 7(5): 221-229 (2013)

K. Akita, M. Tanaka, S. Tanida, Y. Mori, M. Toda, H. Nakada. CA125/MUC16 interacts with Src family kinases, and over-expression of its C-terminal fragment in human epithelial cancer cells reduces cell-cell adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* 92(8-9): 257-263 (2013)

S. Tanida, Y. Mori, A. Ishida, K. Akita, H. Nakada. Galectin-3 binds to MUC1-N-terminal domain and triggers recruitment of beta-catenin in MUC1-expressing mouse 3T3 cells. *Biochim. Biophys. Acta. in press.*

5. 学会発表など

Y. Yurugi, H. Nakada. Interaction between Siglec-9 and prohibitins down-regulates T cell receptor signaling. The 15th International Congress of Immunology, Milan (Italy), 2013.8.22-27

中田 博: MUC1 発現細胞におけるウロキナーゼの発現誘導. 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、松本市、2013.7.11-12

中田 博、万木 肇、谷田周平、石田有希子、秋田 薫: シグレック-9 によるプロヒビチンを介した TCR シグナル伝達の抑制. 第 32 回日本糖質学会年会、大阪市、2013.8.5-7

森 勇伍、秋田 薫、中田 博: MUC1 発現による uPA の発現誘導. 第 86 回日本生化学会大会、横浜市、2013.9.11-13

石田有希子、秋田 薫、中田 博: CD14 と Siglec-3 の結合による Toll-like receptor-4 シグナル伝達の抑制. 第 86 回日本生化学会大会、横浜市、2013.9.11-13

N. Zamri, F. Oura, N. Masuda, Y. Yajima, H. Nakada, K. Yamamoto, Y. Fujita-Yamaguchi: Characterization of anti-Tn-antigen MLS128 binding proteins involved in growth inhibitory effects on human colon cancer cells. 第 86 回日本生化学会大会、横浜市、2013.9.11-13

森 勇伍、秋田 薫、八代正和、澤田鉄二、平川弘聖、中田 博: MUC1 発現細胞における uPA の誘導. 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市、2013.10.3-5

6. 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: 関節リウマチにおけるスフィンゴシン 1 リン酸レセプター-3 (SIP3) の働き

研究分担者: 中田 博、取得年度: H23-25 年(3 年)

学術研究助成基金助成金・若手研究(B)

課題名: 糖鎖修飾の差異に基づいた既存の卵巣癌血清診断マーカーの臨床的再評価

研究代表者: 秋田 薫、取得年度: H25-26 年(2 年)

2) 知財権等 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 ピアレビューアー

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 なし

5) その他

万木 肇: 京都産業大学大学院・後期博士課程修了、学位(工学博士)取得

研究室メンバーの写真



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、タンパク質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) 小胞体におけるタンパク質品質管理機構と小胞体恒常性維持機構の解明

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とともに、サイトゾルから小胞体内腔へのシグナル伝達を介したそれぞれの恒常性のクロストークについて解析する。

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

肝硬変を代表とする線維化疾患の治療において、コラーゲンの生合成に必須である Hsp47 は重要な創薬ターゲットとなっている。肝臓が障害を受けると、肝細胞と類洞内皮細胞の間に存在する肝星細胞が活性化され、増殖し、サイトカインやコラーゲンを分泌することで肝臓の修復に寄与する。修復後、増殖した肝星細胞はアポトーシスによりその数を減少させ、肝臓は通常の状態に戻ることが知られている。慢性的な線維化においては、肝星細胞はコラーゲンを過剰に産出し、線維化を進行させる。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線維化疾患の治療に使うことを目的とし、その化合物の探索を行い、既に化合物を得ている(特許出願済み)。実際に Hsp47 の機能を阻害した時の、肝星細胞のターンオーバーを調べる事は、線維化疾患治療戦略を考える上で極めて重要である。

今回、Cre-LoxP のシステムを用いて、マウスより単離した肝星細胞において、Hsp47 のノックアウトを行った。その結果、Hsp47 をノックアウトした肝星細胞では細胞外マトリックスのコラーゲン量が著しく減少し、細胞内のコラーゲン蓄積量が増加することが確認された。これによる小胞体ストレスは確認されなかったが、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ3の誘導が確認され、Hsp47 が無いことによって肝星細胞にアポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。今後、Hsp47 阻害剤を用いた解析を進めていく予定である。

2) 小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク: 小胞体恒常性維持の解明

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。我々は小胞体でジスルフィド還元活性に特化する還元酵素 ERdj5 を発見し、ERdj5 が小胞体のレクチンタンパク質 EDEM および分子シャペロン BiP と複合体を形成することを見出した。ERdj5 は小胞体で末期的にミスフォールドした分解基質のジスルフィド結合を自身の還元活性で切断し、小胞体からサイトゾルへの排出を促進し、タンパク質品質管理において重要な役割を果たしていることを見出した (R. Ushioda *et al.*, *Science* 2008; M. Hagiwara *et al.* *Mol. Cell* 2011; R. Ushioda *et al.* *Mol. Biol. Cell* 2013)。

さらに ERdj5 が小胞体膜上に存在するカルシウムポンプ SERCA2 のジスルフィド結合を自身の還元活性で開裂し、複合体を形成することで小胞体へのカルシウム流入を調節し、小胞体のカルシウム動態に影響を与えているという予備的なデータを得ている。このことは ERdj5 の還元力がタンパク質品質管理のみならず、小胞体のカルシウムホメオスタシスも制御し、そのクロストークに重要な役割を果たすことを意味している。本研究は、小胞体内腔の恒常性維持機構を理解する上で重要である。

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

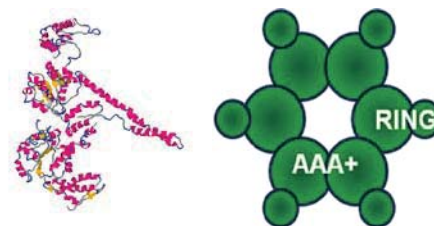
小胞体には20種類を越えるオキシドレダクターゼ(酸化還元酵素)が存在する。酸化還元反応は、一連の電子伝達経路から成るが、プロテオミク解析(特に相互作用解析を主としたインターアクトーム解析)と酸素電極による酸化反応の解析、表面プラズモン(SPR)を用いた相互作用解析などを駆使して、小胞体における一連の酸化反応のカスケードを明らかにした。中でも Ero1a およびPDIという2つの酸化酵素および酸化還元酵素がハブ複合体を作って、小胞体での酸化反応における最上流起点になっているという事実を見出した (K. Araki *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2013)。またこのような酸化酵素ネットワークによって、小胞体内環境が酸化的に保たれることが、正常なタンパク質分泌のために必須であるが、このようなレドックス恒常性が、神経変性疾患や老化により低下することを見出した。神経変性疾患や老化においては細胞質ゾルのタンパク質恒常性が低下することが知られているが、これが膜を越えて小胞体内腔に影響を及ぼしていることは驚くべきことであり、現在そのメカニズムの解明に取り組んでいる。

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 591kDa という巨大な分子であった。しかも、この分子はリボソームに近い大きさの巨大オリゴマーを作り、ダイニンやプロテアソームに類似の ATP アーゼ型メカノエンザイムとして細胞内の物理的な過程に寄与しているであろうことを明らかにした。また、*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. Liver fibrosis is characterized by abnormal collagen accumulation in the extracellular matrix of liver. Collagen specific molecular chaperone Hsp47 is essential for correct folding and secretion of procollagen. Thus, Hsp47 is thought to be potential therapeutic targets for fibrosis. In liver fibrosis, Hepatic Stellate Cells (HSCs) are activated and transformed into myofibroblasts which produce collagen actively. It is known that reversion of fibrosis is accompanied by clearance of myofibroblasts by apoptosis. We have already found that some of small molecule compounds inhibit the interaction between collagen and Hsp47.

For the therapeutic purpose it is important to investigate the turnover of HSCs under Hsp47 inhibition condition. Here, we succeeded in knocking out *hsp47* gene by Cre-LoxP system in isolated HSCs from *hsp47* floxed mice. In *hsp47*-KO HSCs, we confirmed that immature type 1 collagen is accumulated in the ER. We also observed the induction of caspase 3, an apoptosis marker, while we didn't observe induction of BiP, an ER stress inducible protein. We are going to further characterize the *hsp47*-KO HSCs in terms of the induction of apoptosis.

2: Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation and Ca²⁺ flux. We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in ER. ERdj5 forms the supramolecular complex with EDEM and BiP, and activates the degradation of proteins misfolded in the ER by cleaving the disulfide bonds in terminally misfolded proteins and by facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by ubiquitin-proteasome system, which is called as ERAD (R. Ushioda *et al.*, *Science* 2008; M. Hagiwara *et al.* *Mol. Cell* 2011; R. Ushioda *et al.* *Mol. Biol. Cell* 2013).

Furthermore, we found that ERdj5 cleaves the disulfide bond of SERCA2, a Ca²⁺ pump on ER membrane, and regulates its function. It suggests that redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca²⁺ homeostasis in the ER. As the ERdj5 is an oxidoreductase in the ER, it is strongly suggested that three important homeostasis in the ER, protein, redox and Ca homeostasis, are cross-talking each other.

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. Such a network consisting of several oxidoreductases, so-called redox network in the ER, is essential for proper secretion of secretory proteins. We recently revealed that such redox network and homeostasis are perturbed by aging and abnormal proteins that cause neurodegenerative diseases. It is known that proteostasis in the cytosol is impaired by aging and neurodegenerative diseases. It is surprising that perturbation of proteostasis in the cytosol leads to impairment of redox homeostasis in the ER. We are now elucidating how cytosolic stress interferes the redox homeostasis in the ER over the ER membrane.

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 591kDa contains RING finger domain, which causes a polyubiquitination of misfolded proteins, and two AAA+ type ATPase domains. Mysterin forms a huge oligomer the size of which is comparable to known macromolecules such as the ribosome and is supposed to exhibit mechanical activity in the cell. Thus mysterin is a novel oligomeric AAA⁺ protein with RING finger. We preliminary found that knockdown of mysterin in zebra fish caused an aberrantly oriented blood vessels during the development, and would continue such functional analysis.

4. 論文、著書など

- D. Morito, K. Nishikawa, J. Hoseki, A. Kitamura, Y. Kotani, K. Kiso, M. Kinjo, Y. Fujiyoshi & K. Nagata: Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Scientific Reports* in press
- 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 interstitial pneumonia *BMC Pulmonary Medicine* in press
- Y. Honzawa, H. Nakase, M. Shiokawa, T. Yoshino, H. Imaeda, M. Matsuura, Y. Kodama, H. Ikeuchi, A. Andoh, Y. Sakai, K. Nagata, T. Chiba: Involvement of interleukin-17A-induced expression of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease. *Gut* in press
- T. Ramming, H. G. Hansen, K. Nagata, L. Ellgaard, C. Appenzeller-Herzog: GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum *Free Radical Biol Med.* In press
- T. Olszak, J. F. Neves, C. M. Dowds, K. Baker, J. Glickman, N. O. Davidson, C-S. Lin, C. Jobin, S. Brand, K. Sotlar, K. Wada, K. Katayama, A. Nakajima, H. Mizuguchi, K. Kawasaki, K. Nagata, W. Müller, S.B. Snapper, S. Schreiber, A. Kaser, S. Zeissig & R. S. Blumberg: Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* in press
- A. Kitamura, N. Inada, H. Kubota, G. Matsumoto, M. Kinjo, R. I. Morimoto & K. Nagata: Dysregulation of the Proteasome Increases the Toxicity of ALS-linked Mutant SOD1 *Genes to Cells* in press
- T. Kakugawa, S. Yokota, Y. Ishimatsu, T. Hayashi, S. Nakashima, S. Hara, N. Sakamoto, Y. Matsuoka, H. Kubota, M. Mine, H. Mukae, K. Nagata & S. Kohno: Serum heat shock protein 47 levels in patients with drug-induced lung disease.

- Respiratory Research* 14:133(2013)
- T. Kakihana, K. Araki, S. Vavassori, S. Iemura, M. Cortini, C. Fagioli, T. Natsume, R. Sitia & K. Nagata: Dynamic regulation of Ero1 α and Prx4 localization in the secretory pathway *J. Biol. Chem.* 288(41):29586-29594(2013)
- R. Ushioda, J. Hoseki & K. Nagata: Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. *Mol. Biol. Cell.* 24(20):3155-3163(2013)
- K. Araki, S. Iemura, Y. Kamiya, D. Ron, K. Kato, T. Natsume & K. Nagata: Ero1 α and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J. Cell. Biol.* 202(6):861-874(2013)
- 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* 18:581-590(2013)
- T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Nagata, K. Kato & N. Hosokawa: Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded α 1-antitrypsin variant. *FEBS J.* 280(6):1563-1575(2013)
- 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.* 288(6):4452-4461(2013)

5. 学会発表など

招待講演、シンポジウム等

- 永田和宏: 線維化疾患治療に向けたコラーゲン分泌阻害剤の開発、新技術説明会、東京、2036.3.1
- Kazuhiro Nagata: Crosstalk of proteostasis and redox homeostasis in the ER, The 1656th Biological Symposium, 三島市、2013.3.5
- Kazuhiro Nagata: Crosstalk between proteostasis and redox homeostasis in the ER. Organella Homeostasis Research Center Kick-off Symposium, Fukuoka, 2013.3.22
- 永田和宏: 小胞体ホメオスタシスの維持機構、さきがけ「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」研究領域第一回領域会議アドバイザー講演、大阪市、2013.4.9
- Kazuhiro Nagata: ER stress and protein quality control system in the ER. Symposium "The Art of Living with Stress: a Lesson from Ferruccio Ritossa", Roma(Italy), 2013.04.26
- 永田和宏: タンパク質の形が壊れると病気になるってホント? 京都産業大学 創立 50 周年記念事業シンポジウム『細胞内の情報から医療における個人情報へ』、京都市、2013.6.29

Kazuhiro Nagata: Crosstalk among three different systems of ER homeostasis. Northwestern University Seminar, Evanston(USA), 2013.07.05

Kazuhiro Nagata: From proteostasis to organelle-stasis in the ER. (Plenary Lecture) Gordon Research Conferences "Stress Proteins in Growth, Development & Disease", West Dover(USA), 2013.07.07

Kazuhiro Nagata: Regulation of collagen synthesis by Hsp47 and P4H in combination with specific inhibitors. Gordon Research Conferences"Collagen", New London(USA), 2013.07.17

永田和宏: プロテインホメオスタシスにおける小胞体とサイトゾルのクロストーク、第 86 回日本生化学会大会シンポジウム、横浜市、2013.09.11

Kazuhiro Nagata: Crosstalk and regulation of ER homeostasis: Protein, Redox and Calcium. International Mini Symposium"Protein Folding and Disease", Akita(Japan), 2013.10.29

学会発表

- 伊藤進也、永田和宏: Development of therapeutic small compounds for fibrotic-diseases by preventing of collagen secretion. AUTM Asia 2013 Kyoto, Kyoto, 2013.3.20-22
- 伊藤進也、小川 浩二、高木 基樹、吉田 将人、平山 尚志郎、広川 貴次、新家 一男、土井 隆行、五島 直樹、夏目 徹、永田和宏: 線維化疾患治療に向けたコラーゲン分泌阻害剤の同定と解析。第65回日本細胞生物学会大会、名古屋市、2013.06.19-21
- 山本 洋平、桃原 淑、松本 美香、佐藤 仁美、門倉 広、永田和宏、河野 憲二: 小胞体膜に局在する ERAD 複合体による p62 制御機構の解析。第 65 回日本細胞生物学会大会、名古屋市、2013.06.19-21
- Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata: ERdj5, a disulfide reductase in the ER, regulates Ca²⁺ homeostasis through the activation of Ca²⁺ pump, SERCA2b. Gordon Research Conferences"Stress Proteins in Growth, Development & Disease", West Dover(USA), 2013.07.07-12
- 森戸大介: 脳血管疾患モヤモヤ病に関与する ATP アーゼ/ユビキチンリガーゼ、ミステリンの構造と機能。日本生物物理学会北海道支部講演会、札幌市、2013.7.8
- Daisuke Morito, Yuri Kotani, Kouki Nishikawa, Jun Hoseki, Satoru Yamazaki, Shun-ichiro Iemura, Toru Natsume, Seiji Takashima, Yoshinori Fujiyoshi, Kazuhiro Nagata: Structure and function of moyamoya disease-associated AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin. The 35th Naito Conference "The Ubiquitin Proteasome System", Sapporo(Japan), 2013.7.10 (口頭・ポスター発表)

Shoshiro Hirayama, Shun-ichiro Iemura, Kazutaka Araki, Daisuke Morito, Toru Natsume, Shigeo Murata, Kazuhiro Nagata : A new mechanism of nuclear export of ubiquitinated proteins by the UBIN-POST system. The 35th Naito Conference 'The Ubiquitin Proteasome System', Sapporo(Japan), 2013.7.10 (ポスター発表)

Kunito Kawasaki, Kazuo Ikeda, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : ER-stress-mediated apoptotic cell death in Hepatic stellate cells: Effect of deletion of collagen specific molecular chaperone Hsp47 gene in mice. Gordon Research Conferences"Collagen", New London(USA), 2013.07.14-19

Shinya Ito, Koji Ogawa, Motoki Takagi, Akihito Yoshida, Takatsugu Hirokawa, Shoshiro Hirayama, Kazuo Shin-ya, Takayuki Doi, Naoki Goshima, Tohru Natsume, Kazuhiro Nagata : Inhibition of collagen-specific molecular chaperone Hsp47 with small molecules. Gordon Research Conferences"Collagen", New London(USA), 2013.07.14-19

Tomoyuki Kakugawa, Shin-ichi Yokota, Yuji Ishimatsu, Tatsuhiko Harada, Shota Nakashima, Shintaro Hara, Noriho Sakamoto, Hiroshi Kubota, Mariko Mine, Yasuhiro Matsuoka, Hiroshi Mukae, Kazuhiro Nagata and Shigeru Kohno : Serum heat shock protein 47 levels in patients with drug induced lung diseases. European Respiratory Society Annual Congress,Barcelona(Spain), 2013.9.7-11

Kazuhiro Nagata, Daisuke Morito (Speaker), Yuri Kotani : Mysterin, the largest molecule of AAA+ ATPase family members with E3 ubiquitin ligase activity, is involved in development of zebrafish EMBO workshop"AAA+ proteins:from mechanism and disease to targets", Neuss(Germany), 2013.9.15-19 (口頭発表)

Daisuke Morito, Kouki Nishikawa, Jun Hoseki, Akira Kitamura, Yuri Kotani, Masataka Kinjo, Yoshinori Fujiyoshi and Kazuhiro Nagata : Potential dynamic equilibrium of moyamoya disease-associated AAA+ ATPase mysterin. EMBO workshop"AAA+ proteins:from mechanism and disease to targets",Neuss(Germany),2013.9.15-19

Daisuke Morito : Structure and function of moyamoya disease-associated AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin/RNF213. Max Plank Institute Seminar, Martinsried (Germany), 2013.9.21 (口頭発表)

Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : ER homeostatic mechanism through disulfide reductase ERdj5. 第8回小胞体ストレス研究会、金沢市、2013.10.25-26

垣花太一、新木和孝、Stefano Vavassori、家村俊一郎、Margherita Cortini、Claudio Fagioli、夏目徹、Roberto Sitia、永田和宏 : Dynamic regulation of Ero1 α and Peroxiredoxin-4 localization in the secretory pathway. 第8回小胞体ストレス研究会、金沢市、2013.10.25-26

Yoshitsugu Higashi, Tomoyuki Kakugawa, Shin-ichi Yokota, Yuji

Ishimatsu, Shota Nakashima, Shintaro Hara, Noriho

Sakamoto, Hiroshi Kubota, Yasuhiro Matsuoka, Kazuhiro Nagata and Shigeru Kohno :

Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute interstitial pneumonia. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama, 2013.11.11-14

小谷友理、森戸大介、山崎悟、高島成二、平田普三、永田和宏 : もやもや病関連タンパク質 Mysterin による zebrafish の発生制御. 第8回臨床ストレス応答学会大会、松本市、2013.11.15 (口頭発表) (若手研究奨励賞候補)

森戸大介、西川幸希、宝関淳、北村朗、小谷友理、夏目徹、金城政孝、藤吉好則、永田和宏 : モヤモヤ病タンパク質ミステリンの動的複合体形成と細胞内機能. 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ、神戸市、2013.12.3-6 (口頭発表)

潮田亮、宮本章歳、福田泰子、藤井唱平、御子柴克彦、永田和宏 : ERdj5, a disulfide reductase in the ER, regulates Ca²⁺ homeostasis through the activation of Ca²⁺ pump, SERCA2b. CREST-さきがけ構造生命科学領域キックオフミーティング、守口市、2013.12.26

森戸大介、小谷友理、西川幸希、北村朗、山崎悟、金城政孝、高島成二、平田普三、藤吉好則、永田和宏 : モヤモヤ病タンパク質ミステリンの構造と機能. CREST-さきがけ構造生命科学領域キックオフミーティング、守口市、2013.12.26

山本洋平、永田和宏 : 新規オートファジー関連因子 DNAJC16 の機能解析. CREST-さきがけ構造生命科学領域キックオフミーティング、守口市、2013.12.26

伊藤進也、小川 浩二、竹内 恒、五島 直樹、夏目 徹、永田和宏 : 線維化疾患治療にむけたコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の相互作用阻害剤の同定. CREST-さきがけ構造生命科学領域キックオフミーティング、守口市、2013.12.26

森戸大介 : Structure and Function of Moyamoya Disease Susceptibility Protein Mysterin/RNF213. 第1724回バイオロジカルシンポジウム、国立遺伝学研究所、三島市、2014.1.29

6. 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 : H23-26 年(3 年半)

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」

課題名：小胞体恒常性維持機構：Redox, Ca²⁺, 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：H25-30年(5年半)

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・若手研究B

課題名：新規還元酵素 ERdj5 による小胞体恒常性維持機構の解明、研究代表者：潮田亮、取得年度：H25-26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：モヤモヤ病タンパク質ミスレリンによる欠陥・神経形成の制御、研究代表者：森戸大介、取得年度：H25-26年(2年)

科学研究費補助金・若手研究B

課題名：モヤモヤ病タンパク質ミスレリンの構造と機能、研究代表者：森戸大介、取得年度：H25-26年(2年)

国立遺伝学研究所「共同研究(B)」

研究課題名：モヤモヤ病関連遺伝子ミスレリンの機能解析、研究代表者：森戸大介、取得年度：H25年(1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)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：脱ユビキチン化酵素 USP15 による Mysterin の機能制御、研究代表者：小谷友理、取得年度：H25-26年(2年)

2) 知財権等

3) 学外活動

永田和宏：九州大学オルガネラホメオスタシス研究センター
客員教授

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：日本学術会議（細胞生物学）連携会員

永田和宏：日本学術会議 特別推進研究審査委員

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金審査委員（基盤S）

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」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：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：国際高等研究所 研究推進会議委員

永田和宏：基礎生物学研究所 外部点検評価委員

永田和宏：京都大学ウイルス研究所 外部評価委員会委員

永田和宏：群馬大学先端科学研究指導ユニットテニユア審査委員会委員

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：日本結合組織学会 評議員

永田和宏：日本細胞生物学会 運営委員、評議員、編集委員

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：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

4) 受賞等

5) その他 研究室メンバーの写真



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, PhD



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。

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. 1: N. Nakamura, et al., Curr Opin Cell Biol, 24, p.467, 2012)。

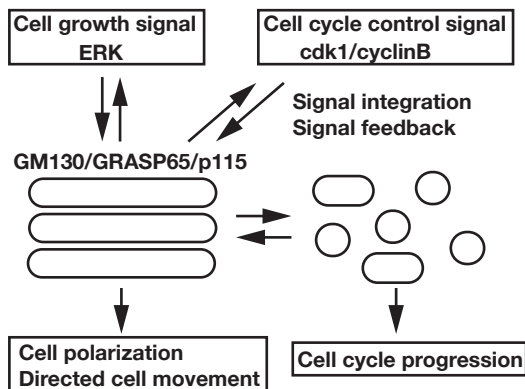


Fig. 1. Golgi appoints as a platform of signal transduction
The Golgi apparatus changes its structure and localization in response to the cell growth signal and the cell cycle control signal. Conversely, the information of the structure and the function of the Golgi apparatus feedback to the signal transduction pathway.

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・運動・増殖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。

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) である。GM130 は、p115 や GRASP65 などの結合タンパク質群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、これらのタンパク質群は先に述べた細胞増殖や細胞運動、極性輸送の調節にも重要な役割を果たしている。私達は、GM130 とその結合タンパク質群の機能解析により、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を理解することを目的として研究を進めてきた。

特に近年は、①GM130 の構造解析と、②ゼブラフィッシュを用いた GM130 の発生生物学的機能解析、③低 pH におけるゴルジ体分散の分子機構、④YIPF ファミリータンパク質の機能解析に重点的に取り組んでいる。

2. 本年度の研究成果

低 pH で引き起こされるゴルジ体の分散へのホスホリパーゼ A2 の関与について解析を行った。これまでにゴルジ体の構造に影響を与えるものとして、cPLA2 α (PLA2G4), iPLA2 γ (PLA2G6), PAFAH1b (PAFAH1B) の3種類のホスホリパーゼ A2 が報告されている。cPLA2 α , iPLA2 γ は単一分子からなり、PAFAH1b は α 1 (B3), α 2 (B2), β (B1) の3つの分子から構成されている。これらはいずれもゴルジ体から膜を管状に突出させ、ゴルジ体膜同士や他のコンパートメントとの融合を引き起こすことが報告されている。これらの PLA2 がゴルジ体の構造に与える影響はよくわかっていない。

HeLa 細胞のゴルジ体は低 pH 処理することによって顕著に分散する。PLA2 阻害剤を用いた研究からこの過程に PLA2 が関与することが示唆されていた。そこで私達は PLA2G4, PLA2G6, PAFAH1B1, PAFAH1B2, PAFAH1B3 の発現抑制によって低 pH 処理によるゴルジ体分散が抑制が見られるかどうかを検討した。その結果、PAFAH1B3 の発現抑制によってのみ顕著なゴルジ体分散抑制が観察された (Fig.2)。不思議なことに、PAFAH1b の他のサブユニットでは同様の効果は見られなかった。従って、低 pH によるゴルジ体の分散は、PAFAH1B3 サブユニットの機能を介した PAFAH1b の機

能によって引き起こされていることが示唆された(投稿中)。

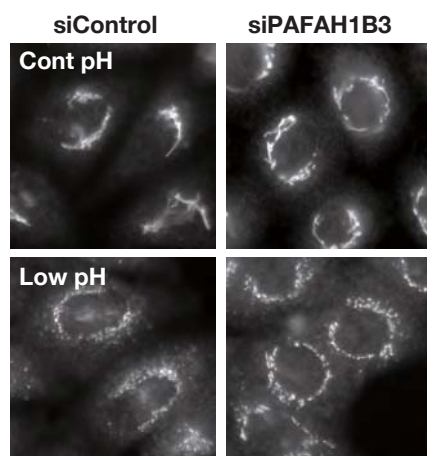


Fig. 2 Knockdown of PAFAH1B3 protect the Golgi apparatus from disassembly under low pH.

3. Research projects and annual reports

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 when it moves to a proper direction. 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.

The secretory pathway has to be activated to support active cell growth. In fact, we have shown that the Golgi apparatus functions as a platform of the growth signal transduction and cell cycle control and controls the activity of the secretory pathway in response to 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, the information of the activity of the Golgi apparatus may provide feedback to the signal transduction pathways (Fig. 1: 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.

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. Under these circumstances, we have been analyzing the function of GM130 and its binding proteins to obtain key information for understanding the regulatory mechanism of the Golgi structure and function and also the mechanism for the regulation of cellular functions by the Golgi apparatus.

We are now focusing on (1) the structural analysis of GM130 molecule, (2) the developmental analysis of GM130 functions using zebrafish as a model organism, (3) analysis of the molecular mechanism of the Golgi disassembly by low pH treatment and (4) analysis of the function of YIPF proteins.

This year, we have analyzed the role of phospholipase A2 in the Golgi disassembly by low pH treatment. It was reported that cPLA2 α (PLA2G4), iPLA2 γ (PLA2G6) and PAFAH1b (PAFAH1B) were involved in the structural and functional maintenance of the Golgi apparatus. PAFAH1b is composed of three subunits (B1, B2, B3) while other PLA2s are a single molecule. All of these PLA2s are reported to induce tubules from the Golgi apparatus and function to fuse with other Golgi fragments or with other secretory pathway organelles. We tried to knockdown these PLA2s and found that only PAFAH1B3 knockdown showed protection of the Golgi apparatus from fragmentation at the low pH (Fig. 2). Surprisingly, knockdown of other subunit of PAFAH1b did not protect the Golgi disassembly. Therefore, it was suggested that PAFAH1b induces the Golgi fragmentation in a B3 subunit dependent manner.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

Jeerawat Soonthornsit, Ryuichi Ishida, Nobuhiro Nakamura. Yip1 domain family members localizing in the trans-Golgi/ trans-Golgi network. 2013 "Molecular Membrane Biology" Gordon Research Conference, Proctor Academy, Andover, NH, USA. 2013.7.14-19

Yoko Yamaguchi, Daisuke Tamura, Jeerawat Soonthornsit, Ryuichi Ishida, and Nobuhiro Nakamura. Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus in a phospholipase A2 dependent manner. Golgi Symposium 2013, Bad Ischl, Austria. 2013.9.17-19

石田竜一, 中村暢宏. GM130複合体の構造解析. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2013.12.3-6



2013.10.12 @ GULAB Dining, Misonobashi Nishizume

6. 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: ゴルジ体に局在する5回膜貫通蛋白質群 YIPF の機能解明

研究代表者: 中村暢宏, 取得年度: H25-27年 (3年)

科学研究費補助金・新学術領域研究(上皮管腔形成)

課題名: 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, 取得年度: H24-25年 (2年)

2) 論文査読

Journal of Cell Science 1件

Genes to Cells 1件

3) 研究費審査

Assessment of research proposal, Research Grants Council, Hong Kong, China 1件

日本学術振興会 約70件

4) その他

第36回日本分子生物学会年会. ワークショップ「細胞機能場におけるプレイヤーの解析から見えてくる機能的ミッシングリンク」. オーガナイザー, 座長

神経回路発生研究室

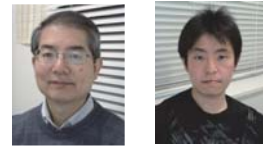
Laboratory of Neural Network Development

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、われわれが体を動かし、考え、意識をもつことができるのは、脳の複雑さの中に現在の知識を超えた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。私の研究室では、脳の個々の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を解明を目指している。このような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微小脳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じる。そして、より微視的には神経細胞間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、遺伝子変異の解析をもとに、特にシナプス間隙を介したシナプス分化の制御機構について研究を行っている。

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。シナプス間隙は神経機能の中心的役割を担うシナプスの一部であるが、そこにどのような分子が存在して神経の発生や機能に関与しているのか不明な点が多い。そこで、この問題を明らかにするために、本研究室では、シナプス間隙に存在する Hig タンパク質を解析の出発点として、分子から個体にいたる様々なレベルでの研究を行っている。

a) Hig タンパク質のシナプス間隙における機能の解明

活動性の低下を示す変異表現型の原因遺伝子として同定された *hikaru genki (hig)* 遺伝子の産物である Hig タンパク質は、分泌性でシナプス間隙に局在する(図1)。この Hig タンパク質のシナプス間隙における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。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。

b) 「シナプス間隙の生物学」の構築を目指して

Hig の他に新たなシナプス間隙分子を同定しシナプス間隙の構築機構を明らかにする。その一例として、Dig タンパク質を既に同定してきている(図2参照)。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。

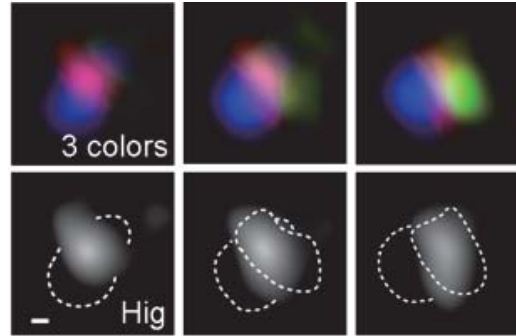


図1 Hig タンパク質のシナプス間隙への局在

SIM レーザ顕微鏡を用いた Z 軸上の連続写真。Hig (赤) がシナプス前部マーカー (青) とシナプス後部マーカー (緑) との間に挟まれている。スケールは 100 nm。

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 タンパク質がコリン作動性シナプスに局在する機構

Hig タンパク質はコリン作動性シナプスに局在するが、非コリン作動性神経でも発現している。そこで、グリア細胞で Hig を発現させたところ、細胞外に分泌した Hig は、コリン作動性シナプス間隙に捕捉されることが示された。このことは、この局在のために特異的な機構が働いていることを示唆する。そこで、アセチルコリン受容体 (AChR) サブユニットの変異体および RNAi を用いて Hig のシナプス局在量を調べたところ、少なくとも3種類のサブユニットが Hig のコリン作動性シナプス間隙への局在に関与していることが明らかとなった。

3) Hig タンパク質のシナプス間隙における機能

Hig タンパク質の欠損変異体は、活動性が低下しており、神経機能が低下していることが予想される。そこでその変異体の脳におけるシナプスタンパク質の局在を調べたところ、AChR サブユニットの Da6 と Da7 の量が減少し、一方、シナプス後部内の足場タンパク質である DLG が増加していた。すなわち、シナプス間隙に存在する Hig タンパ

ク質はシナプス後部タンパク質の編成に関わることが判明した。

4) *hig* 変異体は $D\alpha 6$ アゴニストであるスピノサドに対して耐性を示す

スピノサドは、 $D\alpha 6$ サブユニットに特異的に結合することにより、AChR チャンネルを恒常的に開口させ、昆虫を死に至らしめる。*hig* 変異体は、このスピノサドに対して耐性を示すことから、 $D\alpha 6$ を介した神経伝達が低下していることが示唆される。このことは、*hig* 変異体において $D\alpha 6$ の局在量が減少しているために生じている可能性がある。

5) *hig* 変異のサプレッサー変異の分離

hig 変異体は活動性が低下し、寿命が短くなるが、これらの表現型を回復させるサプレッサー変異の分離を試みた。その結果、2種の劣性変異を分離した。これらの変異は遺伝的解析により、同じ遺伝子上に生じている可能性が高い。原因遺伝子の同定により、Hig と関連した新たな因子を同定することが期待される。現在、1種類のサプレッサー変異体に対して全ゲノム配列決定を行っている。

以上、今年度は、Hig がコリン作動性シナプス間隙に特異的に局在し、シナプス後部に存在する AChR サブユニット $D\alpha 6$ と $D\alpha 7$ および足場タンパク質 DLG の局在を制御しているという、Hig の機能についての重要な結果を得ることができた(図2、中山ら 投稿準備中)。中枢のコリン作動性シナプス間隙に特異的に局在するマトリックスタンパク質の研究は、本研究が初めての例であり、この分野にインパクトをもたらすことが期待される。

なお、スピノサドに対する耐性実験およびサプレッサー変異の分離については、4回生の松下史弥君、松下知樹君がそれぞれ大きな貢献をしてくれた。

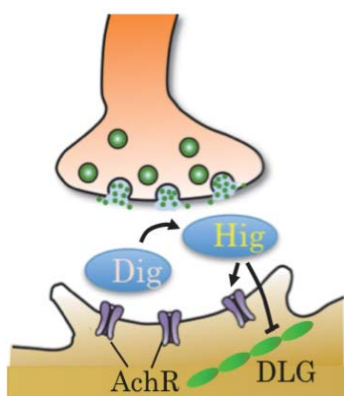


図2 Hig がコリン作動性シナプス間隙に局在するためには、Dig が必要である。Hig は、シナプス後部における DLG の局在を抑える一方、AChR サブユニットの局在を促進する。

3. Research projects and annual reports

How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We are studying molecular mechanisms underlying neuronal events that occur during nervous system

development, and also trying to understand a genetic program that globally organizes 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 the size of a human brain. Our research, based on the analysis of the mutants that show either a behavioral or morphological phenotype, is currently focused on the mechanisms for synaptic differentiation.

Research Project:

A role for Hig protein in the synaptic clefts.

The *hig* (*hikaru geneki*) gene, identified by a mutant phenotype of reduced locomotor activity (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. One of our research aims is to reveal the functional relationships between Hig and the human protein.

Annual reports:

A matrix protein Hikaru genki localizes to the cholinergic synaptic clefts and regulates the postsynaptic organization in the Drosophila brain

The synaptic cleft is a crucial space for neurotransmission and serves as an interface that provides extracellular scaffolds and signals for the differentiation or maintenance of presynaptic and postsynaptic terminals. Albeit a number of molecules that constitute either terminals have been studied, little is known about the proteins that are present in the synaptic cleft matrix, especially in the central nervous system (CNS). We report that Hikaru genki (Hig), a secreted protein with an Ig motif and CCP (Complement Control Protein) domains, localizes specifically to the synaptic clefts of cholinergic synapses in the *Drosophila* CNS. Our data indicate that this specific localization of Hig is achieved by trapping of secreted and diffused Hig to the synaptic clefts even when it is ectopically expressed in non-cholinergic neurons and glia. Notably, in the absence of Hig, an intracellular scaffold protein DLG was abnormally accumulated in the cholinergic postsynapses, while the synaptic distribution of acetylcholine receptor (AChR) subunits $D\alpha 6$ and $D\alpha 7$ were significantly decreased. Consistently, the *hig* mutant flies showed resistance to an AChR agonist, spinosad, which causes lethality by activating specifically $D\alpha 6$ among AChR subunits, suggesting that the loss of Hig compromises the synaptic activity mediated by $D\alpha 6$. These results indicate that Hig is a specific component of synaptic cleft matrix for cholinergic synapses and regulates the postsynaptic organization in the CNS.

4. 論文・著書など

なし

5. 学会発表など

Hikaru genki protein, localized to the synaptic clefts, is required for the normal function of cholinergic synapses.

Minoru Nakayama and Chihiro Hama

第36回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2013. 12.3 - 6

6. 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



糖質生物学研究室

Laboratory of Glycobiology

1. 研究概要

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

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

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

教授 福井 成行

Prof. Shigeyuki Fukui,Ph.D



ために、ポリラクタサミン鎖の発現量が少なかったことが明らかとなった。

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

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

そこで現在は、1) CD24 が癌細胞を含めて未分化細胞に発現されることから、CD24 の発現を抑制した時の分化過程への影響に興味を持たれる。そこで、RNAi 法を用いて PC12 細胞の CD24 発現を抑制させて NGF 刺激による PC12 細胞のニューロンへの分化の影響を観察する。また、NGF の受容体結合によるシグナル伝達に及ぼす CD24 の役割も追及する。2) ポリラクタサミン鎖以外に、CD24 分子上には様々な糖鎖が結合している。それら糖鎖の役割を追及するために、CD24 から分離した糖鎖をネオグリコリピド化し、糖鎖マイクロアレイ法に應用して、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、特にポリラクタサミン糖鎖と相互作用する生体物質を同定する。3) 免疫系の B-細胞に関して、鳥類では骨髄で生まれた未熟 B-細胞は縦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

キウス囊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球由来の株細胞である DT-40 から CD24 の精製を試みている。現在までのところ、ニワトリ CD24 は、マウス、ラット CD24 と同様に GPI アンカーをもつ膜タンパク質であることが分かったが、マウス、ラット CD24 の分離の場合と異なり、有機溶媒に不溶であった。精製の程度は不明であるが、分離した CD24 を使用して、糖鎖マイクロアレイの技術を用いて、レクチン MAA と SNA による結合シグナルを探り、シアル酸残基の結合様式を探索している。

2. 本年度の研究成果

1) CD24 は GPI アンカー型糖タンパク質であり、物理的な性状が糖脂質のそれと類似することから、有機溶媒を用いた精製方法を用いることで効率よく分離できることを明らかとした。また、この性質から、CD24 は糖鎖マイクロアレイ法に直接応用できた。糖鎖マイクロアレイの結果から PC12 細胞由来の CD24 は、ポリラクトサミン糖鎖以外に、 α 2,3 結合や α 2,6 結合したシアル酸、fucose 含有糖鎖などを含む多様性に富む分子であることが明らかになった。興味深いことに、CD24 は由来する組織によってポリラクトサミン糖のみならず糖鎖の構成を異にしていた。2) CD24 分子に結合しているポリラクトサミン鎖は N-グリコシド型糖鎖に結合していること。3) 実験に用いた抗 CD24 モノクローナル抗体の抗原決定基は、ラットとマウスの CD24 のアミノ酸配列の違いから、N-末端 11~13 番目の Asn-Gln (N-glycan bearing) Asn の領域と推定されていたが、13 番目の Asn にフコースの結合したキトビオース構造も含まれることが分かった。4) ニワトリ白血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- β -galactosidase. The amino acid sequence analysis of 62kDa PL-GP quite resembled that of rat CD24.

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

To explore the role of CD24 in an infection of A-type influenza virus, anti-serum against chicken CD24 was constructed using some polypeptides that 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

なし

5. 学会発表

なし

6. その他特記事項

なし

発生システム研究室

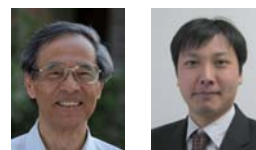
Laboratory of Developmental Systems

教授 八杉 貞雄

Prof. Sadao Yasugi, Ph.D

助教 石井 泰雄

Assist. Prof. Yasuo Ishii, Ph.D



1. 研究概要

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、眼、生殖腺、ニワトリ胚およびアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の心臓である。

(1) 消化器官の平滑筋分化に関する研究

昨年に引き続き、消化器官平滑筋の器官ごとに固有の配置を制御す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を明らかにするために、小腸幹細胞の特異的マーカー遺伝子である *Lgr5* その他の遺伝子の発現を、発生過程を追って観察した。

(3) ニワトリ胚生殖腺の発生に関する研究

鳥類の生殖腺は、雌の卵巣が右側で退化するという顕著な現象を示す。そのしくみを探る研究を行った。

(4) 心臓の発生に関する研究

冠動脈の主な起源である心外膜原基が心臓に融合するしくみを探るとともに、冠動脈形成を促進する液性因子の探索および解析に必要なリソースの整備を行った。

(5) 眼の形態形成に関する研究

眼の基本構造を生み出す形態形成運動に異常を示す二種類の鳥類胚モデルを用い、その細胞学および分子生物学的機構の探索を行った。

(6) 眼の網膜の領域化に関する研究

眼の網膜は、光を受容する神経性網膜とそうでない網膜色素上皮を有するが、それらはともに神経管の一部である眼胞から生じる。眼胞の領域化に関わる転写因子遺伝子群の機能解析を行った。

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

消化器官の平滑筋は、器官ごとにその配置が異なっている。例えば鳥類の前胃では2層の粘膜筋板、1層の輪走筋、1層の縦走筋からなるが、小腸では粘膜筋板を欠いている。このような器官固有の平滑筋層が形成されるしくみを明らかにするために、近縁のニワトリとウズラを用いて、初期胚における移植実験を行った。ウズラの予定前胃領域の中胚葉（後に結合組織と平滑筋に分化）をニワトリの予定腸領域に移植すると、移植された中胚

葉からは前胃とも腸とも異なる平滑筋層が形成され、予定腸領域の中胚葉を予定前胃領域に移植すると、前胃タイプの平滑筋層が形成された。これらの結果は、器官固有の平滑筋層の形成が、その領域の上皮あるいは結合組織などの環境要因によって制御されることを示唆している。

(2) 消化器官幹細胞に関する研究

昨年、*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、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分化することを示した。本年度は、これ以外に *Ascl2* や *Olfm4* などの、小腸幹細胞特異的に発現する遺伝子について同様に発生過程における発現を検討した。その結果、*Lgr5* 以外の遺伝子は、胚発生期間には絨毛の下部に広く発現が見られることが明らかになった（図1）。このことから我々は、*Ascl2* や *Olfm4* は分化途上の絨毛上皮では必ずしも小腸幹細胞の特異的マーカーとはいえ、*Lgr5* を発現する幹細胞は発生後期にこれらの遺伝子を発現する細胞の中から、おそらくは陰窩に局在する Wnt 産生細胞などの影響によって分化する、という仮説を提唱した。

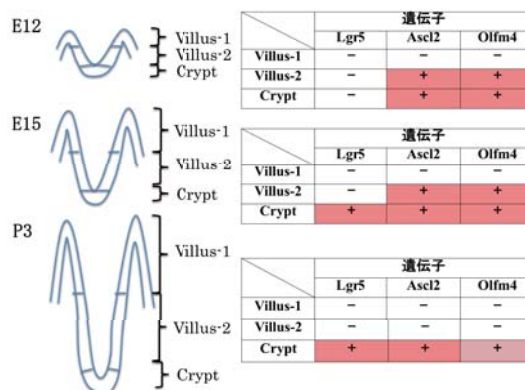


図1 発生過程の小腸における遺伝子発現の変化

(3) ニワトリ胚生殖腺の発生に関する研究

鳥類の雌の右卵巣が退化する原因が、アポトーシスによるのではないかという仮説を検証するために、胚発生期間におけるニワトリ生殖腺について Tunel 法でアポトーシスを検出したが、左右の卵巣原基で特に顕著な差は

認められなかった。このことから、左右で異なる発生のしくみはアポトーシス以外によることが示唆された。

(4) 心臓の発生に関する研究

心臓の心外膜と冠動脈は、心外膜原基と呼ばれる心臓の外に生じる突起状の前駆細胞集団が、拍動を開始した心臓に後から付け加わることによって生じる(図 2A, B)。そのしくみに関しては未だ不明な点が多い。

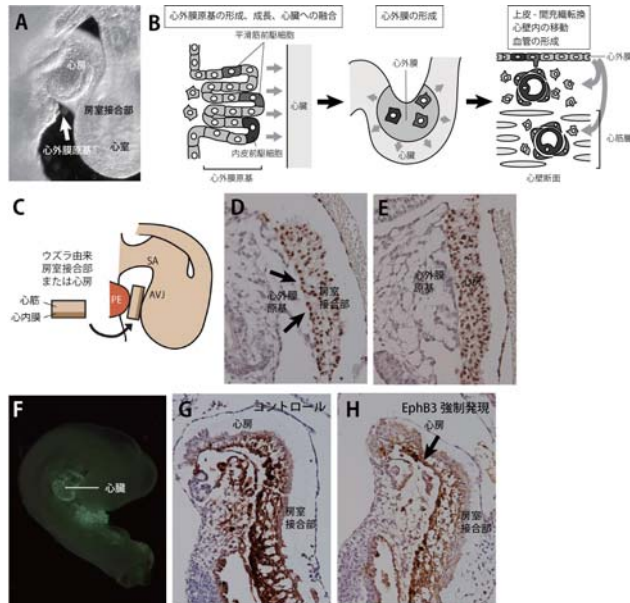


図 2 (A) 心外膜原基。心房の近くに生じる中胚葉性の突起として認められる。(B)心外膜原基は、心臓への融合を含むいくつもの段階を経て、心外膜と冠動脈を形成する。(C-E) 移植実験。心外膜原基の移植片への融合は、心房 (E)を用いた時よりも房室接合部 (D)を用いた時に高い頻度で起こる (D, 矢印)。(F) In ovo リポフェクションにより導入した EGFP 遺伝子の発現。(G)EGFPのみを発現させたコントロール胚では、心外膜原基の融合が房室接合部でのみ起こる。(H) EphB3 を強制発現させた胚では本来起こらない心房への融合が見られる (矢印)。

心外膜原基は必ず、心房と心室の間に位置する房室接合部に融合するが、その融合は同じく近傍に位置する心房では起こらない。このことから、房室接合部からの接触依存性のシグナル伝達が、心外膜原基の融合を引き起こす可能性が考えられた。その仮説を検証するため移植実験を行い(図 2C)、房室接合部と心房の間で、心外膜原基の融合を促進(あるいは許容)する能力に差があることを明らかにした。このような心臓の領域特異性に直接関わる分子を同定するため、マイクロアレイ法および in situ ハイブリダイゼーション法による網羅的発現解析を行い、膜結合型シグナル伝達分子 EphB3 および細胞接着分子 VCAM-1 が、房室接合部に高レベルに発現することを見いだした。In ovo リポフェクション法を改良し、EphB3 を心臓の広い範囲で強制発現させたところ、一部の胚で

心外膜原基の心房への融合が認められた(図 2F-H)。現在、この結果のさらなる検証を進めるとともに、VCAM-1をはじめとする他の候補因子の機能解析を行っている。

冠動脈の走行決定機構の解明は、虚血性心疾患の新たな予防法、治療法の開発にもつながる。冠動脈の形成は、心外膜原基の形成に始まる数多くのステップからなる。それらのうちどれが冠動脈の走行決定に直接関与しているか示唆を得るため、冠動脈を持たない両生類(アフリカツメガエル, 図 3)の胚期および成体心臓の観察を行った。心外膜原基マーカーである Tbx18 と Wt1 の発現が胚期心臓で検出され、羊膜類の心臓と同様、アフリカツメガエルの胚期心臓でも、心外膜原基の心臓への融合が起こっていることが示唆された。しかしアフリカツメガエルの心臓は、成体でも心外膜下の結合組織をほとんど持たないことがわかった(図 3)。これはアフリカツメガエルの心臓では、冠動脈の形成に必要な心外膜から心壁内部への細胞の移動が十分に起こっていないことを示唆しており、羊膜類においても、冠動脈形成細胞の移動を制御することが、冠動脈の走行を決定する鍵となっている可能性が考えられる。我々は、in vitro 組織培養の系において、BMP2, FGF2, PDGF-BB, VEGF, TGF- β 1, TGF- β 2 といった液性シグナル分子が、ニワトリ心外膜原基細胞の移動あるいは遊走を促進することを明らかにしている(Ishii et al., 2010)。これらの因子が、実際に胚体内において、細胞の移動制御を介して血管形成を促進するかどうかを明らかにするため、上記液性分子を強制発現させるためのトランスポゾンベクターを作製した。

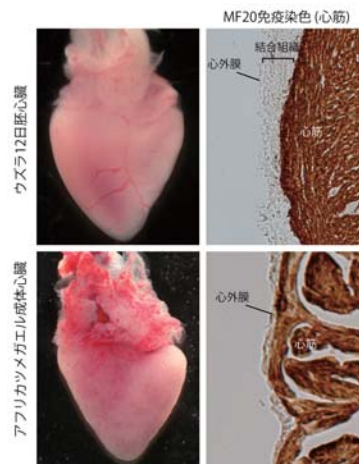


図 3 鳥類(ウズラ)心臓とアフリカツメガエル心臓の比較。アフリカツメガエルの心臓には、冠動脈と心外膜下の結合組織層が見られない。

(5) 眼の形態形成に関する研究

脊椎動物の眼は、水晶体を通った光を杯状の網膜が受容する構造になっている。このような眼の基本構造は、眼の形成過程で、網膜原基である眼胞と水晶体原基である予定レンズ外胚葉が、胚の内側に向かって陥入することによって作られる。眼の陥入が起こる直前のニワトリ

胚頭部を、低温(29-30℃)あるいはRho シグナル伝達阻害剤 Y-27632 の存在下で培養すると、眼の陥入が阻害される(図 4)。我々は、これら形態異常胚における遺伝子発現、細胞増殖、細胞死、形態形成制御因子の分布を解析し、細胞極性制御因子 Par3 および aPKC、細胞接着に關与する N-cadherin および β -カテニンの予定レンズ外胚葉における分布に異常が見られることを明らかにした。このような局在異常は眼胞側には認められず、これまであまり注目されてこなかった眼の陥入におけるレンズ外胚葉の重要性を示唆する結果となった。

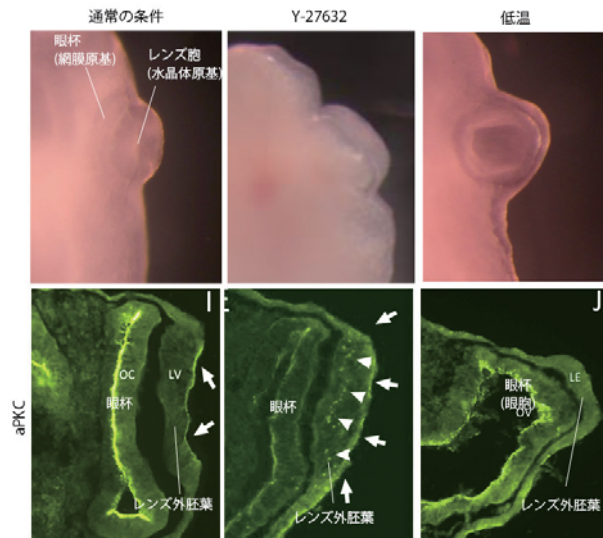


図 4 Rho シグナル伝達阻害剤 Y-27632 の存在下および低温で起こる眼の形態形成異常と aPKC の局在。眼の陥入が起こる通常の培養条件では、レンズ外胚葉の頂端に近いところに aPKC の強いシグナルが検出される(矢印)。Y-27632 を投与した眼では、眼の陥入が阻害されるとともに、aPKC のスポット状のシグナルがレンズ外胚葉の基底側に近い部分に検出される(矢じり)。低温で発生させた頭部では、眼が外側へと突出し、aPKC シグナルの明瞭な局在は見られない。

(6) 眼の網膜の領域化に関する研究

網膜原基である眼胞からは、光受容細胞やニューロンをもつ神経性網膜とそうでない網膜色素上皮を生じる。このような眼胞の領域特異的分化は、周囲の組織からの誘導に依存して起こるが、誘導作用の下流で細胞自律的に運命決定にはたらく遺伝子ネットワークに関する情報は、現在のところ極めて限られている。我々は、ニワトリの予定神経性網膜に特異的に発現する 4 つの転写因子遺伝子 (Chx10, Optx2, Six3, Rx1) に着目し、それぞれを *in ovo* エレクトロポレーション法を用いて、予定色素上皮に強制的に発現させた。結果、Chx10 が色素上皮の発生運命を神経性網膜へと変えるはたらきをもつことがわかった。この運命転換は、同様のはたらきが既に報告されている Sox2 (Ishii et al., 2009) の発現上昇を伴っており、Chx10 が、下流の Sox2 とともに、眼胞のパタ

ーン形成に重要な遺伝子ネットワークの構成メンバーであることが示唆された。

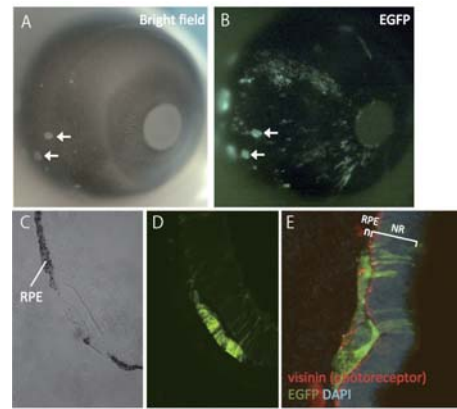


図 5 Chx10 を予定色素上皮で強制発現させると、色素上皮の分化が抑制されるとともに(A-D)、異所的な神経分化が起こる(E)。

3. Research projects and annual reports

In the laboratory of Developmental Systems, the molecular biological, cell biological and histological aspects of organogenesis are being studied. The main targets of the study are digestive organs, heart and gonad of the chicken and *Xenopus* embryos.

(1) Smooth muscle layers of the digestive organs

Digestive organs in the vertebrates have specifically arranged smooth muscle layers important for the transport of food through the gut. We analyzed the effects of environmental factors on the differentiation of muscle layers.

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

To analyze the derivation and localization of stem cells in the intestine during the development we studied the expression of stem cell-specific markers, *Lgr5*, *Sscl2* and *Flm4* genes, during the intestinal development.

(3) Degeneration of right ovary in female chick embryo

Avian ovary provides an interesting example of left-right asymmetric development of organs. We analyzed the occurrence of apoptosis during the development of ovary.

(4) Heart

An important origin of coronary vessels in the heart, which supply oxygen and nutrients to the entire myocardium, is an extracardiac rudiment called the proepicardium (PE). We studied tissue interactions that control fusion of the PE to the heart and molecular basis of these interactions. We also established techniques and molecular tools necessary to study roles of soluble signaling molecules in coronary vessel formation in the maturing heart.

(5) Eye morphogenesis

A cup-like morphology of the eye is a feature shared by most vertebrate species. This basic structure is generated through coordinated invagination of the optic vesicle and the lens ectoderm. We explored molecular and cellular basis of this morphogenetic event, using two avian models that exhibit failed invagination of the eye.

(5) Patterning of the retinal primordium

During eye development the multipotential primordium of the retina, the optic vesicle, is patterned into the neural retina and the retinal pigmented epithelium. Using *in ovo* electroporation, we analyzed functions of transcription factor genes implicated in this patterning event.

Results

(1) Smooth muscle layers of the digestive organs

We analyzed the effect of the epithelium on the arrangements of smooth muscle layers by implanting mesodermal fragments into heterologous presumptive digestive areas. When presumptive stomach mesoderm was transplanted into presumptive intestinal area, mesoderm differentiated muscle layers not identical to those of stomach or intestine. Presumptive intestinal mesoderm formed muscle layers very similar to those of stomach. Thus the developmental fate of the mesoderm is thought to be affected by the environmental factors.

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

Last year we cloned chicken *Lgr5* and *Hairy1* genes and revealed that *Lgr5*-positive cells first appeared on day 15 of incubation at the base of the villi. This year we further investigated the expression of *Ascl2* and *Flm4* genes that are expressed in adult stem cells. These genes are expressed rather widely in the lower half of the villi during the development, and become restricted to the crypt after hatch. Thus the expression of these genes is not specific to the stem cells expressing *Lgr5* gene, at least in the course of development.

(3) Degeneration of right ovary in female chick embryo

To assess whether apoptosis is responsible for the degeneration of right ovary in chick embryo, we detected apoptosis by TUNEL method from day 5 to 20 of embryonic development. However, apoptosis was very rare and there was no difference in its occurrence between left and right ovaries. Therefore, we concluded that apoptosis is not the direct cause of degeneration of right ovary.

(4) Heart

The epicardium and coronary vessels of the heart originate from an extracardiac rudiment called the proepicardium (PE). Although the fusion of the PE to the heart is critical for coronary vessel formation, its mechanisms remain unclear.

The PE always fuses to the atrioventricular junction (AVJ) of the heart, but not to the sinoatrium (SA) despite its proximity to the PE. We therefore hypothesized that a short-range paracrine signal(s) from the AVJ triggers the fusion of the PE to this specific region of the heart. To test this hypothesis, we carried out *in vivo* implantation assay. An AVJ segment isolated from a donor quail embryo was implanted into a chick host carefully, so that the host-derived PE maintains a contact with the outer surface of implanted AVJ. Our histological analysis demonstrated that the fusion of the PE to the implanted heart segment occurs within two hours and that this fusion occurs preferentially to the AVJ (86%), rather than the SA (17%), providing evidence that AVJ and SA differ in capability to induce (or permit) the PE fusion. To gain insights into molecular basis of this regional difference, we carried out microarray analysis and *in situ* hybridization screening of candidate genes, and identified *EphB3*, which encodes a membrane-bound tyrosine kinase receptor, and *Vcam1*, which encodes a cell adhesion molecule, as genes expressed preferentially in the AVJ. Using an improved protocol of *in ovo* lipofection, we are currently testing a potential role of *EphB3* in controlling the site of the PE fusion within the heart.

Major branches of coronary arteries show a stereotypic distribution within the heart. Understanding mechanisms underlying formation of this pattern will provide a foundation for rational therapeutics of coronary disorders, including ischemic cardiac disease. Coronary vessels develop via multiple steps, including induction and growth of the PE, the fusion of the PE to the heart, the epicardial coverage of the heart and epithelial-to-mesenchymal transformation of epicardial cells. To gain insights into key steps of coronary vessel formation, we examined development of *Xenopus* heart, which lacks coronary vessels. Expression of *Tbx18* and Wilms' tumor-1 (*Wt1*), markers for the PE and epicardium, was detectable in or around the heart at stages when the PE develops and fuses to the heart. However, we obtained no clear evidence for the presence of subepicardial connective tissue even in the adult heart, suggesting that reduced epicardial EMT correlates with lack of coronary vessels in the amphibian heart.

The above information led us to hypothesize that distribution pattern of coronary vessels in amniote hearts is affected by the epicardial EMT. We have previously shown that soluble signaling molecules, BMP2, FGF2, PDGF-BB, VEGF, TGF- β 1, TGF- β 2, promote migration of cultured PE-derived cells (Ishii et al., 2010). To test potential roles of these factors in promoting coronary vessels formation in vivo, we generated transposon-based expression vectors.

(5) Eye morphogenesis

The eye in vertebrates has a cup-like retina and a vesicular lens. This basic morphology is generated through coordinated invagination of the optic vesicle and lens ectoderm. We found that the head of chick embryos isolated at embryonic day 2 and cultured in vitro generates invaginating eyes but fails to do so if cultured at a low temperature (29-30°C) or in the presence of a Rho-signaling inhibitor Y-27632. Although this abnormality was not associated with obvious changes in cell proliferation, cell death and expression of developmental genes, cell polarity regulators, Par3 and aPKC, and cell-adhesion related proteins, N-cadherin and β -catenin, exhibited abnormal distributions along the apicobasal axis of the lens ectoderm. Interestingly, such abnormality was not seen in the optic vesicle. The data highlight the significance of the lens ectoderm in generating cup-like eye as a whole.

(6) Patterning of the retinal primordium

In vertebrates the retina develops from a part of the forebrain, the optic vesicle. The distal portion of the optic vesicle (OV) mainly gives rise to the light-sensitive neural retina (NR), whereas its proximal part differentiates into the retinal pigmented epithelium (RPE). While it is well-established that the patterning of the OV into NR and RPE domains depends on paracrine signals from the surrounding tissues, such as the lens and cranial mesenchyme, little is known about the gene regulatory networks underlying this patterning event. Transcription factor genes, Chx10, Optx2, Six3, Rx1, are all expressed in the presumptive NR but not in the RPE. We misexpressed these genes in the presumptive RPE ectopically, using in ovo electroporation in combination with a transposon-mediated gene transfer, and identified Chx10 as a gene capable of inhibiting RPE pigmentation. This inhibition was associated with ectopic NR-like differentiation and ectopic expression of a neural stem cell marker Sox2. Our data suggest that Chx10, as well as its downstream gene Sox2, is an important component of a gene regulatory network that regulate OV cell fate in a cell autonomous manner.

4. 論文・著書

- 八杉貞雄：ヒトを理解するための生物学. 裳華房, 2013. 9. 10.
八杉貞雄：スター生物学 (C. Starr, C. A. Evers, L. Starr著), 東京化学同人, 2013. 10. 30.

5. 学会発表

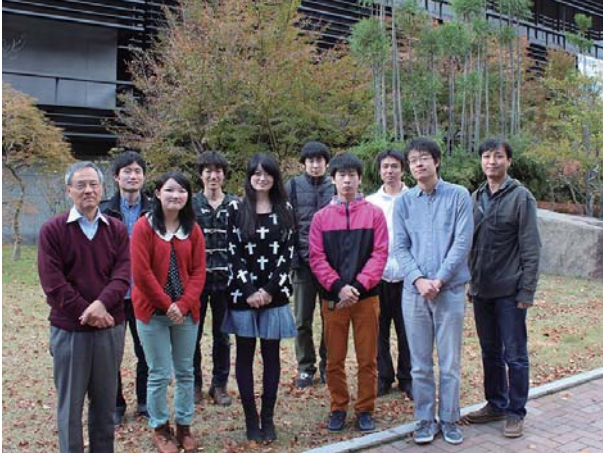
- 八杉貞雄 (2013) 消化器官の発生機構. 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 発生生物学リカレント講座, 神戸市, 2013. 10. 6. (招待講演)
八杉貞雄 (2013) 動物の形作りの謎. 日本動物学会近畿支部講演会. 京都産業大学むすびわざ館. 2013. 11. 16. (招待講演)
Ishii, Y., Fujimoto, K., Yasugi, S.: Expression of *Eph/ephrin* family genes in smooth muscle of the embryonic chicken digestive organs. 46th Ann. Meeting for Jap. Soc. Develop. Biol., Matsue, 2013. 5. 28.
石井泰雄, 芦田航, 藤本聖恵, 八杉貞雄: ニワトリ胚消化管平滑筋組織における *Eph/ephrin* 遺伝子の発現. 日仏生物学会第 178 回例会、東京、2013. 6. 8.
石井泰雄, 角田洋平, 八杉貞雄, 三川隆: 心臓の発生過程における冠動脈幹細胞の進入機構. 日仏生物学会第 179 回例会、仙台、2013. 11. 30.
八杉貞雄, 芦田航, 石井泰雄: ニワトリ胚の消化器官特異的な平滑筋層形成. 日仏生物学会第 179 回例会、仙台、2013. 11. 30.

6. 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: 洛西高等学校模擬授業. 2013. 6. 10.
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、2013. 10. 5-6.
八杉貞雄: 日本動物学会近畿支部講演会「動物の形作りの謎をとく」オーガナイザー. 2013. 11. 6.
八杉貞雄: 日仏生物学会幹事
八杉貞雄: 日本発生生物学学会機関誌編集委員
八杉貞雄: 日本動物学会歴史資料保存委員会委員
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. その他 なし



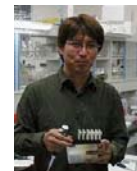
研究室メンバーの写真

膜エネルギー代謝分野

Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism

教授 横山 謙

Prof. Ken Yokoyama, Ph. D



1. 研究概要

生命の維持にはエネルギーが必要である。生命がエネルギー作り出す仕組みを研究するのが、生体エネルギー学 (Bioenergetics) である。生命のエネルギー通貨である ATP の大部分は、呼吸による酸化的リン酸化により効率よく作られる。我々の体では、細胞内器官であるミトコンドリアに存在する呼吸鎖酵素群がその役割を担っている。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、回転輸送体である V-ATPase による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。

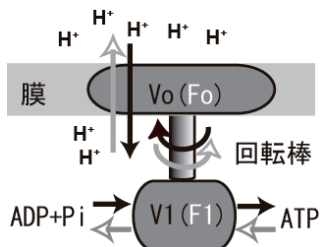


図 1 回転分子モーターの模式図。回転運動を介して水素イオンの輸送と化学反応を結びつけている。

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や、インシュリン分泌等の重要な生命現象と深い関係がある。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 ATP と老化・寿命および、麻酔の作用機構等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) ATP を介した生命現象の発見と理解

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。また、麻酔機構と ATP 濃度変化との関連についても研究を進めている。

3) 分子デザインによる膜輸送体機構の理解

従来の研究は、調べることに重点が置かれていた。操作し造ることで V-ATPase に代表される膜輸送体の分子機構解明を進める。ドメイン交換や遺伝子全合成により、新規の分子モーターや膜輸送体を作製する。

2. 本年度の研究成果

1) ADP 阻害機構の分子基盤の解明

V-ATPase には ATP 合成型と イオンポンプ型が存在する。好熱菌 *Thermus thermophilus* V-ATPase は合成型であり、ADP 阻害型になることで ATP 分解が阻害される。イオンポンプ型の V-ATPase では ADP 阻害が見られない。つまり、ADP 阻害は、V-ATPase の生理機能を決定する重要な分子機構といえる。ドメイン交換の手法により、ADP 阻害を決める因子を探索した。ヌクレオチド結合部位を交換しただけでは、ADP 阻害感受性が残る。C 末領域をセットで交換すると ADP 阻害非感受性になった。ATP 合成実験により、ADP 阻害に非感受性の V-ATPase ではリン酸に対するアフィニティーが上昇していることがわかった。以上の実験から、ヌクレオチド結合領域と C 末領域が相互作用することにより、リン酸に対するアフィニティーが変化し、ADP 阻害への感受性が決められることがわかった。

2) 軸サブユニットの起源の探索

V-ATPase は、一次配列や構造比較から、同じく回転分子モーターである F_0F_1 やべん毛複合体と同じ進化系統樹上にあることが知られている。べん毛複合体を構成するサブユニットである FliJ が D サブユニットに構造が似ていることに着目し、中心回転軸の進化的な関係を明

らかにすることを目的とした。FliJ を A₃B₃ リングと再構成させたところ、リングの中央にささり、キメラ複合体を形成した。1分子観察では、FliJ は回転様の動きをするが、1方向の回転は示さなかった。このことから、FliJ は回転軸としては不完全であることが分かった。そこで、D サブユニットのループ領域を除いた FliJ-like (JL) を構築し、1分子観察を行ったところ、1方向の回転が観察された。これらの結果から、FliJ のような逆並行のコイルドコイル構造が回転軸として機能することが分かった。FliJ のような共通の祖先から、V₁ の DF のような2つのサブユニットからなる回転軸に進化し、その後、遺伝子融合することで F₁ の γ のような回転軸に進化していったと考えられる。

3) ATP と麻酔作用

線虫の固定に使用する麻酔剤により、線虫1個体あたりの ATP 量が減少することが、偶然わかった。他の麻酔剤でも同様の ATP 減少が起こることを発見した。また、細胞でも麻酔剤により ATP 量が大幅に減少することがわかった。神経細胞内の ATP 濃度を下げることで麻酔効果が発揮される可能性が示唆された。

3. Research projects and annual reports

1. Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase.

Reduction of ATP hydrolysis activity of V type ATPase/synthase (V₀V₁) as a result of ADP-inhibition occurs as part of the normal mechanism of V₀V₁ of *Thermus thermophilus*, but not V₀V₁ of *Enterococcus hirae* or eukaryotes. To investigate the molecular basis for this difference, domain swapped chimeric V₁ consisting of both *T. thermophilus* and *E. hirae* enzymes were generated and their function analyzed. The data showed that the interaction between the nucleotide binding and C terminal domains of the catalytic A subunit from *E. hirae* V₁ is central to increasing binding affinity of the chimeric V₁ for phosphate, resulting in reduction of the ADP-inhibition. These findings together with a comparison of the crystal structures of *T. thermophilus* V₁ with *E. hirae* V₁ strongly suggest that the A subunit adopts a different conformation in *T. thermophilus* V₁ from that in *E. hirae* V₁. This key difference results in ADP inhibition of *T. thermophilus* V₁ by abolishing the binding affinity for phosphate during ATP hydrolysis.

2. Common evolutionary origin for the rotor domain of rotary ATPases and flagellar protein export apparatus.

The V1- and F1- rotary ATPases contain a rotor that rotates against a catalytic A3B3 or α3β3 stator. The rotor F(1-γ) or V1-DF is composed of both anti-parallel coiled coil and globular-loop parts. The bacterial flagellar type III export apparatus contains a V1/F1-like ATPase ring structure composed of FliH6 homo-hexamer and FliJ which adopts an

anti-parallel coiled coil structure without the globular-loop part. Here we report that FliJ of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium shows a rotor like function in *Thermus thermophilus* A3B3 based on both biochemical and structural analysis. Single molecular analysis indicates that an anti-parallel coiled-coil structure protein (FliJ structure protein) functions as a rotor in A3B3. A rotary ATPase possessing an F1-γ-like protein generated by fusion of the D and F subunits of V1 rotates, suggesting F(1-γ) could be the result of a fusion of the genes encoding two separate rotor subunits. Together with sequence comparison among the globular part proteins, the data strongly suggest that the rotor domains of the rotary ATPases and the flagellar export apparatus share a common evolutionary origin.

3. ATP sensing system in whole nematode

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is the major energy currency of all living organisms. Despite its important functions, the spatiotemporal dynamics of ATP levels inside living multicellular organisms is unclear. In this study, we modified the genetically encoded Förster resonance energy transfer (FRET)-based ATP biosensor ATeam to optimize its affinity at low temperatures. This new biosensor, AT1.03NL, detected ATP changes inside *Caenorhabditis elegans* cells more sensitively than the original biosensor did, at 25 °C. By expressing AT1.03NL in *Caenorhabditis elegans*, we succeeded in imaging the in vivo ATP dynamics of these model animals at single-cell resolution. that ATeam is available for detection of ATP levels change in nematode cells.

4. 論文・著書等 *Corresponding author

1. Tani K., Arthur C., Tamakoshi M., Yokoyama K., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y., *Gerle C., Visualization of Two distinct states of disassembly in the bacterial V-ATPase from *Thermus thermophilus*. **Microscopy**. Vol. 62(4) pp467-474
2. Kishikawa J., Ibuki T., Nakamura S., Nakanishi A., Minamino T., Miyata T., Namba K., Konno H., Ueno H., *Imada K., *Yokoyama K. "Common evolutionary origin for the rotor domain of rotary ATPases and Flagellar protein export apparatus." **PLoS One** Vol. 8(5) e64695
3. Tsuyama T., Kishikawa J., Han Y.W., Harada Y., Tsubouchi A., Noji H., Kakizuka A., Yokoyama K., Uemura T., *Imamura H. "In vivo fluorescent ATP imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis*

elegans by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures.” **Anal. Chem.** Vol. 85(16) pp7889-7896

4. Kishikawa J., Nakanishi A., Furuike S., Tamakoshi M., *Yokoyama K. “Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase.” **J. Biol. Chem.** Vol. 289(1) pp403-412

5. タンパク質構造研究 化学同人 岩田想 編 Chapter 22, pp187-195 横山謙、古池晶、岸川淳一 (総説)

6. Sexual Reproduction in Animals and Plants. Springer Japan, Part2-16, Ijiri T.W., Kishikawa J., Imamura H, Iwao Y., Yokoyama K., Sato K. (著書)

5. 学会発表・招待講演

岸川淳一, 横山謙: V型回転分子モーターの合成型と分解型をわける分子基盤. 第三回分子モーター討論会, 東大, 7.19-20 (招待講演)

J. Kishikawa, A. Nakanishi, S. Furuike, M. Tamakoshi K. Yokoyama: Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase. 第86回日本生化学会大会, 横浜市, 9.11-13

中西温子, 岸川淳一, 横山謙: V-ATPase の中心回転軸におけるトルク伝達機構, 第86回日本生化学会大会, 横浜市, 9.11-13

J. Kishikawa, A. Seino, A. Nakanishi, N.E. Tirtom, H. Noji, K. Yokoyama, K. Hayashi: F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase. The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, Japan, 10.28-30

T.W. Ijiri, J. Kishikawa, H. Imamura, M. Sakiie, S. Ueno, Y. Iwao, K. Yokoyama, K. Sato: ATP quantification and live-imaging in *Xenopus laevis* oocyte. The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, Japan, 10.28-30

J. Kishikawa, A. Nakanishi, S. Furuike, K. Yokoyama: Analysis of the MgADP-inhibition mechanism of V_0V_1 by domain swapping approach. The 51th Annual

Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, Japan, 10.28-30

A. Nakanishi, J. Kishikawa, K. Yokoyama: Binding interface between rotor subunits with low binding affinity in V_0V_1 . The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, Japan, 10.28-30

岸川淳一, 中西温子, 中村修一, 南野徹, 今田勝巳, 横山謙: 回転分子モーターの中心回転軸の分子進化, 日本生体エネルギー研究会 39 第回討論会, 静岡市, 12.18-20

中西温子, 岸川淳一, 横山謙: V-ATPase の中心回転軸におけるトルク伝達機構, 日本生体エネルギー研究会 39 第回討論会, 静岡市, 12.18-20

6. その他特記事項

1. 外部資金の採択

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. 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

X線結晶構造や生化学的実験から、シャペロニン (GroEL/GroES) は変性タンパク質をその親水性空洞に閉じ込めてフォールディングを援助することが明らかとなっている。そしてシャペロニンは変性タンパク質を空洞内に隔離することで変性タンパク質同士の結合による不可逆な凝集体形成を阻害し、閉じ込められた変性タンパク質は自由にフォールディングすると考えられてきた (Anfinsen cage モデル)。私たち

教授 吉田 賢右

Prof. Masasuke Yoshida, Ph.D

助教 元島 史尋

Assit. Prof. Fumihiko Motojima, Ph.D



は、一度空洞内に閉じ込められた変性タンパク質のある割合が継続的に空洞外へ漏れ出し始めることを発見した。現在のシャペロニンの作用機構の教科書的なモデルでは変性タンパク質は完全に空洞内に閉じ込められている。しかし、空洞内フォールディングの中間状態では、空洞内の変性タンパク質はそのポリペプチドの一部が空洞の外へはみだしているらしい。実際、この中間状態の存在は、溶液に加えた抗基質タンパク質抗体が空洞内に入っている変性タンパク質に結合して、空洞内のフォールディングの進行を停止させることで確かめられた。変性タンパク質は空洞内にわずかに露出する疎水性のサブユニット界面近傍のシステインとジスルフィド架橋を形成し、変性タンパク質はこの領域と疎水性相互作用していると考えられた。また、疎水性を減少させた GroEL 変異体はフォールディングが遅くなり、疎水性相互作用がフォールディングの促進に働く可能性が示唆された。上の研究から、本当の空洞内フォールディングを観察するには、空洞外に漏れ出したポリペプチドの自発的フォールディングを差し引く必要があることも示された。例えばマルトース結合タンパク質変異体 DMMBP は全て空洞内でフォールディングするとされていたが、実際は 90%も空洞外でフォールディングしていた。空洞内負電荷による水和水の安定化がフォールディングを促進するとした説はこの誤った実験結果に基づいており、否定された。また、confinement モデルを裏付けるとされた約 10 倍のフォールディング速度上昇は、タンパク質変性に用いたグアニジン塩酸が自発的フォールディングを遅くすることが原因であり、尿素変性の場合、2 倍程度しか促進されないことを見出した。

ATP 合成酵素

1) ヒト F_1 モーターの回転触媒機構

今までに細菌の ATP 合成酵素およびその部分複合体である F_1 モーターの回転特性については、よく解析されてきた。それによると、ATP が F_1 に結合すると、ローターである γ サブユニットは 80° 回転する。 80° の位置で、ATP 加水分解が起こり、リン酸の解離が起こり、 40° 回転し、 120° の回転となる。これが全生物にとって共通なのか、ミトコンドリアの F_1 モーターの回転を解析する必要がある。しかし、これはこの 15 年間、世界の誰もできなかった。今回、私たちは 1 分子観察によって、ヒトの F_1 モーターの回転を見ることができた。その結果は、以下の通りだった。ATP が F_1 に結合すると、 γ サブユニットは 65°

回転する。そして先に加水分解されて F_1 上に残っていたリン酸が解離して 65° から 90° まで回転する。 90° の位置で、ATP 加水分解が起こり、 30° 回転し、 120° の回転となる。このように、細菌とミトコンドリアでは、 F_1 の停止角度が違っている。また、阻害因子である IF1 は、回転を 90° の位置で停止させることがわかった。

2) 細菌 F_1 モーターの化学・力学共役の仕組み

細胞の中のエネルギー状態 (ATP 濃度、プロトン濃度勾配、など) はいろいろ変わる。いろいろ変わっても、ATP 合成酵素は、ATP 濃度 \leftrightarrow プロトン濃度勾配のエネルギー変換効率をいつでも 100% 近い効率でおこなうことが求められているし、実際にそうしている。どうしてそんなことが可能か。細菌の F_1 のローターに磁気微粒子を付着し、外部磁場によってゆっくりと強制的に回すと、それに逆らって少し遅れながら、あるいは少し先に回転するのが観察される。これは F_1 のトルクによるものであり、この方法で 360° のトルクの大きさを求められる。その結果、ATP が存在すると、トルクは、 0° 、 40° 、 80° でジャンプして漸減するのこぎりの刃のようなパターンを 120° ごとに繰り返していた。ATP 濃度が高ければ、 0° のジャンプのタイミングが 0° よりも早まり、のこぎりの刃は高くなり、回転のエネルギーは大きくなる。このようにして、高い ATP 濃度 (大きな ΔG_{ATP}) はロスなく回転の機械的なエネルギーに変換される。

3) ATP 合成酵素の阻害因子 IF1 の役割

ミトコンドリアの ATP 合成酵素 (および F_1) の ATP 加水分解活性を阻害する調節因子として IF1 が知られている。IF1 がないと、ミトコンドリアのクリステ構造ができにくいか、アポトーシスが起きやすい、とか報告がある。私たちは IF1 遺伝子を完全に欠損したマウスを作成した。予期に反して、このマウスは調べた限りではまったく健康であり、正常なマウスと区別がつかない。IF1 に代わる調節因子が存在するのか、あるいは、ATP 合成酵素は制御される必要がないのか、検討が必要な事態となった。

3. Research projects and annual reports

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

Molecular chaperones

Chaperonin GroEL mediates the folding of protein encapsulated in a large cavity that, when sealed by GroES, is referred to as the central cage. Recently, a critical role of negative charge clusters on the cage wall in folding

acceleration was proposed based on experiments using GroEL single-ring (SR) mutants SR1 and SRKKK2. We revisited these experiments and discovered several inconsistencies with the previously reported conclusion. (i) SR1 was assumed to bind to GroES stably and to mediate single-round folding in the cage. However, we show that SR1 repeats multiple turnovers of GroES release/binding coupled with ATP hydrolysis. (ii) Although the slow folding by SRKKK2 was attributed to mutations that neutralize negative charges on the cage wall, we found that the majority of substrate polypeptides escape from SRKKK2 and undergo spontaneous folding in the bulk medium. (iii) It was proposed that an osmolyte, trimethylamine N-oxide, accelerated SRKKK2-mediated folding by mimicking the effect of cage wall negative charges of WT GroEL and ordering the water structure to promote protein compaction. However, our results demonstrate that in-cage folding by SRKKK2 is unaffected by trimethylamine N-oxide. (iv) Finally, although it was reported that SRKKK2 lost the ability to assist the folding of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, we found that SRKKK2 retains this ability. Our results argue against the role of the negative charges on the cage wall of GroEL in substrate protein folding. Thus, in chaperonin studies, folding kinetics need to be examined thoroughly to determine the fraction of the real in-cage folding.

ATP synthase

1) Rotary mechanism of human mitochondrial F_1

The rotary motor enzyme F_1 -ATPase (F_1) is a catalytic subcomplex of F_0F_1 -ATP synthase that produces the majority of ATP in respiring cells. Chemo-mechanical coupling has been studied extensively for bacterial F_1 but very little for mitochondrial F_1 . Here, we visualize and analyze ATP-driven rotation of human mitochondrial F_1 . A rotor-shaft γ -subunit in the stator $\alpha_3\beta_3$ ring rotates 120° per ATP accompanying three catalytic steps; ATP binding to one β -subunit at 0° , Pi release from another β -subunit at 65° , and ATP hydrolysis on the third β -subunit at 90° . Rotation is often interrupted at 90° by persistent ADP binding and is stalled at 65° by a specific inhibitor azide. These features are different from those of the bacterial F_1 , in which all of the above events except ATP binding occur at 80° . A mitochondrial endogenous inhibitor for F_0F_1 -ATP synthase, IF1, blocks rotation at 90° .

2) Chemo-mechanical coupling of bacterial F_1

F_1 -ATPase (F_1) is a motor enzyme, in which γ subunit rotates 120° per ATP in the $\alpha_3\beta_3$ cylinder. During the operation, the

chemical energy of ATP hydrolysis (ΔG_{ATP}) is converted ~100% into the mechanical energy of rotation. However, the mechanism for such efficient conversion is yet unknown. Here we show the profiles of torque as a function of the rotary angle under various ΔG_{ATP} conditions. The profiles show three jumps of torque at about 0°, 40° and 80° in a 120° rotation each followed by a gradual descent, indicating that F_1 generates torque by the transitions between three states. The angular position of the transition makes a shift as the concentrations of ATP, ADP and P_i vary. These results not only suggest how F_1 rotates but also explain how F_1 varies torque reflecting change of environmental ΔG_{ATP} , thus providing a missing link between its rotation scheme and energetics.

2) IF1 knock-out mice are as healthy as wild-type mice

IF1 is an endogenous inhibitor protein of mitochondrial ATP synthase. It is evolutionarily conserved throughout all eukaryotes and it has been proposed to play crucial roles in prevention of the wasteful reverse reaction of ATP synthase, in the metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, in the suppression of reactive oxygen species generation, in mitochondria morphology and in haem biosynthesis in mitochondria, which leads to anemia. Here, we report the phenotype of a mouse strain in which IF1 gene was destroyed. Unexpectedly, individuals of this IF1-knockout mouse strain grew and bred without defect. The general behaviors, blood test results and responses to starvation of the IF1-knockout mice were apparently normal. There were no abnormalities in the tissue anatomy or the autophagy. Mitochondria of the IF1-knockout mice were normal in morphology, in the content of ATP synthase molecules and in ATP synthesis activity. Thus, IF1 is not an essential protein for mice despite its ubiquitous presence in eukaryotes.

4. 発表論文

- Nojima T, Konno H, Koder 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
- Hara S, Nojima T, Seio K, Yoshida M, Hisabori T. DNA-maleimide: an improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein. Biochim Biophys Acta. 2013 Apr;1830(4):3077-81
- Nishida N, Yagi-Utsumi M, Motojima F, Yoshida M, Shimada I, Kato K Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing

interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins.. J Biosci Bioeng. 2013 Aug;116(2):160-4.

- Nakamura J, Fujikawa M, Yoshida M. IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. Biosci Rep. 2013 Sep 17;33(5).
- Sugawara K, Fujikawa M, Yoshida M. Screening of protein kinase inhibitors and knockdown experiments identified four kinases that affect mitochondrial ATP synthesis activity. FEBS Lett. 2013 Nov 29;587(23):3843-7.
- Fujikawa M, Ohsakaya S, Sugawara K, Yoshida M. Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ). Genes Cells. 2014 Feb;19(2):153-60.
- Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jan 7;111(1):273-8.
- Kang SJ, Todokoro Y, Yumen I, Shen B, Iwasaki I, Suzuki T, Miyagi A, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H. Active-site structure of the thermophilic F_1 -subunit ring in membranes elucidated by solid-state NMR. Biophys J. 2014 Jan 21;106(2):390-8
- Morino I M, Suzuki T, Ito M, Krulwich T. E. (2014) Purification and functional reconstitution of a seven-subunit Mrp-type Na^+/H^+ antiporter. J Bacteriol, 196(1), 28-35.

5. 著書および総説 なし

6. 招待講演、シンポジウム等

- 吉田賢右 細胞呼吸と ATP 合成 科学未来館 2013 年 5 月 16 日
- 吉田賢右 細胞呼吸と ATP 合成 東京大学医学部 2013 年 10 月 10 日
- Yoshida M. Mammalian ATP synthase; from single molecule to body ドイツ Bochum.Univ. 2014. Jan. 10
- Yoshida M, Motojima F. Renovation of chaperonin mechanism after 15 years; a tethering polypeptide in the "football" cage folds in-cage or escapes out Bochum.Univ. 2014. Jan. 10
- Yoshida M, Motojima F. "Football" with tethered polypeptide: Renovation of chaperonin mechanism Protein folding, in and out of Anfinsen's closet スイス Arolla 2014. 1.14
- 鈴木俊治 生命の ATP システムを作り出す FoF1-ATP 合成酵素、大阪大学 医学部講演会 (大阪)、2014 年 1 月 23 日

7. 学会発表

税田英一郎、木下一彦、吉田賢右. Microstructure of the torque generated by F1-ATPase. 日本生物物理学会, 年会 2013. 10. 28-30. 京都

藤川誠、菅原佳奈子、吉田賢右. ヒト FoF1 の d-サブユニットノックダウン株を用いた FoF1 アセンブリ機構の解析. 日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会・2013. 12. 18-20. 静岡

元島史尋、元島(宮崎)優子、吉田賢右. シャペロニンがタンパク質フォールディングを援助する仕組み. 日本蛋白質科学会、2013. 6. 11-13、鳥取

元島史尋. 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抑制の解析. 国際高等研究プロジェクト第二回研究会、2013. 8. 8-9. 京都

Kang S, Todokoro Y, Yumen I, Shen B, Iwasaki I, Suzuki T, Miyagi A, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H, The Active-Site Structure of Thermophilic FoF1-ATP Synthase c-Subunit Rings in Membranes、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月、京都

Tasaki K, Kasuya Y, Soga N, Suzuki T, Yoshida M, Kazuhiko Kinoshita Jr, Quantitative assay of ATP-driven proton-pump activity of FoF1、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月、京都
Suzuki T, Tanaka K, Wakabayashi C, Furuie S, Saita E, Kinoshita K, Yoshida M, Single molecule analyses of human F1-ATPase revealed distinct rotation scheme of mitochondrial F1 motor.、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月、京都

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、ヒト F1-ATPase の一分子解析が明らかにした、バクテリアとは異なったミトコンドリア F1 の回転スキーム、日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会、静岡、2013 年 12 月

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)

2. 知財権等；

なし

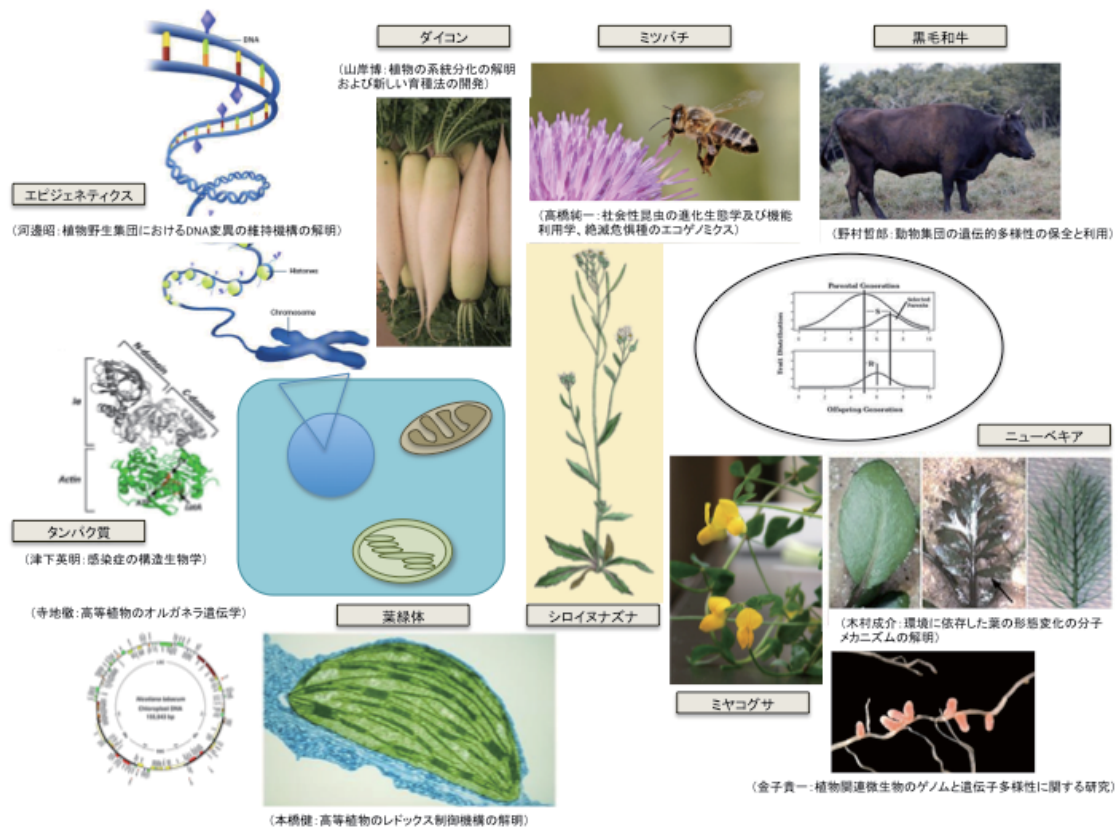
3. 学外活動；

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の基盤技術」領域アドバイザー

吉田賢右：文部科学省「創薬等支援技術基盤プラットフォーム」推進委員会副委員長

【研究】生命資源環境学科では、様々な生命現象を生物と環境との相互作用の視点から探求しており、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。図に示したように、研究対象は実験のモデル植物から作物までを含む高等植物、ミツバチなどの昆虫、牛、馬などの家畜動物と多岐にわたり、適宜、集団、個体、細胞及び分子レベルの研究を、実験的あるいは理論的方法で実施している。生命資源環境学科は総合生命科学部の他の学科と比べ、より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り、当学科で行われている研究の多くは、遺伝、進化、生態、植物生理、環境応答、共生など、生物を理解するうえでの本質的な部分にウェイトが置かれている。一方、近い将来人類が直面するであろう、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、応用的な基礎研究も推進されており、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も進められている。ここでは、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。



【教育】別表は、生命資源環境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。学科定員 35 名に対して、12 名の専任教員が教育にあっており、総合生命科学部の他の学科と同様、徹底した少人数教育が実施されている。学生は 3 年の秋semesterの基礎特別研究から研究室へ分属し、4 年の春semesterの応用特別研究で本格的な卒業研究に取り組む。現在は、教員 1 名が、学生 3～4 名の卒業研究を指導している。全体的なカリキュラムの構成は、入学後に生物学、化学の基礎を学んだ後、1、2 年次で基礎専門科目、その後により専門性の高い科目を履修できるようになっている。大学院への進学も推薦されており、卒業後は、食品、製薬、バイオ関連企業、公務員、教員などへの就職を想定している。

科目名	配当学年	担当教員
生命資源環境学概論	1	金子、高橋(純)、野村
基礎環境学	1	本橋
生物学通論A	1	木村、寺地
生物学通論B	1	河邊、高橋(純)
化学通論A	1	本橋
化学通論B	1	津下
基礎コンピュータ演習	1	野村、(石井)
応用コンピュータ演習	1	金子
生物学実験	1	木村、高橋(純)、本橋、桶川、鶴村、(井尻)
生物数学	1	野村
生物統計学	1	河邊
生物学演習	1	非常勤講師
化学演習	1	非常勤講師
基礎遺伝学	2	寺地
基礎生態学	2	木村、高橋(純)
科学英語I	2	山岸、高橋(亮)、鶴村
科学英語II	2	河邊、桶川、鶴村
化学実験	2	津下、鶴村、他
生命資源環境学実験・演習I	2	金子、河邊、津下、寺地、野村、安本、高橋(亮)、鶴村
植物生理学	2	本橋
生命資源工学	2	津下
バイオインフォマティクス入門	2	金子
植物栽培繁殖学	2	山岸
栽培植物起源学	2	山岸
科学英語III	3	金子、桶川、高橋(亮)
生命資源環境学実験・演習II	3	木村、高橋(純)、本橋、山岸、桶川、高橋(亮)、桶川
基礎特別研究	3	木村、高橋(純)、本橋、山岸、金子、河邊、津下、寺地、野村
植物育種学	3	山岸
動物育種学	3	野村
集団遺伝学	3	河邊
植物分子遺伝学	3	寺地
生命情報科学	3	金子
環境応答学	3	木村
保全遺伝学	3	野村
分子生態学	3	高橋(純)
生体分子機能学	3	津下
応用特別研究1・2	4	木村、高橋(純)、本橋、山岸、金子、河邊、津下、寺地、野村

()は生命システム学科所属の教員

ゲノム生物学研究室

Laboratory of Genomics

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。共生微生物の多くは、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知られている。これまでに、そのような特徴を持つ微生物が、多様な植物から分離されており、そのいくつかは、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。この植物への特性付与は農業生産に有用であることから、研究が進められている。我々は、環境指標となる微生物、特に植物の生育に効果を示す共生微生物のゲノム解読に取り組み、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。ところが、微生物と植物の相互作用特性は微生物系統に依存せず、近縁系統間でさまざまであり、この要因となる因子が未解明の部分も多い。また、環境ゲノム解析によると、未報告の微生物が、共生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、植物と共生微生物のゲノム研究から得られた情報を基盤として共生システムを研究し、植物の機能をより高めるしくみを明らかにすることを目標に研究を進めている。

2. 本年度の研究成果

- (1) *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 は *Rj2* 型ダイズ (Hardee) に根粒形成を誘導することができない。しかしながら、*rhcJ* もしくは *ttsI* を変異させた USDA122 変異体は Hardee に根粒形成を誘導する。これらの変異体は T3SS を形成できないため、エフェクターを共生植物へ分泌できない。つまり、USDA122 では、エフェクターの導入が Hardee の根粒形成を抑制することを示している。(共同研究)
- (2) *Mesorhizobium loti* NZP2037 株の共生アイランドの塩基配列を決定した。NZP2037 株の共生アイランドはフェニルアラニン tRNA 遺伝子に挿入された後、一部にゲノムリアレンジメントが生じていた。この共生アイランドは 533 kb の長さであり、その領域には 504 遺伝子が予測された。同種の MAFF303099 株および R7A 株の共生アイランドと配列比較をおこない、165 遺伝子からなるコア領域を同定した。また、NZP2037 特異的な根粒形成関連遺伝子も見つかり、これらが本菌株の広域宿主特異性に寄与すると予測された。(共同研究)
- (3) *Bradyrhizobium elkanii* はダイズとの共生を成立させるのに、III 型分泌系 (T3SS) を使用することができる。野生型の *B. elkanii* は、NFR 変異ダイズ En1282 の根に窒

准教授 金子 貴一

Assoc. Prof. Takakazu Kaneko



素固定可能な根粒を形成できる。しかし T3SS 欠損変異体では En1282 に根粒形成できない。ダイズ根粒特異的発現遺伝子 ENOD40 と NIN は、野生型 *B. elkanii* を En1282 に接種すると発現が上昇するが、T3SS 欠損変異体の接種では変動しない。つまり *B. elkanii* では、T3SS の作用により Nod 因子認識をバイパスし、宿主の根粒形成シグナル伝達経路を活性化することが可能である。(共同研究)

(4) *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ゲノム上には、ゲニステインを添加した後、数分以内に発現誘導される領域 (BjG30) が存在する。その発現はゲニステイン濃度依存性を示す。BjG30 は共生アイランドから離れた領域に存在しており、その内部には多剤排出ポンプ、TetR ファミリー転写調節因子、およびポリヒドロキシブチレート代謝遺伝子が含まれる。多剤排出ポンプ遺伝子を欠失すると、根粒形成性能および窒素固定能の低下をもたらすことから、この遺伝子の発現が共生の初期段階で重要な役割を果たすことがわかる。(共同研究)

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. Rhizobia and bacterial endophytes have been isolated from several tissues in numerous plant species. Such many bacterial strains have beneficial effects on plant growth and health. Some 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*, *Bradyrhizobium*, and *Azospirillum*. 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.

(1) A *Rj2* soybean plant (Hardee) is symbiotically incompatible with *Bradyrhizobium japonicum* USDA122. The rhizobial *rhcJ* and *ttsI* mutants fail to secrete typical

effector proteins through the type III secretion system (T3SS), and they gain the ability to nodulate Hardee. This suggests that some effectors secreted via the T3SS trigger incompatibility between these two partners.

(2) We determined the complete nucleotide sequence of *Mesorhizobium loti* strain NZP2037 symbiosis island, and we compared it with those of strain MAFF303099 and R7A. The determined 533 kb sequence of NZP2037 symbiosis island, on which 504 genes were predicted, implied its integration into a phenylalanine-tRNA gene and subsequent genome rearrangement. The core regions of the three symbiosis islands consisted of 165 genes. NZP2037 specific-genes encoding functional proteins in nodulation-related events were found. They suggest that these specific genes contribute to broaden the host range of NZP2037.

(3) *Bradyrhizobium elkanii* uses the type III secretion system (T3SS) to militate for symbiosis with soybean. The wild-type strain, but not the T3SS-deficient mutant, is able to form nitrogen-fixing nodules on the root of the soybean *nfr* mutant En1282. Expression of the soybean nodulation-specific genes ENOD40 and NIN is increased in the roots of En1282 inoculated with *B. elkanii* but not with its T3SS mutant. Therefore, T3SS could activate host nodulation signaling by bypassing nod-factor recognition.

(4) *Bradyrhizobium japonicum* occurs triggering their symbiotic interaction with soybean by the detection of genistein. A genomic locus (BjG30) that is separated from the symbiosis island is induced the expression within minutes after the addition of genistein. The mRNA levels showed distinct concentration dependence. This locus contains genes for the multidrug efflux pump, TetR family transcriptional regulator, and polyhydroxybutyrate (PHB) metabolism. The deletion of genes encoding the multidrug efflux pump resulted in defective nodulation performance and lower nitrogen-fixing capability. These results indicate that BjG30 plays a key role in the early stage of symbiosis as a nod gene inducer.

4. 論文, 著書など

T. Tsukui, S. Eda, T. Kaneko, S. Sato, S. Okazaki, K. Kakizaki-Chiba, M. Itakura, H. Mitsui, A. Yamashita, K. Terasawa, K. Minamisawa: The type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic

incompatibility with Rj2 soybean plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, **79**,1048-1051

- H. Kasai-Maita, H. Hirakawa, Y. Nakamura, T. Kaneko, K. Miki, J. Maruya, S. Okazaki, S. Tabata, K. Saeki, S. Sato: Commonalities and differences among symbiosis islands of three *Mesorhizobium loti* strains. *Microbes Environ.* 2013, **28**, 275-278
- S. Okazaki, T. Kaneko, S. Sato, K. Saeki: Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2013, **110**, 17131-17136
- K. Takeshima, T. Hidaka, M. Wei, T. Yokoyama, K. Minamisawa, H. Mitsui, M. Itakura, T. Kaneko, S. Tabata, K. Saeki, H. Oomori, S. Tajima, T. Uchiumi, M. Abe, Y. Tokuji, T. Ohwada: Involvement of a novel genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* early in the interaction with *Glycine max* (L.) Merr. *Microbes Environ.* 2013, **28**, 414-421.

5. 学会発表など

宮澤幸樹, 佐藤修正, 平川英樹, 岡崎伸, 佐伯和彦, 金子貴一: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii*の比較ゲノム解析
第23回植物微生物研究交流会、岡崎市、2013.9.7-9

6. 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: ミヤコグサ親和性エンドファイトによる共生システムの情報基盤形成

研究代表者: 金子貴一, 取得年度: H25-27年(3年)

2) 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. KAWABE, Akira.



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きの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。

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されている。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あり、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ね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

本年度は動原体の進化機構の解明のために、動原体構成の異なる系統間で作出した F1 の染色体の伝達率の調査をおこなっている。前年度におこなった交配による次世代への伝達率の調査に加えて減数分裂時の伝達様式の解析をおこなった。

転移因子の解析に関しては、シロイヌナズナで転移活性が確認された TIR (Terminal Inverted Repeat) のない MULE である VANDAL ファミリーの転移機構の解明をおこなった。VANDAL ファミリーは末端の反復配列を欠いているが切り出しと挿入は正常に起こる。VANDAL ファミリーが持つ3つの遺伝子の役割を明らかにするためにそれぞれの遺伝子の導入個体を作成したところ、これまで機能が未知であった遺伝子が VANDAL のメチル化レベルを低下させることによりこの転移因子

の再活性化能を持つことが明らかになった。再活性化能はそのコピーに配列の相同性が高いものを特異的に認識している可能性が有り、これまで良くわかっていなかった転移因子の利己的な増幅機構や、転移因子の制御機構の理解に貢献することが期待される。このような再活性化能のある遺伝子の存在や、宿主の抑制機構のターゲットとなりうる反復配列の欠如は、他のMULEに比べてVANDALファミリーが高い増幅能を持つことの一因となっている可能性がある(図1)。

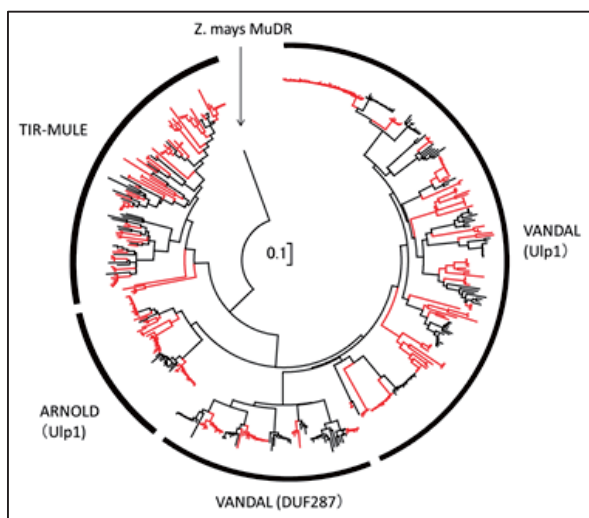


図1 VANDALファミリーを含むMULEの分子系統樹(赤線は*A. lyrata*、黒線はシロイヌナズナ由来のもの)

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学的解析をおこない、前年度に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。本年度はこの現象を検証するために異なる生物で実験解析をおこない、インプリンティングされる遺伝子の進化パターン的一般性を明らかにした。また核ゲノムに存在するオルガネラゲノム由来配列の進化パターンの解析をおこない、オルガネラから核への転移後に起こる突然変異には調査した植物全てで共通する偏りが見られることを明らかにした。この偏りは転移時期によって異なっており、核に存在するオルガネラゲノム断片は何らかの形で認識され、偏った突然変異が起こることが示唆された。現在、この偏りと時間的な変化を起こす原因について解析を進めている。

3. Research projects and annual reports

We focused on the maintenance mechanisms of DNA variation in Plant species. We are interested in the following four 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. 論文, 著書など

H. Ito, T. Yoshida, S. Tsukahara, A. Kawabe: Evolution of the ONSEN retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. *Gene*. 2013. **518**, 256-261

Y. Fu, A. Kawabe, M. Etcheverry, T. Ito, A. Toyoda, A. Fujiyama, V. Colot, Y. Tarutani, T. Kakutani: Mobilization of a plant transposon by expression of the transposon-encoded anti-silencing factor. *EMBO J*. 2013. **32**, 2407-2417

T. Yoshida, A. Kawabe: Importance of Gene Duplication in the Evolution of Genomic Imprinting Revealed by Molecular Evolutionary Analysis of the Type I MADS-Box Gene Family in Arabidopsis Species. *PLOS One*. 2013. 2, e73588

T. Yoshida, HY. Furihata, A. Kawabe: Patterns of genomic integration of nuclear chloroplast DNA fragments in plant species. *DNA Research*, published online ahead of print 2013 Oct 29

河邊昭、高野敏行: 突然変異(3) 遺伝的多型. *遺伝子図鑑* (国立遺伝学研究所「遺伝子図鑑」編集委員会) 2013, 146-147

5. 学会発表など

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遺伝子の遺伝子重複と分子進化. 日本進化学会第15回つくば大会, 筑波市, 2013.8.28-31

小杉亜希、田丸潤、後藤和美、清水顕史、河邊昭、原田英美子: 伊吹山の石灰石採掘場に生育する*Arabidopsis halleri* ssp. *gemmaifera* の2つの生態型における金属蓄積. 日本植物学会第77回大会, 札幌市, 2013.9.13-15

付ゆう、河邊昭、伊藤たすく、豊田 敦、藤山秋佐夫、樽谷芳明、角谷徹仁: シロイヌナズナTEの抑制解除活性. 日本遺伝学会第85回大会, 横浜市, 2013.9.19-21

吉田貴徳、降旗初佳、角谷徹仁、河邊昭: 核に移行した葉緑体ゲノム断片のエピジェネティックな修飾と分子進化. 日本遺伝学会第85回大会, 横浜市, 2013.9.19-21

降旗初佳、吉田貴徳、河邊昭: シロイヌナズナ属植物における染色体伝達率の偏りへの動原体配列の影響. 日本遺伝学会第85回大会, 横浜市, 2013.9.19-21

河邊昭、角谷徹仁: 動原体をターゲットとするLTR型トランスポゾン. 国立遺伝学研究所研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能」, 三島市, 2013.10.10-11

6. 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(計画班・分担)

課題名: イネ属胚乳における父・母ゲノムのエピジェネティックな調和と転写の分子機構

研究代表者: 木下哲, 取得年度: H23-27 年 (5年)

国立遺伝学研究所共同研究A

課題名: シロイヌナズナ近縁種における転移因子の制御機構の解明

研究代表者: 河邊昭, 取得年度: H25 年 (1 年)

2) 学外活動 Genetica: 編集委員

3) その他 なし



研究室集合写真

植物分子発生生物学研究室

Laboratory of Plant Developmental Biology

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3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(*Rorippa 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。この植物は湖畔に生育しており、陸上では楕円形の単葉を発生する一方、湖の水位が上昇して水没すると葉身が針状になった羽状複葉を発生して水の流れに抵抗できるようになる(図1)。このように生物が環境に应答して形態などの表現型を変化させることを表現型可塑性という。ニューベキアの示す葉の形態の表現型可塑性は、水位が変動する環境への適応に役に立っていると考えられる。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 (*Rorippa 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つてよい。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。とくに、野菜などの栽培種がもつ特徴のある形態に注目し、発生学および遺伝学的な解析を進めている。

(3) 植物がゲノムを守るしくみの研究

DNA修復や細胞周期のチェックポイントは、ゲノムを安定に維持し、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

准教授 木村 成介

Associate Prof. Seisuke Kimura, Ph. D.



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。

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. 植物ホルモンの網羅的定量解析: ニューベキアの生育環境に依存した葉形変化には植物ホルモンによる制御が関係していると考えられる。そこで、葉形が変化する条件で栽培したニューベキアの葉原基に含まれる植物ホルモンの定量解析を行ったところ、単葉を作る条件ではジベレリンやジャスモン酸の量が上昇していることがわかった。実際、ニューベキアにジベレリンを添加すると葉が単葉になることから、これらのホルモンが葉形の制御に重要であることが示唆された。

2. 細胞サイズの補償作用の解析: シロイヌナズナでは、何らかの遺伝子の異常により葉を構成する細胞の数が減少しても、細胞サイズが通常より大きくなることにより、葉のサイズが期待されるほどには減少しないという現象が知られており、補償作用と呼ばれている。私達は、ニューベキアを低温で生育させると、細胞数は減少するが、細胞が肥大する補償作用がおきていることを発見した。これは、環境変化により補償作用が誘導されることを見つけた初めての例である。現在、補償作用と葉形変化の関係について解析を進めている。

(2) 葉の形態の多様性の進化発生的研究

長年育種されてきた野菜類の中には、変わった形の葉を持つものが存在する。例えば、京野菜のミズナ(水菜)の葉はギザギザで、ミブナ(壬生菜)の葉は丸い(図2)。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。また、ダイコンの葉にも多様性があり、複葉(切葉)の品種と単葉(板葉)の品種が存在する(図2)。このような野菜に見られる葉形の多様性をモデルにすることで、葉の形態を決定している遺伝子が単離できると考え、研究を進めている。

ミズナのミブナのF₁の葉は中間形態を示し、F₂では形質が分離せずに連続的に分布した。このことから、ミズナとミブナの葉形の決定には複数の遺伝子座が関与していると考えられた。そこで、QTL解析により葉の形態決定遺伝子

座を同定することを試みた。mRNA-seqによりSNPsを同定し、120種のCAPSマーカーを作成した。94個体からなるF₂分離集団のジェノタイピングと葉形の定量解析を行い、QTL解析をしたところ、6番と10番の染色体(連鎖群)に大きなピークが見られた。これらの遺伝子座を解析することで、葉の形態決定遺伝子を同定できると期待される。



図2 野菜に観察される葉形の多様性

(3) 植物がゲノムを守るしくみの研究

DNA損傷応答は、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い。私達は、SOG1という植物独自のチェックポイント因子が、植物のDNA損傷応答のマスターレギュレーターとして働いていることを見だし、SOG1の機能解析を進めている。SOG1は転写因子であるが、他の蛋白質と相互作用しながら機能していると考えられるため、免疫沈降法と質量分析により、相互作用因子の同定を試みた。γ線照射によるDNA損傷誘導後にSOG1と結合する因子や、逆に解離する因子を複数同定することができた。現在、これらの因子の機能解析をおこなっている。

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, *Rorippa aquatica*, shows heterophylly, phenotypic plasticity on leaf shape. 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 lake cress.

We hypothesized that phytohormones have important roles in determination of leaf shape of lake cress. Thus, we quantified various phytohormones in leaf primordia by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. We found that gibberellin and jasmonic acid were more abundant when they develop simple leaves than compound leaves. We also found that application of gibberellin to shoot apex can dramatically change leaf shape of lake cress. These results suggested that gibberellin, at least, is involved in heterophylly of lake cress.

A defect of cell proliferation often triggers enhanced cell expansion in leaves. This phenomenon is called 'compensation'. We happened to notice that leaf cells of lake cress showed compensation reaction when they are grown at relatively low temperature. This is the first finding that compensation reaction is induced by environmental cue, and we are now investigating the mechanism of the reaction.

(2) The evolutionary-developmental study on leaf shape

Cultivated vegetables show remarkable variation in leaf morphology. For example, Mizuna (*Brassia rapa* var. *nipponsinica*) 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 this leaf shape variation. Based on RNA-seq data of Mizuna and Mibuna, we developed more than 120 CAPS markers. Then Ninety-four F₂ individuals from cross between Mizuna and Mibuna were analyzed for segregation at 120 CAPS loci and for variation in leaf shape. Two putative quantitative trait loci (QTL) were detected for the leaf shape variation.

(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. To identify interacting proteins of SOG1, we performed co-immunoprecipitation and mass-spectrometric analysis. We found multiples proteins which associate with or dissociate from SOG1 specifically after induction of DNA damages by gamma-irradiation.

4. 論文, 著書など

Kaoru O Yoshiyama, Junya Kobayashi, Nobuo Ogita, Minako Ueda, Seisuke Kimura, Hisaji Maki, Masaaki Umeda: ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Reports* **14**: 817-822 (2013)

武内亮, 中山北斗, 金井良博, 内山幸伸, 坂口謙吾, 木村成介: 植物のTWINKLEは葉緑体DNA複製に関わるDNAプライマーゼか? -アミノ酸配列の比較による検討- *京都産業大学総合学術研究所報* **8**: 49-55 (2013)

Daniel Koenig*, José M. Jiménez-Gómez*, Seisuke Kimura§, Daniel Fulop§, Daniel H. Chitwood, Lauren R. Headland, Ravi Kumar, Michael F. Covington, Upendra Kumar Devisetty, An V. Tat, Takayuki Tohge, Anthony Bolger, Korbinian Schneeberger, Stephan Ossowski, Christa Lanz, Guangyan Xiong, Mallorie Taylor-Teeple, Siobhan M Brady, Markus Pauly, Detlef Weigel, Björn Usadel, Alisdair R. Fernie, Jie Peng, Neelima R. Sinha, and Julin N. Maloof (*§ These authors contributed equally to this work): Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: E2655-2662 (2013)

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* **126**: 601-609 (2013)

Kaoru O Yoshiyama, Kengo Sakaguchi, Seisuke Kimura: DNA damage response in plants: Conserved and variable response compared to animals. *Biology* **2**: 1338-1356 (2013) (Review)
木村成介: 複葉の発生と進化, *生物の科学 遺伝* **67**: 50-56 (2013) (総説)

5. 学会発表など

生育環境により葉の形態を変化させる植物ニューベキア (*Rorippa aquatica*) を用いた表現型可塑性の研究, 中山北斗, 中益朗子, 天野瑠美, 木村成介, 第一回生態進化発生コロキウム, 東京大学駒場キャンパス, 2013. 12. 27

Developmental and molecular mechanisms of the heterophylly of lake cress, Hokuto Nakayama, Seisuke Kimura, The 31st Plant Biotechnology Symposium Program, International Plant Meeting in Kyoto – Messages from young scientists -, 京都産業大学, 2013.12 (シンポジウム)

植物ゲノムの恒常性維持に働く転写因子SOG1の役割, 愿山(岡本) 郁, 小林純也, 真木寿治, 梅田正明, 木村成介,

第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「染色体DNA複製とゲノムintegrity維持研究の今」, 神戸国際会議場, 2013. 12 (シンポジウム)

葉の形態に表現型可塑性を示すニューベキア (*Neobeckia aquatica*) が多様な葉形を生み出すメカニズムについての理論的な取り組み, 中益朗子, 中山北斗, 末松信彦, 木村成介, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2013.12.3-6

分岐形成の時空間パターンの解析から推測される複葉の成長プロファイルについて, 中益朗子, 木村成介, 末松J信彦, 第 20 回日本時間生物学会学術大会サテライトシンポジウム「生物リズム現象の数理フロンティア」, 近畿大学東大阪キャンパス, 2013.11.11

Comparative analysis on the RNA editing sites between common wheat and *Aegilops geniculata* mitochondrial genome by RNA-seq data, Gyawali Yadav Prasad, Seisuke Kimura, Satoshi Kitagawa, Koji Murai, Toru Terachi, 日本育種学会第 124 回講演会, 鹿児島大学, 2013.10.11-14

植物のDNA損傷チェックポイント因子SOG1は動物ガン抑制遺伝子 p53 のカウンターパートか?, 愿山郁, 真木寿治, 梅田正明, 木村成介, 日本遺伝学会第 85 回大会, 慶応義塾大学日吉キャンパス, 2013.9.19-21

ニューベキアの葉の発生過程における表現型可塑性のモデリング, 中益朗子, 木村成介, 末松J信彦, 日本植物学会第77回大会シンポジウム「形態形成研究の新たなステップ - 遺伝子ネットワークから多細胞動態へ -」, 北海道大学, 2013. 9 (シンポジウム)

異形葉性を示す植物ニューベキア (*Neobeckia aquatica*) を用いた葉形変化制御機構の解析, 中山北斗, 小嶋美紀子, 榊原均, 木村成介, 日本植物学会第 77 回大会, 北海道大学, 2013.9.13-15

京野菜のミズナとミブナに観察される葉形の多様性の発生的・遺伝学的背景の解明, 川勝弥一, 上ノ山華織, 五十嵐香里, 中山北斗, 久保中央, 矢野健太郎, 木村成介, 日本植物学会第77回大会, 北海道大学, 2013.9.13.15

京野菜であるミズナ・ミブナに見られる葉形の多様性について, 川勝弥一, 上ノ山華織, 五十嵐香里, 中山北斗, 久保中央, 矢野健太郎, 木村成介, 日本植物形態学会第25回総会, 北海道大学, 2013.9.12

環境に応じて葉の形態を変える植物ニューベキアを用いたトランスクリプトーム解析, 中山北斗, 坂本智昭, 倉田哲也, 木村成介, NGS 現場の会第 3 回研究会, 神戸国際会議場, 2013.9.4-5

オーキシン極性輸送に基づくパターンの成長場における数値解析 (Numerical analysis for behavior of auxin transport pattern on growing fields), 中益朗子, 木村成介, 末松J信

彦、第 46 回日本発生物学会、くびきメッセ(島根県松江市)、2013.5.28-31

生育条件により葉の形態を変化させるアブラナ科植物ニューベキアを用いた表現型可塑性の研究、木村成介、第 54 回日本植物生理学会年会シンポジウム「シロイヌナズナ野生株と近縁種～研究最前線と未来」、岡山大学津島キャンパス、2013.3 (シンポジウム)

環境に応答して葉形を変化させる植物ニューベキア (*Neobeckia aquatica*) を用いた植物ホルモンの網羅的定量解析、中山北斗、小嶋美紀子、榊原均、木村成介、第 54 回日本生理学会年会、岡山大学津島キャンパス、2013.3.21-23

植物が独自に獲得した DNA 損傷応答のマスターレギュレーター-SOG1 の制御メカニズム、木村成介、真木寿治、梅田正明、愿山(岡本)郁、第 54 回日本生理学会年会、岡山大学津島キャンパス、2013.3.21-23

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費助成事業(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)

日本私立大学振興・共催事業団学術研究振興資金

課題名:「植物の光合成を制御するメカニズムの解明」

研究分担者:木村成介、取得年度:H25 年(1 年)

科学研究費助成事業(特別研究員奨励費)

課題名:環境により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

研究代表者: 中山北斗、取得年度:H25-27 年(3 年)

科学研究費助成事業(特別研究員奨励費)

課題名:植物が独自に獲得した DNA チェックポイント機構の解明

研究代表者: 岡本郁、取得年度:H25-27 年(3 年)

科学研究費助成事業(特別研究員奨励費)

課題名:ニューベキアの複葉におけるフラクタル構造のモデリング

研究代表者:中益朗子、取得年度:H24-26 年(3 年)

2) 受賞等

日本植物学会若手奨励賞(中山北斗), 2013, 6.14

3) その他 なし



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. 本年度の研究成果

1: 在来マルハナバチのDNA 育種

外来種のセイウオオマルハナバチに替わるトマト用ポリネーターとして北海道に広く分布するエゾトラマルハナバチ、エゾナガマルハナバチ、エゾオオマルハナバチの3種に対して、遺伝子情報に基づくDNA 育種法を適用し、セイウオオマルハナバチの代替種として利用し得る種および系統を探索するために北海道で3種の女王蜂を採集し、研究施設で選抜育種を行った。3種の中でエゾオオマルハナバチが最も有望であることから、本種の成熟した巣から上位20巣程度を1~2世代にわたって選抜し、系統造成のための基礎集団を作成し、さらに遺伝子型解析のためのDNA マーカーを開発した。

2: ミツバチとマルハナバチにおける育種へのBLUP 法による選抜の導入

BLUP 法による予測育種価に基づく選抜(BLUP 選抜)は、家畜育種において広く利用され、経済形質の遺伝的改良に目覚ましい成果を上げてきた。しかしながら、ハチ類においては遺伝ならびに繁殖上の2つの特性、すなわち半倍数性の性決定様式および一妻多夫制の繁殖様式によって、BLUP 選抜の適用が他の家畜に比べて立ち遅れている。本研究では、ハチ類に固有の遺伝ならびに繁殖上の特性を考慮に入れて、ハチ類の育種におけるBLUP 法の計算アルゴリズムを開発した。さらに、BLUP 選抜のハチ類の育種への適用例を、仮想的なミツバチ集団を用いて示した。

3: 侵略的外来種ツマアカスズメバチの発見

これまで日本では、外来性スズメバチ類の侵入は確認されていなかったが、今回長崎県対馬において日本未記録のツマアカスズメバチと認められる働き蜂個体を捕

獲した。捕獲した個体の体色および外部形態が日本に生息する7種のスズメバチのどれとも異なっており、Archer (2012)が記述したツマアカスズメバチの持つ複数の形態的特徴が観察された。捕獲した個体は、頭部から腹部前端部分で黒色が強く、腹部中・後端および脚の末端部分が黄色という特徴が観察された。頭楯の形態は、ツマアカスズメバチの特徴である歯状突起の隆起がほとんどなく、側歯は丸くなっていた。触角の節数は12であり、腹部末端には針が確認されたため雌個体であった。前胸背板の前胸背側面下部の前胸後葉片にある縫合線といくつかの隆起線が、不明瞭であったことから本種の特徴を示していた。韓国と対馬の間には、1993年から馬山港および釜山港と厳原港の間で定期航路が開設され、直接物資が持ち込まれている。韓国では、釜山市で初めて本種の侵入・定着が確認されていることから(Choi et al. 2012)、対馬には釜山市の馬山港または釜山港から物資に付随して、侵入した可能性が高いと考えられた。



写真. 対馬で捕獲したツマアカスズメバチの2mを超える巨大巣(左)と働き蜂成虫(右)

4: ミツバチとマルハナバチの微孢子虫症の浸潤状況

微孢子虫の寄生により発症するノゼマ病は、ミツバチやマルハナバチのコロニーが死滅する重篤な病気である。国内に生息しているミツバチおよびマルハナバチに寄生する微孢子虫の浸潤状況をPCR 診断法により検出し、シーケンス解析により同定を行った。セイウミツバチ、ニホンミツバチ、セイウオオマルハナバチの3種におい

て、*Nosema apis* と *N. bombi* の寄生がそれぞれ確認された。セイヨウオオマルハナバチは、採集した全地域の個体から *N. bombi* が検出された。rRNA のシーケンス解析からは、国内でミツバチに寄生している *N. apis* は、病原性の低い系統であることが示唆された。

3. Research projects and annual reports

1: *Discovery of a worker of Vespa velutina (Hymenoptera: Vespidae) from Tsushima Island, Japan.*

We captured one worker of *Vespa velutina* on Tsushima Island of Nagasaki Prefecture on 20 October 2012. This is the first collection record of *V. velutina* from Japan. Since *V. velutina* is known for its great capacity to adapt to environmental changes, it is suggested that the spread of *V. velutina* is likely to affect the unique ecosystem of Tsushima Island in the near future.

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 d15N and d13C values were measured. The d15N and d13C values of periphyton and particulate organic matter, the basal food sources in lentic ecosystems of rice fields, were also measured to estimate the trophic position of *K. deyrolli*. When individual isotopic signatures of the whole body were compared with those of their middle leg tarsus, we found strong correlations between them for both d15N and d13C. To estimate their trophic position without killing individuals, we constructed a regression model incorporating their middle leg tarsus's isotopic signatures and their body size as explanatory variables. This non-lethal method revealed that *K. deyrolli* showed great individual variation in its d15N which is a proxy of trophic position, ranging from 5.60‰ to 8.11‰. To evaluate the negative effects of our non-lethal method on the fitness of *K. deyrolli*, we examined how the removal of the middle leg tarsus affected reproductive performance under laboratory conditions. A comparison between the

manipulated and unmanipulated individuals revealed that the removal treatment did not have any negative effects on female clutch size or egg hatchability for males. In conclusion, stable isotope analysis of the middle leg tarsus of *K. deyrolli* is useful for estimating its trophic position without lethal or any negative fitness effects.

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. 論文, 著書など

学術論文

1. Utsumi S, Ando Y, Roininen H, Takahashi J., Ohgushi T.: Herbivore community promotes trait evolution in a leaf beetle via induced plant response. *Ecology Letters*. (2013) **16**, 362- 370.
2. Ohba S, Takahashi J, 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*. (2013) **6**, 155-161

3. 境良朗・高橋純一：対馬で発見・捕獲されたツマアカスズメバチ (*Vespa velutina*) の働きについて. **昆虫**. 印刷中
4. Kiyoshi T, Fukui M, Fukunaga K, Takahashi J, Tsubaki Y. A Preliminary Report on the Genetic Diversity of a Highly Endangered dragonfly, *Libellula angelina* Selys, 1883, in the Okegaya-numa Pond, Iwata, Japan. *Tombo*. Inpress.

著書

1. みつばち協議会編：養蜂家向け！養蜂マニュアルIII. 女王蜂の作り方. (2013) 東京. pp99. <http://www.beekeeping.or.jp/>

紀要

1. 岡田大地・鷹野由里子・田中美子・佐々木一馬・棚橋靖行・高橋純一・佐倉正明・竹内実：日本国産ハチミツによる肺胞マクロファージの免疫機能に及ぼす影響. *京都産業大学先端科学技術研究所所報*. (2013) **12**, 33-44
2. 野村哲郎・高橋純一・竹内剛：ハチ類の育種へのBLUP法による選抜の導入. *京都産業大学先端科学技術研究所所報*. (2013) **12**, 45-57
3. 高橋純一・竹内実・松本耕三・野村哲郎：ミツバチおよびマルハナバチにおける微生物の浸潤状況. *京都産業大学先端科学技術研究所所報*. (2013) **12**, 59-68
4. 中村純・木村澄・高橋純一・佐々木正己・眞鍋昇：ネオニコチノイドに関する山田論文の問題点について. *現代化学*. 印刷中.
5. 高橋純一：日本におけるミツバチの減少原因について - 本場にミツバチたちは消えたのか - ミツバチ不足. *環境と健康*. 印刷中.

5. 学会発表など

1. 高橋純一：ミツバチ研究の最前線 - 社会性昆虫の不思議を探る -. 公益財団法人体質研究会. 2013年4月20日. 京都市
2. 高橋純一：第2回養蜂のすすめ. 京都産業大学教養講座(前期土曜講座). 2013年6月29日. 京都市
3. 高橋純一：ニホンミツバチは病気にかからない? - その原因と対策 -. 日本みつばち講習会. 2013年6月20日. 諏訪市
4. 高橋純一：ミツバチの病害虫対策とハチミツの効能. 第40回京都府はちみつ品評会. 2013年8月2日. 舞鶴市
5. 高橋純一：ミツバチの生態と生産物. 社団法人ふくい農林水産支援センター. 2013年8月20日. 福井市
6. 高橋純一：養蜂技術指導講習会. みつばち協議会. 2013年9月5日. 札幌市

7. 高橋純一：ミツバチおよびマルハナバチにおける病原性微生物の浸潤状況について. 日本昆虫学会第73回札幌大会. 2013年9月16日. 札幌市
8. 高橋純一：DNA抽出とPCR実験. 島根県立浜田高等学校. 2013年9月21日. 浜田市
9. 高橋純一：ミツバチと養蜂. 養蜂技術指導講習会. 2013年9月26日. 名古屋市
10. 高橋純一：ミツバチ病原性微生物の浸潤状況. 熊本県養蜂協会. 2013年10月7日. 熊本市
11. 高橋純一：ミツバチと養蜂. 養蜂技術指導講習会. 2013年10月10日. 熊本市
12. 高橋純一・高橋稜一・岩口健太郎・里見優・原田レオナ・境良朗・山村辰美：対馬における外来種ツマアカスズメバチの帰化と被害について. 第68回日本衛生動物学会西日本支部例会. 2013年10月26日. 福井市
13. 高橋純一：ミツバチの生態. 京都府私立中学校高等学校理科研究会. 2013年11月16日. 京都市
14. 高橋純一：ミツバチの生態について. 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター. 養蜂セミナー. 2013年12月1日. 箕面市
15. 高橋純一：対馬に侵入した外来種ツマアカスズメバチの分布と生態について日本昆虫学会関西支部会. 2013年12月8日. 大阪市
16. 高橋純一：ニホンミツバチとツマアカスズメバチについて. 対馬ニホンミツバチ部会. 2013年12月20日. 対馬市

6. その他特記事項

1) 外部資金

1. 科学研究費補助金・若手(B)

課題名: 刺さないミツバチの遺伝学的解析

研究代表者: 高橋純一, 取得年度: H24-25 年 (2 年)

2. 環境省環境総合研究推進費・若手

課題名: 在来マルハナバチによる環境調和型ポリネーション様式の確立に関する研究

研究代表者: 高橋純一, 取得年度: H24-26 年 (3 年)

3. 科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名: 局所的近縁種の生息地分離と形質置換をもたらす生態学的要因

研究分担者: 高橋純一, 取得年度: H23-25 年 (3 年)

4. 科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名: 在来マルハナバチによる環境調和型ポリネーション様式の確立に関する研究

研究分担者: 高橋純一, 取得年度: H24-26 年 (3 年)

5. 科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名: 原始的真社会性種の繁殖制御: 遺伝子から行動まで

- 研究分担者:高橋純一, 取得年度:H24-26年(3年)
6. 委託研究・社団法人日本養蜂はちみつ協会
研究分担者:高橋純一, 取得年度:H25-26年(2年)
7. 委託研究・社団法人日本ローヤルゼリー校正取引協議会
研究分担者:高橋純一, 取得年度:H25年(1年)
8. 委託研究・株式会社スジョン・ジャパン
研究分担者:高橋純一, 取得年度:H25-26年(2年)

2) 学外活動

- 蜜蜂医薬品開発協議会:副会長
蜜蜂医薬品開発協議会専門技術委員会:委員長
京都府養蜂組合:顧問
和歌山県養蜂組合:顧問

3) その他

メディア

- 朝日新聞:2013年1月14日
- 国立環境研究所・環境展望台:
<http://tenbou.nies.go.jp/news/jnews/detail.php?i=10085>
- マイナビ・ニュース:
<http://news.mynavi.jp/news/2012/12/27/126/index.html>
- yahoo ニュース(マイナビ・ニュースの転載):
<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20121227-00000058-myc-omj-sci>
- NHK E テレ:『モリゾー・キッコロ森へ行こうよ!』美女がつくる!?あま〜い味わい 森の極上スイーツを探せ!5月4日:監修
- テレビ朝日 素敵な宇宙船地球号『鎌倉あじさい〜生命の色38億年〜』:2013年7月21日放送:出演
- KTN テレビ長崎:2013年9月20日放送:出演
- 読売新聞:2013年9月16日
- 読売新聞:2013年9月19日
- 西日本新聞:2013年9月19日
- 京都三条ラジオカフェ:2013年9月29日放送:ゲスト出演
- 朝日新聞:2013年9月30日
- 読売新聞:2013年10月5日
- NHK 総合 おはよう日本『ミツバチを襲う外来種スズメバチ 長崎 対馬』:2013年10月13日放送 オンデマンド:
http://cgi4.nhk.or.jp/eco-channel/jp/movie/play.cgi?did=D0013772562_00000

第1回生命資源環境学科卒業研究発表会

ポスター発表優秀賞 中濱奏絵 2014年2月28日



研究室の様子(①第1実験室棟共同実験室(左から1期生の
大石友樹、中濱奏絵、吉岡雅人)、②キャンパス(1期生)、③
京都府立植物園のイベント参加(1期生)、④神戸市立六甲山
牧場のイベント参加(1期生)、⑤ミツバチの巣板の検査作業(2
期生高橋稜一)、⑥学内養蜂場での巣箱塗装(2期生里見優)、
⑦琉球大学熱帯生物圏研究センター西表島実験棟でのツマグ
ロスズメバチの巣の調査(2期生原田レオナ)、⑧第1実験室棟
共同実験室でツマアカスズメバチの巣の調査(2期生岩口健太
郎)

タンパク質構造生物学研究室

Laboratory of Protein Structural Biology

教授 津下 英明

Prof. Hideaki Tsuge, Ph.D

助教 鶴村 俊治

Assit. Prof. Toshiharu Tsurumura



1. 研究概要

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

タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要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癒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 ウィルスによって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。鳥に感染したウイルスが変異してヒトへの感染が起これらと考えられる。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

2. 本年度の研究成果

(1) 昨年度の年報に詳しく記載したように、初めてのアルギニンADPリボシル化反応を捉え、「イオタ毒素-アクトン複合体結晶構造解析から示唆されるアルギニンADPリボシル化の反応機構」として、2月4日発刊の米国科学アカデミー紀要に報告した。またこの論文は、同雑誌でKlaus AktoriesによりCommentaryとして紹介された。「一連のADPリボシル化複合体の結晶構造解析とそこで提唱したStrain-alleviation model(緊張と緩和モデル)は、毒素が引き起こすADPリボシル化の理解だけでなく、様々に働く内在性のADPリボシル化酵素の分子反応の理解につながる事であり、画期的な発見である。」

(2) インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼのPB2サブユニットは宿主mRNAのcap構造を認識し取り込むcap snatching

機構を持つ。このドメインの結晶構造をcapのあるなしで解析し、今までとは異なる7methylGTPの結合機構を明らかにした。また、この解析した結晶のN末端部分は α ヘリックスを持つが、capの結合によりこの部分がほどける性質を持つ。これらの結果をPloS ONEに報告した。(Figure参照)

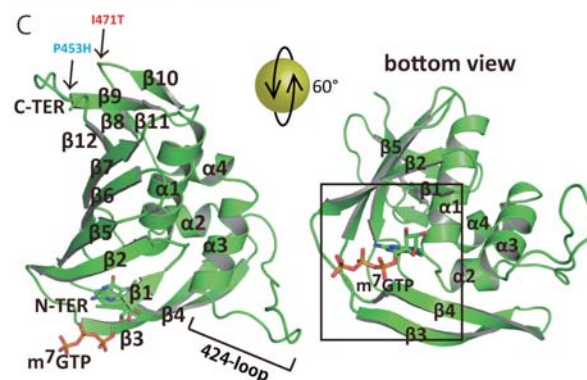
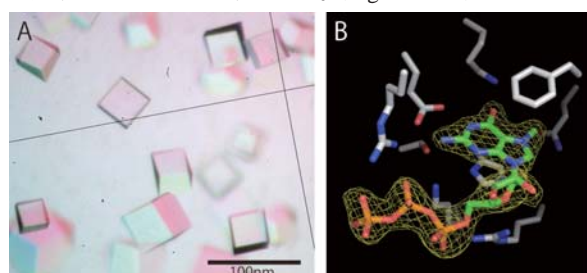


Figure A) PB2 中間ドメイン-m⁷GTP の複合体結晶、B) PB2 中間ドメイン内の m⁷GTP の電子密度、C) PB2 中間ドメイン-m⁷GTP の複合体構造

(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) *Aeromonas sobria* 由来のセリンプロテアーゼの構造は2008年にJBCに報告しているが、今回、そのexternalシャペロンの機能と複合体構造を明らかにし、現在論文投稿中である。また日本女子大学、島根大学との共同研究により、新規ペルオキシダーゼDyPの生化学と構造研究を行っている。

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 protein and human protein.

(1) Actin ADP-ribosylating toxin (ADPRT) such as iota toxin from *C.perfringens* ADP-ribosylates Arg-177 of α -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⁺ analog β TAD; however, the structures of the NAD⁺ bound form (NAD⁺-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⁺-Ia-actin in crystal. We revealed high-resolution structures of NAD⁺-Ia-actin and Ia-ADPR-actin obtained by soaking apo-Ia-actin crystal with NAD⁺ under different conditions. The structures of NAD⁺-Ia-actin and Ia-ADPR-actin respectively represent the pre- and post-reaction states. Considering all the structures in each reaction step including β 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) Influenza pandemics with human-to-human transmission of the virus are of great public concern. It is now recognized that a number of factors are necessary for human transmission and virulence, including several key mutations within the PB2 subunit of RNA-dependent RNA polymerase. The structure of the middle domain in PB2 has been revealed with or without m⁷GTP, thus the middle domain is considered to be novel target for structure-based drug design. Here we report the crystal structure of the middle domain of H1N1 PB2 with or without m⁷GTP at 1.7Å and 2.0Å resolution (Figure B), respectively, which has two mutations (P453H, I471T) to increase electrostatic potential and solubility. Here we report the m⁷GTP has unique conformation differ from the reported structure. 7-methyl-guanine is fixed in the pocket, but particularly significant change is seen in ribose and tri-phosphate region: the buried 7-methyl-guanine indeed binds in the pocket forming by H357, F404, E361 and K376 but other region of m⁷GTP continues directed to the outer domain (Figure B, C). The presented conformation of m⁷GTP may be a clue for the anti-influenza drug-design.

(3) We are currently going on the structural study of poly-ADP-ribose glycohydrolase, chaperone of *Aeromonas sobria* serineprotease, and novel peroxidase DyP.

4. 論文著書など

- [Tsurumura T](#), Qiu H, Tsumori Y, Oda M, Nagahama M, Sakurai J, [Tsuge H](#)
Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex.
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 110(11):4267-4272. (2013)
- [Tsurumura T](#), Qiu H, Yoshida T, Tsumori Y, Hatakeyama D, Kuzuhara T, [Tsuge H](#).
Conformational Polymorphism of m(7)GTP in Crystal Structure of the PB2 Middle Domain from Human Influenza A Virus
PLoS One. 8(11):e82020 (2013)
- [Tsuge H](#) and [Tsurumura T](#)
Crystal structure analysis of ADP-ribosylating enzyme and substrate protein complex
Photon Factory Activity Report 2012 #30 (2013)

5. 学会発表など

- [津下英明](#)
シンポジウム「めざせ！細菌学の星☆2013」
病原菌をさらに理解するための構造生物学
日本細菌学会 2013.3.19 (招待講演)
- [鶴村俊治](#), [津守耶良](#), [秋こう](#), [津下英明](#)
「Ia-actin複合体結晶場におけるADPリボシル化の捕捉」
第13回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館 (鳥取)、
2013.6.12-14
- [Toshiharu Tsurumura](#), [Hideaki Tsuge](#)
「Substrate Selectivity of Monoacylglycerol Lipase based on the Crystal Structure」
Structural Life Science 7th International Conference on Structural Genomics、京王プラザホテル札幌 (札幌)、2013.7.29-8.1
- [津下英明](#)
ATPase, GTPaseを標的とした細菌毒素による翻訳後修飾の構造生物学
日本女子大学「理学セミナー」、日本女子大学 (東京) 2013.10.2 (招待講演)
- [江村晃太](#), [吉田徹](#), [津下英明](#)
「分解能決定におけるCChalfとR値の関係性の考察」
日本結晶学会、熊本大学 (熊本)、2013.10.12
- [鶴村俊治](#), [秋こう](#), [吉田徹](#), [津守耶良](#), [津下英明](#)
「インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ CAP 結合とその構造」
ビタミンB研究協議会、名古屋ウイנקあいち (名古屋)、
2013.11.2

6. 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」

研究代表者：津下英明、取得年度：H25-H26(2年)

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 PARG 阻害剤による効果増強法の実用化研究」 研

究分担者：津下英明、取得年度：H24-H25(2年)

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」 研究分担者：津下英明、取得年度：H23-H27(5年)

(2) 知的権等

なし

(3) 学外活動

日本学術振興会 特別研究員等審査委員 2012-2013(7月まで)

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

Journal of Crystallography (Hindawi) Editorial board

Advances in Biology (Hindawi) Editorial board

(4) 受賞等

なし

(5) その他

日本学術振興会・特別研究員として吉田徹くんが東京工業大学
からラボメンバーに参加しました。



ラボメンバーと(11月)

植物分子遺伝学研究室

Laboratory of Plant Molecular Genetics

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をめざした基礎的研究から、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)は、これまで同名のプロジェクトが外部資金で実施されてきたが、平成25年3月にこれらのプロジェクトが終了したことに伴い、研究の一部を学内の植物ゲノム科学研究センターに引き継いだ。

このうち1)のプロジェクトは、植物オルガネラゲノムの改変により、人類に有用な植物を育成することを大きな目標とする。そのため、細胞質置換、細胞融合、ならびに葉緑体の遺伝子組換えなどの実験を行っている。中でも葉緑体の遺伝子組換えは重点的に実験を進めており、全体の研究戦略として、まず栽培タバコの葉緑体へ適切な遺伝子を導入し、組換え体のパフォーマンスを調査した後、パンコムギ、レタス、トマトなど他の植物種(作物)へ応用しようとしている。これまで非生物的ストレスに強い植物を育成するため、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)を効率的に消去できる植物の育成を行った。この実験では、これまでに、上記酵素の遺伝子を単独、あるいは複数持つ10種類の組換え体(25系統)を得ることができている。その結果、導入遺伝子の種類によって程度の差はあるものの、この方法で上記酵素の活性を高めることができ、組換え体はROSを発生させる除草剤への耐性が高まることが示された。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。

また、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

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr.



助教 高橋 亮

Assist. Prof. Kiyoshi Takahashi, Dr. Sci.

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有な材料を用いて、コムギの近縁種であるエギロプ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するとともに、コムギと近縁種の系統進化に関する新知見を得ようと考えている。

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、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ィトキレーチンの前駆物質としても知られている、グルタチオンの濃度を高める実験を行った。昨年、葉緑体内でグルタチオン合成を触媒する酵素GSH1及びGSの遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコを、それぞれ3個体と5個体得ることに成功したが、本年度はこれらの組換え個体を自殖して多数の種子を得てT₁系統として確立した。これらの系統の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グルタチオンの酸化型/還元型のいずれもが大幅に増加していた。一方、GS系統では野生型と比べて大きな違いは観察されなかった。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。一方、除草剤を用いた実験では、いずれの組換え系統も、ROSの消去能力が高まっていた。

ここ数年、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ている。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。さらに安定して植物材料を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。そのため平成 25 年も国内の共同利用・共同研究拠点で共同研究を実施し、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 月に入手できる体制を構築した。またトマトは、筑波大学の形質転換植物デザイン研究拠点から MicroTom という実験システムを入手し、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が得られなかったものの、ベンサミアナタバコについては *apx* 及び *gsh1* 遺伝子、レタスについてはフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換え体を得ることができた(図 1)。



図 1. 葉緑体ゲノムにダイズのフェリチン遺伝子が導入された組換えレタス

左:野生型(King crown)、中、右:組換え体
特にレタスの場合、得られた T_0 は1個体のみであったが、これを水耕栽培で開花結実するまで育てることができ、次世代(T_1)の種子を大量に得ることができた。 T_1 を用いた実験で、 T_0 に導入されたフェリチン遺伝子が正確に保持されており、転写、翻訳されていることが示された。また葉の鉄分が野生型と比べて2倍になっていることもわかった。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。

上記3)のプロジェクトについては、昨年引き続き *Triticum 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、ゲノム解読を進めている。このうち、*T. timopheevi*, *Ae. speltoides* 及び *Ae. ovata* の3種については、次世代シーケンシングによるデータ取得後、

PCR とサンガー法による隣接コンティグの確認などのフィニッシングを完了し、ミトコンドリアゲノムのマスターサークルを提唱できる段階に達している。前2種は、いずれもパンコムギの系統分化考察の際に鍵となる植物であり、*Ae. ovata* の細胞質はコムギに出穂遅延を引き起こす興味深い植物である。ミトコンドリアのゲノム解読がこれらの問題を解決するのに寄与するものと考えている。

なお、上記2)のプロジェクトについては、今年度、このプロジェクトに関連する課題を研究テーマとして取り組んだ大学院生、学部生がいなかったため、進展させることができなかった。

3. Research projects and annual reports

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

1: Production of transplastomic plants that are useful for human beings.

2: Comprehensive studies on the molecular mechanism of the male-sterility/fertility restoration system in radish.

3: Comparative mitochondrial genome analysis of *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. 論文, 著書など

M. Tsujimura, N. Mori, H. Yamagishi, T. Terachi: A possible breakage of linkage disequilibrium between mitochondrial and chloroplast genomes during Emmer and Dinkel wheat evolution. *Genome* **56**(4), 187-193

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*). *Theor. Appl. Genet.*

DOI:10.1007/s00122-013-2097-6

5. 学会発表など

Y. P. Gyawali, T. Terachi: Mitochondrial genome comparison of wheat alloplasmic lines by next-generation sequencing. The 8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology ICPMB 2013, Rosario, Argentina, 2013.5.12-16

M. Tsujimura, H. Yamagishi, T. Terachi: Mitochondrial genome analysis of *Triticum* and *Aegilops* species relevant to polyploid wheat evolution. The 8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology ICPMB 2013, Rosario, Argentina, 2013.5.12-16

Gyawali Yadav Prasad, 寺地 徹: Complete sequence of mitochondrial genome of an alloplasmic line of common wheat with *Aegilops geniculata* cytoplasm. 第123回日本育種学会講演会, 世田谷区, 2013.3.27-28

安本 景太, 高木 宏樹, 寺内 良平, 寺地 徹: 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. 第123回日本育種学会講演会, 世田谷区, 2013.3.27-28

辻村 真衣, 森 直樹, 山岸 博, 寺地 徹: コムギ・エギロブ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. 第123回日本育種学会講演会, 世田谷区, 2013.3.27-28

福永 明日美, 辻村 朋彦, 植村 香織, 寺地 徹: 葉緑体の遺伝子組換えを用いた高濃度グルタチオン含有植物の育成. 第123回日本育種学会講演会, 世田谷区, 2013.3.27-28

井上 理恵子, 植村 香織, 寺地 徹: ダイズのフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出. 第123回日本育種学会講演会, 世田谷区, 2013.3.27-28

大矢 悠貴, 寺地 徹: グルタミン酸脱水素酵素遺伝子(*gdh1*)を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出. 第123回日本育種学会講演会, 世田谷区, 2013.3.27-28

福永 明日美, 植村 香織, 寺地 徹: 葉緑体の遺伝子組換えにより作出されたグルタチオン高含有タバコの特徴づけ. 第124回日本育種学会講演会, 鹿児島市, 2013.10.12-13

大矢 悠貴, 寺地 徹: グルタミン酸脱水素酵素遺伝子(*gdh1*)を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコ後代の特徴づけ. 第124回日本育種学会講演会, 鹿児島市, 2013.10.12-13

井上 理恵子, 植村 香織, 寺地 徹: フェリチンを葉緑体で高発現する遺伝子組換えレタス後代の解析. 第124回日本育種学会講演会, 鹿児島市, 2013.10.12-13

植村 香織, 辻 雅之, 林 清音, 山本 裕範, 寺地 徹: ストロマ型 APX を葉緑体で強発現する組換えタバコの系統で観察された斑入りに関する研究. 第124回日本育種学会講演会, 鹿児島市, 2013.10.12-13

岡部 真弥, 田中 義行, 山岸 博, 寺地 徹: 次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 3: 青長ダイコンの全ミトコンドリアゲノム配列の決定. 第124回日本育種学会講演会, 鹿児島市, 2013.10.12-13

辻村 真衣, 森 直樹, 山岸 博, 寺地 徹: 核ゲノム構成により違いを示す Emmer-Dinkel コムギのミトコンドリアの多型. 第124回日本育種学会講演会, 鹿児島市, 2013.10.12-13

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究

課題名: 葉緑体の遺伝子組換えによるストレス耐性パンコムギの育成

研究代表者: 寺地 徹, 取得年度: H24-26 年 (3 年)

岡山大学 資源植物科学研究所 共同研究

課題名: 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

研究代表者: 寺地 徹, 取得年度: H24-25 年 (2 年)

鳥取大学 乾燥地研究センター 共同研究

課題名: 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

研究代表者: 寺地 徹, 取得年度: H24-25 年 (2 年)

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 共同研究課題名: マイクロトムを用いたトマトの葉緑体形質転換技術の確立

研究代表者: 寺地 徹, 取得年度: H25 年 (1 年)

2) その他

日本学術振興会 科研費審査委員(寺地)

Gene & Genetic Systems editor(寺地、高橋)

Breeding Science editor(寺地)

他大学講師: 京都府立大学大学院「植物バイオテクノロジー特論」(寺地)、筑波大学生命環境学群生物学類「理論集団遺伝学」(高橋)

動物遺伝育種学研究室

Laboratory of Animal Genetics and Breeding

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) 血統および DNA 情報を用いた黒毛和種の系統再構築法の開発

黒毛和種においては、少数の人気種雄牛に繁殖供用が集中することによって、品種内の遺伝的多様性が激減していることが指摘されている。遺伝的多様性を維持・回復させるためには、品種内に遺伝的に分化した系統を再構築することが有効であると言われている。そこで、血統および SNP 情報を用いて品種内に系統を再構築するための手法を開発した。開発した手法は、まず血統情報に基づいて各系統のコアとなる個体群を設定し、新たな候補個体は SNP 情報を用いた判別分析によって適切な

教授 野村哲郎

Prof. Tetsuro Nomura, Ph. D.



系統に割り振るものである。方法の有効性を、実際の黒毛和種の血統および SNP 情報を用いて検証した。

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 法による予測育種価に基づく選抜 (BLUP 選抜) は、家畜育種において広く利用され、経済形質の遺伝的改良に目覚ましい成果を上げてきた。しかしながら、ハチ類においては遺伝ならびに繁殖上の2つの特性、すなわち半倍数性の性決定様式および一妻多夫制の繁殖様式によって、BLUP 選抜の適用が他の家畜に比べて立ち遅れている。そこで、ハチ類に固有の遺伝ならびに繁殖上の特性を考慮に入れて、ハチ類の育種における BLUP 法の計算アルゴリズムを開発した。さらに、BLUP 選抜のハチ類の育種への適用例を、仮想的なミツバチ集団を用いて示した。

3. Research projects and annual reports

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

1: Development of method for re-establishing strains in the Japanese Black cattle population, using pedigree and DNA information

In the Japanese Black cattle population, intensive use of popular sires for reproduction has led to a drastic decline of genetic diversity within the breed. It has been proven that re-establishment of genetically divergent strains is effective for recovering and maintaining the genetic diversity in the Japanese Black cattle. We developed a method for establishing strains in the breed, using pedigree and SNP information. In the method, animals representative of a strain are first

selected as a 'core' group of the strain. Assignment of a candidate animal to the group is judged by a discriminant function with SNP markers. The effectiveness was verified with actual pedigree and SNP data of the Japanese Black cattle.

2: Application of BLUP selection to honeybee and bumblebee breeding

Selection on predicted breeding values by BLUP methodology (BLUP selection) has been widely practiced in animal breeding, leading to a remarkable genetic improvement in economic traits. However, the application of BLUP selection to bee breeding has not been as advanced as in other agricultural species due to two distinctive genetic and reproductive peculiarities in bees, i.e., haplodiploid sex determination and polyandrous breeding system. Taking the two peculiarities into account, we developed a computing algorithm for BLUP in bee breeding. Application of BLUP selection was illustrated with a hypothetical honey bee population.

4. 論文, 著書など

野村哲郎・高橋俊一・竹内 剛 (2013). ハチ類の育種への BLUP 法による選抜の導入. 京都産業大学先端科学技術研究所報. 第 12 号. 45-57.

高橋純一・竹内 実・松本耕三・野村哲郎 (2013). ミツバチおよびマルハナバチにおける微生物の浸潤調査. 京都産業大学先端科学技術研究所報. 第 12 号. 59-67.

野村哲郎 (2013). 遺伝的多様性の確保. "牛疫学(第 3 版)" 近代出版.

野村哲郎 (2013), 牛の育種 "牛の科学" pp.141-159. 朝倉書店.

5. 学会発表など

野村哲郎 (2013) 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センターの概要. 第25回ミツバチ科学研究会. 玉川大学. 2013. 1. 13.

6. 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: 選抜育種による北海道産マルハナバチの高受粉系統の作出

研究代表者: 野村哲郎, 取得年度: H24-26 年 (3 年)

2) 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

3) その他

なし



ハウス栽培の受粉用昆虫として導入され、北海道で分布域を拡大している外来種のセイヨウオオマルハナバチ (左) とセイヨウオオマルハナバチに代わる新たな受粉昆虫として注目される在来種のエゾオオマルハナバチ (右) 選抜育種によりエゾオオマルハナバチの高受粉能力系統の作出を目指しています。

植物生理学研究室

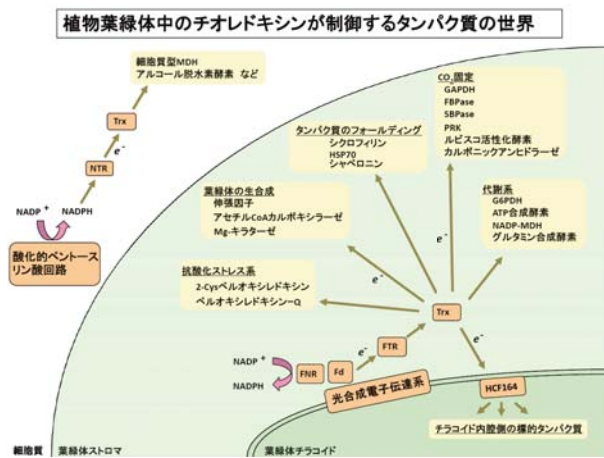
Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry

1. 研究概要

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

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

葉緑体のレドックス制御機構では、チオレドキシシ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は、カルビンサイクルなどの酵素を還元し活性化する、ペルオキシレドキシシ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

准教授 本橋 健

Assoc. Prof. Ken MOTOHASHI, Ph. D.



助教 桶川 友季

Assist. Prof. Yuki OKEGAWA, Ph. D.

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

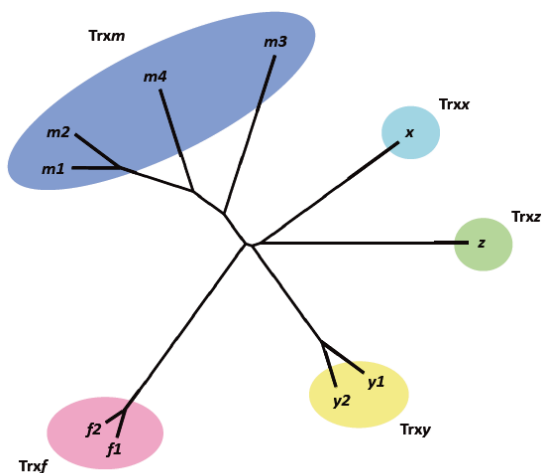
葉緑体は、外包膜、内包膜という二枚の膜に囲まれたオルガネラである。葉緑体は、さらにチラコイド膜と呼ばれる膜を持っており、形態上も複雑なオルガネラである。昼と夜とで大きくレドックス環境が変化する葉緑体ストロマ画分とは対照的に、チラコイド膜を隔てたチラコイドの内側(チラコイド内腔)のレドックス状態変化はほとんど知られていない。私たちは、チラコイド内腔にもチオレドキシシ様タンパク質が局在することを証明し、これがチラコイド内腔で機能していることも明らかにした。還元力の蓄積のないチラコイド内腔で、チオレドキシシのような酸化還元タンパク質が機能するためには還元力の供給が必要である。チラコイド内腔で必要となる還元力をストロマから伝達する分子メカニズム、およびその生理学的な意義を明らかにする。

2. 本年度の研究成果

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

高等植物のモデル植物である *Arabidopsis thaliana* では、5グループ 10 種類におよぶチオレドキシシアイソフォームの存在が明らかとなっている。これら多くのアイソフォームの機能分担が、葉緑体内での各種経路への還元力供給の使い分けを可能にしていると考えて、これらのタンパク質の機能解析を進めた。*m* 型チオレドキシシに関しては、シロイヌナズナで *m1*, *m2*, *m3*, *m4* の4種類のアイソフォームのうち *m1*, *m2*, *m4* に変異を持つシロイヌナズナ変異体を取得し、これらの解析を進めている。この *trxm124* 変異体は個体が小さく、光合成電子伝達速度や炭酸固定反応にも影響が見られた。現在、これらの現象が観察される理由を、分子メカニズムの観点から明らかにすることを目指して研究を進めている。また、T-DNA挿入変異株の解析に加えて、RNAi 法による *m* 型チオレ

ドキシンの変異体も取得し、解析を行った。こちらは、T-DNA 挿入変異株に比べ、*m*型チオレドキシンの蓄積タンパク質量がより少なく、表現型がはっきりと現れ、個体も非常に小さく、弱光条件でなくては生育ができないことがわかった。



Arabidopsis 葉緑体 Trx-familyの分子系統樹

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

私たちのこれまでの研究から、還元力の蓄積のないチラコイド内腔に還元力を供給するシステムの存在が示唆されている。生化学的な解析などから、チラコイド膜タンパク質である CcdA がチラコイド膜を超える還元力受け渡しの候補因子であることが明らかとなってきた。本年度は、シロイヌナズナの CcdA 欠失変異体における植物体の表現型の観察を行った。その結果、CcdA 欠失変異株では、成長が遅く、葉には光阻害の影響が観察された。

3. Research projects and annual reports

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

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

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

The redox state of higher plant chloroplasts fluctuates widely under light and dark conditions. In the light,

reducing equivalents are produced from photosystem and used to produce the reductant NADPH. NADPH is further used for the reduction of CO₂ in the chloroplast stroma. A portion of the reducing equivalents is also utilized for reduction of stroma thioredoxins. Thioredoxins transfer reducing equivalents for regulation of thiol-enzymes, scavenging for reactive oxygen species, or reducing equivalents transfer system across thylakoid membranes. How stromal thioredoxins recognize various target proteins in stroma, without being confused?

Arabidopsis thaliana have five groups of stromal thioredoxins. We have focused *m*-type thioredoxin, a member of stromal thioredoxin family proteins. T-DNA insertion lines of *m*-type thioredoxin in *A. thaliana* were screened. The *trxm124* mutant showed the growth defect and the decreased chlorophyll content, compared with the wild type. We also made *m*-type thioredoxins deficient line by RNAi method. These RNAi lines have showed severe phenotype in growth.

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

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

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

demonstrated CcdA could be reduced, in which a luminal thioredoxin-like protein was reduced. In this year, we screened the *ccdA* deficient T-DNA insertion lines in *Arabidopsis thaliana* and observed the *ccda* mutant phenotype.

4. 論文, 著書など

- K. Yoshida, K. Noguchi, K. Motohashi, T. Hisabori: Systematic Exploration of Thioredoxin Target Proteins in Plant Mitochondria. *Plant Cell Physiol.* **54**, 875-892 (2013)
- Y. Taira, Y. Okegawa, K. Sugimoto, M. Abe, H. Miyoshi, T. Shikanai: Antimycin A-like molecules inhibit cyclic electron transport around photosystem I in ruptured chloroplasts. *FEBS Open Bio* **3**, 406-410 (2013)
- K. Sugimoto, Y. Okegawa, A. Tohri, T. A. Long, S. F. Covert, T. Hisabori, T. Shikanai: A single amino acid alteration in PGR5 confers resistance to Antimycin A in cyclic electron transport around PSI. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1525-1534 (2013)

5. 学会発表など

- 桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナのレドックス制御におけるm型 Trxの役割 第55回日本植物生理学会年会, 富山市, 2014. 3.18-20
- 桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナにおける葉緑体チオレドキシンの生理学的解析 第85回日本生化学会, 横浜市, 2013. 9.11-13
- 桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナのm型チオレドキシ変異株の解析 第4回日本光合成学会年会, 名古屋市, 2013. 5.31-6.1
- 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

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究

課題名: 光合成産物可視化のための蛍光プローブ開発

研究代表者: 本橋健, 取得年度: H25-26 年度 (2 年)

学術研究振興資金(日本私立学校振興・共済事業団)

課題名: 植物の光合成を制御するメカニズムの解明

研究代表者: 本橋健, 取得年度: H25年度 (1年)

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)

科学研究費補助金・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: H22-24 年度 (3 年)

2) その他 研究室メンバーの写真



植物育種学分野研究室

Laboratory of Plant Breeding

教授 山岸 博

Prof. Hiroshi Yamagishi, Agr. D



1. 研究概要

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

このため、細胞質雄性不稔性を植物の F₁ 育種に実際に適用するためには、ミトコンドリアゲノムおよび核ゲノムの遺伝子の機能を正しく把握する必要がある。それと同時に、この雄性不稔-稔性回復の系は、植物における核とミトコンドリアのクロストークの進化を科学的に解明するための優れた舞台となる。

このような視点から、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元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研究で、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。その結果、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。また、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。

一方、栽培・野生ダイコンにおいては、オグラ型細胞質を含めて、多様な細胞質の分化が存在することが認められている。この細胞質の分化とその起源を明らかにすることを目的として、ミトコンドリアゲノムの全塩基配列の解析を進めた。そのうち、上記の「クロダイコン」のミトコンドリアおよび「青長ダイコン」のミトコンドリアについて全ゲノムの塩基配列情報を得た。それらの結果から、ダイコンにおける異なる細胞質の間の進化上の相互関係を解明しようとしている。

2) シロイヌナズナとキャベツの細胞融合による新しい雄性不稔の開発

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5世代 (BC₅) 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、BC₄ 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、体細胞雑種の方の親であるキャベツに加えて、ハクサイ、クロガラシ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た。さらに、*atp1* 遺伝子の上流には、それぞれの細胞質に特有の *orf* が存在することが確認された。これらのうち、花粉形成不全型の雄性不稔を誘起する細胞質について、*orf* の発現と花粉稔性の表現型との対応を観察した。その結果にもとづき、花粉形成不全型雄性不稔の原因遺伝子が、*atp1* の上流に存在する特有の *orf* であることが推定された。

これら、ナスの雄性不稔性に関する一連の研究成果を背景として、新しくナスの花粉稔性回復遺伝子の単離を目標とする研究を開始した。稔性回復遺伝子の有無によって花粉稔性が分離する大規模な集団を供試するとともに、ナスの高密度連鎖地図上の DNA マーカーを調査した。その結果、稔性回復遺伝子が座乗するナスの染色体が明らかになり、かつ染色体上の領域が絞り込まれつつある。

3. Research projects and annual reports

In the field of plant breeding, F₁ hybrids have many genetic advantages and contribute to the increase of worldwide crop production. For the efficient and stable F₁ hybrid production, cytoplasmic male sterility (CMS) is the most useful genetic characteristic. Besides the practical importance of the CMS, it is useful to study the interactions between nuclear genes and mitochondrial ones from scientific view points, especially for molecular and evolutionary genetics. Thus, we have been studying the CMS of various plants both in order to know the evolutionary processes and to exploit new breeding materials. For the establishments of new male sterile materials, we are utilizing organelle genome engineering methods such as cell fusion, and cytoplasm substitution.

1) Ogura CMS and its fertility restoring genes.

Ogura CMS found in a Japanese radish is the most important one in Cruciferous plants, being used worldwide. We have been studying the distributions and differentiations of Ogura CMS gene, *orf138*. 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 BC₄ progenies. The BC₄ progenies were segregated into completely male sterile plants and partially fertile plants. However, all the BC₄ 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. 論文、著書など

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*. **126**, 1851-1859

安本景太・寺地 徹・山岸 博: ダイコンのオグラ型雄性不稔細胞質に対する *Rft* 稔性回復遺伝子座のマッピング 京都産業大学総合学術研究所所報 第8号, 123-130

H. Yamagishi, S. R. Bhat: Cytoplasmic male sterility in

Brassicaceae crops. *Breeding Science*. **64**(No.1), in press (総説)

5. 学会発表など

辻村真衣、森直樹、山岸博、寺地徹:核ゲノム構成により違いを示す Emmer-Dinkel コムギのミトコンドリアの多型。日本育種学会第124回講演会, 鹿児島県, 2014.10.12-13

岡部真弥、田中義行、山岸博、寺地徹:次世代シークエンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析3:青長ダイコンの全ミトコンドリアゲノム配列の決定。日本育種学会第124回講演会, 鹿児島県, 2014.10.12-13

山岸 博:「京野菜とそれらの品種改良」～日本人の育種の知恵と先端植物バイオテクノロジー～。一般財団法人杉山産業化学研究所 第77回 公開講演会, 横浜市, 2013.10.25 (招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

農林水産省・ゲノム情報を活用した農畜産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクト(園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発)

課題名:ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の単離

研究代表者:山岸博, 取得年度:H25(1年)

2) 知財権等 なし

3) 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

4) 受賞等 なし

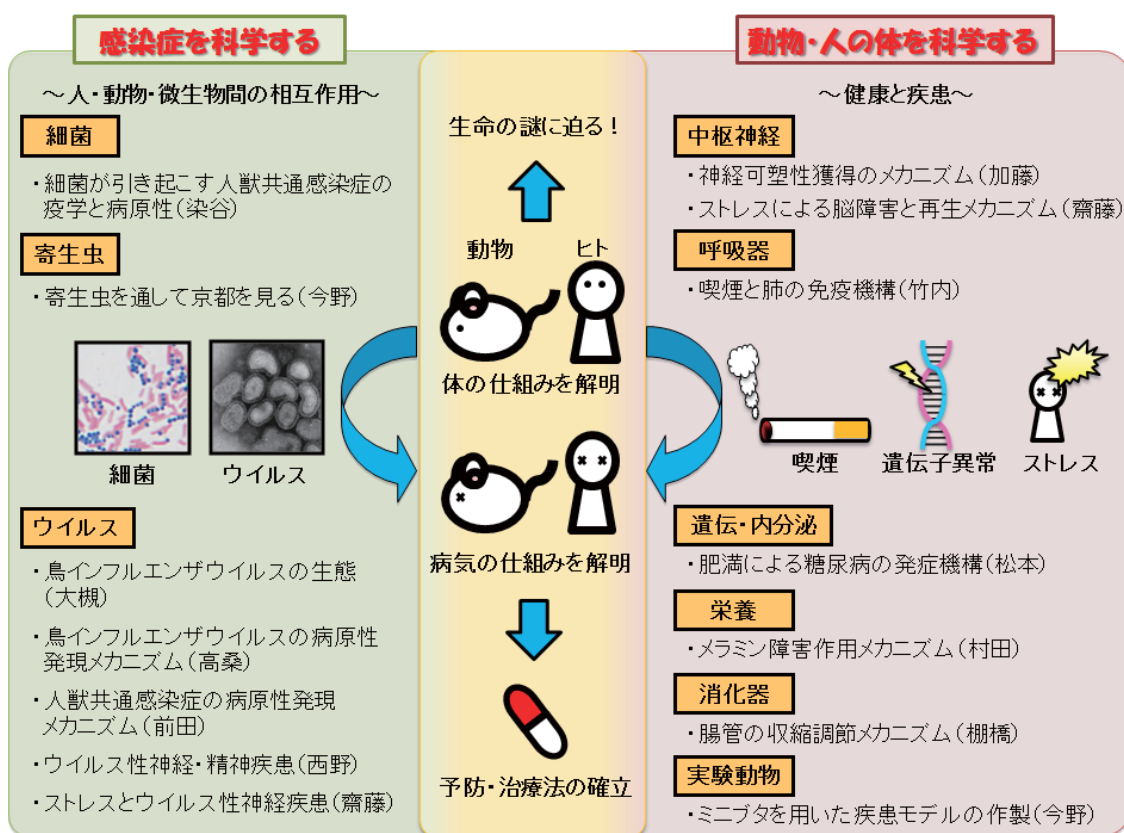
5) その他

副学長 (2010年10月～)

動物生命医科学科

【研究】

動物生命医科学科では、動物に関して遺伝子から個体レベルまで理解し、病気の解明のためのモデル動物の開発、感染症の解明、実験医学の応用による食品・製薬などの安全性確保に役立つ研究を行っています。研究内容は、図に示すように幅広く、種々の研究テーマについて展開しています。ウイルス、細菌と感染症の分子レベルでの解明、神経系疾患や糖尿病の病態の解明、免疫系、消化管運動の分子機構の解明、化学物質の食品への安全性、病態モデル動物の開発などについて、分子レベルから個体レベルまで研究を進めています。そして、人類の生命と健康に役立つ生命医学への応用を目指して、世界レベルの国内有数の実験施設のもとで研究を展開しています。また、京都府、京都市、大阪府立大学との学術交流協定を結び、特に感染症に関する研究を積極的に進め、グローバルからグローバルまでの研究を展開しています。



【教育】

下表は、動物生命医科学科の教員が担当する授業科目です。本学科は、定員 35 名に対して 12 名の教員が講義、実習を担当し、入学から卒業まで徹底して少数精鋭教育を実施しています。特に、学科の特性上、実習に重きをおき、1 年生から実習を始め、学年が進むにつれてより専門的で高度な実習を行います。3、4 年生の基礎、応用特別研究では、教員 1 名に 3～4 名の学生を対象として細やかに行き届いた指導をしています。また、特筆すべき教育として、鳥取大学、岐阜大学と連携教育を行っています。カリキュラム構成は、初年度は生物学、化学通論、生化学実習などの基礎を学んだのち、2 年生から解剖学、生理学、微生物学、動物繁殖学実習などの基礎専門科目を学びます。その後、より専門性の高い、衛生学、感染症学を学び、3 年生の秋学期から各研究室に所属し、基礎特別研究を学習し、4 年生からより専門性の高い応用特別研究に取り組みます。また、3 年生の秋学期には実験動物一級技術者資格試験を受験することが出来、平成 25 年度は 17 名もの合格者を出しています。大学院への進学者も多く、社会の安心・安全に貢献する、動物に関連した高度技術者・研究者や食の安全の専門的知識・技術を兼ね備えた人材を育成しています。

科目	対象学年	担当教員
動物医科学通論	1	大槻・加藤・今野・齋藤(敏)・高桑・竹内(実)・西野・前田(秋)・松本(耕)・村田(英)・棚橋・染谷
化学通論A・B	1	棚橋
実験動物学	1	松本(耕)
生物学通論A	1	西野
生物学通論B	1	前田(秋)・村田(英)
生命倫理	1	前田(秋)
動物遺伝学	1	松本(耕)
生化学実習	1	西野・染谷
動物遺伝学実習	1	加藤・齋藤(敏)
医動物学	2	今野
解剖学	2	加藤
解剖学実習	2	加藤
科学英語Ⅰ	2	染谷
科学英語Ⅱ	2	大槻
基礎病理学	2	竹内(実)
生理学	2	齋藤(敏)
動物繁殖学	2	今野
微生物学Ⅰ	2	染谷
微生物学Ⅱ	2	西野
免疫学Ⅰ・Ⅱ	2	竹内(実)
薬理学・毒性学	2	棚橋
生理学実習	2	齋藤(敏)
実験動物学・毒性学実習	2	松本(耕)・竹内(実)・棚橋
動物繁殖学実習	2	今野
栄養衛生学	3	村田(英)
科学英語Ⅲ	3	高桑
人獣共通感染症学	3	前田(秋)
動物感染症学Ⅰ	3	大槻
動物感染症学Ⅱ	3	高桑
動物と法・経営概論	3	大槻・竹内(実)・他
動物発生工学	3	松本(耕)
動物倫理学	3	村田(英)
動物感染予防学実習	3	大槻・高桑
動物発生工学実習	3	今野・松本(耕)
基礎特別研究	3	大槻・加藤・今野・齋藤(敏)・高桑・竹内(実)・西野・前田(秋)・松本(耕)・村田(英)・棚橋・染谷
生物災害防止論	4	前田(秋)
動物福祉学	4	村田(英)
応用特別研究1・2	4	大槻・加藤・今野・齋藤(敏)・高桑・竹内(実)・西野・前田(秋)・松本(耕)・村田(英)・棚橋・染谷

家畜衛生学研究室

Laboratory of Animal Hygiene

1. 研究概要

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
- 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
- 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

2. 本年度の研究成果

西日本における鳥インフルエンザ調査を、琵琶湖東岸で行なっている。渡り鳥が飛来する11月から北帰行を完了する4月まで毎月採材を行なっている。また、島根県安来市郊外の能義平野において、コハクチョウの糞を多数採材している。ウイルスを分離中である。

ベトナムでの鳥インフルエンザの疫学的研究は、2005年度から継続して実施している。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九州大学医学部実験動物学教室、長崎大学熱帯医学研究所と共同で実施している。ベトナムはウイルスは常在化しており、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誌に順次公表している。

抗インフルエンザウイルス素材の開発は、高桑准教授、藪田研究員らと共同研究を実施している。企業から提供される様々な種類の素材の抗ウイルス作用について検討を実施している。研究成果の一部は、企業と共同で特許出願も行なっている。

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

教授 大槻 公一

Professor Koichi Otsuki, DVM, Ph D



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・論文など

大槻公一 安全な食品の加工製造のためのチェックガイド.

4. 家畜の伝染病の項目を執筆 食の安全研究会編著 第一法規、東京、2013(著書)

K. Hotta, H. Takakuwa, T. Yabuta, T. T. Ung, T. Usui, H. L. Nguyen, T. T. Le, M. Q. Le, T. Yamaguchi, K. Otsuki, T. Ito, T. Murase, T. Yamashiro. Antibody survey on avian influenza viruses using egg yolks of ducks in Hanoi between 2010 and 2012. *Veterinary Microbiology*. 2013. **166**, 179-183 (論文)

H. Takakuwa, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, H. Ozaki, R. Tsunekuni, T. Usui, H. Ito, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, E. Ono, K. Otsuki. The characterization of low pathogenic avian influenza viruses isolated from wild birds in northern Vietnam from 2006 to 2009. (*Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2013. **36**, 581-590. (論文)

Y. Fujimoto, K. Ozaki, M. Maeda, K. Nishijima, H. Takakuwa, K. Otsuki, H. Kida, E. Ono. Resistance to influenza A virus infection in transformed cell lines expressing an anti-PB2 monoclonal antibody. *Veterinary Journal*. 2013. **198**, 487-493. (論文)

大槻公一. 中国でヒトに発生している低病原性鳥インフルエンザ 鶏の研究, 88, 14-17, 2013. (解説)

大槻公一. 中国で発生した低病原性鳥インフルエンザ. 養鶏の友, No. 616, 46-49, 2013. (解説)

大槻公一. 鳥インフルエンザの上陸の可能性 ヒトからヒトへのパンデミックは起るのか? 消費と生活, No. 312, 2013. (解説)

大槻公一. 人獣共通感染症の先回り予防策. CICORN バイオセキュリティニュースレター. バイオセキュリティ分野の国際連携協力に関する研究調査報告書(平成24年度文部科学省研究委託), 長崎大学熱帯医学研究所, 41-43, 2013. (総説)

大槻公一. 高桑弘樹, 藪田淑予, 庄司早希, 山岡敏之. 中国で発生した低病原性鳥インフルエンザ(H7N9). 京都産業大学先端科学技術研究所所報, No. 12, -, 2013. (総説)

大槻公一. 鳥インフルエンザの正しい知識とリスク・マネジメント. 教職研修, No. 492, 83-86, 2013. (解説)

大槻公一. 中国で発生している鳥インフルエンザ(H7N9)で最近明らかになった、関心が持たれる知見(上). 鶏の研究, 88, 14-18, 2013. (解説)

大槻公一. 中国で発生している鳥インフルエンザ(H7N9)で最近明らかになった、関心が持たれる知見(下). 鶏の研究, 88,

14-18, 2013. (解説)

大槻公一. 視点 人獣共通感染症対策に貢献する獣医学. 公衆衛生, 77, 944-945, 2013. (巻頭言)

大槻公一. カガクへの視点 自然界は奥深い—鳥インフルエンザを例に. 化学, 68, 11, 2013. (巻頭言)

5. 学会発表

大槻公一:鳥インフルエンザ～野鳥から鶏へ～. 朝日新聞社主催 朝日地球環境フォーラム 2013. 東京都千代田区 2013年10月1日 (シンポジウム)

大槻公一:鳥インフルエンザウイルス—その生態、新型インフルエンザウイルスへの変異メカニズム、農場から食卓までの安全管理. 第34回日本食品微生物学会学術総会 東京都江戸川区 2013年10月4日 (教育講演)

H. Takakuwa, K. Hotta, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, T. Usui, H. Ozaki, H. Ito, T. Murase, T. Yamaguchi, T. Ito, E. Ono, K. Otsuki: Distribution of antibodies to Influenza Virus in Wild Birds in Northern Vietnam in 2011. Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, 2013.1.23-24. (シンポジウム)

6. その他特記事項

1) 外部資金

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)

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)

2) 知財権等

公開日:2013年7月11日名称:鳥インフルエンザウイルスに対する消毒方法

発明者:大槻公一、高桑弘樹、常國良太、川口直康、原邦夫、大上猛夫、三浦治

3) 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～)

公益財団法人鳥取県食鳥肉衛生協会理事 (H4年～)

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～)

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～)

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～)

京都府家畜改良増殖審議会委員 (H23年～)

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～)

4) 受賞など

なし

5) 社会貢献(講演)

大槻公一:鳥インフルエンザA(H7N9)について. 京都府健康福祉部健康対策課主催 中国における鳥インフルエンザA(H7N9)に係る医療関係者研修会 京都市 2013年4月23日

大槻公一:鳥インフルエンザの最新知見と防疫対策について. 姫路家畜保健衛生所主催 姫路家畜保健衛生所開設記念式典 兵庫県姫路市 2013年4月26日

大槻公一:鳥インフルエンザについて. 社団法人新潟県ペストコントロール協会主催 第9回県民公開講座 感染症予防衛生講習会 新潟市 2013年6月27日

大槻公一:食品業界における鳥インフルエンザへの対応. 日本食品工業倶楽部主催 食品の品質保証懇話会 平成25年7月例会 大阪市 2013年7月18日

大槻公一:中国に出現した鳥インフルエンザ(H7N9)の脅威と防疫. 三菱京都病院主催. 感染対策職員講習会. 京都市 平成25年8月20日

大槻公一:世界における鳥インフルエンザの発生状況と有効な防疫対策. 滋賀県畜産課主催 平成25年度高病原性鳥インフルエンザ防疫対策研修会 滋賀県大津市 2013年10月8日

大槻公一:近冬に想定される鳥インフルエンザ発生の動向と対策. 近畿農政局主催 平成25年度近畿農政局重要家畜伝染病防疫実務演習 京都市 2013年10月10日

大槻公一:鳥インフルエンザについて. 全国消防長会主催 平成25年度全国消防長会消防長研修会 京都市 2013年10月30日

大槻公一:アジアで発生し続けている鳥インフルエンザの脅威. 広島国際大学主催 卒後教育研修会 広島県呉市 2013年11月3日

大槻公一:家畜衛生の最新の知見について. 京都府農林水産部主催 京都府家畜伝染病防疫研修会 京都府亀岡市 2013年12月18日

大槻公一:鳥インフルエンザに関する最新情報について. 鶏病研究会長崎支部主催 鶏病技術研修会 長崎市 2013年12月20日

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の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。また、てんかん誘導刺激を導入した扁桃体は、情動中枢の神経領域であることから、成長ホルモンシグナル系が、情動行動に影響する可能性が考えられる。そこで、成長ホルモンや成長ホルモン受容体拮抗薬を海馬に投与し、直接、成長ホルモンシグナル系の発動と情動系行動への効果の相互作用を検討した。さらにもう一つのてんかん原因分子であるシアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) については、その遺伝子欠損マウスを作成し、そのマウスがてんかんを発症するかどうかについて検討した。同腹子の野生型マウスすべてがてんかんを発症する条件で、ほとんどの ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスは、てんかんを発症しなかった。このことから、ST3Gal IV がてんかん原因分子であることが明らかとなった。今後さらに、てんかん発症に関わるシアル酸転移酵素と

成長ホルモンの発現機構や、相互関連性等、これら分子によるてんかん発症機構の解明を目指している。

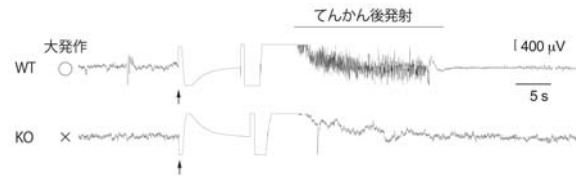


図1. 大発作時のてんかん後発射。

野生型(WT) 同腹子マウスは、典型的なてんかん後発射(脳波)を含む大発作を示した。シアル酸転移酵素遺伝子欠損マウス(KO)の脳波に、てんかん後発射は認められず、マウスは大発作を示さなかった。(矢印は、てんかん誘導刺激)

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

ヒトのてんかん患者は、睡眠障害、うつ、不安症、統合失調症等の神経精神疾患を併発することが多い。一方で、シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) を欠損したマウスは、てんかんを発症しないものの、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)を発症するマウスであった。すなわちこのマウスは、てんかんの併存症あるいは、治療による副作用効果を示していると考えられ、シアル酸転移酵素がてんかんや、不安症を含む神経精神疾患の中心となる分子機構を提起していると考えられる。以上の知見を論文にまとめている一方で、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、その併存症や副作用(情動系障害)に関わるのかについて研究を進めている。

歩行軌跡

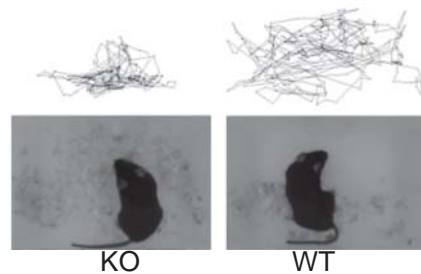


図2. 恐怖条件付け試験による不安症の検定。

(図2解説, 音刺激の最後にフットショックを与えた2日後, 同じ音を聞かせたとき, シアル酸転移酵素遺伝子欠損マウス(KO)は, 歩行軌跡より, すくんで動かなくなったことがわかる。同じ環境下で, 野生型(WT)同腹子マウスは, よく動いており, すくみの程度の低いことがわかる。)

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, さらにヒト難治てんかん治療につながることで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, 成長ホルモンシグナル系の下流の遺伝子産物の発現変動と情動系の行動への効果を検討した。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(Arc, Nr4a1)の発現変動と相関性を示した。現在, 論文のリバイスに向けて実験を追加している。シアル酸転移酵素遺伝子欠損マウスが, てんかんを発動しないことから, このシアル酸転移酵素がてんかん原因分子であることがわかった。また, てんかんの発症時に脳内で著しく発現が更新する成長ホルモンが, シアル酸転移酵素遺伝子欠損マウス脳内で発現を著しく減少していることがわかった。このことから, シアル酸転移酵素とその支配下にある成長ホルモンが協調することで, 側頭葉てんかんが発症すると示唆された。現在, 本遺伝子欠損マウスの研究結果について, 論文投稿中である。

2) シアル酸修飾が制御する情動系神経回路の応答機構の解明

シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)を欠損したマウスは, うつ・不安障害, 環境適応不全, 睡眠障害, ホルモン恒常性障害(成長阻害や性行動不全)に加え, 新たに, 統合失調症様症状も示すことがわかってきた。また, シアル酸転移酵素を欠損したマウスは, 血中の成長ホルモンの低下により成長遅延を示す。また, 分娩時にプロゲステロンの低下が阻害され, その結果分娩遅延による流産を示す。さらには, FSHの分泌不全による性周期不全や, 分娩後発情不全を示す。以上のことから, シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)を欠損したマウスは, ホルモン恒常性異常を示すことが明らかとなり, 現在論文投稿に向けた準備をおこなっている。

3) ストレス性情動系障害への飼料摂取効果の検討

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, 統合失調症様症状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ことが示唆され, 8月に特許を出願した。また現在論文投稿に向けた準備をおこなっている。

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, てんかん治療に有効である知見をToxiconに発表した。

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

1: Clarification of mechanism of epilepsy progression.

Amygdala-kindling model mice are 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. First, we found there is 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. Now we prepare a revised paper. Second, a sialyltransferase ST3Gal IV deletion failed to develop temporal lobe epilepsy using the ST3Gal IV gene-deficient mice. It indicates that ST3Gal IV is an effective target for treating epilepsy. Presently, we aim to investigate involvement of the sialyltransferase with expression of growth hormone in the brain showing epilepsy progression.

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

Epilepsy patients are at a greater risk for developing anxiety, depression, psychosis, and learning disorders. On the other hand, the 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 the deficient mice, in contrast with tremendous up-regulation of growth hormone following epileptic seizures. These data was summarized and submitted to a Journal. On the other hand, the deficient mice showed decrease of plasma growth hormone and Igf1 according to growth delay. Furthermore, failures of post-partum estrous cycle depending on decrease of FSH, and of parturition by sustaining plasma progesterone levels on gestation 19 day were observed. It proposed that ST3Gal IV regulates hormonal metastasis on growth hormone-Igf1 axis and progesterone-GnRH system. Now we are preparing a manuscript.

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 dietary oil affected depression, anxiety, environmental adjustment disorder, and activity. Then, we applied for a patent in August, 2013. 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. In this year, we published several data in *Toxicon*.

4. 発表論文

Kato K, Akaike N, Kohda T, Torii Y, Goto Y, Harakawa T, Ginnaga A, Kaji R, Kozaki S. Botulinum neurotoxin A2 reduces incidence of seizures in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Toxicon* 74:109-15 (2013年11月) (2014年1月31日 166部ダウンロード)

5. 著書および総説

なし。

6. 招待講演、シンポジウム等

1. Srimontri P, Nakayama Y, Kurosaka A, Endo S, Sakamoto T, Itohara S, Hirabayashi Y, and Kato K. Sialyltransferase ST3Gal IV is involved in temporal lobe epilepsy and its associated disorders. International Symposium on Glyco-Neuroscience in Awaji Yumebutai International Conference Center 2014年1月 9-11日 (シンポジウムポスター)
2. 加藤啓子 神経可塑性の不思議と神経精神疾患との関連性 武庫川女子大学 みだしの会「女性研究者研究活動支援事業 (文部科学省)」 2013年10月16日 (招待講演)

7. 学会発表

1. 加藤啓子, 西嵯大貴 情動行動への油脂摂食効果について 第156回日本獣医学会学術集会 2013年9月21日 岐阜大学 (口頭)

8. その他特記事項

1. 外部資金

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

ストレス性情動系障害を改善する医薬用油脂組成物
特願 2013-164210 2013年8月7日

3. 学外活動

日本糖質学会評議員

日本神経化学会評議員

関西実験動物研究会評議員

理化学研究所 脳科学総合研究センター 客員研究員

4. 受賞等

なし。

5. その他

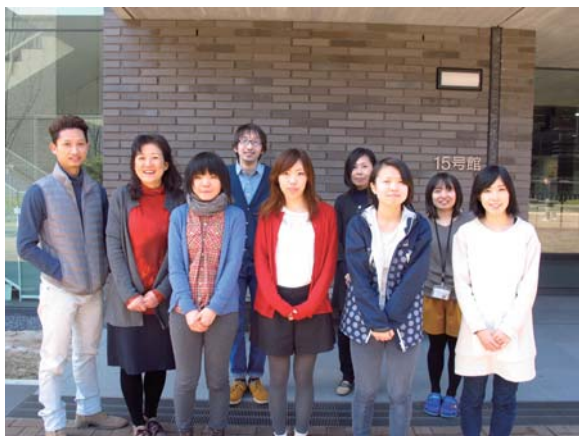
書籍: Kato, K. Underlying Mechanisms of Epilepsy, Edited by:

Fatima Shad Kaneez ISBN 978-953-307-765-9, Publisher: InTech

(2011年9月発刊 2014年3月11日1512部ダウンロード。)

ホームページ

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

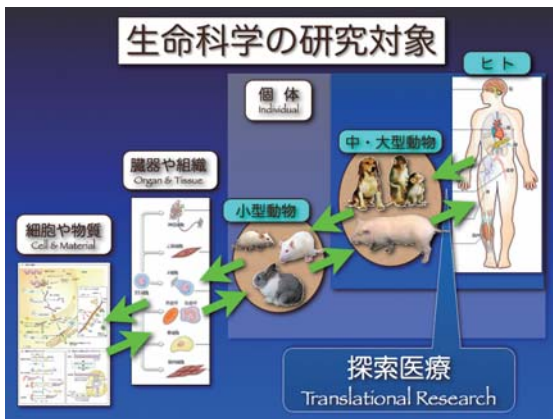


実験動物医学研究室

Laboratory of Laboratory Animal Medicine

1. 研究概要

本研究室の研究テーマは、探索医療 (Translational Research: TR) です。TRとは、基礎研究の成果を臨床に実用化する、言い換えますと、橋渡しする事を目的とした研究で、動物実験を行うために、前臨床研究とも呼ばれます。



教員である今野は、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。本学に移籍するまで、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TRに携わってきました。今野は、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。現在は国立循環器病研究センター研究所にも籍を置き、ミニブタから得られたMRIの画像情報を元にして、ミニブタの3D解剖図を作製しています。

3D解剖図の作製には、自動車などの工業製品を精密に作図するためのコンピュータグラフィック技術を応用していますが、この研究を進める事により、動物の有益な情報を社会に提供する事で、今後、iPS細胞などを用いたTRが盛んに行われると考えられますが、そういった研究において大いに役立つと考えられます。また、この成果によって動物を無駄に殺す(解剖する)機会を減らす事が出来るなど、動物愛護の精神(実験動物の3R)にも繋がります。そして、ヒトでは、最先端技術として一部の大学病院での臨床現場において導入は始まりましたが、獣医臨床レベルではまだで

助教 今野 兼次郎

Assist. Prof. Kenjiro Konno,

oD. V. M., Ph. D., DJCLAM



あり、この技術を獣医臨床にも活かせる可能性が十分にあります。

そして、これまでの知識や経験、技術などを活かして、本学ではマウスやラットなどの実験用小動物、特に遺伝子改変マウスを用いて、血管障害に関して研究を進めています。臓器移植や再生医療に共通するキーワードの1つが「血管」です。ミニブタを用いた医療デバイスの開発も、血管内ステントの開発でした。ヒトの体を都市に例えると、血管は「道路」と言えますが、災害時、道路が機能なくなると、人々の生活のみならず健康をも脅かし、死をも招きかねません。それと同様、血管はヒトや動物が健康な生活を送るために、非常に重要な役割を果たしており、これが破綻すると単に健康のみならず、生死にも繋がりがかねません。実際、心筋梗塞や脳梗塞を始め、血管障害が原因で死亡する日本人の数は、死因の1/3を占めます。また、今野が従事してきた臓器移植や再生医療の研究では外科的手技が非常に重要ですが、彼はその特技や経験、そして知識を活かして、疾患モデル動物を外科的に作出し、血管障害の原因究明に従事しています。現在は、血管障害とヒアルロン酸の関係に注目して、研究を進めています。

さらにはその一環として、マウスやラットの吸入麻酔に関する研究も進めています。麻酔はそれを施されたヒトや動物の肉体に大きな影響を及ぼしますが、その結果、麻酔方法が実験データにも大きく影響を与え、データの信頼性にまで大きく影響を及ぼします。しかしながら、実験小動物への麻酔方法は、ヒトとは大きく異なっているのが現状です。幸い、私はブタやサル、イヌなど、ヒト同様の麻酔に多数携わって来ましたので、そういった知識や経験、技術を活かし、実験小動物の麻酔方法を改善する研究にも従事しています。この研究成果も、動物愛護の精神に大きく寄与します。

以上が本研究室における研究概略です。私は実験動物学を専門としますが、実験動物学は動物実験から得られた成果をヒトに外挿(還元)する事を目的とした学問です。ノーベル賞を受賞された山中伸弥先生も、常々動物実験の重要性を説いておられますが、上述した血管内ステントの研究成果は、東京大学医学部附属病院においてヒトへの臨床研究に駒を進め、数年以内に初の純国産血管内ステントとして製品化される予定です。これは、経済産業省や厚生労働省の支援を受けた研究であり、日本という国の安全保障にも大きく寄与します。このよう

に、研究のための研究に終わる事無く、可能な限り社会に研究成果を還元出来る様、分属学生や共同研究者と共に、日々研究に取り組んでいます。

2. 本年度の研究成果

これまで血管障害に注目して研究を進めてきました。特に、マウスを用いた血管障害モデルを作製し、血管障害における内皮細胞の重要性、特にヒアルロン酸との相互関係に焦点を絞り、研究を進めてきました。Sataモデル(Mouse femoral artery injury model)を参考にしながら、更に改良を加え、血管構造を損傷する事無く、血管内皮細胞のみを剥離するマウス大腿動脈内皮細胞剥離モデルの作製を行ってきました。現在は、この有益なモデル作製が安定して出来る様になり、現在は、そのモデルから回収したサンプルを解析中です。



また、その疾患モデル作製時に、麻酔管理が大変重要であり、モデル作製と同時に、マウスやラットの麻酔管理の改善も研究対象としてきました。ヒトや小動物の臨床では、多くの場合、気管チューブを挿管した後、人工呼吸器を用いて吸入麻酔を施しますが、これまでマウスやラットへの気管挿管、特にマウスでは困難と言われ、殆ど実用化されて

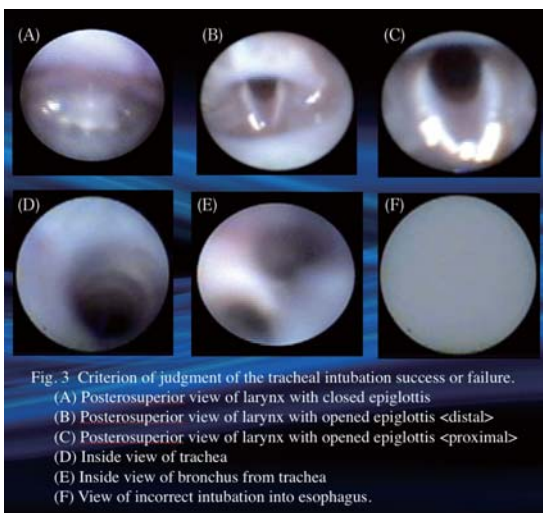
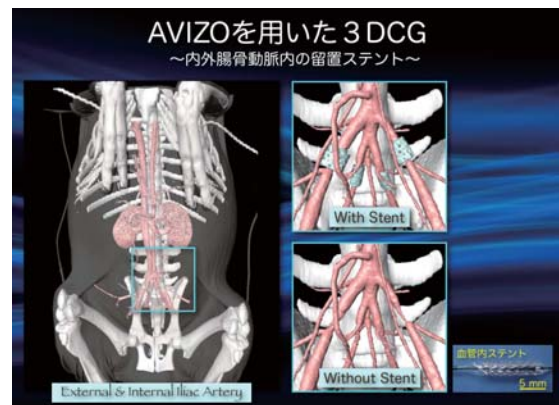


Fig. 3 Criterion of judgment of the tracheal intubation success or failure.
 (A) Posterosuperior view of larynx with closed epiglottis
 (B) Posterosuperior view of larynx with opened epiglottis <distal>
 (C) Posterosuperior view of larynx with opened epiglottis <proximal>
 (D) Inside view of trachea
 (E) Inside view of bronchus from trachea
 (F) View of incorrect intubation into esophagus.

いませんでした。そこで、企業との共同研究として、内視鏡技術を応用した装置を用いて迅速かつ安全、そして確実な方法を確立しました。その成果は、論文にまとめると共に、東北大学の高度麻酔研究会の講師として、あるいは日本獣医学会で開催されたフォーラムでの演者として、発表しました。

さらには、国立循環器病研究センター研究所において、ミニピタを用いて3テスラのMRIによってDICOMデータを回収し、現在はそのデータを3Dコンピュータグラフィック技術を用いてミニピタの3D解剖図を作製しています。



3. Research projects and annual reports

3. Research projects and annual reports

Laboratory animal medicine is the new specialty field within laboratory animal science, and also is one of veterinary medicine that is concerned with the diagnosis, treatment, and prevention of diseases in animals used in research, testing, and teaching. And it includes methods to minimize and prevent pain, discomfort, and distress in research animals and ways to identify factors that may affect animal research. The results of these researches contribute to both the improvement in reliability of laboratory experiments, and animal welfare.

Assist. Prof. Konno is a diplomate of the Japanese College of Laboratory Animal Medicine (JCLAM) and a member of the Japanese Association of Laboratory Animal Medicine (JALAM). He has been engaging in the researches of translational research including regenerative medicine, organ

transplantation, investigation of diseases using laboratory animals.

A main theme of the research in this laboratory is a translational research. Translational research is one of the scientific researches, and its purpose is practical applications to make findings from basic science applicable for human, that is, for our society.

(1) Relationships between blood vessel injury and hyaluronic acid - mouse model of vascular injury -

Although it is thought that hyaluronan synthase is a very important for the repair of the inner surface of the artery, it has not yet been proved in detail. Therefore, in order to prove the hypothesis, with the mouse model of the vascular injury, we are promoting the analysis. Because only arterial endothelial cells of the model mouse are curetted surgically, the making of the rodent model is needed for the advanced techniques, knowledges and experiences. But we have completed the production of the disease model, and now the process of the repair are being analyzing.

(2) Anesthesia - endotracheal intubation and inhalation anesthesia for mice and rats -

Appropriate and effective anesthesia is critical, because it has a strong influence on laboratory animals, and its affect greatly impacts the experimental data. Inhalational anesthesia by endotracheal intubation is currently prevailing in general anesthesia and is preferred over injection anesthesia, especially for large laboratory animals, because it is a safe and easy control agent. However, it is not common for small laboratory animals, because of the high degree of technical skills required. We assessed the capability of use for mice of the endotracheal intubation by using the

endoscope system "TESALA AE-C1" and inhalational anesthesia using a ventilator.

Endotracheal intubation was successfully performed on all 10 C57BL/6 mice injected with M/M/B: 0.3/4/5 comprised of medetomidine, midazolam and butorphanol, at a dose of 0.3 mg/kg + 4.0 mg/kg + 5.0 mg/kg body weight/mouse, respectively. After the intubated mice were connected with the inhalational anesthesia circuit and the ventilator, vital signs were measured until 15 min after the connection. The data with M/M/B: 0.3/4/5 showed stable and normal values, which indicated that this new endotracheal intubation method was simple, reliable and safe, which means that this anesthesia is favorable in regard to the animal's welfare.

(3) 3D anatomical figures using computer graphical technology

Interactive visualization is a branch of graphics in computer science that involves the creation of graphic illustrations using computers. And many animals are used for the purpose of education or research, and especially miniature pigs are used for translational research. Therefore, by the fusion laboratory animal science and computer science, we have been preparing 3D anatomical figures of miniature pigs. These results give both useful information for education and research, and benefits also useful for animal welfare.

4. 論文, 著書など

A. Hirao, T. Kawarasaki, K. Konno, S. Enya, M. Shibata, A. Kangawa and E. Kobayashi. Green fluorescent protein (GFP) expression patterns in the olfactory epithelium of GFP transgenic cloned Jinhua pigs. *Acta Zoologica*. 94, 1-11

Y. Hirono, Y. Tanahashi, K. Sasaki, K. Konno, Y. Shirai, K. Kobayashi, A. Someya, S. Inaga, M. Sakura, E. K.

Pinkerton and M. Takeuchi. Alveolar macrophage functions and DNA damage in cigarette smoke-exposed mice. 4, 1-7

今野兼次郎, 小川哲平, 畠山美香, 板野直樹 : 内視鏡を用いたマウスの気管挿管と吸入麻酔 2 ～前投薬の改良～. 先端科学技術研究所所報. 12号, 21-31

5. 学会発表など

今野兼次郎, 畠山美香, 小川哲平, 塩谷恭子 内視鏡プローブを用いたマウスへの安定・安全な気管チューブ挿管と吸入麻酔の検討. 第60回日本実験動物学会総会, つくば市, 2013.5.15-17

今野兼次郎 実験動物医学専門医協会主催 The 2nd JCLAM Forum 「海外における動物愛護関連法規とRefinementへのDJCLAMの取り組み」 2) 導入麻酔としての三種混合麻酔 (げっ歯類の気管挿管). 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 2013.9.20-22

6. その他特記事項

1) 外部資金

特定課題研究 C13010

「幹細胞ニッチの形成機構解明と血管再生療法への応用」:
研究分担者: 今野兼次郎, 取得年度: H25-27年 (3年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動 日本獣医学会: 評議員

4) 受賞等 なし

5) その他 なし

東北大学動物実験センター 実験動物高度取扱技術研修会 —マウスの高度麻酔法—

2013年2月22日に東北大学動物実験センターにおいて、東北大学主催で開催された上記研修会において、講師を務め、講義と実習を行った。

大阪府立生野高等学校スーパーサイエンスハイスクール (SSH) プロジェクト

2013年7月29日 (火) ～31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。

日本実験動物協同組合関西支部会での学術講演

2013年11月29日 (金) にキャンパスプラザ京都で開催された日本実験動物協同組合関西支部会の研修会において、「実験動物としてのブタ」と題して学術講演を行った。



ラボのメンバー似顔絵

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。研究の中では、ストレスによる脳の神経変性の原因を明らかにするため、脳の血流調節、モノアミン神経系などの機能変化、副腎皮質ホルモンの脳に与える影響などの解析、指標となるマーカー探索を柱としている。また、これらの研究で得られる成果をもとに、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。

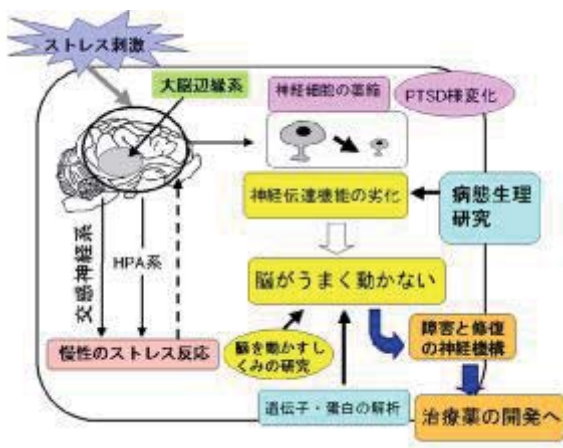


図1. 本研究の概略

2. 本年度の研究成果

1) 脳組織におけるTimmの試み

脳の中には亜鉛陽性反応を示す領域が存在することが組織学的研究で明らかにされているが、これらの脳

領域には海馬や前頭前野等、ストレスによって神経変性や萎縮がおこる部分が含まれている。亜鉛の役割については、グルタミン酸等の神経伝達物資の貯蔵・放出に関与していると考えられている。一方、過剰量の亜鉛はカルシウムと同様、神経毒性を有する可能性が指摘されており、ストレスによる脳神経変性や萎縮に何らかの形で関与していると考えられる。神経細胞シナプス小胞内の亜鉛はTimm染色法により可視化することが可能であるが、簡便な染色プロトコールがみあたらない。そこで、染色法を再検討し、マウスの脳を対象にした簡便なTimm染色法を確認することができた(図1; Timm陽性反応はCA1~CA3領域とは異なる場所に見られる)。今後、ストレスによるTimm陽性反応の変化、神経細胞の変性や萎縮との関わりについて検証していく予定である。



図1. マウス海馬のTimm染色像。※印; 陽性反応部位(主として苔状繊維)

2) 培養細胞レベルでの研究に向けた展開

副腎皮質ホルモンなどのストレスホルモンが神経細胞に及ぼす影響を細胞レベルで解析するため、培養細胞を利用した実験系を検証した。その結果、大脳由来の細胞を分離・培養することが可能となった。現在、神経細胞、グリア細胞の同定を進めるとともに、海馬

からの神経細胞の分離・培養法について検討を行っている。

3) 大型実験動物(ミニブタ)を用いた脳血流変化測定技術の開発

麻酔状態で、ミニブタの鼻の異なる位置から求心性刺激を加え、刺激部位の違いによって大脳皮質の一次体性感覚野の異なる位置で誘発電位を記録できた。また、同様にしてミニブタの鼻の異なる位置から刺激を加え、一次体性感覚野の表面から直接血流変化を測定したところ、鼻の刺激位置の違いに応じた体性感覚野の位置で、脳の血流反応が起こることを実証した(表紙参照;自治医科大学、中央大学との共同研究)。

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. In the laboratory, we are examining neuronal signals which reflect acute and chronic stress in the brain, and how neurons are damaged by stress and are regenerated.

Research topics:

- 1) Development of detection methods of neuronal signals related to degeneration of neurons by stressors in the brain.
- 2) Neuromodulators to dysregulate neural communication by exposure to stressors, and to promote regeneration of the damaged neurons in the brain.

Annual reports:

1) Timm-staining method to visualize zinc-containing neuropils

The purpose of this study is to examine and to evaluate whether such stress hormone as glucocorticoid may cause

damage in zinc-containing neurons of the brain, especially the hippocampus.

To visualize the zinc-containing neuropil, Timm-staining method is often used. There are many variants in this technique, so that it is much less comprehensive for experimenters.

In this study, we re-examined the Timm-staining protocol using mouse, in addition to perfusion and fixation method with sodium sulfide and paraformaldehyde. Through the study, we obtained the simple and comprehensive protocol for use.

2) Estimation of neural degeneration in in vitro experiments

We examined techniques for isolation and primary culture of neuronal cells from the fetal brain of mouse in order to investigate any early sign of neuronal degeneration by exposure to stress hormones at the cellular level. At present, we have tried to find the neuronal marker representing the neuronal damage by glucocorticoid treatment.

3) Direct cortical hemodynamics measurement using a functional Near-infrared Cortical Imaging technique

We developed functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI), which enables us the direct measurement of cortical hemodynamics. Using miniature pigs (Mexican hairless pigs), we validated the fNCI system in a direct cortical measurement. By comparing functional mapping with somatosensory-evoked potential (SEP) measurements in the pig brain cortex, our study provides experimental evidence for the applicability of direct functional measurement of cortical hemodynamics with the fNCI system (See figures in the cover; Joint research with Jichi Medical University and Chuo University).

4. 発表論文、著書など

Toshiyuki Saito, Minako Uga, Daisuke Tsuzuki, Hidenori Yokota, Keiji Oguro, Tsuyoshi Yamamoto, Ippeita Dan, Eiju Watanabe (2013) Evoked potential mapping of the rostral region by frameless navigation system in Mexican hairless pig. **Journal of Neuroscience Methods** 212:100-105.

Ponnirul Ponmanickam, Govindaraju Archunan, Shanmugam Achiraman, Rajanarayanan Sankar, Toshiyuki Saito, Yoshiaki Habara. (2013) Preputial gland activates olfactory receptor neurons in rat: Calcium imaging study using laser scanning confocal microscopy. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics** 50:242-246

Minako Uga, Toshiyuki Saito, Toshifumi Sano, Hidenori Yokota, Keiji Oguro, Edmi Edison Rizki, Tsutomu Mizutani, Takusige Katura, Ippeita Dan, Eiju Watanabe. Direct cortical hemodynamics mapping of somatotopy of pig nostril sensation by functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI). **Neuroimage** (in press)

5. 学会発表など

齋藤敏之、市川みなみ、小野隆祐、西野佳以：脳における Timm 染色法の再検討。第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜大学、岐阜市、2013. 9. 20-22

6. その他の特記事項

1) 外部資金

科学研究費助成金 基盤研究 C (一般)

課題名：画像支援定位脳手術の新規モデル確率に向けたミニブタの脳地図作製

研究代表者 齋藤敏之、取得年度：H24-26 年 (3 年)

科学研究費助成金 基盤研究 C (一般)

課題名：ウイルス性神経疾患に影響を及ぼす宿主要因と環境要因

研究代表者 西野佳以、取得年度：H25-27 年 (3 年)

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：日本生理学会評議員

齋藤敏之：日本獣医学会評議員

4) 受賞等 なし

5) その他

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

研究代表者 齋藤敏之、取得年度：H24-25 年 (2 年)

(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



研究室メンバー(4年生)との集合写真

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。本研究室では、マダニ媒介性感染症の疫学調査、食肉の流通現場における大腸菌の抗菌薬耐性、ウシの血液に感染するバルトネラについて研究している。

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。今年度は、京都市におけるマダニの分布をより詳細に明らかにするため、毎週 1 回マダニの採集を行い、マダニの季節消長を明らかにした。また、マダニに感染し、日本紅斑熱を引き起こす *Rickettsia japonica* の保有状況を調査した。その結果、マダニの種類により、リケッチアの保有率が異なることが明らかになった。さらに、食肉の流通現場より大腸菌を分離し、薬剤感受性の調査を行った。また、ウシの血液を採取し、バルトネラの感染状況を調査した。

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.

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 ticks in Kyoto was investigated. Ticks were collected weekly by flagging method and rickettsial DNA was detected by PCR. The rate of rickettsial infection depended on tick species.

The drug resistant bacterium in food processing can spread the drug resistance to commensal microflora in human. Therefore, susceptibility to antimicrobials in *Escherichia coli* isolated from slaughterhouse was investigated.

助教 染谷 梓

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



The prevalence of *Bartonella* in cattle was also investigated.

4. 論文、著書など

Hirono, Y., Tanahashi, Y., Sasaki, K., Konno, K., Shirai, Y., Kobayashi, K., Someya, A., Inaga, S., Sakura, M., Pinkerton, K. E., Takeuchi, M.: Alveolar macrophage functions and DNA damage in cigarette smoke-exposed mice. *Adv. Biosci. and Biotechnol.* 4:1-7 (2013)

染谷梓, 池永充宏, 大西修, Igor Velado Fernandez, 西野佳以, 前田秋彦:京都市山科区で駆除されたイノシシに寄生していたマダニ類の解析. *京都産業大学総合学術研究所所報* 8:57-62

染谷梓:リケッチア, クラムジア. *動物微生物学検査学* (印刷中)

5. 学会発表など

伊藤亜希, 米島万有子, Igor Velado Fernandez, 福田美樹, 染谷梓, 前田秋彦:京都市における蚊媒介性フラビウイルス媒介蚊の調査. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 熱海市, 2013.5.24-25

6. その他特記事項

1) 外部資金

京都産業大学・特定課題研究

課題名:「京都市の感染症の疫学的解析と感染症マップの作製」に関する基盤研究

研究分担者:染谷梓, 取得年度:H24-25年(2年)

2) 知財権等

染谷梓:ウイルス不活化剤、抗菌剤、ウイルス不活化方法、並びに、抗菌方法. 特願 2013-110849

3) 学外活動

染谷梓:京都市衛生環境研究所との共同研究

染谷梓:大阪府立大学客員研究員

4) その他 なし



感染症学研究室

Laboratory of Infectious Disease

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、感染症の原因である病原体の生態を解明し、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

H5N1 亜型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、生息および飛来する各種野鳥間で維持されている鳥インフルエンザウイルスの浸淫調査を行った。その結果、ヤマシギから分離された H5N2 亜型鳥インフルエンザウイルスが近年東アジアの分離株と近縁であり、H5N2 亜型ウイルスはこれらの地域維持されている可能性がある。また、ガビチョウから分離された H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルスは、その後、香港のヒトから分離された株と遺伝子性状が非常に近縁であったことから、ベトナムや中国において、野鳥の間でウイルスが維持され、ヒトの間での新たな鳥インフルエンザウイルスの流行に野鳥が関わっている可能性を示唆していた。

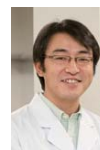
3. Research projects and annual reports

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.*

准教授 高桑 弘樹

Assoc. Prof. Hiroki Takakuwa, D.V.M., Ph.D.



3: *Development of strategies for the prevention and control of the infections.*

Due to concerns that wild birds could possibly spread H5N1 viruses, surveillance was conducted to monitor the types of avian influenza viruses circulating among the wild birds migrating to or inhabiting in northern Vietnam. An H5N2 virus isolated from a Eurasian woodcock had a close phylogenetic relationship to H5 viruses recently isolated in South Korea and Japan, suggesting that H5N2 has been shared between Vietnam, South Korea, and Japan. An H9N2 virus isolated from a Chinese Hwamei was closely related to two H9N2 viruses that were isolated from humans in Hong Kong, suggesting that an H9N2 strain relevant to the human isolates had been transmitted to and maintained among the wild bird population in Vietnam and South China. The results support the idea that wild bird species play a significant role in the spread.

4. 論文、著書など

- K. Hotta, H. Takakuwa, T. Yabuta, T. T. Ung, T. Usui, H. L. Nguyen, T. T. Le, M. Q. Le, T. Yamaguchi, K. Otsuki, T. Ito, T. Murase, T. Yamashiro. Antibody survey on avian influenza viruses using egg yolks of ducks in Hanoi between 2010 and 2012. *Veterinary microbiology*. 2013. **166**, 179-183
- 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, K. Otsuki. The characterization of low pathogenic avian influenza viruses isolated from wild birds in northern Vietnam from 2006 to 2009. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2013. **36**, 581-590
- Y. Fujimoto, K. Ozaki, M. Maeda, K. Nishijima, H. Takakuwa, K. Otsuki, H. Kida, E. Ono. Resistance to influenza A virus infection in transformed cell lines expressing an anti-PB2 monoclonal antibody. *Veterinary journal*. 2013. **198**, 487-493

5. 学会発表など

- H. Takakuwa, K. Hotta, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, T. Usui, H. Ozaki, H. Ito, T. Murase, T. Yamaguchi, T. Ito, E. Ono, K. Otsuki: Distribution of antibodies to Influenza Virus in Wild Birds in Northern Vietnam in 2011. *Asia-Africa Research*

Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, 2013.1.23-24

K. Hotta, H. Takakuwa, T. Yabuta, T. T. H. Ung, N. L. K. Hang, L. T. Thanh, L. Q. Mai, K. Otsuki, T. Ito, T. Murase, T.

Yamashiro: Antibody Survey on Avian Influenza Viruses using Duck's Egg Yolk in Hanoi, during 2010 to 2012. Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, 2013.1.23-24

高桑弘樹:ベトナムにおける鳥インフルエンザウイルス浸潤状況.

平成24年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会・日本産業動物獣医学会シンポジウム「鳥インフルエンザウイルスの最近の動向」, 大阪市, 2013.2.9-11.

藤本佳万、尾崎絹代、前田雅弘、西島謙一、高桑弘樹、大槻公一、喜田宏、小野悦郎: 抗PB2細胞内発現単クローン抗体のA型インフルエンザウイルスに対する感染抵抗性. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 2013,9,20-22

藤本佳万、尾崎絹代、高桑弘樹、小野悦郎: 可溶性ネクチン2による単純ヘルペスウイルス2型 に対する間接的感染抵抗性の付与. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 2013.11.10-12

高桑弘樹:農林水産省・レギュラトリーサイエンス事業推進会議「高病原性鳥インフルエンザの野生動物による感染の確認及び消毒方法の開発」外部専門家

4) 受賞等 なし

5) その他 なし

6. 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: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

研究代表者:高桑弘樹, 取得年度:H23-25年(3年)

感染症研究国際ネットワーク推進プログラム

課題名: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)

農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業

課題名: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

研究総括者:山野辺敦, 取得年度:H24-25年(2年)

日本学術振興会・二国間交流事業共同研究

課題名:キヌレニン経路関連遺伝子改変マウスによる中枢神経系障害と神経保護作用機序の解析

研究代表者:小野悦郎, 取得年度:H25-26年(2年)

2) 知財権等

公開日:2013年7月11日

名称:鳥インフルエンザウイルスに対する消毒方法

発明者:大槻公一、高桑弘樹、常國良太、川口直康、原邦夫、大上猛夫、三浦治

3) 学外活動

免疫病理学研究室

Laboratory of Immunopathology

1. 研究概要

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。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研究し、新薬の開発を目指し、「喫煙と免疫と癌と天然成分を科学」し、以下の研究テーマについて研究を進めている。

1) タバコ煙による肺胞マクロファージへの影響と遺伝子損傷について



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

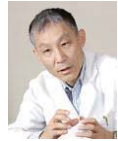
える上で重要である。そこで、自動喫煙装置を用いて、マウスに一定量、一定期間、均一にタバコ煙を喫煙させた後、気管支肺胞洗浄により肺胞マクロファージを採取し、肺胞マクロファージの免疫機能と遺伝子への影響および喫煙の LPS 肺炎症への影響、スギ花粉による肺への影響についても研究している。

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。そこで、

教授 竹内 実

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



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たからの肺免疫系に及ぼす影響については十分な説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、蜂蜜は、栄養が豊富な天然の食品として親しまれている。蜂蜜のひとつであるジャングルハニーは、アフリカ・ナイジェリアの熱帯雨林に生息する野生の蜜蜂が長期にわたり樹木や花から集めてできた蜂蜜である。ナイジェリアでは、この蜂蜜が風邪、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、日本全国から蜜源の違う日本国産ハチミツの免疫機能への影響と有効成分についても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、ブラジルのピエダーテ地方と呼ばれる高地に唯一自生している。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活性が知られている。しかし、免疫作用の機構については十分に解明されていないため、そのメカニズムと有効成分について研究している。



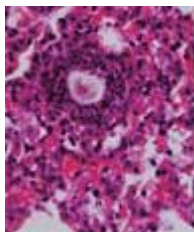
2. 本年度の研究成果

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の抗原提示機能の抑制が認められた。この抑制機

構については、AM 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、この AM の細胞内変化が、AM の免疫機能の抑制に関係していることが示された。

天然成分に関しては、日本国産ハチミツには肺胞マクロファージを活性化させ、好中球に対する移動性・走化活性が新しく認められ、またジャングルハニーに抗体産生機能を増強することが新しく認められ、細菌感染に有効であることが示唆された。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貪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、貪食作用を高め、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。

スギ花粉(CJp)による肺の初期免疫応答に関しては、スギ花粉の気管支内投与により、肺毛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、スギ花粉の Cryj1 に好中球に対する走化活性があることが認められ、また CJp が肺胞マクロファージの TLR4 ではなく TLR2 を介して刺激後、好中球のケモカインである CXCL2 の産生増強によ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. 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 plays an important role as the first line of defense in immunological surveillance for the lung. In the aim of our study, we are investigating “making a science for

smoking.” Since the fact that immune functions are suppressed by smoking and tumor growth, we are also investigating the mechanisms of inhibition and restoration of suppressed immune functions by natural products.

1: Study for tobacco smoke

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). Smoking has been shown to increase production of reactive 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. Inclusion bodies of high density appeared in the cytoplasm of AM by cigarette smoke..

2: Study for Natural products

(1) 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 and the varieties are due to components of flower sources. Jungle honey is used as traditional medicine for cold, skin inflammation and burn wound but not only health care. JH enhanced antibody production through the increase of CD19 positive cells and proliferation of spleen cells by augmentation of IL-1 β and IL-6 mRNA expressions. Japanese honey enhanced IL-1 β mRNA expressions in alveolar macrophage.

(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. Therefore, we are focusing on the mechanism of activity of immune functions in immune cells associated with anti-tumor activity by Agaricus blazei Murill hot water extract and its characterization of effective component. We have demonstrated that extract of Agaricus blazei Murill activated immune functions neutrophils and macrophages in mice.

4. 論文, 著書など

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 自然科学系列*, **42**, 21-52

M. Miyagawa, Y. Hirono, A. Kawazoe, E. Shigeyoshi, M. Nose, M. Sakura, K.E. Pinkerton, M. Takeuchi: Effect of hot water extract from agaricus blazei murill on chemotaxis of neutrophils. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, **3**, 12-17

M. Sakura, Y. Chiba, E. Kamiya, A. Furukawa, N. Kawamura, M. Niwa, M. Takeuchi, M. Hosokawa: Spontaneous occurrence of photoaging-like phenotypes in the dorsal skin of old SAMPI mice, an oxidative stress model. *Experimental Dermatology*, **22**, 62-64

Y. Hirono, A. Kawazoe, M. Nose, M. Sakura, M. Takeuchi: Cigarette smoke induce alteration of structure and function in alveolar macrophages. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, **3**, 125-128

Y. Hirono, Y. Tanahashi, K. Sasaki, K. Konno, Y. Shirai, K. Kobayashi, A. Someya, S. Inaga, M. Sakura, K.E. Pinkerton, M. Takeuchi: Alveolar macrophages functions and DNA damage in cigarette smoke-exposed mice. *Journal of Advances in Bioscience and Biotechnology*, **4**, 1-7

5. 学会発表など

竹内実: 蜂蜜の効能. 東海地区養蜂研究会総会, 名古屋市, 2013.1.28 (招待講演)

竹内実: はちみつによる生体の免疫機能に及ぼす効果. 岐阜県養蜂組合連合会設立60周年記念式典, 岐阜市, 2013.2.1 (招待講演)

竹内実: ハチミツが免疫機構に及ぼす効果について. 京都府養蜂組合総会, 綾部市, 2013.2.12 (招待講演)

Y. Hirono, A. Kawazoe, M. Nose, M. Sakura, M. Takeuchi: Cigarette smoke induce alteration of structure and function in alveolar macrophages. 3rd International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2013), Rome, 2013.2.24-25

X. Li, M. Xue, H. Aaron, M. Tagmount, M. Takeuchi, E. Eisen, C. Vulpe, J. Zink, Risbud, K.E. Pinkerton: Highly mechanized nano-structures with controlled-release targeting technology is safe and compatible in an aerosol model for enhancing delivery. ATS 2013 International Conference, Philadelphia, 2013.5.17-22

M. Takeuchi, A. Kawazoe, Y. Hirono, M. Nose, S. Inaga, K.E. Pinkerton: Effect of cigarette smoke exposure on LPS-induced lung inflammation in mice. ATS 2013 International Conference, Philadelphia, 2013.5.17-22

M. Takeuchi, Y. Hirono, M. Nose, S. Inoue, K. Sasaki, K.E. Pinkerton: Cigarette smoke as environmental factor induce inhibition of immune functions and DNA damage in alveolar macrophages. EAACI-WAO Congress, Milan, 2013.06.22-26

竹内実: ハチミツと免疫. 京都産業大学教養講座, 京都市, 2013.7.6 (招待講演)

竹内実: ハチミツと免疫. 京都産業大学ミツバチ講座, 箕面市, 2013.9.14 (招待講演)

M. Takeuchi, Y. Hirono, M. Sakura: Cigarette smoke induces DNA damage and inhibition of function in alveolar macrophage. 44th Union World Conference on Lung Health, Paris, 2013.10.30- 11.3

竹内実: ハチミツと免疫. 京都府私立中高等学校理科研修会, 京都市, 2013.11.16 (招待講演)

竹内実: ハチミツと免疫. 京都府獣医師会総合部会研修会, 京都市, 2013.11.27 (招待講演)

竹内実: WOXの免疫賦活に関する効果. QOLサポート研究会, 川崎市, 2013.11.28 (招待講演)

Y. Hirono, K. Sasaki, Y. Tanahashi, M. Sakura, T. Ishida, S. Inaga, M. Takeuchi: The mechanism of inhibition of apoptosis in alveolar macrophages by cigarette smoke. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉市, 2013.12.11-13

K. Sasaki, Y. Hirono, Y. Tanahashi, M. Sakura, T. Ishida, M. Takeuchi: Effect of cigarette smoking on infiltration of neutrophils in LPS-induced lung inflammation. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉市, 2013.12.11-13

6. 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: 受動喫煙による肺胞マクロファージの染色体異常と遺伝子損傷への影響

研究代表者: 竹内実, 取得年度: H23-25年(3年)

2) 学外活動

竹内実: 京都府獣医師会京都支部長, 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

3) その他

NHK ゆうどきネットワーク 講師として出演, 2013.6.12

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



薬理学研究室

Laboratory of Pharmacology

助教 棚橋 靖行

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



1. 研究概要

当研究室では、主に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M₁からM₅までの5つのサブタイプが同定されており、このうち、腸管平滑筋細胞にはM₂とM₃サブタイプが存在している。コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンがこれらのムスカリン受容体を刺激すると、平滑筋細胞内のCa²⁺濃度が増加し、最終的に筋は収縮する。また、近年、腸管の神経叢に存在するカハール細胞(ICC)と呼ばれる間質細胞にもムスカリン受容体が存在しており、腸管の運動調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている(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、M₂、M₃サブタイプやカハール細胞がそれぞれどのような役割を果たしている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、M₂またはM₃サブタイプを欠損したマウスやカハール細胞を欠損したマウスを用いて、上記の未解決問題に取り組んでいる。

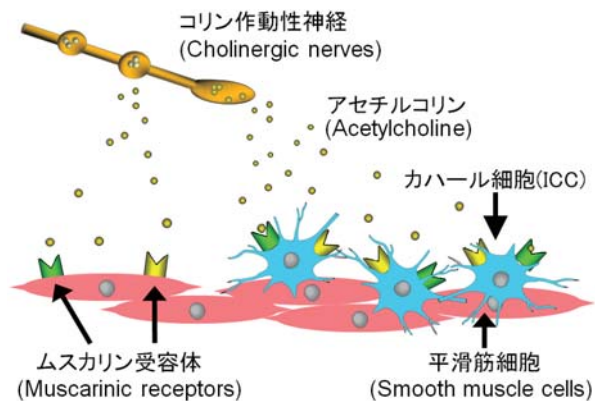


Figure 1. Regulation of gut motility by cholinergic nerves

(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。これは、喫

煙により気管支平滑筋の収縮過敏が惹起され、その結果起こる気道の狭窄が原因の一つ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

コリン作動性神経による小腸蠕動運動の発現には、M₂サブタイプが重要であり、M₃サブタイプおよびカハール細胞は、むしろ発生した蠕動運動の規則性を調節する役割を担っていることを明らかにした。また、小腸におけるコリン作動性神経と縦走平滑筋細胞間の神経筋伝達には、M₂とM₃両サブタイプの刺激が重要であり、更にICCが関与していることを明らかにした。また、小腸平滑筋に発現するATP感受性K⁺チャネル(K_{ATP}チャネル)の薬理的性質を明らかにする一環として、野生型マウスの小腸平滑筋細胞標本において、各種K_{ATP}チャネル開口薬により誘発されるK_{ATP}チャネル電流を記録し、各開口薬の50%有効濃度(EC₅₀値)を決定した。

(2) 喫煙による気管支平滑筋収縮機能への影響

タバコ煙を暴露したマウスから作製した気管支平滑筋リング標本において、高濃度K⁺溶液を適用した時に生ずる収縮反応を記録し、非喫煙マウスのものと比較・解析した。喫煙マウスの標本では、非喫煙マウスと同様、高濃度K⁺溶液により一過性の収縮反応が生じた。収縮反応の大きさについては、両群間において差は認められなかったが、喫煙マウスでは、薬物を適用してから最大反応に至るまでの時間が有意に減少していた。これらの結果

は、喫煙により気管支平滑筋の脱分極に対する感受性が増強されることを示唆している。

3. Research projects and annual reports

It is well known that the motility of gastrointestinal tract is regulated by acetylcholine (ACh) released from cholinergic nerves, which act on the muscarinic receptors. The receptors have been classified into five subtypes including M_1 , M_2 , M_3 , M_4 and M_5 . In gastrointestinal smooth muscles, two subtypes of muscarinic receptor, M_2 and M_3 , are found with no measurable quantities of other subtypes. As shown in Figure 1, stimulation of M_2 and M_3 receptors by ACh increases in the intracellular concentration of Ca^{2+} , 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_2 and M_3 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_2 and/or M_3 muscarinic receptor knockout (KO) mice and ICC deficient mice.

(1) Mechanisms of gastrointestinal motility.

We investigated roles of M_2 and M_3 muscarinic receptor subtypes and ICC in the regulation of the peristalsis in small intestine. Our results show that M_2 receptors play an essential role in the generation of the peristalsis, and that M_3 receptors have rather a modulatory role in controlling periodicity of the peristaltic activity together with the ICC. We also investigated roles of M_2 and M_3 muscarinic receptor subtypes and ICC in cholinergic neuromuscular transmission in ileal longitudinal smooth muscles. Our results suggested that both M_2 and M_3 receptors are involved in cholinergic neuromuscular transmission together with ICC. In addition, to characterize pharmacological properties of ATP sensitive K^+ (K_{ATP}) channels expressed in the intestinal smooth muscles, we recorded the current through K_{ATP} channels induced by several selective K_{ATP} channel openers in small intestinal smooth muscle cells from wild type mice and determined the 50 % effective concentration values (EC_{50}) of the openers.

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

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 which 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 recorded High K^+ -induced contractions in bronchial muscle ring preparations from the mice which were exposed to cigarette smoke (CS mice) and compared data from the CS mice with data from the control mice which were exposed to the air instead of cigarette smoke. In preparations from CS mice, application of high K^+ solution induced a phasic contraction as seen in control mice. Although the magnitude of the contractions was not obviously different from that in preparations from control mice, the contractions reached a peak more quickly in CS preparations than those in control preparations. These results suggested that exposure to cigarette smoke can induce hyperresponsiveness to depolarization in bronchial smooth muscles.

4. 論文, 著書など

- H. Matsuyama, Y. Tanahashi, T. Kitazawa, M. Yamada, S. Komori, T. Unno: Evidence for M_2 and M_3 muscarinic receptor involvement in cholinergic excitatory junction potentials through synergistic activation of cation channels in the longitudinal muscle of mouse ileum. *J. Pharmacol. Sci.* **121**(3), 227-236
- Y. Hirono, Y. Tanahashi, K. Sasaki, K. Konno, Y. Shirai, K. Kobayashi, A. Someya, S. Inaga, M. Sakura, K. E. Pinkerton, M. Takeuchi: Alveolar macrophage functions and DNA damage

in cigarette smoke-exposed mice. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **4**, 1-7

Y. Tanahashi, N. Waki, T. Unno, H. Matsuyama, S. Iino, T. Kitazawa, M. Yamada, S. Komori: Roles of M₂ and M₃ muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* **25**, e687-e697

Y. Tanahashi, Y. Ichimura, K. Kimura, H. Matsuyama, S. Iino, S. Komori, T. Unno: Cholinergic neuromuscular transmission mediated by interstitial cells of Cajal in the myenteric layer in mouse ileal longitudinal smooth muscles. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* in press DOI 10.1007/s00210-013-0944-2

棚橋靖行、海野年弘、松山勇人、北澤多喜雄、小森成一：マウス小腸平滑筋のムスカリン作動性収縮調節機構におけるATP感受性K⁺チャンネルの役割とその情報伝達機構。日本病態生理学雑誌、**22(3)**、36-38

棚橋靖行、竹内実：マウス気管平滑筋標本における張力測定法の開発。京都産業大学総合学術研究所所報、**8**、131-136

岡田大地、廣野由里子、田中美子、佐々木一馬、棚橋靖行、高橋純一、佐倉正明、竹内実：日本国産ハチミツによる肺胞マクロファージの免疫機能に及ぼす影響。京都産業大学先端科学技術所所報、**12**、33-44

5. 学会発表など

Y. Tanahashi, T. Unno, H. Matsuyama, T. Kitazawa, M. Yamada, J. Wess, S. Komori: Muscarinic regulation of ATP sensitive K⁺ channels in mouse ileal smooth muscles. 第86回日本薬理学会年会, 福岡市, 2013.3.21-23

T. Unno, T. Katsurada, H. Matsuyama, Y. Tanahashi, T. Kitazawa, M. Yamada, J. Wess, S. Komori: Involvement of M₂ or M₃ muscarinic receptor-coupled signalling molecules in the activation of muscarinic cation channels in mouse ileal smooth muscle cells. 第86回日本薬理学会年会, 福岡市, 2013.3.21-23

棚橋靖行、海野年弘、松山勇人、北澤多喜雄、小森成一：マウス小腸平滑筋のムスカリン作動性収縮調節機構におけるATP感受性K⁺チャンネルの役割とその情報伝達機構、第23回日本病態生理学学会サテライトセミナー&ディスカッション、東京、2013.8.2-4(招待講演)

K. Sasaki, Y. Hirono, Y. Tanahashi, M. Sakura, T. Ishida, M. Takeuchi: Effect of cigarette smoking on infiltration of neutrophils in LPS-induced lung inflammation. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉市, 2013.12.11-13

Y. Hirono, K. Sasaki, Y. Tanahashi, M. Sakura, T. Ishida, S. Inaga, M. Takeuchi: The mechanism of inhibition of apoptosis in

alveolar macrophages by cigarette smoke. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉市, 2013.12.11-13

6. その他特記事項

1) 外部資金

学術研究助成基金・若手研究(B)

課題名：ムスカリン受容体の腸管運動制御におけるATP感受性Kチャンネルの役割とその分子実態

研究代表者：棚橋靖行，取得年度：H25-27年（3年）

京都産業大学 特定課題研究

課題名：喫煙による気管支平滑筋の収縮過敏性に対する薬理・免疫学的研究

研究代表者：棚橋靖行，取得年度：H24-25年（2年）

2) その他

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



薬理学研究室メンバー

病原微生物学研究室

Laboratory of Virology

1. 研究概要

私達は多くの微生物に囲まれて生きている。ウイルスは微生物の一員であるが、自己複製のために必要な最小限度の遺伝子しか持たないため、動物や植物に寄生し、宿主細胞内の小器官を拝借して増殖する。その結果、寄生した細胞の破壊、細胞機能の障害といった直接的な障害、あるいはウイルス抗原を発現した感染細胞が宿主免疫応答から「異物」と認識されて排除されサイトカイン等の液性因子の産生が誘導されるといった間接的な障害を引き起こす。このような感染個体における様々な影響、いわゆる病気を起こすのである。私達の研究室では、動物あるいは人獣共通のウイルス感染症、特に神経ウイルス症に興味がある。なぜなら、中枢神経系を好むウイルスは免疫応答を誘導しにくく、また血液脳関門の存在により他の臓器に比べ効果的な化学療法剤に限られることから治療法が困難な場合が多く、社会的にその解決が望まれているからである。

私達は、「ウイルス性神経・精神神経疾患」を研究するために、ボルナ病ウイルス(BDV)感染により引き起こされるボルナ病に焦点を絞って研究を行ってきた。ボルナ病はウマやヒツジに持続的に感染し、時に致死的な神経疾患を引き起こす病気として100年以上前から知られていた。最近では、ネコ、イヌ、アライグマ、鳥類、ニホンザル、さらにヒトを含む幅広い温血動物に感染が認められる新興感染症として認識されている。しかしながら、いまだ病気の発症メカニズムは十分に解明されていない。また、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されていない。私達は、BDVの持続感染性と病原性を多角的に解析する目的で、ラットやマウス等の感染モデル動物における病態(運動障害と行動学的異常)の解析と、野外の動物における感染疫学調査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- β 関連遺伝子の発現とウイルス病原性との関連性について
- 3) ウイルスが宿主動物に馴化する際のウイルスゲノムの変異機構について

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino, DVM,

Ph.D



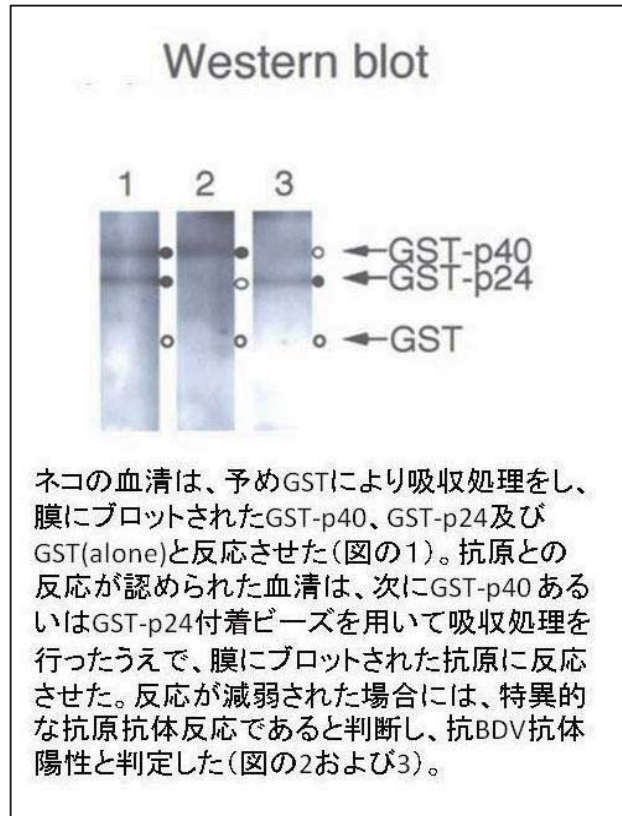
- 4) ボルナ病発症に関与する宿主因子と環境因子について
- 5) ウイルス蛋白質の細胞内局在機構と病原性との関連性について
- 6) 家畜・ペットにおけるボルナ病ウイルス感染疫学調査
- 7) 抗ウイルス活性物質の解析

2. 本年度の研究成果

「東京近郊のイエネコにおけるボルナ病ウイルス感染疫学調査」

ボルナ病ウイルス(BDV)はネコに感染すると神経症状を引き起こす。私達は、東京近郊地域の複数の動物病院に来院した199匹のイエネコにおいてBDV感染調査を行った。

GST-BDVp24あるいは-p40抗原に対する血漿抗体がウエスタンブロット法により検出された場合を抗体陽性と診断し、BDVに感染した(履歴がある)と判定した。



その結果、53匹(27.1%)のイエネコにおいて、BDV特異抗体が検出された。興味深いことに、抗体陽性と診断されたイエネコの割合は、健康群(29.8%)、神経症状を伴わない疾患群(22.2%)、神経疾患群(33.3%)の3群間で有意差がなかった。また、BDV特異抗体は1歳未満のイエネコにおいても認められた。抗体陽性率は、性別、年齢群、そして採材した季節間で有意差は認められなかった。

以上の結果から、BDVが自然感染したネコがボルナ病を発症するには、さらに何らかの要因が必要であろうこと、そしてBDVはネコにおいて垂直伝播している可能性が示唆された。

3. Research projects and annual reports

Borna disease virus (BDV) infection causes neurological disease in cats. Here we report BDV infection on 199 hospitalized domestic cats in Tokyo area. BDV infection was evaluated by detection of plasma antibody against BDV-p24 or -p40. BDV-specific antibodies were detected in 54 cats (27.1%). Interestingly, the percentage of seropositive cats was not significantly different among three clinical groups, i.e., healthy (29.8%), neurologically asymptomatic disease (22.2%) and neurological disease (33.3%). The specific antibodies were present even in cats aged below one year. The seropositive ratio was constant, irrespective of age and sampling season. The present study suggests that additional factors are required for onset of Borna disease on naturally infected cats, and that BDV is transmitted through vertical routes in cats.

4. 論文, 著書など

Murakami, M., Shirai, M., Ooishi, 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, 51: 202-210. 2013.

西野佳以:ボルナ病ウイルス感染症、感染症症候群(第2版)上
病原体別感染症編. IV.ウイルス感染症 RNAウイルス感染症.
別冊日本臨床 pp.506-509 新領域別症候群シリーズ No.24.
2013.(総説)

染谷梓、池永充宏、大西修、Velado Fernandez, Igor, 西野佳以、前田秋彦. 京都市山科区で駆除されたイノシシに寄生していたマダニ類の解析. *京都産業大学総合学術研究所報*. 8:57-62. 2013.

齋藤敏之、西野佳以. 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. *京都産業大学総合学術研究所報*. 12:93-99. 2013

5. 学会発表など

齋藤 敏之、市川 みなみ、小野 隆祐、西野 佳以:脳におけるTimm染色法の再検討. 第156回日本獣医学会 2013.9.20(岐阜市)

6. 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:ウイルス性神経疾患に影響を及ぼす宿主要因と環境要因

研究代表者:西野佳以, 取得年度:H25-27年(3年)

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)

2) 知財権等

【特願番号】特願 2013-110849

【名称】ウイルス不活化剤、抗菌剤、ウイルス不活化方法、並びに、抗菌方法

【出願人】学校法人京都産業大学、株式会社スジョン・ジャパン

3) 学外活動

日本ボルナウイルス研究会::副会長

科学研究費委員会専門委員

4) 受賞等

なし

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5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」、2013.7.1)のコーディネーター

オープンキャンパスにおける模擬実験(2013.8.17)

京都市立紫野高等学校との高大連携授業(生物「遺伝子診断法の実際」(2013.10.19)



秋のお誕生会。3, 4 回生が揃い賑やかに！



4 回生と図書館裏で記念撮影。ちょっとアート？

環境衛生学研究室

Laboratory of Environmental Hygiene

1. 研究概要

私たちの周囲には、数え切れない程、様々な微生物が存在する。その中には、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、動植物の進化の過程で重要な役割を担っていると考えられているものまで、様々なものが存在する。この様に、私たちの周りに存在する微生物は、様々な動物や植物と相互に影響し合い、生態学的なマイクロコスモスと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」に感染する人獣共通感染症 (Zoonosis) を引き起こす病原微生物について、病原性発現メカニズムや環境中での存在様式を解明する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域の拡大と、それに伴う当該感染症の流行域の拡大が危惧されて久しい。日本においても、海外で流行しているウイルスや細菌等の病原体の侵入と、国内での流行への対策が急務となっている。そこで本研究室では、主に以下の研究テーマについて研究している。

- (1) 蚊およびダニ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と、新規検査法やワクチンを開発する。
- (2) 蚊およびダニ媒介性人獣共通感染症を引き起こす病原微生物の分子生物学的解析を行う。

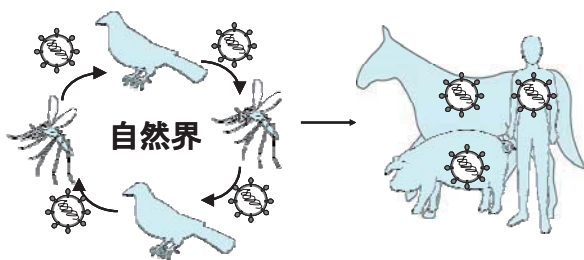


図 1. 節足動物媒介性人獣共通感染症の感染環の例

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(ベクター)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重篤な症状を引き起こす。

教授 前田 秋彦

Prof. Akihiko Maeda, D.V.M., Ph D



2. 本年度の研究成果

(1) 蚊およびダニ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 准教授と同大学院 3 年生の米島さん、麻生大学の二瓶 客員研究員との共同研究として行った。蚊やダニ等の吸血性節足動物は、様々な感染症を動物から人に媒介する。媒介される伝染病は蚊やダニの種類により異なる。したがって、人が居住する環境中に生息する蚊やダニの種類によって、当該地域で流行する感染症が異なるものと考えられる。そこで、本年度では、まず、京都市内で蚊やダニを採取し、種を古典的な形態学的鑑別法に従って同定した。また、形態学的に鑑別が困難であるアカイエカとチカイエカについては、PCR法を用いて鑑別した。さらに、蚊やダニが保有する病原微生物(各種のフラビウイルスやリケッチア、SHFSV、鳥マラリア、イヌフィラリア等)を、病原体を特異的に検出する PCR あるいは RT-PCR 法を用いて、その検出を試みたところ、フラビウイルスの一種およびリケッチアが検出された。また、病原体分離を試みたところ、これまでに日本で報告のないウイルス種が分離された。

(2) 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、ウイルス粒子の表面に存在する膜蛋白質の一種である E 蛋白質と、細胞表面蛋白質(今だ統一した見解はない)との結合により始まるとされている。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、E 蛋白質と相互作用する宿主タンパク質の検索・同定を行い、幾つかの候補蛋白質となる宿主蛋白質を同定した。現在、両蛋白質の相互作用を確認するとともに、ウイルス感染における当該蛋白質の役割について検討している。また、フラビウイルス研究のための道具として、レポーター蛋白質遺伝子をゲノム遺伝子として含むフラビウイルス様粒子の簡便で安全な作製法を開発した。

3. Research projects and annual reports

Research projects

Many micro-organisms exist in natural environment. Some of them infect to plants, and some do to animals including human. They cause unique diseases to their

host plants and animals. However, the others do not. Some are alive in animal intestine and help food-digestion of host animals. Some are thought to play important roles for host evolution. Microbes interact with their host and establish micro- and macro-cosmos in nature.

We are now studying on pathology, ecology, and other basic researches of zoonoses, especially, mosquito- and tick-borne diseases. Recently, arthropod vectors are spreading their living places due to global warming. Therefore, the diseases become one of big concerns in world-wide public health. In Japan, it is also urgent to establish a detection and prevention system for these diseases.

Now, we are doing research on;

- (1) Epidemiological study on mosquito- and tick-borne diseases in Kyoto-City, and development of new diagnostic and vaccine protocols for vector-borne diseases
- (2) Molecular biology of the infection mechanisms of mosquito- and tick-borne pathogens

Annual reports

(1) Epidemiological study on mosquito- and tick-borne diseases in Kyoto-City, and development of new diagnostic and vaccine protocols for vector-borne diseases

We collected mosquitoes, which are vectors of many mosquito-borne diseases, at several fixed observation points in Kyoto-City. We then tried to detect pathogens within mosquitoes by molecular diagnostic protocol. As the result, we did not get any signs of infection of the pathogens within mosquitoes captured in Kyoto City.

We also conducted a tick-surveillance at north part of Kyoto City. We collected many species of ticks, and tried to detect pathogens within ticks. We detected several viruses by reverse transcription-polymerase reaction. Now, we would identify tick species and phylogenetic analysis.

We collaborated with Mr. Ikenaga, Mr. Ito, Miss Konno, and Miss Sugie in the Kyoto City Institute of Health and environmental Sciences, Dr. Nakaya and Miss Yoneshima in Ritsumeikan University, and Dr. Nihei in Asabu University.

(2) Molecular biology of the infection mechanisms of mosquito- and tick-borne pathogens

Flavivirus is one of etiological agents of tick- and mosquito-borne diseases. The infection of the viruses starts by attachment to cell surface receptor. However the detail mechanisms of virus infection are still unclear. To study the first event of virus infection, we tried to identify the interaction partners against virus envelope protein, E, which is thought to be a virus-factor for infection. We identified several candidates of host factors for flavivirus infection. Now, we are confirming the actual interaction between viral E protein and candidate cellular proteins using molecular techniques.

Mr. Igor and I are now doing research on this project.

4. 論文, 著書など

Y. Makino, T. Suzuki, R. Hasebe, T. Kimura, A. Maeda, H.

Takahashi, H. Sawa: Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. *J. Virol. Methods*. **195**, 250-257

A. Maeda, J. Maeda: Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet. J.* **195**, 33-40 (review)

染谷 梓, 池永充宏, 大西 修, Velado Fernandez Igor, 西野佳以, 前田秋彦: 京都市山科区で駆除されたイノシシに寄生していたマダニ類の解析. *京都産業大学総合学術研究所所報*. **8**, 57-62

前田秋彦: 第4章 動物感染症診断のための微生物検査, 1. 産業動物, 4)神経系感染症.(編)副所秋雄, 前田秋彦ら *動物微生物検査学* 近代出版. pp.155-157

5. 学会発表など

M. Yonejima, T. Nakaya, N. Nihei, Y. Tsuda, M. Kobayashi, M.

Watanabe, A. Maeda: Effects of land use pattern on spatial distribution of host-seeking mosquitoes within urban areas in Kyoto, Japan. International Geographic Union, Kyoto Regional Conference, kyoto, 2013.8.4-9

米島万有子, 前田秋彦, 福田美樹, 伊藤亜希, Velado

Fernandez Igor, 津田良夫, 渡辺 護, 中谷友樹: 京都市におけるアカイエカとチカイエカの捕集数および構成比の空間差異, 第65回日本衛生動物学会大会, 江別市, 2013.4.5-7

伊藤亜希, 米島万有子, Velado Fernandez Igor, 福田美樹, 染谷 梓, 前田秋彦: 京都市における蚊媒介性フラビウイルス媒

介蚊の調査. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 熱海市,
2013.5.24-25

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・挑戦的萌芽

課題名:フラビウイルスの感染臓器特異性に関する研究

研究代表者:前田秋彦, 取得年度:H24-25年(2年)

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再
興感染症研究事業)

課題名: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(H24-新興-一般-013)

研究分担者:前田秋彦, 取得年度:H24-26年(3年)

2) その他 なし



研究室メンバーの面々

実験医科遺伝学研究室

Lab. Genetics in Experimental Medicine

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おりと推定されており、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

教授 松本 耕三

Prof. Kozo Matsumoto, DVM, Ph.D



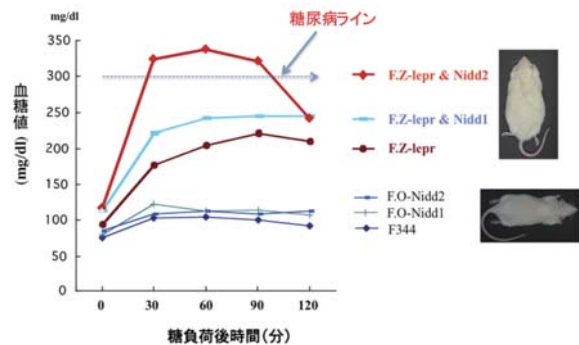
の肥満下における動作を研究することが初めて可能となるからである。

2. 本年度の研究成果

Nidd2-lepr 肥満糖尿病遺伝子導入ダブルコンジュニック系統の特性と肥満に伴う2型糖尿病原因遺伝子解明

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を作成を行った。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個体が選別された。

それらダブルコンジュニック系統の血糖値の検査をOGTTにて行った。肥満コントロールラットは、F344ラットと比較して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, Nidd4, Nidd6の各糖尿病遺伝子を導入したダブルコンジュニックラットのOGTT結果は、OGTT60分値で、Nidd2-leprラットは肥満コントロールラットよりさらに100mg/dLも高い高血糖値を示し、さらにOGTT120分での血糖値は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。一方、Nidd4-leprラットは肥満F344ラットとほぼ同じ血糖値であり、Nidd4遺伝子座は高血糖に関与していないことが判明した。また、Nidd6-leprラットでのOGTT結果は、Nidd2-leprとNidd4-leprとの中間程度の血糖値を示した。Nidd2-lepr程ではないが、しかし肥満



に伴い血糖値を上昇させる遺伝子がある領域内にあることが判明した。

本年度は *Nidd2* 遺伝子座領域内にある肥満に伴い糖尿病を発症する原因遺伝子の確定を行った。Real Time PCRにて *Nidd2* コンジェ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、肥満 F344 ラットをコントロールとして各遺伝子発現の比較を行った。その結果、*Nidd2* QTL のほぼピーク付近に高い有意差のある遺伝子が一つ見いだされた ($p = 0.0017$)。発現量は約 2 倍であった。その遺伝子の発現量増大により、肝臓の糖新生抑制が解除され、高血糖になったものと考えられる結果を得た。

糖尿病に及ぼすハチミツの影響

ハチミツが健康食品の一つとして広く利用されていることから、糖尿病患者さんにもハチミツが良い効果をもたらすと、一部では信じられている。しかし、糖尿病の専門医の先生はそのことに関しては懐疑的である。なぜなら、ハチミツは主としてブドウ糖と果糖から構成されており、体内に入れば砂糖などと同じことになると考えるからである。ただ、両者とも実験データの無い議論となっている。

従って今年度はまずハチミツの糖尿病への効能について、遺伝的に均質な肥満性糖尿病マウスを使用し、ハチミツの長期投与による影響を調べ、ハチミツの長期使用で肥満や血糖値にどのような影響が出るかを検討した。その結果、単花蜜であるアカシアハチミツ、クリハチミツに関しては糖尿病マウスに対しても血糖値を初期値とほぼ同じで、砂糖のように高血糖にならないことが判明した。

糖尿病に及ぼすローヤルゼリーの影響:

ローヤルゼリーと糖尿病に関する文献であるが、これは非常に少ない。糖尿病の発症している状態でのローヤルゼリー使用の報告は調べた限りではこれまで無いようである。本研究は糖尿病との絡みなので血糖値に対し、ローヤルゼリーが何らかの影響を与えないとそもそもが始まらない。

1. 体重(肥満)に及ぼす影響

まず、1 週間という短期間のローヤルゼリー投与では体重や血糖値に関しては全く変化が見られない。しかし、続けて 2 週間、トータルで 3 週間投与すると、投与群はコントロール群に比較して少し体重が低めとなり、特に 100mg/kg ローヤルゼリー投与群とコントロール群には体重そのものに有意差が認められた。肥満性糖尿病

マウスの肥満に RJ 投与が若干ブレーキをかけたと言える。

2. 血糖値に及ぼす影響

一方、血糖値の方はどうかとみると、これがまた嘘のようなきれいな結果が出ている。まず空腹時血糖値に関してはローヤルゼリー投与群はコントロール群よりも有意に低いのである。さらに経口的グルコース負荷試験 (OGTT) では 100mg ローヤルゼリー投与群は OGTT 60 分値、90 分値でコントロール群に比較して高い有意差をもって低いのである。本当に嘘のようなホントの結果である。OGTT 120 分値は有意差が惜しいところで認められなかったが、例数が多ければ有意差が出たであろう。その血糖値に及ぼすローヤルゼリーの影響をそのまま素直に解釈すれば、ローヤルゼリーは空腹時並びに糖負荷試験において、血糖値を押し下げる作用があると云えよう。従って、現在、このデータのさらなる解析を進めているところである。

3. Research projects and annual reports

Diabetes mellitus is considered one of the main threats to human health in both developed and developing world. Common diseases such as type 2 diabetes mellitus result from complex interplay among multiple genes, signaling pathways and environmental factors. 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 have produced a double congenic line with a hyperglycemic gene (*Nidd2*, *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(2013 年度分)

1. High Expression of Atp7b mRNA in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of the Long-Evans Cinnamon Rats: an Animal Model of Wilson's Disease. Kenji Nakayama, Yoshinobu Katoh, Norikazu Shimizu, Toyo Okui, Kozo Matsumoto, Yukiharu Sawada, Tsugutoshi Aoki. Hereditary Genetics 2, 1-5, 2013
2. Animal Models of Diabetes and Metabolic Disease. Tomohiko Sasase, Marcus G. Pezolesi, Norihide Yokoi, Takahisa Yamada, and Kozo Matsumoto. J. Diabetes Res. ID 281928, 1-2, 2013

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、4 回生へ特別講義を数回行う。17 名が学科合格。また、実技練習を毎週 2~3 回、ほぼ 2 月にわたって実施、指導する。17 名全員が難関の実技にも合格した。

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

安全な食料(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

In vivo 及び in vitro 実験を通して、メラミンによる、腎臓組織や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

食品や飼料中に混入したメラミンが、消化管から体内に吸収され循環系を経由して排泄に至る過程で、類似構造体の一つであるシアヌル酸と反応し、腎臓で結石化し、重篤な腎障害をもたらすことが既に報告されている。その主要構成物メラミンシアヌレートは in vitro 下でも容易に再現できるが、実際の結石発症例(in vivo)では、腎臓のネフロン部位以外での存在は確認されていない。その理由はまだ明らかではないが、反応時のメラミンとシアヌル酸の濃度要因が関与している可能性がある。今年度は、その可能性を in vitro 実験で検証した。

20~1000 μ g/ml に調整したメラミンとシアヌル酸を混和(同一濃度で等量)し、その生成物の存在や形状を gold nanoparticle(GNP) 同定手法(Li ら, 2010)を用いて、光学顕微鏡で観察した。メラミンシアヌレートは、その表層が青色を呈する GNP で覆われた針状あるいは球状生成物として観察された(図)。この形状の違いは、混和環境内に血清タンパク

質が存在するか否かによって生じた。この知見は昨年度の研究報告(Taksinoros & Murata, 2012)と一致した。一方、両混和物が 200 μ g/ml 以下の濃度では、メラミンシアヌレートは針状、球状いずれも生成しないことが確認された。メラミン及びシアヌル酸の血中濃度は、動物への投与実験では 20 μ g/ml 程度と報告されていることから、おそらく循環血中や腎臓以外の諸臓器では、メラミンとシアヌル酸が会合しても生成物は生じ得ず、腎臓の濃縮過程で十分量の濃度に達した両者が反応して初めて結晶(すなわち結石の主要成分)を生成するのではないかと示唆された。

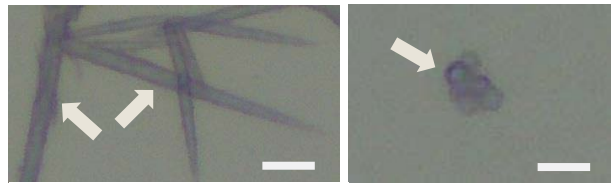


図:メラミンシアヌレート(左:針状と右:球状結晶)の光学顕微鏡像表層に青色 GNP マーカーが附着している(白矢印)
(スケールバーは 2.5 μ m)

2) 簡単・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。次年度以降に課題を継続する。

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, through in vivo and in vitro studies, and (2) establish a rapid, easy and cheap melamine screening method.

The results obtained this year are summarized as follows:

1: On the threshold concentrations of melamine and cyanuric acid for formation of melamine-cyanurate crystals:

The crystals accumulate as urolites but are not found outside the urinary system. In this *in vitro* experiment we found that M-C crystals were not formed in a mixture of melamine and cyanuric acid at low concentrations ($< 200 \mu\text{g/ml}$). The results suggest that the plasma melamine and cyanuric acid concentrations reported in clinical cases would be too low to form and/or accumulate M-C crystals in the bloodstream, thus explaining why the crystals are not detected outside the urinary organs in affected humans and animals.

2: Development of a melamine screening method

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

4. 論文、著書など

S. Taksinoros, H. Murata.: Effects of polyvinylpyrrolidone on *in vitro* melamine cyanurate crystal formation: An electron microscopy study. 2013. *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 653-655

5. 学会発表など

なし

6. その他特記事項

1) 外部資金

なし

2) 学外活動

The Veterinary Journal 誌の Editorial Advisory 委員
京都動物愛護センター(仮称)運営委員

3) その他

京都産業大学 DAY in 佐賀 での講演
「動物たちへの配慮(愛護と福祉)」(2013.08.24)

栄養衛生学研究室の構成(2014年3月現在)

大学院博士後期課程学生 1名

学部4年生 4名

学部3年生 3名

S. Taksinoros (大学院生) と村田



応用特別研究(4年生)の一風景



2013年
総合生命科学部
研究トピックス

研究トピックス（１）：バイオフィォーラムなどのセミナー開催状況

開催年月日	関係学科	講演者(所属先)	イベント名・講演タイトル(世話人、敬称略)
2013.01.11	生命資源環境	金 鍾明(キム・ジョンミョン)博士(理化学研究所 植物科学研究センター)	バイオフィォーラム「植物のエピジェネティクス研究で乾いた地球を緑にできるか!?」(世話人:河邊昭)
2013.01.21	生命システム	Gunnar von Heijne 博士(ストックホルム大学 生化学・生物物理学部門 膜研究センター)	バイオフィォーラム「Translocon-mediated assembly of membrane proteins: Energies and forces」(世話人:伊藤維昭)
2013.02.07	生命システム	Richard I Morimoto博士(ノースウエスタン大学 ライス生物学研究所・所長 生物学講座・教授)	バイオフィォーラム「A Systems Approach to Cell Stress and Proteostasis Networks(細胞ストレスとプロテオスタシスネットワークへのシステムアプローチ)」(世話人:永田和宏)
2013.02.22	生命システム	柴田大輔 博士(かずさDNA研究所 産業基盤開発研究部)	バイオフィォーラム「メタボローム解析-基礎研究、応用研究の応用例について-」(世話人:金子貴一・寺地徹)
2013.02.25	生命システム	華岡光正 博士 (千葉大学)	生命科学セミナー「24時間リズムを生み出す転写調節システム」(世話人:中山秀喜)
2013.03.08	生命資源環境	門脇 光一博士((独)農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所 所長)、久保 友彦博士(北海道大学大学院)、椎名 隆博士(京都府立大学大学院)、山岸 博博士(京都産業大学)、寺地 徹博士(京都産業大学)	第3回 京都産業大学 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ゲノム研究の未来」(世話人:寺地徹)
2013.03.26	生命システム	大内将吉 博士(九州工業大学)	生命科学セミナー「バイオ技術へのマイクロ波加熱の利用」(世話人:中山秀喜)
2013.04.18	動物生命医科	中村 織江 博士(大阪府立母子保健総合医療センター研究所)	生命科学セミナー「妊娠成立にむけてダイナミックに変化する子宮内膜～プロテアーゼ調節から見る子宮内膜脱落膜化～」(世話人:西野佳以)
2013.04.25	生命資源環境	市橋 泰範 学振特別研究員(カリフォルニア大学デービス校・理化学研究所)	生命科学セミナー「葉の複雑性を多様化させた遺伝子制御ネットワーク」(世話人:木村成介)
2013.04.26	生命システム	伊藤潤哉博士(麻布大学獣医学部)	生命科学セミナー「精子内卵活性化因子の機能解析と生殖補助医療技術への応用」(世話人:佐藤賢一)
2013.05.02	生命システム	星野幹雄博士(国立精神・神経医療センター・神経研究所・部長)	生命科学セミナー「小脳神経前駆細胞の時空間形質の制御による神経細胞多様化の分子戦略」(世話人:浜千尋)
2013.06.04	生命システム	伊藤 弘樹 博士(東北大学大学院・生命科学研究所)	生命科学セミナー「ショウジョウバエ脳の性を調節するクロマチン因子の作用機構」(世話人:浜千尋)
2013.06.05	生命システム	眞 昌寛博士(マサチューセッツ医科大学ウースター校)	生命科学セミナー「ゼブラフィッシュの血管新生においてVegfシグナル依存的 ERKシグナルの活性化が血管細胞の独自性を制御する」(世話人:八杉貞雄)
2013.06.21	生命システム	Professor Dr. Johannes Buchner(ミュンヘン工科大学)	バイオフィォーラム「Molecular chaperones -cellular machines for protein folding」(世話人:永田和宏)
2013.06.26	動物生命医科	田原 雄一郎博士((株)フジ環境サービス 学術顧問)	バイオフィォーラム「中米諸国のシャーガス病予防圧作戦」(世話人:大槻公一)
2013.07.01	生命システム	平田 普三 博士(国立遺伝学研究所 新分野創造センター准教授)	生命科学セミナー・細胞生物学セミナー「運動システムの発達とグリシン作動性シナプスの形成」(世話人:永田和宏)
2013.07.19	生命システム	浅野 弘嗣博士(京都産業大学 特約講師)、藤本 崇宏博士(京都府立医科大学大学院 講師)	バイオフィォーラム「【第1部】マウス大脳皮質発達過程における自閉症関連分子Shank3のバリエーション解析、【第2部】肥満・糖尿病・癌標的分子でありかつCa ²⁺ シグナル制御因子であるKRAP」(世話人:中田博、瀬尾美鈴)
2013.07.22	生命システム	朝倉博博士(ミネソタ大学医学部・幹細胞研究所・筋ジストロフィーセンター准教授)	生命科学セミナー「骨格筋幹細胞の自己複製の分子機構と血管ニッチ」(世話人:浜千尋)
2013.07.26	生命資源環境	平竹 潤 博士(京都大学化学研究所生体触媒化学研究領域教授)	生命科学セミナー「グルタチオン代謝の制御と抗酸化ストレス応答-GGT阻害剤の開発とその応用-」(世話人:寺地徹)
2013.07.30 2013.08.01 ・02	生命システム	Shoshana Bar-Nun博士(Tel Aviv University, Israel)	生命科学セミナー・細胞生物学シリーズセミナー「Quality Control from Yeast to Men:Proteins Aggregation and Degradation」(世話人:永田和宏)
2013.09.06	生命システム	武田 洋幸博士(東京大学大学院理学系研究科)、川原 敦雄博士(理化学研究所)	バイオフィォーラム「【第1部】メダカ耳石変異体からバイオミネラル形成の謎に迫る、【第2部】脂質メディエーター・スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の初期発生における機能」(世話人:黒坂光、中山喜明)
2013.09.30	生命システム	森浩禎博士(奈良先端科学技術大学院大学)	生命科学セミナー「細胞内全生理機能ネットワーク解明に向けて」(世話人:伊藤維昭)
2013.08.02	生命システム	Shoshana Bar-Nun博士(Tel Aviv University, Israel)	生命科学セミナー・細胞生物学シリーズセミナー「Quality Control from Yeast to Men:Proteins Aggregation and Degradation」(世話人:永田和宏)

研究トピックス（１）：バイオフィォーラムなどのセミナー開催状況

開催年月日	関係学科	講演者(所属先)	イベント名・講演タイトル(世話人、敬称略)
2013.10.21	生命システム	堀内高博士(基礎生物学研究所)	生命科学セミナー「遺伝子増幅(gene amplification)の話」(世話人:伊藤維昭)
2013.10.28	生命システム	Ulrich Hartl博士(Max Planck Institute)、Manajit Hayer-Hartl博士(Max Planck Institute)	バイオフィォーラム・細胞生物学シリーズセミナー「Molecular chaperones in protein folding and proteostasis controlおよびChaperones for the Folding, Assembly, and Activation Maintenance of RuBisCO」(世話人:永田和宏)
2013.10.29	生命システム	渋谷 正史博士(上武大学学長、医学生理学研究所所長)	バイオフィォーラム「VEGFとその受容体による血管新生機構と、疾患との関わり」(世話人:瀬尾美鈴)
2013.11.15	生命システム	田村 宏治博士(東北大学大学院生命科学研究所)	バイオフィォーラム「両生類とほ乳類における四肢再生と創傷治癒の関係」(世話人:八杉貞雄)
2013.11.20	生命システム	Michelangelo Campanella博士(University of London)	生命科学セミナー・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」セミナー「Inside Out Mitochondrial Biology: Role the F1-FoATPsynthase "Endogenous Regulator" Atpif1」(世話人:吉田賢右)
2013.12.05	生命システム	姫野 倭太 博士(弘前大学農学生命科学部)	生命科学セミナー「tmRNA・SmpBによるタンパク質合成の停滞解消システム」(世話人:嶋本伸雄)
2013.12.06	生命システム	Hanna Engelberg-Kulka博士(ヘブライ大学医学部)	バイオフィォーラム「バクテリアの2つのProgrammed Cell Death 系とその生物学的意義 Two Bacterial Programmed Cell Death Systems and their Biological Relevance」(世話人:永田和宏)
2013.12.10	生命資源環境	竹中 瑞樹博士(ウルム大学植物分子生物学分野)	バイオフィォーラム「Complex composition of the RNA editosomes in plant organelles」(世話人:寺地徹)
2013.12.13	生命資源環境	Christian Breuer博士(CSRS, RIKEN)、Diana Buzas博士(奈良先端技術大学院大学)、Yadav P. Gyawali博士(京都産業大学)、Hokuto Nakayama博士(京都産業大学)、他3名	第31回植物バイテクシンポジウム開催(世話人:木村成介・寺地徹)
2013.12.16	生命システム	相馬亜希子博士(千葉大学・助教)	生命科学セミナー「逆転および高度分断化 tRNA遺伝子の解析」開催(世話人:千葉志信)
2013.12.25	生命資源環境	吾郷 日出夫博士(独立行政法人理化学研究所)	バイオフィォーラム「新たな超高輝度光源が拓く膜タンパク質結晶構造解析のフロンティア」(世話人:津下英明)
2013.12.26	生命システム	村松里衣子博士(大阪大学大学院医学研究科)	細胞生物学セミナー・生命科学セミナー「中枢神経系の恒常性の破綻・維持を制御する分子細胞メカニズム」(世話人:永田和宏)

研究トピックス（2）：その他の大学ホームページ（HP）に掲載されたトピックス

HP掲載月	関係学科	関係者	トピック内容
1	生命資源環境	内海俊介博士(北海道大学北方生物圏フィールド科学センター)、安東義乃博士(京都大学生態学研究センター)、Heikki Roininen博士(東フィンランド大学生物学科)、高橋純一准教授(京都産業大学総合生命科学部)、大串隆之博士(京都大学生態学研究センター)	北海道大学北方生物圏フィールド科学センター内海 准教授と総合生命科学部 高橋純一准教授らの研究が科学雑誌Ecology Lettersに掲載
1	生命システム	横山 謙教授	横山研究室の発表論文が、The Journal of Biological Chemistry 誌のJBC's Best papers of 2012 に選ばれました
1	生命資源環境	降旗 初佳、河邊 昭准教授	総合生命科学部河邊研究室 降旗初佳 特定研究員の発表が九州大学で開催された日本遺伝学会第84回大会でBest Papers賞を受賞
1	生命資源環境	岡本(愿山) 郁、木村 成介准教授	総合生命科学部木村研究室 岡本 郁 日本学術振興会特別研究員-RPDの発表が九州大学で開催された日本遺伝学会第84回大会でBest Papers賞を受賞
2	生命資源環境	鶴村俊治助教(津下研究室)、津下英明教授	総合生命科学部、構造生物学研究センターの津下教授と鶴村プロジェクト助教等の発見が米国科学アカデミー紀要(PNAS)のオンライン版に掲載
3	生命資源環境	鶴村俊治助教(津下研究室)、津下英明教授	構造生物学研究センター 津下教授と鶴村プロジェクト助教等の論文に対して米国科学アカデミー紀要(PNAS)でCommentaryが掲載され評価されました
3	生命システム	佐藤 賢一教授、井尻貴之助教(佐藤研究室)	生命システム学科 佐藤教授、井尻助教らの共著論文が「Global Medical Discovery」サイトの「Key Scientific Articles」として紹介されました
5	学部全体		平成25年度 総合生命科学部奨励金授与式を挙りました
6	学部全体		グローバル人材育成推進セミナー開催
6	生命システム	永田和宏教授、吉田賢右教授	リエゾンオフィス主催シンポジウム「細胞内の情報から医療における個人情報へ」開催
7	生命システム、生命資源環境、動物生命医科	黒坂 光学部長、浜 千尋教授、木村 成介准教授、本橋 健准教授、加藤 啓子教授、今野 兼次郎助教	KSUサイエンス講座開催
7	生命システム	永田和宏教授	総合生命科学部 生命システム学科 永田和宏教授が「講談社エッセイ賞」と「日本一行詩大賞」を受賞！
8	生命資源環境	高橋純一研究室 学生	総合生命科学部 高橋純一研究室で開発中の新品種ミツバチの蜂蜜が「第40回京都府はちみつ品評会」で第3位入賞！
9	学部全体		2014(平成26)年4月 大学院 生命科学研究科(修士課程)開設 決定
9	生命資源環境	中山 北斗、木村 成介准教授	総合生命科学部 木村研究室の中山北斗(日本学術振興会特別研究員-SPDが2013年度日本植物学会若手奨励賞を受賞
9	学部全体		第一回 京都産業大学 ミツバチ産業科学研究センター ミツバチ講座
9	学部全体		グローバル人材育成推進事業 サマーセミナー開催
10	生命資源環境	金子 貴一准教授	総合生命科学部 金子 貴一准教授らが共同研究により根粒菌のダイズへの新規共生経路を発見

研究トピックス（２）：その他の大学ホームページ（HP）に掲載されたトピックス

HP掲載月	関係学科	関係者	トピック内容
10	動物生命医科	西野 佳以准教授	京都市立紫野高等学校との連携講座実施
10	生命資源環境	本橋 健准教授、津下 英明教授	同上
10	生命システム	横山 謙教授	同上
10	生命システム	瀬尾美鈴教授	岡山県立岡山操山中学校 生徒が総合生命科学部を訪問
11	生命システム	八杉貞雄教授	日本動物学会近畿支部講演会『動物の形作りの謎を解く』開催(世話人:八杉貞雄)
11	学部全体		「第2回 京都産業大学・大阪府立大学教育連携 特別講義」開催
12	学部全体		第二回 京都産業大学 ミツバチ産業科学研究センター ミツバチ講座
12	動物生命医科	前田 秋彦 教授、染谷 梓 助教	京都府立北稜高等学校と連携授業を実施
12	学部全体		第9回「京都産業大学図書館書評大賞」で本学部の4年次生2名が大賞と優秀賞を受賞
12	動物生命医科		難関！実験動物一級技術者の資格認定試験に動物生命医科学科の学生17名が合格!! さらに、学生部門の1位から3位を独占し、成績優秀者として表彰されました。
12	生命システム	茶谷悠平博士(伊藤研究室)	総合生命科学部伊藤研究室 茶谷悠平 客員研究員の発表が慶應義塾大で開催された 日本遺伝学会第85回大会でBest Papers賞を受賞
12	生命システム	嶋本伸雄教授	総合生命科学部 嶋本伸雄 教授の総説がアメリカ化学会が出版するトップランクの雑誌 Chemical Reviews (Impact factor 41)に掲載されました！

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
16号館	総合生命科学部事務室 (1F) 動物生命医科学科 (B1F)
9号館	生命資源環境学科 (2F・3F)
15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4号 2013 (平成25年)

発行日 2014 (平成26) 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/>