

ISSN 2186-5507

京都産業大学総合生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences
Kyoto Sangyo University



《第5号》

2014
平成26年

【ゼブラフィッシュを用いた遺伝子の発現解析】

体外受精を行い，発生期間を通じて胚が透明で，発生が早いゼブラフィッシュ（写真下）は，初期発生の研究に適したモデル生物です．

ウィリアムズ病は，精神発達遅滞を特徴とする遺伝病です．この疾病の原因候補遺伝子の一つである *WBSCR17* は哺乳類において脳特異的に発現しています．上の写真は，ゼブラフィッシュオロソグ遺伝子 *wbscr17* の発現を **WISH** (**Whole mount *in situ* hybridization**) で調べたものです．*wbscr17* は哺乳類と同様に中枢神経系に強く発現することが明らかとなりました．

Nakayama, Y. *et al.* (2014) *Gene Expression Patterns* **16**, 1-7

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	
2014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	7
	板野直樹 教授	9
	遠藤斗志也 教授	12
	川根公樹 准教授	16
	黒坂光 教授(学部長)	18
	近藤寿人 客員教授	21
	佐藤賢一 教授(学科主任)	24
	嶋本伸雄 客員教授	27
	瀬尾美鈴 教授	30
	千葉志信 准教授	34
	中田博 教授	38
	永田和宏 客員教授	41
	中村暢宏 教授	47
	浜千尋 教授	50
	横山謙 教授(副学科主任)	53
生命資源環境学科	生命資源環境学科の教育研究活動	59
	金子貴一 教授	61
	河邊昭 准教授	63
	木村成介 准教授	66
	高橋純一 准教授	71
	津下英明 教授(学科主任)	75
	寺地徹 教授	78
	野村哲郎 教授(副学科主任)	81
	本橋健 准教授	84
	山岸博 教授	87
動物生命医科学科	動物生命医科学科の教育研究活動	93
	加藤啓子 教授	95
	齋藤敏之 教授(副学科主任)	99
	染谷梓助 教授	102
	高桑弘樹 教授	104
	竹内実 教授(学科主任)	106
	棚橋靖行 准教授	109
	西野佳以 准教授	112
	前田秋彦 教授	115
	松本耕三 客員教授	118
	村田英雄 教授(副学部長)	121
	2014年度 動物実験教育訓練および動物慰霊祭	123
	平成26年度「京都産業大学・大阪府立大学 教育研究連携協定」 に関する教育連携事業報告書	124
2014年 総合生命科学部	研究トピックス	127

巻 頭 言

総合生命科学部長

黒 坂 光

今年も総合生命科学部年報(第5号)の出版の運びとなりました。学部設立5年目の昨年は例年にもまして慌ただしく、そして重要な決定に迫られた1年でした。そのために、年報の発行が遅くなりました。

昨年(平成26年)の出来事としては、まず4月に生命システム学科に4人の新任教員(遠藤教授、近藤教授、川根准教授、千葉准教授)が着任されたことをご報告しなければなりません。それぞれの研究分野をリードする先生方をお迎えして、本学部の教育と研究は大いに活性化されました。また昨年は、教育においても多くの変化がありました。まず、学部の完成年度を終えて、新しいカリキュラムによる学部教育がスタートしました。それに加えて、文部科学省の採択事業であるグローバル社会で活躍できる理系産業人育成を目的とする「理系グローバル人材育成事業」も本格的に稼働しました。昨年4月から全学的に導入されたTOEICを用いた実学英语教育と合わせて、専門知識に裏付けされた実用的な英語運用能力を有する学生の育成に学部全体で取り組んでいます。動物生命医科学科では、実験動物1級技術者認定試験に18名の学生が合格するという、特筆すべき教育成果をあげました。また、この3月には本学部の第2期生が卒業しましたが、1期生に続き良好な就職状況でした。卒業生の社会に出てからの活躍を大いに期待します。

総合生命科学部には学部開設時に、5年の時限制度であるプロジェクト研究支援制度が導入されました。この制度は、外部審査員により選定された学部内の研究課題について、助教などの研究員を配置して研究を推進するものです。昨年度はその最終年度を迎え、プロジェクト研究の評価と見直しが行われました。多くのプロジェクト研究は優れた研究を行い、積極的に外部資金を獲得するとともに、学部全体で5年間に国際専門誌に400報以上の学術論文を発表するという成果目標を達成しました。また、論文のクオリティーも高く、Natureなどのトップジャーナルにも多くの論文が掲載されました。京都産業大学は2014年4月1日～2015年3月31日にNatureおよびScienceに6報の論文を掲載し、年間論文数で国内私立大学ランキング第1位、大学全体でも第7位という素晴らしい成績を収めました。本学部からもNatureに3報の論文を掲載しており、大学の研究レベルの向上に大きく貢献しました。

平成27年度からは、新たな教育研究支援制度が発足しました。5年間の時限制度である新制度においても、選定された14の課題について研究助教を配置して、教育と研究の活性化をはかります。また生命科学研究科においては、博士後期課程を平成28年4月に開設するための準備を進めています。新研究支援制度の導入、および博士後期課程の開設により、総合生命科学部・生命科学研究科の教育・研究の体制作りがようやく完了すると言えるでしょう。

本学部はこれからも、優れた研究力を教育に還元し、確固たる専門知識および技術を有し、社会に出て貢献できる人材を育成して行かねばなりません。そのためには、34人の教員、14人の研究助教、さらに多くの研究員、嘱託職員等が協力して、教育・研究に邁進する覚悟が必要です。著しい勢いで変革する生命科学の分野の中にあり、現状維持は後退を意味します。総合生命科学部は、新しい研究支援制度のもとで新たな成果を求めて歩み続けます。

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・研究補助員	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		
		教授	遠藤斗志也	元河島史尋 河野 慎		江崎芳介 本磯裕康 荒渡 紀	鈴木俊治	中嶋晶子 中嶋純子
		准教授	川根公樹			前田昭宏		中原匡咲(9月まで) 坪井秀憲
	学部長	教授	黒坂光	中山喜明(9月まで)			肥塚靖彦	高橋由衣
		客員教授	近藤寿人	石井泰雄			Claire BOITET	
	学科主任	教授	佐藤賢一	井尻貴之				横山朋子(3月まで)
		客員教授	嶋本伸雄	中山秀喜			奈良重俊	
		教授	瀬尾美鈴		浅野弘嗣		上野信洋	清水昭男
		准教授	千葉志信			千葉直美 藤原 圭吾	由良 隆	
		教授	中田博	秋田 薫			河野正孝 村上希子 石田有周	
		客員教授	永田和宏	潮田 亮		伊藤進也 森戸大洋 山本玉美 石福田泰和 木田 美 福木 子 田 望	Shoshana Bar-Nun	川崎邦人
		教授	中村暢宏			石田 竜一		
		教授	浜千尋	中山 実				
副学科主任	教授	横山 謙			岸川 淳一		中西 温子	
生命資源環境		教授	金子 貴一					
		准教授	河邊 昭			吉田 貴徳 吉田 初佳		
		准教授	木村成介			中岡益朗(学振PD) 中山 郁(学振PD) 中山 北斗(学振PD)		上ノ山 華織
		准教授	高橋 純一				藤本 卓矢	
	学科主任	教授	津下英明	鶴村俊治		吉田 徹		秋 浩(3月まで) 津 守耶良
		教授	寺地 徹	高橋 亮		塚谷 真衣	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	
動物生命医科		教授	加藤 啓子					渡邊 裕子
		助教	今野 兼次郎					
	副学科主任	教授	齋藤 敏之					
		助教	染谷 梓					
		教授	高桑 弘樹					
	学科主任	教授	竹内 実				石佐田 裕明 伊倉正起 池藤充宏 今江千清 川崎成朝 杉江理人 田村北子 渡邊佳史	廣野由里子(5月まで) 野田中美子
		准教授	棚橋 靖行					川原 瑞穂(2月まで)
		准教授	西野 佳以				萩原 克郎	
		教授	前田 秋彦				好井 健太郎	
		客員教授	松本 耕三					
副学部長	教授	村田 英雄						

スタッフ等名簿	
大学院生	その他
Ontong Pawaraid (D2) 望月 信利 (M1)	
飯田 英明 (D1)	
西川 裕貴 (M1)	
Ksenia Pavlovna Shcherbakova (D3)	
吉田 亜佑美 (D3) 近藤 真菜美 (M1)	
森 勇伍 (D3) 田中 涼太 (M2) 溝上 侑也 (M1)	佐々木 綾 (大学院委託生) 永原 秀剛 (大学院委託生) 荻田 祐司 (大学院委託生)
小谷 友理 (D3) 杉原 宗親 (M1)	
Jeerawat Soonthornsit (D2)	
辻野 裕大 (M1) ハク イナ (M1)	
川勝 弥一 (D2) 天野 瑠美 (M1) 久保 俊彰 (M1)	
大石 友樹 (M1) 中濱 奏絵 (M1)	
Waraphan Tonity (D1)	
大矢 悠貴 (D1) 岡部 真弥 (M2) 辻 雅之 (M2) 大森 健人 (M1)	
奥島 輝也 (M1)	
山本 一皓 (M2) 茨木 亮多 (M1) 金山 純子 (M1) 向井 章人 (M1)	
Srimontri Paitoon (D3) 廣田 暖奈 (M1)	
小野 隆祐 (M1)	
木下 佳紀 (M1)	
高崎 摩依子 (M1) 渡谷 理沙 (M1)	
伊藤 亜希 (M1) 岡本 奈津実 (M1) 古藤 惇 (M1)	
佐々木 大樹 (D2)	
Sarawut Taksinoros (D3) 加島 圭悟 (M1)	

総合生命科学部事務室スタッフ名簿

役職名等	氏名
学長室 総合生命科学部長補佐	井上 朋広
教学センター課長補佐 (総合生命科学部担当)	中上 ゆかり
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)	伊原 和美
教学センター契約職員 (総合生命科学部担当)	角 理恵子
教学センター契約職員 (総合生命科学部担当)	橋本 智子
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)	佐々木 瑛峰
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)	宮田 朋子
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 (R1業務担当)	碓山 菜々子

全学委員会等委員名簿

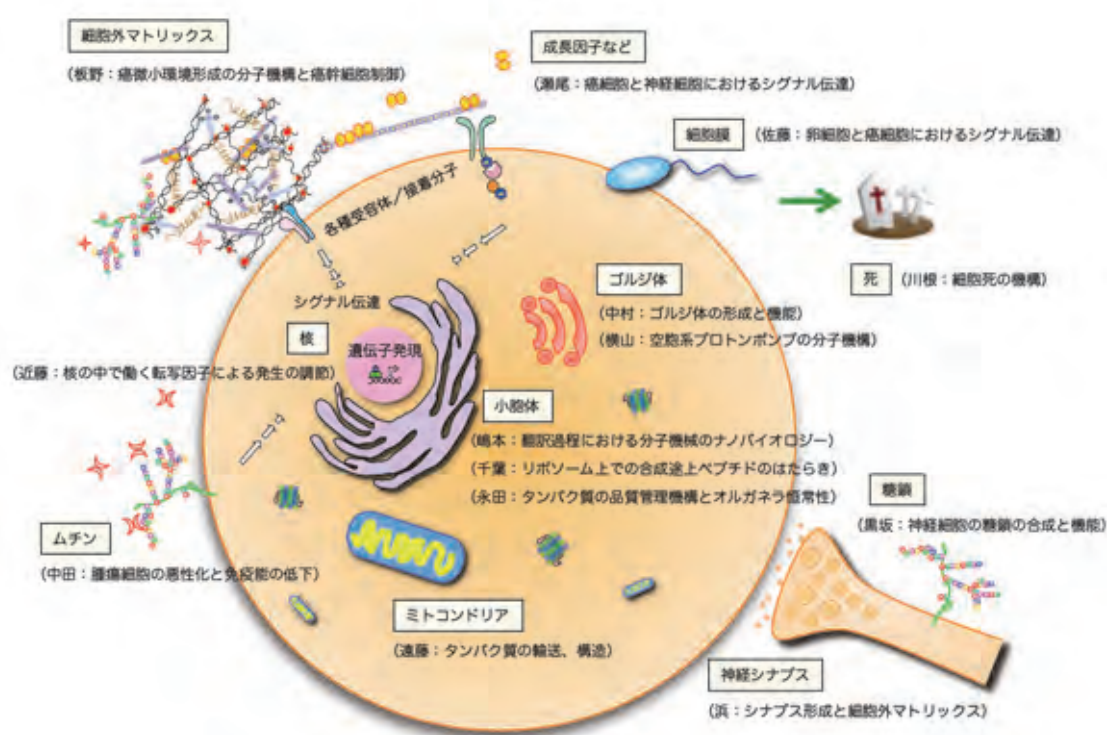
委員会等名称	委員氏名
交通対策委員会	河邊 昭
省エネルギー推進委員会	今野 兼次郎
自己点検・評価運営委員会 (総合生命科学部)	加藤 啓子
自己点検・評価運営委員会 (生命科学研究科・工学研究科)	河邊 昭
学部 FD/SD推進ワーキンググループ	村田 英雄
大学院 FD/SD推進ワーキンググループ	浜 千尋
高大接続ワーキンググループ	金子 貴一
ラーニングコモンズ運営委員会	中村 暢宏
GSC (グローバルサイエンスコース) ワーキンググループ	中村 暢宏
教務委員会	前田 秋彦
留学アドバイザー	千葉 志信
学生部委員会 (兼・奨学生選考委員会)	横山 謙
学生寮教育スタッフ	川根 公樹
障がい学生支援委員会	野村 哲郎
入学試験委員会	金子 貴一
AO入試委員会	金子 貴一
進路センター運営委員会	板野 直樹 河邊 昭
情報基盤運営委員会	高桑 弘樹
ネットワークセキュリティ委員会	高橋 純一
大学院委員会	浜 千尋
図書館委員会	寺地 徹
学術リポジトリ運営委員会	寺地 徹
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
教職課程教育センター運営委員会	瀬尾 美鈴 藤 敏之
国際交流推進委員会	板野 直樹
論集編集系列委員会	遠藤 斗志也
リエゾンオフィス運営委員会	津下 英明
人権センター運営委員会	西野 佳以
人権委員会	高桑 弘樹
人権センター窓口相談員	西野 佳以

生命システム学科

生命システム学科

【研究】

本学科は専任教員(教授12, 准教授2)14名を擁する。うち、4名は今年度新たに着任した。研究の特色は、多種多様な生命の営みを、分子レベルの生命現象と細胞・組織・個体の各レベルの生命現象とが縦横に結びついた統合システム(生命システム)の働きとしてとらえ、研究している点である。各教員の研究テーマは、下図に示すように、分子・細胞レベルでは遺伝子の転写・翻訳、タンパク質・複合糖質等の合成・成熟・品質管理、それらの輸送・運搬、そして、ゴルジ体構造の維持、ミトコンドリア形成と生体エネルギー産生、リン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾、細胞膜受容体や細胞外マトリックスを介する細胞内外のシグナル伝達など、多岐にわたる。また、より高次(組織・個体レベル)の生命現象も、受精、発生、神経など多様である。さらには、癌をはじめとするいくつかの疾病を、機能分子の異常による生命システムの破綻ととらえた研究も行なっている。



【教育】

別表(次ページ)は、専任教員が担当する授業科目のリストである。1学年の学生定員が45名である本学科は、入学から卒業まで徹底した少人数教育を実践している。特に1年春学期のフレッシューズセミナーと3年秋学期以降の基礎および応用特別研究では、教員1名あたりの指導学生数は3~4名である。

カリキュラム全体の構成は次の通りである。初年次から2年次にかけて生物学と化学の基礎を講義科目(生物学通論、化学通論)と実験科目(化学実験、生物学実験)で学ぶ。そして、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、より専門性の高い諸科目(遺伝子工学、発生生物学、神経生物学、免疫学、薬理学など)、応用的な実験科目(生命システム実習)などを学び、3年次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(生命システム英語講読)や演習にも多くの時間を割いている。進路支援としては、大学院生命科学研究科への進学を強く推奨する一方で、学部・大学院の卒業・修了後の就職も見据えたキャリア形成支援を進路センターとの連携により実施している。今年度は第2期生(平成23・西暦 2011 年度入学生)の卒業年度である。

科目名	配当学年	担当教員
フレッシューズセミナー	1	板野、遠藤、川根、黒坂、近藤、佐藤、嶋本、瀬尾、千葉、中田、中村、永田、浜、横山
生物学通論A、B	1	川根、嶋本
化学通論A、B	1	横山
生命システム概論	1	永田
物質生物化学	1	黒坂、浜
分子生物学	2	瀬尾、千葉
遺伝子工学	2	嶋本
代謝生物化学	2	遠藤、中田
細胞生物学	2	中村、永田
発生生物学	2	近藤、佐藤
システム生物学	3	遠藤、中村
バイオ解析科学	3	板野、中村
タンパク質制御システム	3	永田、横山
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
腫瘍生物学	3	佐藤
再生システム学	3	川根、近藤
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	板野、瀬尾、横山、黒坂、中村
生命科学演習Ⅰ、Ⅱ	1	川根、板野
生命システム英語講読Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ	2, 3	近藤、佐藤、遠藤、瀬尾、中田、千葉、浜
生物学実験	2	板野、佐藤、中村、浜
生命システム実習Ⅰ、Ⅱ	2, 3	板野、遠藤、川根、黒坂、近藤、佐藤、嶋本、瀬尾、千葉、中田、中村、永田、浜、横山
基礎特別研究	3	板野、遠藤、川根、黒坂、近藤、佐藤、嶋本、瀬尾、千葉、中田、中村、永田、浜、横山
応用特別研究	4	板野、黒坂、佐藤、嶋本、瀬尾、中田、中村、永田、浜、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。また、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の発現を指標に癌幹細胞様細胞数を計測した。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てきた。本年度私達は、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞において、細胞間隙におけるE-カドヘリンの発現が減弱し、EMT関連分子のTGF- β やSnail/Twist転写因子の発現が亢進することを明らかにした。この結果は、ヒアルロン酸の過剰産生が、乳癌細胞にEMTを誘導していることを示唆している。

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. In this year, we found the down-regulation of E-cadherin and up-regulation of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-related molecules such as transforming growth factor beta (TGF- β) and Snail/Twist transcriptional factors in hyaluronan-overproducing cancer cells. Taken together, our findings suggest that excess hyaluronan production induces the EMT in breast cancer cells.

4. 論文, 著書など

T. Chanmee, P. Ontong, N. Mochizuki, P. Kongtawelert, K.

Konno, N. Itano: Excessive hyaluronan production promotes acquisition of cancer stem cell signatures through the coordinated regulation of Twist and the TGF- β -Snail signaling axis. *J. Biol. Chem.* **289**, 26038-26056

T. Chanmee, P. Ontong, K. Konno, N. Itano: Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* **6**, 1670-1690. 2014.

A.M. Arranz, K.L. Perkins, F. Irie, D.P. Lewis, J. Hrabe, F. Xiao, N. Itano, K. Kimata, S. Hrabetova, Y. Yamaguchi: Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal

activity and seizures via reduction in brain extracellular space.
J. Neurosci. **34**, 6164-6176

K. Konno, Y. Shiotani, N. Itano, T. Ogawa, M. Hatakeyama, K. Shioya, N. Kasai: Visible, safe and certain endotracheal intubation using endoscope system and inhalation anesthesia for rats. *J. Vet. Med. Sci.* **76**, 1375-1381

K. Konno, N. Itano, T. Ogawa, M. Hatakeyama, K. Shioya, N. Kasai: New visible endotracheal intubation method using the endoscope system for mice inhalational anesthesia. *J. Vet. Med. Sci.* **76**, 863-868

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

T. Chanmee, P. Ontong, N. Itano: Hyaluronan: cancer and cancer metastasis. *Glycoscience: Biology and Medicine* (Eds. Taniguchi N. et al.) Springer pp. 1411-1417

N. Itano, T. Chanmee, K. Kimata: Hyaluronan synthase 1-3 (HAS1-3) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (Eds. Taniguchi N. et al.) Springer 865-872

T. Chanmee, P. Ontong, N. Itano: Biosynthetic pathways of proteoglycans *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (Eds. Taniguchi N. et al.) Springer 1681-1686

5. 学会発表など

チャンミー シーラウト, 板野直樹: ヒアルロン酸誘導性上皮間葉転換によるがん幹細胞性の制御. 第23回日本がん転移学会学術集会・総会, 金沢市, 2014.7.10

板野直樹: 癌進展におけるヒアルロン酸微小環境の多面的な役割. 第87回日本生化学会大会, 京都市, 2014.10.18 (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: ニッチの均質化によるがん幹細胞脆弱化の基盤研究

研究代表者: 板野直樹, 取得年度: H26-28年 (3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

4) 受賞等 なし

5) その他

岡山大学非常勤講師 (2014年4月1日~2015年3月31日)

ホームページ:

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



研究室メンバー

生物化学研究室

Laboratory of Biochemistry

1. 研究概要

真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。たとえば真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、不良ミトコンドリアを除去すると共に、常時ミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアはゼロからは作られず、既存のミトコンドリアを拡大、分裂、分配することで増える。ミトコンドリアを拡大するためには、ミトコンドリアを構成するタンパク質（出芽酵母では 800 種、ヒトでは 1500 種）と特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリアに合成・配送しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生合成のためのタンパク質と脂質の合成・配送、それに伴う品質管理やオルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。近年オルガネラは完全に独立して存在するのではなく、オルガネラ間で構造機能的に連携して働くことが分かり始めているが、ミトコンドリアも ER や液胞との間にコンタクト部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心にオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

2. 本年度の研究成果

1) 膜間部側から外膜に挿入される新規 N アンカー型外膜タンパク質の移行経路の解析

ミトコンドリアタンパク質の局在化経路についてはかなり詳細に解析がされているが、外膜の α -ヘリックス型膜タンパク質の局在化経路については、まだ不明ことが多い。N アンカー型外膜タンパク質 Om45 は、サイトゾル側から特定の自発的に N 端側膜貫通(TM)配列により外膜にアンカーされると考えられていた。しかし今回、Om45 がま

教授 遠藤斗志也

Prof. Toshiya Endo, Ph. D.

助教 河野 慎

Assist. Prof. Shin Kawano, Ph. D.



ず TOM40 複合体を介して外膜を通過し、続いて膜間部側から外膜に挿入されること、この経路は内膜 TIM23 複合体と内膜の膜電位を必要とすることを見出した。N 端側の TM 配列は Tom70 の TM 配列と入れ替えても同じ経路で輸送されるので、この経路は N アンカー型外膜タンパク質のデフォルト経路と考えられる。一方で、C 端ドメインが大きかったりフォールドしていると、Tom40 チャンネルの通過が妨げられ、おそらくラテラルリリースにより外膜に挿入される。この結果、N アンカー型外膜タンパク質のトポロジーが逆転するらしい。

2) 外膜トランスロケータ TOM40 複合体の構造機能解析

TOM40 複合体はミトコンドリア外膜でほとんどすべてのミトコンドリアタンパク質のミトコンドリアへのインポートの入り口となるトランスロケータである。今回、部位特異的に光架橋性非天然アミノ酸 BPA を導入した Tom40 を酵母細胞内で発現して、Tom40 と他の TOM40 複合体構成サブユニットとの光架橋産物を得た。この結果に基づいて、Tom40 と他のサブユニットとの空間的配置をマッピングした。この結果、Tom40-Tom22 は三量体をつくることが分かったが、一方で Tom40-Tom40 の架橋実験 (Pfanner らとの共同研究) の結果は Tom22 含まぬ二量体の存在を示唆しており、Tom22 を含む Tom40 三量体は一部が Tom22 を含まない Tom40 二量体と動的平衡にあることが示唆された。次に部位特異的に BPA を導入した Tom40 を発現する酵母細胞からミトコンドリアを単離し、モデル前駆体タンパク質を用いた *in vitro* インポート実験に供した。前駆体の膜透過を停止させて膜透過中間体をつくり、UV 照射することで、前駆体と相互作用する Tom40 のチャンネル内部をマッピングすることができる。プレ配列を持つ前駆体はチャンネル内の複数の酸性アミノ酸残基のパッチと相互作用し、プレ配列の正電荷がチャンネル内で安定化されつつ膜透過していくことがわかった。プレ配列を持たない前駆体はチャンネル内の複数の疎水性アミノ酸残基のパッチと相互作用し、疎水性 TM 配列がチャンネル内で安定化されつつ膜透過していくことがわかった。示唆されたサブユニット間相互作用、基質との相互作用に重要な残基に変異を導入し、機能解析を行っている。

3) ミトコンドリア内で脂質輸送を担う Ups1 システムの構造機能解析

最近、ミトコンドリアの外膜内膜間で Ups1-Mdm35 がホスファチジン酸 (PA) を特異的に輸送するモデルが提唱された。Ups1 の脂質輸送能を検討するために、Ups1 を大腸菌内で Mdm35 と共発現する系を確立し、Mdm35、Ups1-Mdm35、Ups1-Mdm35-PA (PA は基質) の構造決定に成功した。Ups1 は両親媒性のポケットを持ち、ポケット内には塩基性アミノ酸が多かった。これらの塩基性アミノ酸の電荷を変えるような置換を行うと、*in vitro* で脂質輸送活性がなくなった。さらにポケットの入り口には Ω ループがあり、これを欠失させるとやはり *in vitro* で脂質輸送活性がなくなった。 Ω ループはポケットに入った脂質が解離しないよう、フタをする役割があるのではないかと考えられる。また Ups1-Mdm35 は脂質膜に結合する際、解離すると考えられているが、X 線構造に基づいて、解離しないよう Cys 変異体かつ Ups1-Mdm35 融合タンパクを用いてジスルフィド結合で架橋したところ、膜への結合はできなくなったが、脂質輸送活性は (減少するものの) 残っていた。したがって、Ups1-Mdm35 の解離は脂質輸送には必須ではないことがわかった。

3. Research projects and annual reports

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol, and are subsequently imported into mitochondria. Much is known about the pathways/components for the protein transport to the matrix, inner membrane (IM), and intermembrane space (IMS), yet little is known for the insertion of outer membrane (OM) proteins with a single α -helical TM segment. Om45 is one of the most abundant proteins in the OM of yeast mitochondria and was thought to be inserted into the OM from the cytosolic side as an N-anchor protein. We now revealed that Om45 is anchored to the OM from the IMS by its N-terminal hydrophobic segment. Unlike any of the known OM proteins, Om45 import requires the TIM23 complex in the inner membrane, a translocator for presequence-containing proteins, and the membrane potential ($\Delta\Psi$). Therefore, Om45 is anchored to the OM via the IMS by a novel import pathway. Interestingly, the length and folding of the C-terminal segment appear to block the Om45 transport through the Tom40 channel, thereby switching the membrane topology of Om45 in the OM.

The TOM40 complex functions as the protein entry gate into mitochondria. We systematically mapped the interactions of the Tom40 β -barrel channel with translocating preproteins and α -helical subunits of the TOM40 complex by *in vivo* and *in organello* site-specific crosslinking. The paths of presequence-containing and presequence-less proteins were defined, demonstrating translocation through the interior of the Tom40 β -barrel. The positively charged presequence of the presequence-containing protein follows an acidic patch cluster on the inner wall of the Tom40 pore to be funneled toward the trans presequence binding site of the TOM40 complex in the IMS for subsequent transfer to the TIM23 complex. Presequence-less carrier proteins interact with distinct residues lining the Tom40 pore, most of which are hydrophobic, to be funnelled toward the N-terminal domain of Tom40 and its attendant small TIM chaperones for the IM translocator. Analysis of the contacts between Tom40 and Tom22 revealed that Tom40-Tom22 trimers form the architectural core of the native TOM40 complex. In addition, the TOM40 complex was found to be in a dynamic equilibrium between the native major 440 kDa complex containing a Tom40-Tom22 trimer and a less abundant 100 kDa complex containing Tom40 dimers but lacking Tom22. Such an exchange may be important not only for continuous assembly of new subunits through their exchange for old subunits, but also for the function of the TOM40 complex.

Organelle functions rely on lipid trafficking to achieve membrane-specific compositions of lipids, yet its mechanisms are unclear. We focused on the Ups1/Mdm35 system, which mediates phosphatidic acid (PA) transfer between the OM and IM, and determined the X-ray structures of Mdm35 and Ups1-Mdm35 with and without PA. The Ups1-Mdm35 complex constitutes a single domain that has a deep pocket and flexible Ω -loop lid. Structure-based mutational analyses revealed that a basic residue at the pocket bottom and the Ω -loop lid are important for PA extraction from the membrane after Ups1 binding to the membrane. Basic residues around the pocket entrance are important for Ups1 binding to the membrane for PA extraction. Ups1 binding to the membrane is enhanced by dissociation of Mdm35. These results provide a structural basis for understanding of the mechanism of PA transfer between the mitochondrial membranes.

4. 論文, 著書など

D. Maruyama, M. Yamamoto, T. Endo, and S.

Nishikawa, Different sets of ER-resident J-proteins regulate distinct polar nuclear-membrane fusion events in *Alabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1937-1944 (2014)

Y. Tamura, H. Sesaki and T. Endo, Phospholipid transport via mitochondria (Review). *Traffic* **15**, 933-945 (2014)

F. Koyano, K. Okatsu, H. Kosako, Y. Tamura, E. Go, M. Kimura, Y. Kimura, H. Tsuchiya, H. Yoshihara, T. Hirokawa, T. Endo, E. A. Fon, J. F. Trempe, Y. Saeki, K. Tanaka, and N. Matsuda, Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162-166 (2014)

J. Song, Y. Tamura, T. Yoshihisa, and T. Endo, A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex. *EMBO Rep.* **15**, 670-677 (2014)

H. Okamoto, A. Miyagawa, T. Shiota, Y. Tamura and T. Endo, Intra-molecular disulfide bond of Tim22 maintains integrity of the TIM22 complex in the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* **289**, 4827-4838 (2014)

D. Maruyama, T. Sugiyama, T. Endo, and S. Nishikawa, Multiple BiP genes of *Alabidopsis thaliana* are required for male gametogenesis and pollen competitiveness. *Plant Cell Physiol.* **55**, 801-810 (2014)

B. Rahman, S. Kawano, K. Yunoki-Esaki, T. Anzai, and T. Endo, NMR analyses on the interactions of the yeast Tim50 C-terminal region with the presequence and Tim50 core domain, *FEBS Lett.* **588**, 678-684 (2014)

5. 学会発表など

安西高廣, 河野慎, 遠藤斗志也: NMRによるミトコンドリア酸化還元トランスロケータTim40の基質認識機構の解析(口頭), 2013年度生物物理学会中部支部会, 岡崎, 2014.3.6

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria from proteins and lipids. Mini-symposium at National Taiwan University (招待講演), Taipei, 2014.5.16

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria by transport of proteins and lipids, Seminar at Institute of Molecular Biology, Academia Sinica (招待講演), Taipei, 2014.5.19

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria from proteins and lipids, The KSU International Symposium: Cutting-edge of Life Sciences (招待講演), Kyoto, 2014.5.30-31

田村康, 遠藤斗志也: 試験管内リン脂質輸送反応アッセイ系の開発, 第66回細胞生物学会大会シンポジウム「ミトコンドリア研究の新潮流:ミトコンドリアダイナミクスから合成生物学まで」(招待講演), 奈良, 2014.6.11-13

Jiao Song, Yasushi Tamura, Tohru Yoshihisa, Toshiya Endo A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex, 第66回細胞生物学会大会(口頭), 奈良, 2014.6.11-13

小島理恵子, 梶浦秀, 遠藤斗志也, 田村康: ERMES構成因子欠損株のマルチコピーサブプレッサーの解析, 第66回細胞生物学会大会(ポスター), 奈良, 2014.6.11-13

遠藤斗志也: 遠藤プロジェクトの紹介, 科学未来館研究棟セミナー(招待講演), 東京, 2014.7.25

遠藤斗志也: ミトコンドリア生合成の分子機構, 第97回血栓止血研究会セミナー(招待講演), 大阪(国立循環器病研究センター研究所), 2014.8.21

遠藤斗志也: 酵母ミトコンドリアにおけるタンパク質と脂質の輸送機構 Mechanisms of protein and lipid transport in yeast mitochondria, 第52回生物物理学会年会シンポジウム「膜動態から探るミトコンドリア・ネオバイオロジー」(招待講演), 札幌, 2014.9.25-27

Yasushi Tamura and Toshiya Endo: Phospholipid trafficking between mitochondria and the endoplasmic reticulum (招待講演), 第87回日本生化学会大会シンポジウム「New Phase in Organelle Biology: Cellular Organellostasis with Mitochondria as a Hub」, 京都, 2014.10.15-18

松本俊介, 嶋田睦, 遠藤斗志也, 神田大輔: 古細菌由来オリゴ糖転移酵素の基質ペプチド複合体の結晶構造(口頭+ポスター), 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

河野慎, 浅井絵里, スチンバラ, 遠藤斗志也: ERMES複合体構成因子Mdm12およびMmm1によるリン脂質輸送メカニズムの解明(口頭+ポスター), 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

渡邊康紀, 河野慎, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリア膜間部におけるリン脂質輸送タンパク質Ups1-Mdm35複合体の構造機能解析(ポスター), 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

植田依里, 田村康, 遠藤斗志也: 出芽酵母におけるミトコンドリアクリステジャンクション形成因子の輸送経路の解析(ポスター), 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

江崎芳, バイチュルラーマン, 石丸雄基, 河野慎, 遠藤斗志也: 2つの機能ドメインに注目したミトコンドリア内膜透過装置構成

因子Tim50によるプレ配列認識機構の解析(ポスター), 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

小島理恵子, 梶原秀, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリアと小胞体を結合させるERMES複合体欠損株のマルチコピーサブレッサー解析(ポスター), 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

Jiyao Song, Yasushi Tamura, Tohru Yoshihisa, and Toshiya Endo: A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex(ポスター), 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学技術振興機構・CREST

課題名:ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワーク

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:H24-29年度(6年)

科学研究費補助金・基盤研究(S)

課題名:ミトコンドリア膜を舞台としたタンパク質の交通管制機構の解明

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:H22-26年度(5年)

科学研究費補助金・若手研究(B)

課題名:ミトコンドリア-小胞体係留複合体構成因子 Mmm1 と Mdm12 の構造機能解析

研究代表者:河野慎, 取得年度:25-27年度(3年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名:ミトコンドリア膜間のリン脂質輸送機構の構造生物学的解明

研究代表者:渡邊康紀, 取得年度:H26-28年度(3年)

2) 知財権等

3) 学外活動

遠藤斗志也:日本蛋白質科学会会長

遠藤斗志也:九州大学客員教授

遠藤斗志也:名古屋大学招聘教員

遠藤斗志也:日本細胞生物学会評議員

遠藤斗志也:日本細胞生物学会常任編集委員

4) 受賞等

5) その他 なし



26年8月 研究室(京産大+名大)のリトリート(菅島)

細胞死研究室

Laboratory of Cell Death

1. 研究概要

本研究は、腸管及び腸管免疫の恒常性の理解を目的とし、この問題に、腸管上皮細胞のターンオーバーにおける細胞死（細胞脱落）及び腸管でのDNA分解の二つの独自の視点から迫るものである。細胞脱落は、上皮細胞など接着細胞がその終焉を迎える際に組織から剥離、離脱する現象で、アポトーシスともネクローシスとも異なる細胞終焉様式である。腸管でのDNA分解は死細胞由来のDNAのみならず腸内細菌や食物由来のDNAなど対象が多岐に及ぶ点が特徴である。解析が遅れているこれらの現象に着目する本研究によって、その破綻との関連が予想される癌、炎症疾患、感染などの治療法開発へ新たな側面から道を拓くことを目指す(図1)。

この目的のため、まず腸管における細胞脱落及びDNA分解の分子機構を、マウス及びショウジョウバエの生体内上皮あるいは培養腸上皮構造体（オルガノイド）を用いて明らかにする。続いて脱落やDNA分解に異常を来すマウスの解析により、これらの破綻と疾患の関連を解明する。

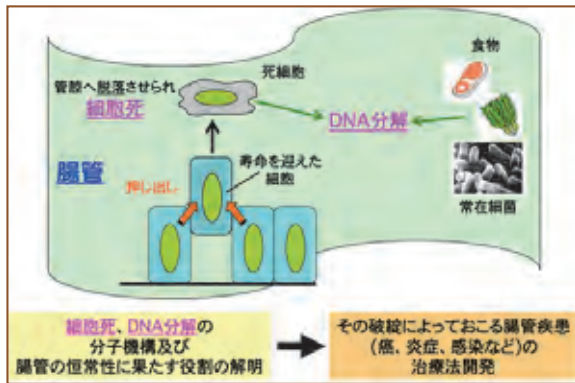


図1. 腸管での細胞死とDNA分解

2. 本年度の研究成果

A 細胞脱落を司る遺伝子同定のためのショウジョウバエを用いたスクリーニング系の最適化を行った。

すなわち、腸上皮において、双子娘細胞に由来する双子クローン効率よく誘導する条件などを決定した。

B 細胞脱落の実行過程の機構の解析のためのマウスオルガノイドを用いた実験系の樹立を行った。

准教授 川根公樹

Associate Prof. Kohki KAWANE, Ph. D.



すなわち腸オルガノイドの系をたちあげ(図2)、細胞脱落のライブイメージングに成功した(図3)。この時、細胞は生きたまま脱落していることを示すイメージング結果を得た。この脱落時の各種タンパク質(細胞骨格や細胞接着分子など)の分子動態を解析するため、それぞれと蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するオルガノイドを樹立した。また、オルガノイドにおける細胞脱落の定量系の構築に着手した。

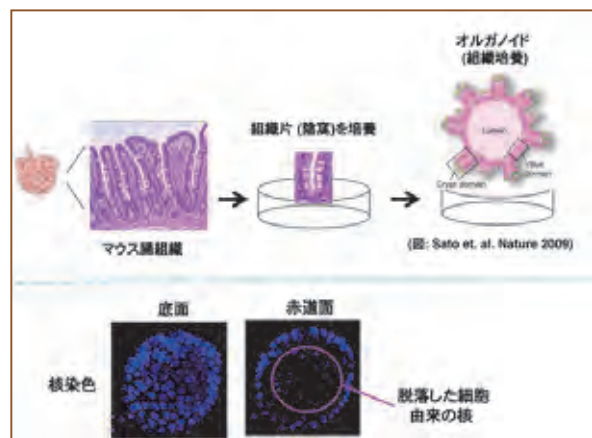


図2. マウスオルガノイドを用いた細胞脱落の解析

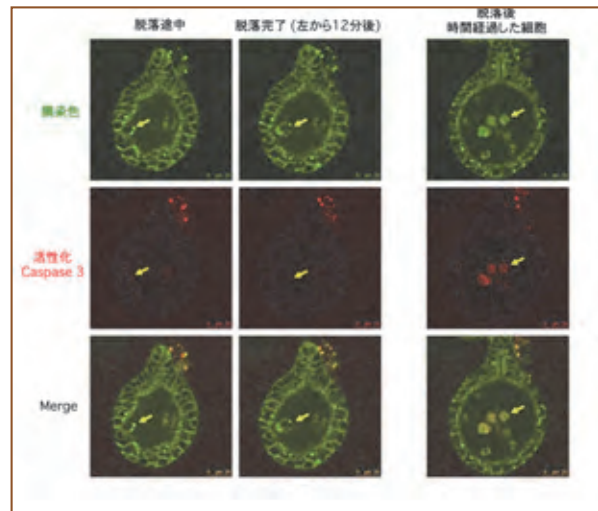


図3. 細胞脱落のライブイメージング

3. Research projects and annual reports

The homeostasis in gut is maintained by the balance of proliferation and death of epithelial cells with the barrier function of epithelia. The impairment of them causes various

disease such as cancer, inflammatory disease, and infection in gut. I focus on two related phenomena, cell death and DNA degradation, to decipher their molecular mechanism and role for gut homeostasis. The insight obtained from the project will contribute to understand the disease in gut and develop novel treatments against them.

A. We have done the optimization of a novel RNAi screening system in *Drosophila* to identify involving genes in cell death (extrusion).

B. We established a system, in which live imaging analysis of cell extrusion can be performed by using mouse intestinal organoid (mini-gut) and found that the cells are delaminated from epithelial layer as they are still alive.

4. 論文, 著書など

1. Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T, Saitoh S, Ohto U, Shimizu T, Barber GN, Miyake K* : DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9 degradation. *Nat Commun.* 6: 5853, 2015
2. Kawane K, Nagata S* : DNA degradation and its defects. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6: pii: a016394, 2014

5. 学会発表など

川根公樹: 細胞社会からの視点から見た細胞死と細胞死に伴う現象. 順天堂大学医学部第45回細胞生物学セミナー, 東京都, 2014.5.14

川根公樹: 腸管の恒常性における細胞死とDNA分解の役割. Crest-さきがけ合同キックオフ会議 (生体における動的恒常性維持・変容機構の解明と制御), 東京都, 2014.11.16

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・若手研究(A)

課題名: 未解明の細胞死様式である細胞脱落の分子機構の解明

研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H26-30年 (4年)

科学研究費補助金・さきがけ

課題名: 腸管の恒常性における細胞死とDNA分解の役割
研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H26-30年 (3年半)

持田記念医学薬学振興財団 持田記念研究助成

課題名: 腸上皮細胞の細胞寿命を規定する分子機構の解析
研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H25-26年 (1年)

武田科学振興財団 医学系研究奨励

課題名: 新規スクリーニング系を用いた、上皮組織における細胞脱落現象の分子機構の解明: 川根公樹, 取得年度: H25- (使用期限 H30年まで)

東京生化学研究会 研究奨励金

課題名: 細胞老化がもたらす、腸管上皮細胞の細胞死 (脱落死)の分子機構

ノバルティス科学振興財団 ノバルティス研究奨励金

課題名: 新たな細胞死様式である細胞脱落の分子機構の解明

2) 知財権等 該当なし

3) 学外活動 該当なし

4) 受賞等 該当なし

5) その他 なし



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、またな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 のノックアウト/トランスジェニックマウスを作製して、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

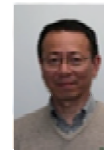
酵素活性が検出できず生化学的な解析が困難なサブファミリーを主なターゲットとして、ゼブラフィッシュを用いて発現解析、および機能阻害実験を行ってきた。本年度は、発現解析実験を取りまとめ、さらにゲノム編集技術である TALEN 法や CRISPR/Cas システムを用いて、変異体作製を試みた。

3) P19 胚性腫瘍細胞を用いた新規神経分化モデルの確立

神経細胞の擬能や分化の解析等に用いられる、多分化能を有するマウス胚性腫瘍由来 P19 細胞は、レチノイン酸存在下で浮遊培養することで、神経、およびグリア細胞へと分化する。しかしこの方法では、非神経系細胞

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



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、接着培獲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。

2. 本年度の研究成果

1) GalNAc-T17 の機能解析

我々は GalNAc-T17 の機能解明のため、GalNAc-T17 ノックアウト、およびトランスジェニックマウスを作製し、比較検討した。我々は、ノックアウトマウスの体重が減少し、このマウスが成長不全を示すこと、下垂体前葉ホルモンである成長ホルモンの分泌が低下し、プロラクチンの分泌が亢進すること (Fig. 1A)、プロラクチンの分泌亢進が視床下部弓状核からのドーパミンの抑制性シグナルの低下に起因すること (Fig. 1B)、及び雌マウスが分娩異常を示すことを見出している。これらの知見は、Galnt17 が視床下部におけるホルモン分泌調節因子として機能する可能性を指摘するものであり極めて興味深い。

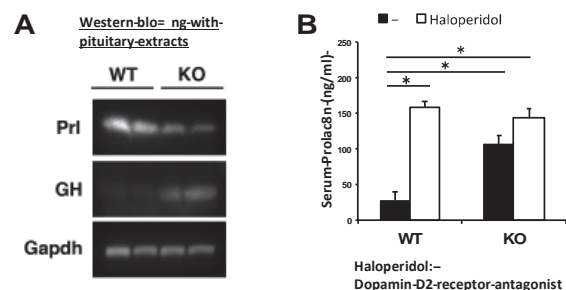


Fig. 1. Secretion of prolactin and growth hormone is affected by decreased dopamine signal in the *galnt17* KO mice.

2) ゼブラフィッシュ GalNAc-T ファミリーの解析

GalNAc-T アイソザイムのうちで、発現や機能が理解されておらず、特有のアミノ酸置換を持つため酵素活性も検出されていない Y サブファミリーと呼ばれる一群のアイソザイム(GalNAc-T8, -T9, -T17, -T18)の発現解析を行った (Nakayama, Y. *et al.* (2014) Gene Expr. Patt). その結果、これらのアイソザイムはいずれも脳に多く、発生時期により特有の発現パターンを示すことがわかった (Fig. 2).

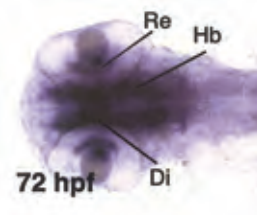


Fig. 2. Expression of *galnt17* in the brain. Di; diencephalon, Hb; hindbrain, Re; retina

また、ゲノム編集技術である TALEN, CRISPR/Cas システムを用いて、GalNAc-T 遺伝子を欠損する変異体作製を試み、*galnt9* 欠損ゼブラフィッシュの作製に成功した。

3) P19 胚性腫瘍細胞を用いた新規神経分化モデルの確立

P19 細胞の神経細胞への分化には、レチノイン酸存在下で細胞凝集塊を形成させる方法が用いられてきた。我々は、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、論文として公表した(Nakayama, Y., *et al.* (2014) *J. Neurosci. Meth.*).

3. Research projects and annual reports

We have been investigating roles of an O-linked sugar chain with the carbohydrate-protein linkage structure, GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr), which is called a mucin-type carbohydrate. Its biosynthesis is initiated by a group of enzymes, UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts). GalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in humans. Interestingly, GalNAc-T8, -T9, -T17, and -T18 consist of a unique subfamily that have characteristic amino acid substitutions in the catalytic domains and they show almost no detectable catalytic activity. Among them, we have isolated GalNAc-T9 and -T17, and demonstrated that they are brain-specific and biologically important for the neural differentiation. Based on these backgrounds, we have focused on the functions of glycosyltransferases to make mucin-type carbohydrates, and obtained the following findings.

1) Analysis of *galnt17* knockout mice

Analysis of *galnt17*^{-/-} mice exhibited no obvious defects in the brain structures and their memory, but showed reduction in body size and food intake, and defect in reproduction (female KO mice). We performed Western blot analysis of pituitary extracts from 8 weeks old WT and KO male mice using anti-prolactin (Prl), anti-growth hormone (GH), and anti-GAPDH antibodies, and found that the serum growth hormone level is downregulated, but that of prolactin is upregulated (Fig. 1A). We then determined serum Prl levels in WT and KO females that were intraperitoneally administered with saline (-) or haloperidol, a dopamine receptor antagonist. Haloperidol upregulated WT serum Prl as high as that of KO mice (Fig. 1B), indicating that the inhibitory signal of dopamine was decreased in the KO mice. This

suggests that *galnt17* regulates serum levels of pituitary gland hormones by regulating the dopamine signal.

2) Analysis of zebrafish *galnt* genes during embryonic development

We have isolated zebrafish Y-subfamily *galnt* genes, and determined their spatial and temporal expressions during the early development of zebrafish (Nakayama, *et al.* (2014) *GEP*). Our study demonstrated that *galnt8* was expressed in the cephalic mesoderm and hatching gland during early developmental stages, and differently expressed in the head, somatic muscles, and liver in the later stages. The other three orthologs (*galnt9*, *17*, and *18*) also exhibited the characteristic expression patterns, although their expressions were generally strong in the nervous systems (Fig. 2).

To produce zebrafish mutants that are defective of *galnt* genes, we employed recently developed genome-editing technology, TALEN and CRISPR/Cas systems. We have successfully generated *galnt9* mutant zebrafish.

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

We have developed a novel method for the rapid and efficient neurogenesis of P19 cells, without aggregate formation in a suspension culture. The new approach is based on an adherent serum-free culture in a laminin-coated dish in the presence of FGF8, α -secretase inhibitor, and cytosine arabinoside. The new method efficiently induced P19 cells to differentiate into neurons within 4 days, and subsequently into mature neurons that were responsive to several neurotransmitters, giving spontaneous neuronal network activity within 6 days (Nakayama, Y., *et al.* (2014) *J. Neurosci. Meth.*).

4. 論文、著書など

Kurosaka, A., Nakayama, Y., & Nakamura, N. (2014).

O-Glycosylation in the development of zebrafish. In *Glycoscience: Biology and Medicine* (pp. 1–8). Tokyo: Springer Japan.

Nakayama, Y., Nakamura, N., Kawai, T., Kaneda, E., Takahashi, Y., Miyake, A., Itoh, N., & Kurosaka, A. (2014). Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase Y-subfamily genes during embryonic development. *Gene Expression Patterns*, **16**(1), 1–7.

Nakayama, Y., Wada, A., Inoue, R., Terasawa, K., Kimura, I., Nakamura, N., & Kurosaka, A. (2014). A rapid and efficient method for neuronal induction of the P19 embryonic carcinoma cell line. *Journal of Neuroscience Methods*, **227**, 100–106.

Srimontri, P., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Hirabayashi, Y., & Kato, K. (2014). Sialyltransferase ST3Gal IV deletion protects against temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, **131**(5), 675–687.



集合写真(15号館裏にて)

5. 学会発表など

中山 喜明, 加藤 啓子, 中村 直介, 黒坂 光 :
Galnt17/Wbscr17遺伝子欠損マウスは成長不全と高プロラクチン血症を示す. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014.11.25-27

高橋 由衣, 金田 鋭一, 中村 直介, 中山 喜明, 黒坂 光 :
ゼブラフィッシュを用いたGalNAc-T18a, bの機能解析. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014.11.25-27

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: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)

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:H26年(1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

大学院特論: 京都大学薬学部 (2014.6.3)

高大接続授業: 紫野高校生徒に「化学反応とタンパク質」に関わる実習を行った (2014.7.19)

リエゾンオフィスシンポジウム「作物改良の過去, 現在, そして未来へ ~交雑育種から遺伝子組換えまで~」: 「遺伝子の正体とその働き」について講演 (2014.7.12)

発生生物学研究室

Laboratory of Developmental Biology

1. 研究概要

私たちの体は、哺乳類では着床後に成立する「エピブラスト」から発生する。最初は均一であるエピブラストからどのような機構で、さまざまな体細胞系列が派生してくるののかは、発生生物学の根本問題であり、私たちはその問題に挑んでいる。

エピブラストからさまざまな体細胞系列を生み出すのに直接的に関与している、SOX2 をはじめとするいくつかの転写因子の作用、またそれらと細胞間シグナルの相互作用を研究している。(1)それらの条件的ノックアウト(細胞系列や発生時期を限定した遺伝子失活)マウス胚の作製と解析、(2)マウス胚のエピブラストから直接樹立したエピブラスト幹細胞を活用した解析、これらを研究方法の中心に据えつつ、哺乳類と同じ羊膜類であるニワトリ胚を活用するなど、柔軟な作戦で研究を展開している。

転写因子の中では、特にSOX2の作用と、Sox2 遺伝子自体の制御を研究している。エピブラスト幹細胞を活用して、さまざまな転写因子が複合体をつくりつつゲノム上のさまざまな制御標的のどのように相互作用しているのかを、転写因子-クロマチン複合体の ChIP-seq 解析や、転写因子変異体の核内での可動性測定などによって研究している。

体細胞系列の中では、神経系、感覚器、心臓、体節、消化管などを生む細胞系列の初期過程に焦点を当てて研究している。特に心臓の形成に関しては、さまざまな体細胞系列の細胞が参加して心臓の組織全体を構成する機構を研究している。

2. 本年度の研究成果

Sox2, Zic などの転写因子の条件的ノックアウトを実施するために、各遺伝子座に LoxP 配列を持ったマウスと、Tamoxifen で活性化される Cre 組換え酵素の遺伝子を持ったトランスジェニックマウスを導入して、それらの交配を開始した。

C57BL/6 の 5.5 日胚のエピブラストから、エピブラスト幹細胞株を新たに樹立し、その安定な維持のため条件を詳細に検討した。また、129 マウス系統の胚から樹立されたエピブラスト幹細胞との比較を行った。

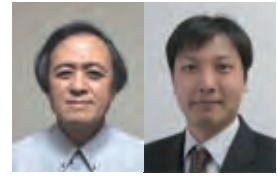
エピブラスト幹細胞において、SOX2 をはじめとするさまざまな転写因子がどのように相互作用しながらゲノム上のどのような位置に結合し、そしてどのような遺伝子群を

教授 近藤寿人

Prof. Hisato KONDOH, Ph.D.

助教 石井泰雄

Assist. Prof. Yasuo ISHII, Ph.D.



制御しているのかを、ビオチン化転写因子を用いた ChIP-seq 法で解析し、マウス ES 細胞、ヒト ES 細胞、マウス神経系幹細胞の場合と比較した。

Sox2 が持つ多数のエンハンサーの特異性、Sox2 遺伝子と重複して転写される非コード RNA である Sox2OT のエクソンとエンハンサー配列との関係を解析した。

エピブラスト幹細胞から神経系原基を生み出すための、細胞外シグナルの条件、さらに神経系原基に領域性を生み出すための条件、心臓や消化管の原基を生み出すための条件を検討した。

細胞系列の制御を研究するために、細胞系列の枠を超えた細胞分化現象(分化転換)の典型例である、神経性網膜から水晶体への分化を分析した。この現象には Notch シグナルが関与することを見いだした。

心臓を構成する組織のうち、心臓表面を覆う心外膜は冠血管の主な起源の一つである。本年度の研究によって、血管内皮細胞増殖因子 A(VEGF-A)が外膜細胞の移動を促進するとともに、発生過程における冠動脈形成を制御することが明らかになった。

3. Research projects and annual reports

All somatic cells of our body develop from epiblast, a cell population that develops in post-implantation embryos in the case of mammals. How a variety of somatic cell lineages develop from initially homogeneous epiblast is a fundamental problem of developmental biology, which we are investigating.

The approach we are taking is to investigate the regulation of cell lineage specification by SOX2 and other transcription factors, and the effects of intercellular signaling on the action of transcription factors. To this end, we analyze conditional knockout mouse embryos, where particular transcription factor genes are inactivated in developmental stage/cell lineage-specific manner. We also utilize epiblast stem cell lines and chicken embryos to manipulate epiblast cells with exogenous factors.

Epiblast stem cells are also used to investigate the interaction of transcription factors, e.g., SOX2, with their regulatory target sites in the entire genome, using ChIP-seq and other technologies.

Among the somatic cell lineages, we are interested in those leading to neural, sensory, cardiac, somitic and digestive tract development. Concerning heart development, we also investigate how cells derived from multiple cell lineages are organized to form a single organ.

In 2014, we started crossing conditional knockout mouse lines for various transcription factor genes and Cre- recombinase transgenic mouse lines that are activated by tamoxifen treatment.

We established a new epiblast stem cell line from a C57BL/6 embryo, and compared its characteristics with another line derived from the 129 mouse line. Taking advantage of epiblast stem cells, we investigated the binding site distribution of transcription factors and their complexes in the whole mouse genome using ChIP-seq. The results were compared with those using ES cells, human ES cells, and mouse neural stem cells. We further investigated the conditions for epiblast stem cells to develop into limited somatic cell lineages.

To investigate mechanisms to specify particular developmental pathways, developmental processes that do not follow ordinary developmental pathways (e.g., lens transdifferentiation from neural retina) can provide essential clues. Investigations along this line are also ongoing.

The epicardium of the embryonic heart contributes to coronary vessels. We showed that vascular endothelial growth factor (VEGF)-A activates mobility of epicardium-derived cells and promotes formation of vascular structures.

4. 論文, 著書など

- Matsuda K, & Kondoh H. Dkk1-dependent inhibition of Wnt signaling activates Hesx1 expression through its 5' enhancer and directs forebrain precursor development. *Genes Cells*. 19, 374-385 (2014).
- Yoshida M, Uchikawa M, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Takemoto T & Kondoh H. Regulation of mesodermal precursor production by low-level expression of B1 Sox genes in the caudal lateral epiblast. *Mech Dev*. 132, 59-68 (2014).
- Kondoh, H. & Kuroiwa, A. (Eds). *New Principles in Developmental Processes* (Springer, Tokyo, 2014).
- Liedtke D, Erhard I, Abe K, Furutani-Seiki M, Kondoh H & Schartl M. Xmrk-induced melanoma progression is affected

by Sdf1 signals through Cxcr7. *Pigment Cell Melanoma Res*. 27, 221-233 (2014).

5. 学会発表など

近藤寿人

- T. Takemoto, H. Kondoh: The role of Tbx6 in the derivation of mesodermal tissue from the axial stem Cells. 47th Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists Nagoya, 2014.5.27-30.
- M. Uchikawa, R. Okamoto, H. Kondoh: Multiple enhancers of the Sox2 locus distributed within a 200 kb region in the chicken genome. 47th Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists Nagoya, 2014.5.27-30.
- H. Kondoh: Dynamics of gene regulatory network centered by Sox2 during embryogenesis. KSU International Symposium: Cutting-edge of Life Sciences. Kyoto, 2014.5.30-31.
- H. Kondoh: An ensemble of Sox-partner interactions determines genomic targets and specify cell states. 4th International SOX Research Conference. Cleveland, Ohio, USA 2014.9.8-12
- H. Kondoh: Regionally specific mechanisms of neural plate development. 18th International Conference of the International Society of Differentiation. London, UK, 2014.11.2-5.
- H. Kondoh, K. Matsuda, T. Mikami, M. Andrabi, S. Oki, K. Yamaguchi, S. Shigenobu: Dynamic changes in gene regulatory network during early stages of embryogenesis, as indicated by an efficient ChIP-seq analysis. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014.11.25-27.
- H.Iida, Y. Ishii, H. Kondoh: Mechanisms underlying transdifferentiation of chicken embryonic neural retina into lens. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014.11.25-27.
- 石井泰雄
- Y. Ishii, K. Fujimoto, W. Zi, S. Yasugi: Expression of Eph/ephrin family genes in the heart tube and proepicardium of the chick embryo. 47th Ann. Meeting for Jap. Soc. Develop. Biol., Nagoya, 2014.5.28-29.
- 石井泰雄、王梓、八杉貞雄: ニワトリ胚網膜原基の領域化における転写因子群の役割. 日仏生物学会第180回例会、東京、2014.6.7.
- 石井泰雄: 接触型組織間相互作用が心外膜・冠状血管前駆細胞の心臓への進入を制御する. 第13回日本心臓血管発生研究会、磐梯熱海、2014.10.17
- 石井泰雄: 心臓発生における冠動脈形成細胞の移動と分化. 日仏生物学会第181回例会、京都、2014.12.6 (招待講演)

飯田英明、ヨウテンテン、八杉貞雄、石井泰雄：ニワトリ胚眼における形態形成運動のタイミング制御、日仏生物学会第181回例会、京都、2014.12.6

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(A)

課題名：エピブラストから多様な体細胞系列を生み出す遺伝子制御ネットワークの解析

研究代表者：近藤寿人、取得年度：H26-28年(3年)

科学研究費補助金 新学術領域研究(研究領域提案型)

課題名：蛍光キネティクスによる、転写因子複合体の細胞分化・がん化に 관련된核内過程の研究

研究代表者：近藤寿人、取得年度：H25-26年(2年)

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年 (5年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

近藤寿人

International Society of Differentiation, Board of Directors

日本学術会議 連携会員

日本学術振興会 科学研究費委員会専門委員

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニワトリ・ウズラ」運営委員

ナショナルバイオリソースプロジェクト「メダカ」運営委員

石井泰雄

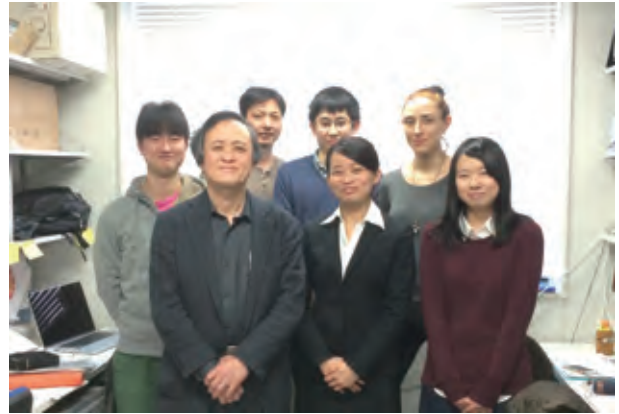
「高校生物教職員研修会 発生生物学リカレント講座」講師、神戸市、2014.10.3-5.

日仏生物学会幹事

4) 受賞等

石井泰雄 :分かり易かったで賞 日仏生物学会第 180 回例会、東京、2014.6.7.

5) その他 なし



発生情報学研究室

Laboratory of Cell Signaling and Development

1. 研究概要

哺乳類や鳥類において発がんに関わる遺伝子(がん遺伝子)のなかには、その相同遺伝子が比較的単純な体制をもつ多細胞生物種や単細胞生物種にも存在するものがある。このことは、がん遺伝子の構造と機能が、地球上における生命の長い進化の過程で古くから保存されてきたこと、そしてその生理機能は必ずしも「発がん」が中心ではなく、より基本的な、言い換えれば「正常な」生命活動に欠くことの出来ないものであることを強く示唆している。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、およびヒトの培養がん細胞の細胞機能(受精と発生開始、発がんと悪性機能の維持)におけるがん遺伝子 Src(サーク)、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) 膜ドメイン UPII-Src システムの形成と機能
- 2) 新規受精シグナル分子の探索
- 3) 卵細胞 ATP の可視化と機能

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

- 1) がん細胞の血清飢餓抵抗性の細胞増殖
- 2) Src 依存的チロシンリン酸化の生理的意義
- 3) 新規 Src 基質シグナル分子の探索

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、生命科学研究所生命システム学コース修士1年生1名(西川 裕貴)、生命システム学科4年生4名(岡 慎也、嘉門 未紗、菊地 志朗、轟 真伍)および同3年生4名(荒井 華菜香、小山 智裕、吉川 弥里、四ッ谷 想羅)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

卵細胞プロジェクトにおける主に過年度までの成果は、原著論文2報、総説2報、および英文書籍チャプター2報により公表した。今年度あらたに得た知見は、次のとおりである。

1) 成熟前後における卵母細胞内 ATP の解析:プロゲステロン依存的な卵成熟反応に伴う細胞内 ATP の定性的および定量的観察に成功した(図1)。従来おこなってい

教授 佐藤 賢一

Prof. Ken-ichi Sato, Ph.D.

助教 井尻 貴之

Assist. Prof. Takashi Ijiri, Ph.D.



た透明化処理卵母細胞の解析では、長時間の連続観察が困難であるという課題があった。表層顆粒色素を欠損したアルビノカエルの卵母細胞を用いた生細胞イメージング解析により、この課題が克服された。今回のデータ取得により、マウス卵母細胞の成熟反応と細胞内 ATP の関係についての先行研究との比較考察が可能になった。また、ATP 合成阻害剤により、卵成熟に伴う卵母細胞表層の形態変化や細胞内 MAP キナーゼの活性化反応が遅延を起こす等の新規の知見も得られた。

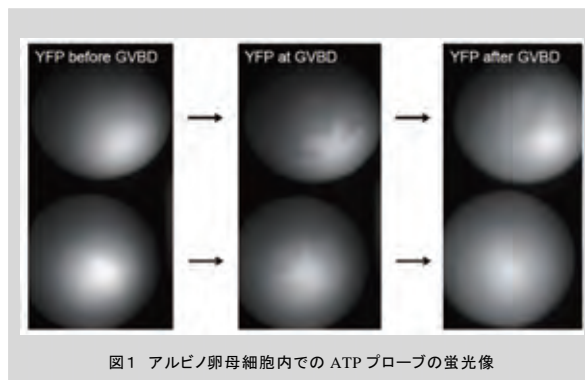


図1 アルビノ卵母細胞内での ATP プローブの蛍光像

2) 未受精卵の膜画分を抗原として作成したラットモノクローナル抗体の性状解析:昨年度までに解析対象として絞り込んだ3種類の抗体クローンそれぞれについて、当該精製 IgG の卵表層への結合、および人工受精への影響を検討した。その結果、卵表層結合性をもつ1クローンを含む、全ての抗体クローンに卵活性化あるいは受精阻害能がないことがわかった。また、3抗体クローンそれぞれの標的タンパク質を、未受精卵の膜ドメインおよび非膜ドメイン分画を材料とする免疫沈降実験により濃縮精製することに成功した。現在、同タンパク質の質量分析データを取得・解析中である。

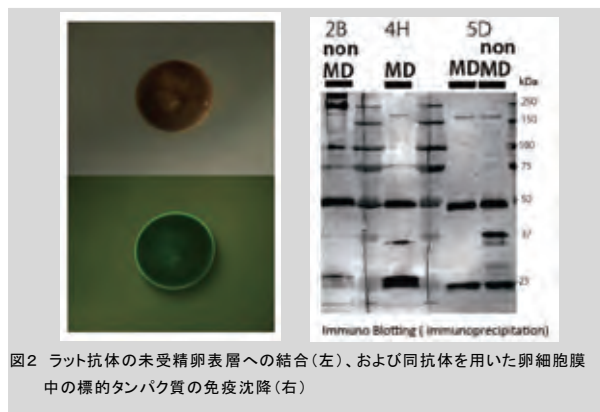
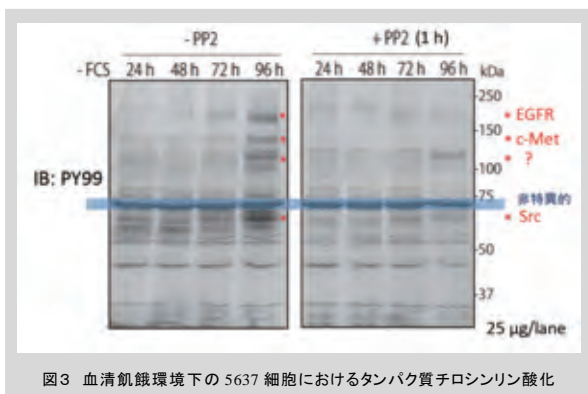


図2 ラット抗体の未受精卵表層への結合(左)、および同抗体を用いた卵細胞膜中の標的タンパク質の免疫沈降(右)

がん細胞プロジェクトでは、ヒト膀胱がん細胞株 5637 を用いた研究により、以下の知見を得た。

新規 Src 基質としての FAK の同定: 血清飢餓培養環境下で Src 依存的に、すなわち Src 阻害剤 PP2 感受性で、チロシンリン酸化されるタンパク質を探索したところ、SDS-PAGE 上で分子サイズ約 125 kDa のタンパク質を検出した(図3)。特異抗体を用いた免疫沈降実験により、このタンパク質が FAK (focal adhesion kinase) であること、また、リン酸化部位特異的抗体を用いた実験により、FAK のチロシン残基 576/577/925 が Src 依存的にリン酸化されていること、等が明らかとなった。さらに、FAK 特異抗体あるいはリン酸化チロシン特異抗体を用いた免疫沈降実験により、FAK 相互作用タンパク質および新規チロシンリン酸化基質と思われるいくつかのタンパク質の濃縮精製に成功した。現在、これらについても質量分析を行っている。



3. Research projects and annual reports

Research in our laboratory focuses on the molecular and cellular mechanism of oocyte maturation and fertilization in oocyte/egg of the African clawed frog *Xenopus laevis* (Egg Project), and anti-apoptotic proliferation and drug-resistance in human bladder carcinoma cells (Cancer Cell Project).

In the *Egg Project*, we have employed albino oocytes to analyze intracellular ATP concentration ($[ATP]_i$) in the course of progesterone (PG)-induced oocyte maturation. The live cell-imaging experiments demonstrated that $[ATP]_i$ increased until GVBD (germinal vesicle breakdown), then decreased a while and shifted to a moderate increase. These $[ATP]_i$ changes are similar to those reported in the mouse oocytes. Oligomycin A, an inhibitor of ATP synthase, was found to cause a delay in the timing of the PG-dependent $[ATP]_i$ increase and the appearance of white spot, a hallmark of oocyte maturation, on the animal surface of

oocytes. These results suggest a functional relationship between ATP metabolism and oocyte maturation.

In the *Cancer Cell Project*, we have been interested in addressing the Src-dependent mechanism of serum-independent survival, proliferation, and tyrosine phosphorylation in human bladder carcinoma cell line 5637. PP2, a Src inhibitor, induces cell death in serum-starved 5637 cells that is accompanied by an increase in the caspase activity. In this fiscal year, we succeeded in identifying and characterizing a novel Src substrate in serum-starved 5637 bladder carcinoma cells. Immunoblotting showed that serum starvation promoted an increase in PP2-sensitive tyrosine phosphorylation of not only known substrates such as EGFR, Src and c-Met, but also a unknown protein of 125 kDa, in 5637 cells. Further experiments demonstrated that the 125-kDa protein was focal adhesion kinase (FAK). We are in the process of determining the phosphorylation site(s) in FAK by phospho-specific antibodies and the roles played by FAK using knock down and/or pharmacological approaches.

4. 論文, 著書など

- Sato, K.: Transmembrane signal transduction in oocyte maturation and fertilization: focusing on *Xenopus laevis* as a model animal. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 114-134, 2014.
- Tokmakov, A.A., Stefanov, V.E., Iwasaki, T., Sato, K., Fukami Y.: Calcium signaling and meiotic exit at fertilization in *Xenopus* eggs. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 18659-18676, 2014.
- Iwao, Y., Shiga, K., Shiroshita, A., Yoshikawa, T., Sakiie, M., Ueno, T., Ueno, S., Ijiri, T.W., Sato, K.: The need of MMP-2 on the sperm surface for *Xenopus* fertilization: Its role in a fast electrical block to polyspermy. *Mechanism of Development* **134**, 80-95, 2014.
- Mahbub Hasan, A.K.M., Hashimoto, A., Maekawa, Y., Matsumoto, T., Kushima, S., Ijiri, T.W., Fukami, Y., Sato, K.: The egg membrane microdomain-associated uroplakin III-Src system becomes functional during oocyte maturation and is required for gamete bidirectional signaling at fertilization in *Xenopus laevis*. *Development* **141**, 1705-1714, 2014.
- 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* **2**, 65-75, 2014.

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* (Sawada et al. eds., Springer) 157-170, 2014.

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* (Sawada et al. eds., Springer) 181-186, 2014.

5. 学会発表など

西川 裕貴、佐藤 賢一: Tyrosine kinase signaling and anti-apoptotic growth in human bladder carcinoma cells. サイエンスセミナー、京都産業大学、2014.3.6.

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イメージング. 新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証機構の解明」第8回領域会議、名古屋市、2014.1.8-10.

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成熟過程における卵母細胞のATP産生. 第85回日本動物学会大会、仙台市、2014.9.10-13.

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 production in *Xenopus laevis* oocytes during maturation. 第52回日本生物物理学会年会、札幌市、2014.9.25-27.

西川 裕貴、佐藤 賢一: Src-dependent tyrosine phosphorylation contributes to anti-apoptotic cell proliferation in human bladder cancer cells. 第37回日本分子生物学会年会、横浜市、2014.11.25-27.

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: Inhibition of ATP synthesis affects white spot occurrence and the increase of ATP during progesterone induced maturation in *Xenopus laevis* oocyte. 第37回日本分子生物学会年会、横浜市、2014.11.25-27.

井尻 貴之: アフリカツメガエル卵成熟過程における卵母細胞のATP産生. 第8回日本ツメガエル研究集会、相模原市、2014.11.28.

6. その他特記事項(学内外での諸活動)

合同研究交流会 2014.2.5. 摂南大学理工学部生命科学科西村仁教授研究室との合同。

大学コンソーシアム京都第19回FDフォーラム 2014.2.23. 分科会登壇者: 授業アンケートがわたしたちを変える、わたしたちが授業アンケートを変える。佐藤 賢一

卒業研究発表会 2014.3.1. 京都産業大学総合生命科学部6研究室での合同。

大学コンソーシアム京都第20回FDフォーラム企画検討委員 2014.4.1~12.31. 佐藤 賢一

京都産業大学総合生命科学部国際シンポジウム 2014.5.30-31. “Cutting-edge of Life Sciences (生命科学の最前線)” 事務担当(共同): 佐藤 賢一

卒業研究中間発表会 2014.8.1. 京都産業大学総合生命科学部8研究室での合同。

IDE 大学セミナー(北海道支部) 2014.8.28. 講演: 京都産業

大学の組織的かつ対話する“楽しそう”なFD活動。佐藤 賢一

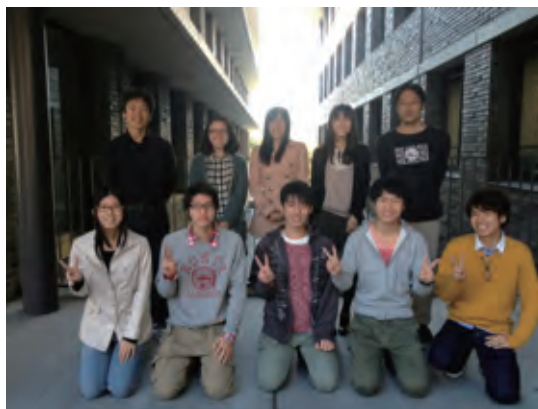
合同研究交流会 2014.9.1. 摂南大学理工学部生命科学科西村仁教授研究室、生理学研究所毛利達磨博士との合同。



15号館テラスにて(2014年7月撮影)



名古屋大菅島臨海実験所での合同研究会(2014年9月撮影)



15号館と14号館の間にて(2014年10月撮影)

ナノバイオロジー研究室

Laboratory of Nanobiology

1. 研究概要

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。本学部内の共同研究の成果である。また、DNA クローニングの手法に工夫を加えると共に、すでに報告されている方法を収集して、最も効率的な方法で互いに短所を補う手法を3つ選び、まとめて発表した。その結果、実験に要する時間を一桁縮めることに成功し、相当の反響を得ている。

2. 本年度の研究成果

1) 最も効率が高くローコストのクローニング技術
クローニングとプラスミド作成の方法は、ここ40年来、制限酵素による切断とリガーゼによる連結からほとんど進歩が無かった。非常に数多い改良法が発明されたが、効果が低かったり、手間が多すぎたり、高価で有ったり、必要な DNA 量が大きかったりして、従来法を変えるまでには至らなかった。ところが 2010 年以後、非常に大きな進歩があり、シームレスクローニングと呼ばれる、制限酵素を全く用いない方法が広がり、非常に安価で高効率を持つ方法も発明された。高価な酵素を多量に使う方法も、実際にはそれほど酵素を必要としないことが、我々や本学部の他研究室の協力で判明した。そこで、いくつかの方法をさらに発展させ、改良を行った。現在最も優れたプラスミド作製法は、1) fusion PCR, 2) Gibson Assembly 3) SLiCe であり、長短補い合う関係にある。1)は最も簡単であるが、予定通り行かないことがある。2)は、繰り返し配列があるときでも有効で、最も一般的で、高効率の方法である。3)は、他法で PCR が困難な場合に有効な高効率法である。

2) 大腸菌の生存戦略のナノバイオロジー:100S リボソームの新しい役割

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、まず tmRNA 等9つの protease/

教授 嶋本 伸雄

Prof. Nobuo Shimamoto

助教 中山 秀喜

Assist. Prof. Hideki Nakayama.



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。従って、タンパク質分解によってアミノ酸が補われる protein turnover が役割をもつ可能性が示された(文献)。

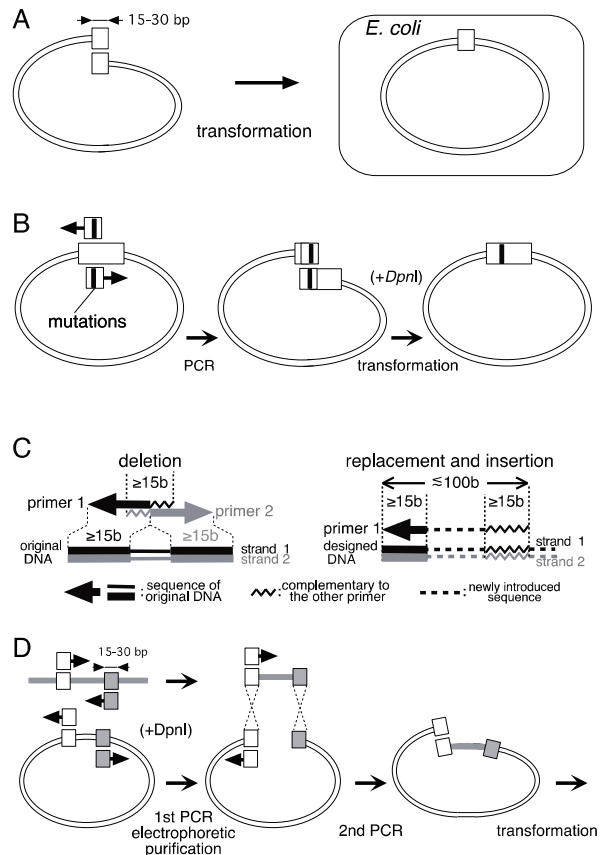


図1. リガーゼを用いない fusion PCR. A. 同一塩基配列をもつ線状 DNA を形質転換するだけで良い. B. Fusion PCR を利用した変異の導入. DpnI は大腸菌内で作られたベクターを切断してバックグラウンドを下げる. C. 様々な場合のプライマーの設計法 D. 長い DNA の挿入法.

リボソームはアミノ酸のソースとして細胞内で最大であり、定常期で RMF により 70S リボソームが 2 量体 90S を形成し、HPF が安定な 100S を形成する現象が知られている。しかし、この 100S は、protein turnover に関係するのかわ、関係するならばいつリボソームは分解するのか、リボソーム分解を促進するのか阻害するのか、リボソーム分解は inclusion body を経由するのかどうか、が不明であった。

そこで昨年発明した抗退色 GFP B maggio を染色体の *rpsJ* に protein fusion した株を上記新クローニング法で作成し、各ステージでの存在形態を、アガロースゲル電気泳動、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS による inclusion body からの抽出、しょ糖密度勾配超遠心で分析し、生死の index である Colony Forming Unit と比較した。その結果、リボソームタンパク質は、リボソームとして原形質に存在するか、中間状態にとどまらずに速やかに分解されるかのどちらかで、inclusion body での蓄積は少なかった。また、100S 形成を阻害する RpsB-GFP 株、RpsJ-GFP Δ *rmf* 株、psJ-GFP Δ *hpf* 株では、リボソームはアガロース電気泳動では不均一な移動度を示し、分解がその前段階を示した。また、CFU の減少も早期に起こった。つまり、100S 形成はリボソームを保護し、100S の形成は生存を促進する。一方、100S の分解が阻害されている RpsJ-GFP Δ *yfiA* 株でも、同様な CFU の早期減少が観測されたので、100S 自体が生存を促進するのではなく、100S 形成と分解の適切なタイミングが生存を促進する。また 100S 形成の時間経過は、ppGpp による stringent control により形成され始めるが、最大は stringent control よりずっと遅い定常期後期の 18 時間であり、定常期が終了する 24 時間までには、完全に終了している。

これらの結果は、100S は定常期前半に起こるタンパク質の分解からリボソームを保護し、定常期後半に解離・分解して供給源としてアミノ酸のホメオスタシスを実現し、減衰期に備えるという機構を示している。

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) Development of Modern and simple construction of plasmid

In any field of biology, cloning a gene as well as its controlling sites has been one of the time-consuming and intelligence-demanding tasks. Now, it recently became more than 10 times quicker without increased cost, no need for broad and deep knowledge, and even becomes easier in some sense than washing lab instruments, which requires a certain amount of care. Therefore, cloning is no longer the rate-limiting step of a project, and this revolution is now changing the schedules and strategies adopted not only in a bacteriology lab, but also in most experimental biology labs. In this review, at first, we briefly summarize the historical background of the recent major advances in the recombination technique. We then concentrate this

review on introducing three new or revived techniques for the routine construction of plasmids of ordinary lengths, rather than the high technologies used in synthetic biology and systems biology, which deal with DNAs of genome sizes. The three methods are PCR cloning, Gibson assembly, and SLiCE. We have provided our lab protocol in the publication (1).

2) Role of 100S ribosome in terms of protein turnover
The degradation of proteins is essential for maintaining the protein homeostasis, and the generated amino acids are used to synthesize new proteins. This recycling, protein turnover, is found in the bacteria growth as a dynamic equilibrium. When bacteria have consumed amino acids in a culture, only protein turnover can support translation of new proteins. Therefore, in the decay period following the steady state, where CFU decreases, protein turnover becomes critical for viability.

As an amino-acid source, ribosome has the largest size among proteins or proteinous particles, and occupies up to 28% of dry mass of *E. coli*. During the steady state phase, the level of ribosome is maintained approximately constant, although rRNA is kept cleaved and synthesized as quality control. The translating 70S ribosome is stable against degradation, and free 30S and 50S subunits are the best substrates for degradation triggered by carbon starvation. Consistently, starvation of various nutrients and Mg²⁺ ion are known to induce ribosome degradation. In the degradation induced by phosphate depletion, the acid-insoluble fractions of the incorporated [³H]uridine, RNA, decreased to two third during the decay period. However, the correlation with the protein turnover was not yet clear.

A universal form of inactivation of proteins is inclusion body, which is a loose aggregate of proteins with secondary structure retained and tertiary structure disturbed. Inclusion body exists even in healthy *E. coli* cells, and many ribosomal proteins in aberrant form are included, suggesting that inclusion body is a temporary trash organelle.

Bacterial ribosome has a specific inactive form, 100S ribosome, which is essentially dimeric 70S ribosome. In *E. coli*, transcription of *rmf* is activated by ppGpp, and RMF dimerizes 70S to initiate the following two-step reaction.



Two more factors with 40% sequence homology with each other, HPF and YfiA, enhance or impair 100S formation, respectively.

To study protein turnover, we constructed S10-GFP fusion by inserting a *gfp* at downstream of the essential chromosomal *rpsJ* gene to follow its fate. By developing a new GFP, we solved several problems in using GFP fluorescence quantitatively. We also constructed another GFP gene fusion with the essential *rpsB* as negative control strain for 100S formation. Due to the bulky GFP moiety, the S2-GFP cannot form the intact S2-S2 contact surface required for 100S.

The comparison among the amounts of cytoplasmic and insoluble S10-GFP, the level of 100S, and CFU in steady state and decay period showed that most S10-GFP stays in cytoplasm and its amount is temporally proportional to CFU. The level of 100S rises and drops before the decay of CFU. The results support a model that a cell survives in the decay period with a just enough amount of ribosome translating proteins essential to survive by using the amino acids supplied by the degradation of extra ribosome. The deletions of *rmf*, *hpf*, and *yfiA* as well as S2-GFP strain did not disturb the agreement, but die much earlier than the parental S10-GFP strain. Therefore, the 100S is likely to protect ribosome temporary from degradation to supply amino acids for translation of survival factors just before the decay period.

4. 論文, 著書など

Nakayama, H., and Shimamoto, N. (2014). Modern and simple construction of plasmid: Saving time and cost. *J. Microbiol.* 52, 891-897.

嶋本伸雄, RNAポリメラーゼの動きを理解する トピック1分子生物学, 原田慶恵, 石渡信一(編)化学同人

5. 学会発表など

Shimamoto N., Nakayama, H., Strategy of Survival of *E. coli* and Translational System

Shimamoto N., Nakayama, H., Genetics of Bacterial Death: Survival Chaperons Asian Conference on Transcription. 2014.02. Melbourne, Australia

Nakayama, H., and Shimamoto, N. Measuring Formation of 100S Ribosome in vivo., ACT2014 The 13th Asian Conference on Transcription. 13th Asian Conference on Transcription. 2014.02. Melbourne, Australia

Shchervakova K., Nakayama, H., and Shimamoto, N. "E.coli 100S ribosome and its role in viability." 13th Asian Conference on Transcription. 2014.02. Melbourne, Australia

中山 秀喜, 吉田 秀司, 嶋本 伸雄 “100S ribosome 形成因子 RMF の翻訳後分解による発現調節”(21世紀大腸菌研究会、2014年6月)

中山秀喜, 嶋本伸雄 “大腸菌のサイクリン”(細菌学会若手コロッセウム 2014年 8月)

中山 秀喜, 吉田 秀司, 嶋本 伸雄 “100S ribosome形成因子 RMFの翻訳後分解による発現調節”(分子生物学会 2014年12月)

6. その他特記事項

1) 外部資金

共同研究堀場製作所(株): 新規蛍光タンパク質の開発 戦略的研究基盤形成支援事業:「タンパク質の生成と管理」

2) 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

Shchervakova K. (京都中ロータリークラブ活動)

卓話「ソチオリンピックの両面」、京都、2014年03月

卓話「ロシアのスマイル」、京都、2014年10月

第2650地区米山学友会の第五回年末交流会、フルート演奏、京都、2014年11月

年度総会、台北、台湾、2014年12月



図2 特研究生と(左茶室前、右 15 号館前)左から大塚祐、嶋本、立木康貴、柴崎竜馬、立木康貴。様々な表情が、「内定をもらって分かる うつろな大学」「就職は 地獄か極楽 たぶん前」「と言わぬが花で頑張ろう」と物語る。

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。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、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

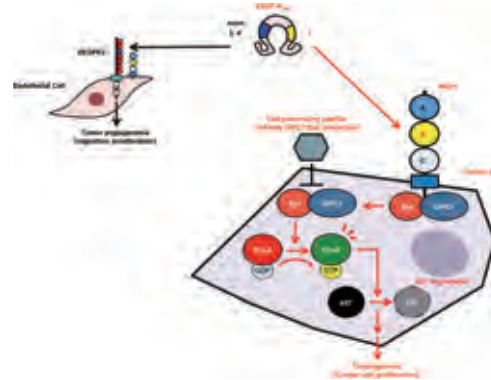
1) VEGF-A/ニューロピリン-1(NRP1)のシグナル伝達経路とがん細胞の悪性化機構

我々は、血管内皮増殖因子(VEGF-A)が血管内皮細胞だけではなく、がん細胞の増殖と浸潤・転移を直接促進すること、その促進効果はがん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。ヒト皮膚由来扁平上皮がん、前立腺がん、神経膠芽腫などのがん細胞は VEGF-A を発現し、VEGF-A は NRP1 を介してがん細胞の足場非依存状態における増殖と浸潤を促進した。NRP1 の shRNA を導入し NRP1 の発現を抑制したがん細胞では、増殖と転移が抑制されたが、同じ細胞に正常型 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増殖と転移は回復しなかったことから、NRP1 の細胞内領域はがん細胞の増殖と浸潤・転移シグナルの伝達に必須であることが分かった。NRP1 の細胞内領域は足場タンパク質 GIPC1、Syx (RhoGEF) と結合し、GIPC1/Syx 複合体形成を誘導した。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 RhoA を活性化し、活性化型 RhoA は細胞周期を制御する CDK 阻害因子 p27 のタンパク質の分解を促進し、細胞周期の進行を促進した。GIPC1/Syx 複合体の形成を阻害する膜透過型のペプチドを作製し、がん細胞を処理すると RhoA の活性化が抑制され、その結果増殖と浸潤が抑制された。以上の結果から、NRP1 のシグナルの下流で働く分子を標的とした新規抗がん剤は有効であると考えられる。

図 1 VEGF-A/NRP1 シグナルは、がん細胞の増殖・浸潤と転移を促進する。

教授 瀬尾 美鈴

Prof. Misuzu Seo, Ph. D.



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

日本における食道がんの患者の5年生存率は30%である。本研究において、食道がん(扁平上皮がん)の悪性化に線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)の発現異常が寄与している可能性を検証した。食道がん組織からの抽出 RNA を用いた RT-PCR によって、がん部位における FGFR3 の発現が正常食道部位に比べ上昇していた。中でも splice variant である FGFR3IIIc 発現でがん部位(16人中12人)は正常食道部位(16人中6人)の2倍であり、FGFR3IIIc の発現量は、正常食道部位と比較して約5倍高かった。一方、FGFR3IIIb 発現および発現量の増加は認められなかった。食道がん患者由来組織切片の免疫染色において、SCC-112(扁平上皮がん細胞マーカー)陽性細胞に FGFR3IIIc の発現が認められ、細胞増殖のマーカーである Ki67 陽性とも一致した。よって、FGFR3IIIc の発現が、食道がん組織に浸潤した免疫細胞および間充織系細胞ではなく、実際にはがん細胞で FGFR3IIIc の発現が上昇していることが示された。

In vitro において、FGFR3IIIc を過剰発現した EC-GI-10 細胞(FGFR3IIIc-EC-GI)の細胞増殖能は、対照の EC-GI-10 細胞と比較して約2倍高く促進した。FGFR3IIIc のリガンドである FGF2 は食道がんおよび EC-GI-10 細胞において発現していることから、FGFR3IIIc-EC-GI の細胞増殖能の促進作用は、オートクリン作用である可能性がある。したがって、食道上皮細胞のがん化過程が FGFR3 の選択的スプライシングを FGFR3IIIc へと誘導する機構を引き起こすことにより、発現上昇した FGFR3IIIc は食道がんから分泌される FGF2 によって活性化され、食道がんの細胞増殖を亢進させ、食道がんの進行に寄与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に起因する先天性疾患であると考えられているが、その分子基盤については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産物 Anosmin-1 が嗅索形成を制御するガイダンス分子 Netrin-1 の受容体 Neogenin および DCC と高い相同性があることを見出した。免疫沈降法、BIACORE を用いた解析から、Anosmin-1 と Netrin-1 (NTN-1) が直接的に結合し、解離定数が 5.13nM であることを明らかにした。また、カルマン症候群患者で見られる変異型 Anosmin-1 (S396L, E514K) の NTN-1 との結合を検討した結果、野生型と比較し会合係数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) が上昇することが明らかになった (野生型: 7.9×10^4 , S396L: 13.5×10^4 , E514K: 11.0×10^4)。Anosmin-1 が NTN-1 の生物学的活性への影響を与えるかを、神経系細胞株 PC12R1L を分化誘導し検討した。成長円錐崩壊作用への影響を Collapse アッセイ、軸索ガイダンス作用への影響を outgrowth assay を行って評価した。その結果、NTN-1 単独では成長円錐の崩壊および軸索伸長の阻害が見られたのに対し、Anosmin-1 と NTN-1 の同時添加群では成長円錐の崩壊と軸索伸長の阻害が見られなかった。本研究から、Anosmin-1 は NTN-1 による反発性シグナルを阻害することにより、嗅球形成および嗅索伸長に関与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。

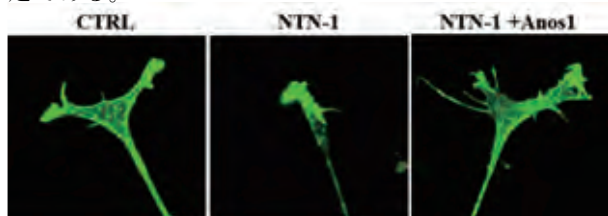


図1 ラット副腎髄質由来褐色細胞種 PC12 細胞は分化誘導することにより成長円錐を形成する。NTN-1 を添加すると成長円錐の崩壊が観察された。NTN-1 と Anosmin-1 を同時に添加すると NTN-1 単独で観察された成長円錐の崩壊が観察されなかった。これらの結果、Anosmin-1 は NTN-1 の反発性シグナルを阻害していることが示唆された。

3. Research projects and annual reports

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

Neuropilin-1 (NRP1) has been identified as a VEGF-A receptor. DJM-1, a human skin cancer cell line, expresses endogenous VEGF-A and NRP1. RNA

interferences of VEGF-A or NRP1 suppressed DJM-1 cell proliferation. Overexpression of NRP1 wild type restored shNRP1-treated DJM-1 cell proliferation, but NRP1 cytoplasmic deletion mutants failed to restore proliferation. Co-immunoprecipitation analysis showed that VEGF-A induced interactions between the NRP1 and GIPC1, a scaffold protein, and complex formation between GIPC1 and Syx, a RhoGEF. Knockdown of GIPC1 or Syx reduced active RhoA and DJM-1 cell proliferation without affecting either MAPK or Akt pathway. C3 exoenzyme or Y27632 inhibited VEGF-A-induced proliferation of DJM-1 cells. Conversely, overexpression of the constitutively active form of RhoA restored proliferation in siVEGF-A-treated DJM-1 cells. Furthermore, inhibition of the VEGF-A/NRP1 signaling upregulated p27, CDK inhibitor. A cell-penetrating oligopeptide that targets to GIPC1/Syx complex formation and inhibited the VEGF-A-induced RhoA activation and suppressed DJM-1 cell proliferation. In conclusion, this new signaling pathway of VEGF-A/NRP1 induces cancer cell proliferation by forming a GIPC1/Syx complex that activates RhoA to degrade the p27 protein.

2: Enhanced Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 IIIc Promotes Human Esophageal Cancer Malignant Progression.

Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) is a tyrosine kinase receptor that harbors oncogenic activity in several types of cancers. Two alternatively spliced isoforms of FGFR3 exist, FGFR3IIIb and FGFR3IIIc. We investigated the gene expression of FGFR3IIIb and FGFR3IIIc in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patients by RT-PCR, and found that the incidence of FGFR3IIIc was higher in ESCC (12/16, 75%) than in normal esophageal epithelia (6/16, 38%). Moreover, a semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that FGFR3IIIc expression levels were higher in ESCC than in the normal esophagus. On the other hand, no significant difference was observed in the incidences or levels of FGFR3IIIb between ESCC and the normal esophagus. An immunohistochemical analysis of early stage-ESCC showed that carcinoma cells with the squamous cell carcinoma marker SCC-112 expressed FGFR3IIIc, and ESCC expressing FGFR3IIIc were stained with Ki67, a cell proliferation marker. The function of FGFR3IIIc was evaluated by treating the

representative esophageal carcinoma cell line EC-GI-10 with FGF2, a specific ligand for FGFR3IIIc, and/or siRNA for FGFR3. The knockdown of endogenous FGFR3 by the siRNA treatment significantly abrogated cell proliferation. The overexpression of FGFR3IIIc in cells enhanced cell proliferation due to the endogenous expression of FGF2, whereas that of FGFR3IIIb did not.

In conclusion, the strong expression of FGFR3IIIc may promote malignant progression in ESCC. FGFR3IIIc may have the potential to be an early stage-tumor marker and molecular target for ESCC therapy.

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

Kallmann's syndrome (KS) is known as a congenital disease associated with hypogonadotropin hypogonadism, impaired sense of smell, loss of secondary sexual characteristics. Patient of KS is impaired in axon outgrowth of olfactory neuron, formation of olfactory bulb, migration of gonadotrophin rereleasing hormone (GnRH) neuron. Eight causal genes including KAL1, encoding Anosmin-1(Anos1), have been isolated. Anos1 is known as an extracellular secretion protein. The function of Anos1 is thought to attract guidance cue, but its molecular mechanism has not been elucidated yet. By comparison of Anos1 protein homology to the database of NCBI protein blast, Anos1 have high homology to DCC and Neogenin, receptors of Netrin-1 (NTN1). NTN1 signaling has a key role to regulate olfactory development and migration of GnRH neuron. Here we show that Anos1 directly binds to NTN1 to modulate the NTN1 signaling.

Co-immunoprecipitation analysis between recombinant Anos1 and NTN1 showed that Anos1 directly bound to NTN1. The affinity was analyzed by Biacore T-100. Soluble Anos1 bound to immobilized NTN-1 with the affinity, KD 3.6 nM. NTN1 induced growth cone collapse in PC12 cells. Anos1 inhibited NTN1-induced growth cone collapse. Next, to investigate the signal transduction of growth cone collapse, we examined dephosphorylation of cofilin that regulates actin polymerization. NTN1 induced cofilin dephosphorylation. Anos1 inhibited NTN1-induced cofilin dephosphorylation. NTN1 binds to its receptor UNC5B to induce repulsive signaling in growth cone. Anos1 inhibited NTN1 binding to UNC5B. These results

suggest that Anos1 act as an attractive guidance cue by inhibiting NTN1-induced repulsive signaling.

4. 論文, 著書など

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)

Someya A, Fukushima R, Yoshida M, Tanahashi Y, Prapeuk T, Iizuka R, Hirami H, Matsuda A, Takahashi S, Kurita G, Kimura T, Seo M, Funaba M, Nishino Y. A study on Borna disease virus infection in domestic cats in Japan. *J Vet Med Sci.* **76**(8):1157-60 (2014)

5. 学会発表など

吉田亜佑美*, 清水昭男, 門之園哲哉, 近藤科江, Michael Klagsbrun, 瀬尾美鈴: VEGF-A/NRP1 はその受容体 NRP1 の細胞内領域と GIPC1、Syx との複合体形成を促進し RhoA の活性化を介してがん細胞の増殖と浸潤を誘導する。第 61 回日本生化学会近畿支部例会、京都、2014.5.17(口頭発表、ポスター発表)*発表優秀賞受賞

Waraphan Toniti, Akio Shimizu, Misuzu Seo: The roles of estrogen on canine mammary gland tumors: Clinical diagnosis and treatment. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会、京都、2014.5.17(口頭発表、ポスター発表)

近藤真菜美, 清水昭男, 浅野弘嗣, 瀬尾美鈴: Anosmin-1 が血管内皮細胞におよぼす生理作用とその受容体の解明。第 61 回日本生化学会近畿支部例会、京都、2014.5.17(口頭発表、ポスター発表)

吉田亜佑美, 清水昭男, 門之園哲哉, 近藤科江, Michael Klagsbrun, 瀬尾美鈴: 膜透過性ペプチドは、VEGF-A/NRP1 シグナルをNRP1の下流シグナル分子との結合を阻害することで抑制する。第18回日本がん分子標的治療学会学術集会、仙台市、2014.6.25-27(口頭発表)

佐藤(上野)信洋, 清水昭男, 曾和穂菜美, 金井陸行, 中山淳, 板野直樹, 瀬尾美鈴: 食道がんにおける FGFR3IIIc アイソフォームのがん悪性化促進メカニズムの解析。第 87 回日本生化学会、京都、2014.10.16(口頭発表、ポスター発表)

浅野弘嗣, 竹内祥人, 清水昭男, 佐藤直子, 瀬尾美鈴: カルマン症候群原因因子 Anosmin-1 は Netrin-1 による成長円錐崩壊を直接的に阻害する。第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014.11.26(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: H19-26年(8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~)

日本生化学会近畿支部奨励賞審査委員

(2014.9.1~)

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58回京都府発明等功労者の審査を行った。2014年3月

2) 瀬尾美鈴: 第61回日本生化学会近畿支部例会開催
例会長、京都産業大学神山ホール、図書館ホール他、
2014.5.17

3) 瀬尾美鈴: 京都産業大学附属高校接続授業「がんの治
療と創薬」を実施した。2014.10.10

4) 瀬尾美鈴: 平成26年度ダイバーシティ推進室 副室長



研究室写真: 岐阜県恵那峡への教室旅行にて、卒業記念アル
バム用に撮影(2014年9月6日)

タンパク質バイオジェネシス研究室

Laboratory of Protein Biogenesis

1. 研究概要

タンパク質は、合成が完了し、しかるべき立体構造を形成した後機能する。翻訳途上の新生ポリペプチド鎖は未成熟な合成中間体であり、当然機能を持たないものと考えられてきた。ところが、特定の条件下で自身の翻訳伸長を一時停止(アレスト)させ、それを利用して、翻訳の途上で多様な生理機能を発揮する、いわば「働く翻訳途上鎖」とも言うべき一連の因子が、最近になって、細菌からヒト、植物に至るまで、様々な生物種で見出されつつある。我々は、働く翻訳途上鎖の一つである枯草菌 MifM を発見し、以来、翻訳途上の新生鎖が主役を演じる生命現象を追求してきた。MifM は、翻訳途上鎖の状態でもタンパク質膜組込装置 YidC の活性をリアルタイムでモニタリングしており、何らかの理由で YidC 依存的なタンパク質膜組込活性が不足すると、それを補うべく、枯草菌 YidC パラログ (SpoIIIJ と YidC2) のひとつ、YidC2 の合成を促進する。膜タンパク質のバイオジェネシスは細胞の生育に必須であるため、この MifM の働きは、細胞の基本性能を維持するという重要な意味合いを持つ。当研究室では、MifM や、過去に大腸菌で見出された SecM などの「働く翻訳途上鎖」の生理機能と分子機構の研究を進めつつ、タンパク質のバイオジェネシスや局在化に関する研究、翻訳伸長のダイナミズムとその細胞機能との関わりなどについても研究を進展させようとしている。これらの研究を通じて、「翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象」を理解することを目指し、「翻訳途上鎖の分子生物学」という新たな学術分野の創成と発展に貢献したいと考えている。教育面においては、分属学生も当該研究に関連した個別の研究テーマに沿って研究活動に参加し、研究活動を通じて、各自が、実験技術・論理的思考力・計画推進力・コミュニケーション力・英語力などを主体的に伸ばすことが期待されている。

当研究室は、2014 年 4 月に千葉が准教授に着任するとともに発足した。一方、本学における「働く翻訳途上鎖」研究は、2014 年 3 月まで当学科で研究室を主宰してきた伊藤維昭・元教授(現・京産大シニアリサーチフェロー)と、当時はプロジェクト助教であった千葉が共同で推進してきた。千葉研究室発足後も、伊藤氏との協力関係の下、研究を遂行している。その研究上の連続性・関連性を考慮し、本年報では、2014 年初頭の伊藤研での研究活動、および、伊藤維昭シニアリサーチフェローの活動のうち、

准教授 千葉 志信

Associate Prof. Shinobu Chiba, ph.D.

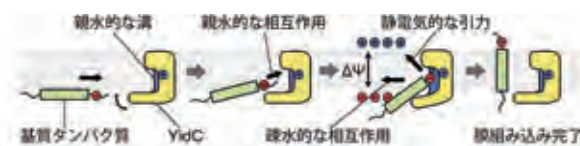


千葉研究室における研究活動に関連したものも併せて報告する。

2. 本年度の研究成果

(1) タンパク質膜組込装置 YidC の反応機構の解明

新生膜タンパク質が膜に組み込まれる過程で、基質となる膜タンパク質の親水的な細胞外領域が疎水的な細胞膜を透過し、反対側へと移行するためには、そのエネルギー的な障壁を乗り越えるための何らかの機構が必要である。タンパク質膜透過装置 Sec 複合体は、膜に新生ポリペプチド鎖の通り道であるチャンネル(孔)を形成することで、この問題を克服している。Sec 複合体とは別のタイプの膜組込装置である YidC もやはり、二量体を形成してチャンネル構造をとると提唱されていたが、共同研究先の東大・濡木理教授、奈良先端大・塚崎智也准教授らによって解かれた YidC の X 線結晶構造は、予想に反して、以前提唱されていた YidC の二量体チャンネルモデルとは相容れないものであった。すなわち、YidC は、膜貫通領域で、膜内に「溝」のような構造を作り、その溝は、細胞質側に大きく口を開けているものの、細胞外側に対しては閉じていた。これでは、仮に二量体を形成したとしても、膜を貫通するチャンネルを形成するのは難しいことが予想された。さらに、その溝の内側には親水性アミノ酸残基が多くあり、塩基性に偏っていた。一方、我々は以前、YidC の活性をモニタリングする因子として MifM を発見し、それを利用し、枯草菌細胞で、YidC によるタンパク質膜組込活性を簡便にアッセイするレポーター系を構築していた。そこで、この系を利用し、枯草菌 YidC ホモログ (SpoIIIJ)、および、基質膜タンパク質である MifM をターゲットとした変異解析を行った。その結果、YidC の親水的な溝の内部にある塩基性アミノ酸残基アルギニンと、基質の細胞外領域および膜内領域にある酸性残基の重要性を見出し、他の生化学的解析とも併せて、それらの間で生じるであろう静電的相互作用が、タンパク質の膜挿入の駆動力になっていることを提唱するに至った。



構造・生化学・遺伝学的解析を組み合わせたこの一連の共同研究は、YidC が、「チャンネルに依存しない新規の

反応機構」を利用してタンパク質の膜組込を行っていることを示すこととなった。

(2) SecM の翻訳アレスト解除に重要な新規エレメントの同定

以前、伊藤らが見出した、大腸菌においてタンパク質の分泌活性をモニタリングする「働く翻訳途上鎖」である SecM は、C 末端付近の「アレストモチーフ」を介してリボソームと相互作用することで、翻訳アレストを起こす。その翻訳アレストは、SecM の N 末端にある分泌シグナルが、Sec 膜透過装置によって認識され、SecM が膜透過されると、おそらくはその時に生じる「引っ張り力」によって解除される事が示唆されていた。ところが、今回、アレストモチーフと分泌シグナルに挟まれた中央領域内に、翻訳アレスト解除に必要なと思われる第3のエレメントが存在することが、SecM の変異解析から明らかとなった。本研究では、伊藤研大学院生・中森健太氏が中心となって実験を遂行した。

3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM as a regulatory nascent chain that monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying on a class of proteins called 'regulatory nascent chains', which function while they are still in the process of biosynthesis. A remarkable property of this class of nascent chains is that they interact cotranslationally with components of the polypeptide exit tunnel of the ribosome and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation can be stabilized or canceled in response to changes in the cellular physiology, allowing each nascent chain to serve as a unique biological sensor to feedback-regulate gene expression. For instance, translation arrest of nascent MifM chain is released when it is inserted into the membrane in a YidC-dependent manner. Because elongation arrest of MifM ultimately leads to the elevation of the synthesis level of YidC2, one of the two *B. subtilis* YidC paralogs (SpoIIIJ and YidC2), the regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the capacity of membrane protein biogenesis under ever-changing intra- and extracellular environments. Our interests are also focused more generally on the mechanisms of protein localization and biogenesis, the biological processes where nascent

substrates undergoes dynamic interactions with the machineries of translation, targeting and translocation. Through our research activities outlined above, we would like to develop a new research area that might be called "nascent chain biology", which aims at understanding the still hidden principle of the central dogma of gene expression, where nascent chain might play key roles.

This year's accomplishments

1) YidC as a channel-independent membrane protein insertase.

YidC has an "insertase" activity that mediates membrane protein insertion. Previous studies had suggested that YidC forms a dimeric channel-like structure. However, crystal structures of YidC solved by collaboration with Nureki (University of Tokyo) and Tsukazaki (Nara institute of Science and Technology) laboratories have revealed that YidC forms a hydrophilic cavity that opens toward the cytoplasmic but not extracytoplasmic side of the membrane, arguing against the channel model. Using our MifM-based *lacZ* reporter assay system that can measure YidC-mediated membrane protein insertion activity, we carried out mutational analyses of SpoIIIJ (a *B. subtilis* YidC homolog) and MifM (a substrate of YidC) and found that the positive charge of an arginine on the concave surface of the YidC cavity facilitates membrane insertion of MifM by electrostatically attracting the negatively charged moieties of substrates. Our results, together with those of the structural and other biochemical analyses, suggest that YidC is a channel-independent insertase and its electrostatic interaction with a substrate plays a crucial role to drive the membrane insertion reaction.

2) Identification of the arrest release-promoting element of SecM

E. coli SecM is a regulatory nascent chain that monitors protein secretion pathway and modulates expression level of secretion motor ATPase, SecA. The C-terminally located arrest element of SecM interacts with the ribosomal components in the exit tunnel to halt its own translation elongation. The elongation arrest is released upon the engagement of its N-terminal region, carrying the export signal sequence, in the Sec secretion

reaction. Through a series of systematic mutational analysis, we now identified a sequence of 10 amino acids that resides just outside of the exit of the ribosome tunnel as an element that participates in the secretion-dependent release of the arrest.

4. 論文, 著書など

原著論文

- D. Sohmen, S. Chiba, N. Shimokawa-Chiba, A. Innis, O. Berninghausen, R. Beckmann, K. Ito, D. Wilson: Structure of the *Bacillus subtilis* 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling. *Nat. Commun.* (2015) *in press*
- N. Shimokawa-Chiba, K. Kumazaki, T. Tsukazaki, O. Nureki, K. Ito, S. Chiba: A hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2015) *in press*

*S. Chiba, K. Ito: MifM monitors total YidC activities of *Bacillus subtilis* including that of YidC2, the target of regulation. *J. Bacteriol.* (2015) *in press*
(*corresponding author)

K. Nakamori, S. Chiba, K. Ito: Identification of a SecM segment required for export-coupled release from elongation arrest. *FEBS Lett.* (2014) **588**, 3098-3103.

*K. Kumazaki, *S. Chiba, M. Takemoto, A. Furukawa, K.I. Nishiyama, Y. Sugano, T. Mori, N. Dohmae, K. Hirata, Y. Nakada-Nakura, A.D. Maturana, Y. Tanaka, H. Mori, Y. Sugita, F. Arisaka, K. Ito, R. Ishitani, T. Tsukazaki, O. Nureki: Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* (2014) **509**, 516-520.
(*同等貢献)

書籍

K. Ito (Editor) "Regulatory Nascent Polypeptides" Springer.
ISBN 978-4-431-55051-8. DOI
10.1007/978-4-431-55052-5

執筆担当部分

K. Ito, S. Chiba (2014) Biological significance of nascent polypeptides that stall the ribosome. pp 3-20, *Regulatory Nascent Polypeptides* (Ed. Ito, K.), Springer Japan

K. Ito (2014) Analyzing the nascentome (polypeptidyl-tRNAs), the dynamic hub of translation. pp 135-150, *Regulatory Nascent Polypeptides* (Ed. Ito, K.), Springer Japan

S. Chiba (2014) MifM, a regulatory nascent chain that monitors membrane protein integration. pp 257-277, *Regulatory Nascent Polypeptides* (Ed. Ito, K.), Springer Japan

Web記事

熊崎薫、千葉志信、塚崎智也、濡木理「膜組み込み酵素YidCによるタンパク質の細胞膜への組み込みの分子機構」ライフサイエンス新着論文レビュー

5. 学会発表など

伊藤維昭、茶谷悠平、千葉志信: 翻訳再訪. 分子遺伝学シンポジウム2014「新しい生命像を導いた大腸菌遺伝学の系譜」、京都、2014.3.1

千葉志信: MifM研究から見えてきた翻訳伸長アレストの多様性 2013年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」、三島・遺伝研 2014. 3. 24-25 (招待講演)

Y. Chadani, S. Chiba, K. Ito: Revisiting translation, the key process along the central dogma. 国際会議Microbial Genetics and Genomics VI- Beckwith Reunion 2014, パリ・パスツール研究所 2014. 4. 16-18

千葉志信、熊崎薫、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭: YidCによるタンパク質膜組込機構 第61回生化学会近畿支部例会・京都 2014. 5. 17

伊藤維昭: Revisiting translation, the key process along the central dogma 京都産業大学総合生命科学部主催の国際シンポジウム「生命科学の最前線」・京都 2014. 5. 30-31 (招待講演)

伊藤維昭: 翻訳をシスに制御するアレストペプチド 第11回21世紀大腸菌研究会・盛岡2014. 6. 5-6

由良隆: 大腸菌熱ショック応答の新規制御回路: 転写因子シグマ32の膜移行 -研究経過と現状のまとめ- 第11回21世紀大腸菌研究会・盛岡2014. 6. 5-6

石井英治、橋本成祐、千葉志信、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森博幸: 海洋性ビブリオ菌におけるタンパク質分泌不全時の救済機構 第11回21世紀大腸菌研究会・盛岡2014. 6. 5-6

E. Ishii, N. Hashimoto, S. Chiba, S. Kojima, M. Homma, K. Ito, Y. Akiyama, H. Mori: The mode of expression and physiological roles of SecDF paralogs, protein translocation enhancing factors, in *Vibrio alginolyticus*. 第9回研究所ネットワーク国際シンポジウム・大阪 2014.6. 19-20

伊藤維昭: 合成途上鎖から見えてきた翻訳の自律性と機能発現 第66回日本細胞生物学会大会・奈良 2014. 6. 11-13 (招待講演)

千葉志信、熊崎薫、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭: 働く新生鎖MifMを利用した蛋白質膜組込装置YidCの機能解析— Functional analysis of membrane protein insertase YidC using a regulatory nascent chain MifM. 第14回日本蛋白質科学会年会・横浜 2014. 6. 25-27 (招待講演)

熊崎薫、千葉志信、武本瑞貴、古川新、菅野泰功、森貴治、田中良樹、杉田有治、伊藤維昭、石谷隆一郎、塚崎智也、濡木理：膜タンパク質YidCによるタンパク質膜組み込み機構の構造基盤 第14回日本蛋白質科学会年会・横浜 2014. 6. 25-27

千葉志信：翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象 シンポジウム「分子から生命へ」・京都 2014. 7. 26

伊藤維昭：遺伝情報の翻訳とタンパク質の運命 シンポジウム「分子から生命へ」・京都 2014. 7. 26(招待講演)

千葉志信、熊崎薫、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭：チャンネルに依存しない蛋白質膜組込機構：アレスト因子MifMを利用したYidCの機能解析 2014年度グラム陽性菌ゲノム機能会議・鶴岡 2014. 9. 3-5

茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭：大腸菌タンパク質合成における伸長アレストの全体像解明に向けて 日本遺伝学会年会第86回大会・長浜 2014. 9. 17-19(招待講演)

千葉志信：蛋白質局在化装置の活性をモニターする新生鎖 新学術領域「新生鎖の生物学」公開キックオフミーティング・東京 2014. 9. 30

伊藤維昭：新生鎖の生物学の始まり 新学術領域「新生鎖の生物学」公開キックオフミーティング・東京 2014. 9. 30(招待講演)

千葉志信、熊崎薫、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭：YidCによるチャンネルに依存しない蛋白質膜組込機構 第87回日本生化学会大会・京都 2014. 10. 15-18(招待講演)

塚崎智也、熊崎薫、千葉志信、武本瑞貴、古川新、伊藤維昭、石谷隆一郎、濡木理：タンパク質の膜への組み込みに関わる膜タンパク質YidCの結晶構造と作業機序 平成26年度日本結晶学会年会・東京 2014. 11. 3

石井英治、橋本成祐、千葉志信、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森博幸：Vibrio alginolyticusが持つ駆動力の異なるタンパク質分泌促進因子の生理的機能分担と発現制御機構 第48回腸炎ビブリオシンポジウム・函館 2014. 11. 13-14

千葉志信、熊崎薫、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭：YidCによるタンパク質膜組込機構の解明 第37回日本分子生物学会年会・横浜 2014. 11. 25-27

K. Ito: From membrane protein integration to ribosome sensing of nascent chains. Arthur Johnson教授退職記念シンポジウム、Philadelphia, USA. 2014. 12. 6.

Y. Chadani, S. Chiba, K. Ito: General occurrence of pausing in translation of the E. coli proteome members as studied by direct detection of nascent polypeptides. The 2014 ASCB/IFCB meeting, Philadelphia, USA. 2014. 12. 6-10.

6. その他特記事項

1) 外部資金

科研費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」計画研究
 課題名：働く新生鎖の生理機能と分子機構
 研究代表者：千葉志信、研究分担者：伊藤維昭、取得年度：H26-30年(5年)

科研費補助金・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構
 研究代表者：千葉志信、取得年度：H25-27年(3年)

科研費補助金・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)

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：伊藤維昭、取得年度：H23-27年(5年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

千葉志信：シンポジウム「分子から生命へ」(京都 2014. 7. 26)を主催。

千葉志信：第37回日本分子生物学会年会(横浜 2014. 11. 25-27)において、ワークショップ「生命活動を支える高次複合体の動態と機能」を、九州大学・大橋英治助教と共催。

伊藤維昭：Member, Faculty of 1000(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

4) 受賞等 なし

5) その他 なし



mRNA-リボソーム-翻訳途上鎖複合体：遺伝情報が生命活動へと変換される最初の重要なプロセスである翻訳伸長過程を雪で表現。…もしくは、いびつな雪だるま。

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。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。癌化に伴い極性が消失し、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面全体に輸送される。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) MUC1 と転写因子 NF- κ B の複合体形成とプラスミノーゲンアクティベーター(uPA)のプロモーター領域への結合による uPA の転写誘導

MUC1は様々なヒト悪性腫瘍で過剰発現しており、その発現量は予後不良と関連している。DNA マイクロアレイによる解析により、MUC1 過剰発現細胞において uPA の発現が上昇することがわかった。また、その発現レベルは MUC1のそれと呼応していた。事実、様々なヒト癌細胞組織において、MUC1 と uPA は同様の分布を示した。ChIP アッセイにより MUC1 発現細胞において形成された転写因子 NF- κ B と MUC1 の複合体は uPA のプロモーター上に存在することがわかった。また、ルシフェラーゼアッセイにより uPA の転写活性は MUC1 の発現レベルと呼応し、その活性は uPA プロモーター上の NF- κ B 結合部位を変異することにより消失した。これらの結果より、MUC1 と NF- κ B の複合体の形成は核移行を促進し、同複合体の uPA プロモーター上への結合が uPA の転写を亢進することを示している。更に、uPA は MMP-9 及び 2 の活性を高め、癌細胞の浸潤を促進することがわかった。此の様に、MUC1 発現細胞において NF- κ B シグナル経

教授 中田 博

Prof. Hiroshi Nakada, Ph.D.



助教 秋田 薫

Assist. Prof. Kaoru Akita, Ph.D.

路は MUC1 と協調して、癌細胞の浸潤能を高めていることがわかった。

2) MUC1 発現マウス 3T3 細胞における MUC1-N 末ドメインへのガレクチン-3 の結合による β -カテニンのリクルート

ガレクチン-3 の発現レベルは癌の進行と関連している。また、ガレクチン-3 は MUC1 のリガンドであるとされている。マウス 3T3 細胞に MUC1 の遺伝子を導入して安定発現株を得た。MUC1 は MUC1-ND (N 末ドメイン) と MUC1-CD (C 末ドメイン) から構成されるが、ガレクチン-3 の結合ドメインは MUC1-ND であることが分かった。細胞表面に存在するガレクチン-3 は MUC1 の発現により増加し、かつ共局在した。3T3/MUC1 細胞にガレクチン-3 を作用させた後、MUC1-CD を免疫沈降し、電気泳動により解析すると共枕した β -カテニンが検出された。従って、ガレクチン-3 の MUC1 への結合がシグナルを惹起し、 β -カテニンがリクルートされたものと考えられる。

3) 子宮内膜症と上皮性卵巣癌患者血清中の CA125 のメソテリン結合能の差異

CA125 は卵巣癌の腫瘍マーカーとして頻用されるが、子宮内膜症などの良性疾患でも高い陽性率を示す。CA125 と結合するレクチンであるメソテリンと抗 CA125 抗体を用いたサンドイッチ ELISA を用いて測定すると血清中のメソテリンと結合する CA125 のレベル及び CA125 に対するメソテリン結合性 CA125 の比が卵巣癌で著しく高いことを見出した。従って、本手法は子宮内膜症と卵巣癌患者の識別に有用である。

3. Research projects and annual reports

Mucins are major components covering the luminal surfaces of the epithelial respiratory, gastrointestinal, and reproductive tracts, and are high molecular weight glycoproteins with a number of O-glycans.

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: Transcriptional induction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) by forming a complex of MUC1 and NF- κ B p65 transcription factor and binding to the uPA promoter in MUC1 expressing cells. Mucin 1 (MUC1) is overexpressed in various human malignant tumors and its expression is correlated with a poor prognosis. Microarray analysis revealed that expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) was elevated in MUC1-overexpressing cells. Furthermore, up- and down-modulation of MUC1 expression was clearly correlated with the change of uPA expression. An immunochemical study showed that the distribution of uPA coincided with that of MUC1 in various human cancer tissues. The MUC1 C-terminal domain (MUC1-CD) was associated with nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 in MUC1-expressing cells. ChIP assays demonstrated that MUC1-CD existed with NF- κ B p65 on the uPA promoter. Luciferase assays indicated that the uPA transcriptional activity was correlated with the level of MUC1 expression and that this MUC1-enhancing effect on the uPA transcription was abolished by introduction of mutations into the NF- κ B binding sites on the uPA promoter. These results indicate that formation of the MUC1-CD and NF- κ B p65 complex enhanced nuclear translocation of NF- κ B p65 and subsequent occupancy of NF- κ B binding region on the uPA promoter, leading to elevated transcription of uPA. We also demonstrated that uPA induced by MUC1 enhanced the matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 activities, and consequently promoted cancer cell invasion.

2: Recruitment of β -catenin by binding of galectin-3 to MUC1-N-terminal domain in MUC1-expressing mouse 3T3 cells. Galectin-3 is expressed in a variety of tumors and its expression level is related with tumor progression. It has been reported that MUC1 is a natural ligand of galectin-3. A stable MUC1 transfectant was produced by introducing MUC1 cDNA into mouse 3T3 fibroblasts (MUC1/3T3 cells). Galectin-3 present on the cell surface increased with the expression of MUC1 and is colocalized with MUC1. We found that galectin-3 bound to the N-terminal domain of MUC1(MUC1-ND) but not to the C-terminal one. (MUC1-CD). After ligation of galectin-3 to 3T3/MUC1 cells, MUC1-CD was immunoprecipitated from the cell lysate. β -Catenin was detected in the immunoprecipitate with anti-MUC1-CD Ab from a lysate of galectin-3-treated 3T3/MUC1 cells. These results demonstrate that galectin-3 binds to MUC1-ND and triggers MUC1-mediated signaling in 3T3/MUC1 cells, leading to recruitment of β -catenin to MUC1-CD.

3: Difference in mesothelin-binding ability of serum CA125 between patients with endometriosis and epithelial ovarian cancer. CA125 is the most commonly used serum marker for epithelial ovarian carcinoma (EOC), but shows a high-false-positive rate for several benign diseases such as endometriosis. In our study, using two different CA125-binding molecules, i.e., recombinant mesothelin and an anti-CA125 monoclonal antibody, a novel sandwich ELISA for determining the serum levels of CA125 with mesothelin-binding ability (CA125^{meso}) was developed, and tested for patients with endometriosis (n=59) and EOC (n=36). We found that both the serum CA125^{meso} level and the ratio of the serum CA125^{meso} to CA125 levels (CA125^{meso}/CA125) were significantly higher in patients with EOC than in patients with endometriosis (p<0.00005 and p<0.000001, respectively). Thus, mesothelin-binding ability may be a useful indicator for discriminating CA125 obtained from patients with endometriosis and ovarian cancer.

4. 論文, 著書など

A. Sasaki*, K. Akita*, F. Ito, T. Mori, J. Kitawaki, H. Nakada: Difference in mesothelin-binding ability of serum CA125 between patients with endometriosis and epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer*. 2015. **136(8)**, 1985-1990 (*These authors contributed equally to this work)

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.* 2014. **1840(6)**, 1790-1797

K. Murakami, M. Kohno, M. Kadoya, H. Nagahara, W. Fujii, T. Seno, A. Yamamoto, R. Oda, H. Fujiwara, T. Kubo, S. Morita, H. Nakada, T. Hla, Y. Kawahito: Knock out of S1P3 receptor signaling attenuates inflammation and fibrosis in bleomycin-induced lung injury mice model. *PLoS One.* 2014. **9(9)**, e106792

Y. Mori, K. Akita, S. Tanida, A. Ishida, M. Toda, M. Inoue, M. Yashiro, T. Sawada, K. Hirakawa, H. Nakada: MUC1 protein induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) by forming a complex with NF-kappaB p65 transcription factor and binding to the uPA promoter, leading to enhanced invasiveness of cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2014. **289(51)**, 35193-35204

A. Ishida, K. Akita, Y. Mori, S. Tanida, M. Toda, M. Inoue, H. Nakada: Negative regulation of Toll-like receptor-4 signaling through the binding of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein, CD14, with the sialic acid-binding lectin, CD33. *J. Biol. Chem.* 2014. **289(36)**, 25341-25350

中田 博: 免疫応答に対するムチンの影響. 炎症と免疫. 2014. vol.22. no.4. 先端医学社 (総説)

5. 学会発表など

中田 博: シグレック-3 による TLR-4 情報伝達の制御. 糖鎖免疫 2014, 東京都, 2014.2.17-18 (招待講演)

森 勇伍, 秋田 薫, 八代正和, 澤田鉄二, 平川弘聖, 中田 博: MUC1 による uPA の発現誘導及び悪性化機構. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会, 京都市, 2014.5.17

谷田周平, 秋田 薫, 石田有希子, 森 勇伍, 戸田宗豊, 井上瑞江, 太田麻莉子, 八代正和, 澤田鉄二, 平川弘聖, 中田 博: 膜結合型ムチン MUC1 とシアル酸結合レクチン Siglec-9 の結合は MUC1 と β -catenin の相互作用および細胞増殖を促進する. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会, 京都市, 2014.5.17

中田 博, 森 勇伍, 秋田 薫: MUC1 による腫瘍悪性化機構. 第 33 回日本糖質学会年会, 名古屋市, 2014.8.10-12

森 勇伍, 秋田 薫, 八代正和, 澤田鉄二, 平川弘聖, 中田 博: MUC1 は NF- κ B と複合体を形成し、プロモーターに結合することで uPA の発現を誘導し、癌細胞浸潤能を亢進させる. 第 33 回日本糖質学会年会, 名古屋市, 2014.8.10-12

中田 博: ムチンの生物学的機能の解析と医薬への展望. 第 66 回日本生物工学会大会, 札幌市, 2014.9.9-11 (招待講演)

森 勇伍, 秋田 薫, 八代正和, 澤田鉄二, 平川弘聖, 中田 博: MUC1 は NF- κ B と複合体を形成しプロモーターに結合することで uPA の発現を誘導する. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜市, 2014.9.25-27

秋田 薫, 佐々木 綾, 菅沼 泉, 森 泰輔, 北脇 城, 中田 博: 子宮内膜症患者と卵巣癌患者間における血清 CA125 のメテリン結合能の違い. 第 87 回日本生化学会大会, 京都市, 2014.10.15-18

6. その他特記事項

1) 外部資金

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)

共同研究・和光純薬株式会社

課題名: 抗糖鎖単クローン抗体の開発/商品化

研究代表者: 中田 博, 取得年度: H26 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、京都バイオフォーラム幹事、科学技術振興機構戦略的イノベーション推進部アドバイザー、NEDO ピアレビューアー、日本生化学会評議員、日本糖質学会評議員

4) 受賞等 なし

5) その他

谷田周平: 京都産業大学大学院・博士前期課程卒 (平成 22 年 3 月)、学位 (論文博士) 取得

3 種の単クローン抗体が和光純薬株式会社より製品化された。
(http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/CarboxyAntibody_201502/index.htm)

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。昨年度より新たに、本研究室でクローニングし、命名した新規遺伝子 *mysterin* に関する研究(テーマ4)がスタートしたが、今年度はさらに「新規小胞体膜因子によるオートファジーの負の制御機構の解析」という研究目標を設定し、「テーマ3」として報告する。

タンパク質は正しく合成され、正しい構造をとって初めて本来の機能を発揮するが、それには種々の分子シャペロンが重要な働きをしている。またいったん正しい機能を獲得したタンパク質も、細胞に不断にかかる種々のストレスによって変性したり、遺伝的変異によってどうしても正しい構造をとれないタンパク質も存在する。このようないわゆる「不良タンパク質」は、単に機能を持たないだけでなく、細胞毒性によって細胞死を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の神経変性疾患の原因ともなっている。従って、タンパク質を正しく合成する productive folding と、ミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための品質管理機構をと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。Hsp47 はまた肝硬変などの線維化疾患の増悪にも関与しており、この観点からは線維化組織での Hsp47 の阻害が重要である。継続して阻害剤の探索を行ってきたが、その候補を見つけ、解析を行った。

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

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とともに、カルシウム取り込みの制御およびレドックス制御に関しても研究を行う。

3) 新規小胞体膜因子によるオートファジーの負の制御機構の解析

オートファジーは細胞内のタンパク質やオルガネラそのものを分解処理する機構である。近年我々は、新規のオートファジーの制御タンパク質を発見したので、その機能及び個体での解析を行う。

4) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterin* の機能解析

Moyamoya 病は日本人に多い脳血管疾患であるが、その原因遺伝子の探索を共同研究として行い、初めての確実な遺伝因子として新規の巨大遺伝子 *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は主要な細胞外マトリックスの一つであるコラーゲンの異常な蓄積を特徴とする。慢性的な線維化においては、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し、コラーゲンを過剰に産出し、線維化を進行させる。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、コラーゲン特異的分子シャペロン 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。また、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ることが分かった。このことは、線維化疾患の治療において、Hsp47 が重要な創薬ターゲットとなることを改めて示した(K. Kawasaki et al., *J. Biol. Chem.*, 2015)。

また当研究室では、線維化疾患のターゲットである Hsp47 の機能阻害を目的とし、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害する化合物の探索を行い、既に化合物を得ている(特許所得済み)。今回、NMR 法を用いて化合物の Hsp47 への結合

部位を調べた。その結果、化合物とコラーゲンの Hsp47 への結合部位が重なり、化合物の競合的な阻害様式が明らかになった。今回得られた構造情報はより効果的な Hsp47 阻害剤のデザインに役立つと考えられる(文責:伊藤)。

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ことが明らかになった。さらに ERdj5 は小胞体内腔のカルシウム濃度を感受し、SERCA2 との複合体形成を調節していることを明らかにした(論文投稿準備中)。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の制御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。

また本年度から ERdj5 の還元メカニズムを解明するため ERdj5 の結合タンパク質の同定を行っている。候補分子の同定に成功しており、ERdj5 の詳細な分子メカニズムの解明にも挑戦した(文責:潮田)。

3) 新規小胞体膜因子によるオートファジーの負の制御機構の解析

オートファジーは細胞内の大規模分解系の一つであり、恒常的に細胞内に生じる不良タンパク質や細胞小器官のクリアランスに大きく寄与している。近年、オートファジー分解に必要な膜成分が小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイト(MAM)から生じることが報告され、MAM がオートファジーにおいて重要な役割を持つことが明らかになってきた。我々は小胞体膜に局在する新規タンパク質をクローニングし、さらにそれが

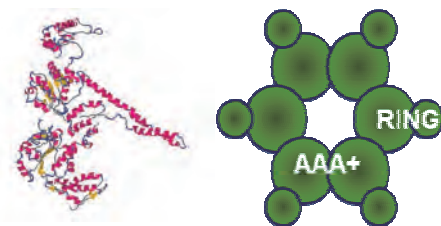
MAM に局在している結果を得た。また興味深いことに、この新規タンパク質の細胞内発現量を抑制するとオートファジーが亢進し、反対に発現量を増加させると、オートファジーが顕著に抑制された。さらに、この新規因子の機能ドメインは小胞体内腔側に位置している。これは、オートファジーの過程を MAM において負に制御し、かつ小胞体内腔側の環境がオートファジーを制御する上で重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。今後、この新規因子のさらなる機能解析を行うことで、オートファジーの制御における新たな小胞体の概念を提案していきたい(文責:山本)。

4) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterin* の機能解析

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 という巨大なタンパク質をコードしていた。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(D. Morito *et al.*, *Sci. Rep.* 2014)。

また、ゼブラフィッシュを用いたノックダウン実験により、*mysterin* が

血管ガイダンスや神経筋発生に必須であり、しかもその機能には *mysterin* のユビキチンリガーゼ活性や ATP アーゼ活性が重要であることを明らかにした(投稿中)。現在、さらに結合タンパク質探索や細胞内機能同定などを含めて、機能解析を行っている(文責:森戸)。



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. In liver fibrosis, hepatic stellate cells (HSCs) are activated and transformed into myofibroblasts which produce collagen actively. Here, we succeeded in knocking out of collagen specific molecular chaperone hsp47 gene by Cre-LoxP system in HSCs isolated from hsp47 floxed mice. In

hsp47-KO HSCs, we confirmed that immature type 1 collagen is accumulated in the endoplasmic reticulum (ER) resulting in causing apoptosis in HSCs. These results suggest that Hsp47 could be potential therapeutic targets for fibrosis (K. Kawasaki et al., *J. Biol. Chem.*, 2015).

We already found that a small molecule compound inhibits the interaction between collagen and Hsp47. We investigated the inhibitor binding site in Hsp47 and revealed that this compound competitively inhibited the binding of procollagen to Hsp47 using NMR methods. Structural information of the interaction of the compound with Hsp47 enables us to design more effective therapeutic drugs for fibrosis.

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 of 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).

We found that ERdj5 cleaves the disulfide bond of SERCA2, a Ca²⁺ pump on ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2. It suggests that redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca²⁺ homeostasis in the ER. As 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.

Furthermore, we tried the screening of interaction partner of ERdj5 to declare redox source of ERdj5. We expect to resolve the detail molecular mechanism of ERdj5.

3. A novel ER membrane protein negatively regulates autophagy at ER-mitochondria contact site. Protein degradation system is important for the intracellular homeostasis. Macro-autophagy (hereafter autophagy) is one of the intracellular degradation systems. At the steady state, autophagy constitutively degrades abnormal organelle and proteins, hence intracellular homeostasis is retained. Autophagosome is originated by isolation membranes which occur on the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria

contact site in mammalian cell. Autophagy is dominated by many autophagic genes. Although positive regulators have been well studied, negative regulator of autophagy is poorly understood. Here we have discovered a novel ER membrane protein that negatively regulates autophagic degradation process, and we are now performing the characterization of this molecule..

4. Functional analysis of a novel protein, mysterin. We isolated a novel gene encoding a huge protein, which we named mysterin, as a susceptibility gene for human cerebrovascular disease (moyamoya disease). Mysterin with a size of 591kDa contains RING finger ubiquitin ligase domain and two AAA+ ATPase domains. Mysterin forms a huge toroidal oligomer the size of which is comparable to known macromolecules such as the ribosome and is supposed to exhibit mechanical activity in the cell (D. Morito et al., *Sci. Rep.* 2014). Knockdown experiments using zebrafish demonstrated that mysterin has essential roles for physiological angiogenesis and myogenesis through its enzymatic activities. Further studies on intracellular function of mysterin and the pathological mechanism are warranted.

4. 論文、著書など

- J. Kirstein-Miles , D. Morito , T. Kakihana, M. Sugihara, A. Minnen, S.M. Hipp, C. Nussbaum-Krammer , U.F. Hartl, K. Nagata, R.I.Morimoto : Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments. *EMBO J.* in press
- D. Morito & K. Nagata : Pathogenic Hijacking of ER-Associated Degradation: Is ERAD Flexible ? *Mol. Cell.* in press
- A. Kitamura , K. Nagata & M. Kinjo : Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques. *Int. J. Mol. Sci.* in press
- K. Kawasaki , R. Ushioda , S. Ito, K. Ikeda, Y. Masago & K. Nagata: Deletion of the Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem.* in press
- E. Avezov , T. Konno, A. Zyryanova , W.Chen, R. Laine ,A.Crespillo-Casado , E. Melo , R. Ushioda , K. Nagata , CF Kaminski , HP Harding & D Ron: Retarded PDI diffusion and a reductive shift in poise of the calcium depleted endoplasmic reticulum. *BMC Biol.* in press
- 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* 24(4):4442 (2014)
- 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* 14:48 (2014)
- 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* 63 (12): 1902-1912 (2014)
- T. Rammung, H. G. Hansen, K. Nagata, L. Ellgaard, C. Appenzeller-Herzog: GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum *Free Radical Biol Med.* 70:106-116 (2014)
- 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* 509:497-502 (2014)
- 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* 19 (3):209-224 (2014)
- 潮田亮, 永田和宏 : レドックス制御による細胞内タンパク質の品質管理. 実験医学(羊土社)Vol. 32, No. 14 2201-2207 (2014)

5. 学会発表など

招待講演、シンポジウム等

- 永田和宏 : ことばの力 京都府病院協会新春講演会、京都市 2014. 1. 9
- 永田和宏 : タンパク質の品質管理機構と小胞体ホメオスタシス 九州大学 SSS セミナー、福岡市、2014. 1. 10
- 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 (口頭発表)
- 永田和宏 : 小胞体ホメオスタシスの制御維持機構 北海道大学第 11 回若手研究者交流会、札幌市、2014. 1. 31
- 永田和宏 : 小胞体ホメオスタシスの維持管理機構 : タンパク質品質管理機構とその向こう. 第 26 回先端医療センター「Monthly Lecture」、神戸市、2014. 2. 14

永田和宏 : 細胞から見えてくる病気。智辯学園奈良カレッジ医学部クラス特別講演、香芝市、2014. 2. 17

Kazuhiro Nagata : Crosstalk among protein, redox and calcium homeostasis in the ER. GBC 65th Mosbacher Colloquium, Mosbach (Germany), 2014. 03. 28

Kazuhiro Nagata : Beyond the Proteostasis. Max Planck Institute Seminar, Martinsried (Germany), 2014. 3. 31

Kazuhiro Nagata : Crosstalk among protein, redox and calcium homeostasis in the ER. JSCB Presymposium "Cutting-edge of stress-response and protein homeostasis", Nara (Japan), 2014. 6. 10

永田和宏 : 小胞体のホメオスタシス維持管理機構. 第 66 回日本細胞生物学会シンポジウム、奈良市、2014. 6. 13

森戸大介 : モヤモヤ病タンパク質ミステリンの構造と機能 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会 合同年会シンポジウム、奈良市、2014.9.30

Ryo Ushioda : ERdj5-mediated ER homeostatic mechanism 日本生化学会大会シンポジウム、京都市、2014.10.15

永田和宏 : 小胞体ホメオスタシスの維持管理機構 : タンパク質品質管理機構とその向こう. 大分大学医学部大学院セミナー、大分市、2014. 10. 15

永田和宏 : タンパク質の品質管理機構と病態. 大分大学医学部特別講義、大分市、2014. 10. 15

永田和宏 : 何のために学ぶのか? - 教養教育と複眼的思考 - 京都三大学教養教育研究・推進機構(リベラルアーツセンター)主催講演会、京都市、2014. 12. 21

学会発表

- Daisuke Morito, Yuri Kotani, Kouki Nishikawa, Satoru Yamazaki, Kenta Yamada, Seiji Takashima, Yoshinori Fujiyoshi, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata : Structure and function of Moyamoya Disease-Associated protein mysterin/RNF213. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, 2014.04.14-17
- 森戸大介、西川幸希、山崎悟、宝関淳、北村朗、小谷友理、金城政孝、高島成二、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. 第 61 回生化学会近畿支部例会、京都市、2014.5.17 (口頭発表とポスター発表) (優秀発表賞受賞)
- 川崎邦人, 潮田亮, 伊藤進也, 池田一雄, 真砂有作, 永田和宏 : Hsp47 欠損は肝星細胞で小胞体ストレス依存的なアポトーシスを引き起こす. 第 61 回生化学会近畿支部例会、京都市、2014.5.17 (口頭発表とポスター発表)
- 小谷友理、森戸大介、山崎悟、山田健太、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 61 回生化学会近畿支部例会、京都市、2014.5.17 (口頭発表とポスター発表) (優秀発表賞受賞)

潮田 亮、永田和宏:還元酵素 ERdj5 を介した小胞体恒常性維持機構の解明. 第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良市、2014.6.11-14 (口頭発表)

森戸大介、Janine Kirstein-Miles、垣花太一、杉原宗親、Mark S. Hipp、F.Ulrich Hartl、Richard Morimoto、永田和宏:老化・疾患による小胞体レドックス恒常性の低下. 第 66 回日本細胞生物学会大会シンポジウム、奈良市、2014.6.11-14 (口頭発表)

小谷友理、森戸大介、山崎悟、山田健太、高島成二、平田普三、永田和宏:AAA+ ATPase/ユビキチンリガーゼタンパク質 mysterin/RNF213 による zebrafish の発生制御. 第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良市、2014.6.11-14 (口頭発表)

萩原誠智、杉浦仁美、夏目徹、稲葉謙次、永田和宏:新規小胞体膜タンパク質 TMX5 の機能解析. 第 66 回日本細胞生物学会年会、奈良、2014.6.11-13 (口頭発表)

Janine Kirstein, Daisuke Morito, Taichi Kakihana, Munechika Sugihara, Anita Minne, Mark S. Hipp, Carmen Nussbaum-Krammer, F. Ulrich Hartl, Kazuhiro Nagata, Richard I. Morimoto: Loss of redox homeostasis by trans-compartmental stress and ageing. Neuroscience Forum, Berlin (Germany), 2015.6.12 (口頭発表)

潮田亮:還元酵素 ERdj5 を介した小胞体恒常性維持機構. 第 9 回小胞体ストレス研究会、徳島市、2014.7.4-5 (若手研究者最優秀発表賞受賞)

川崎邦人:Hsp47 欠損は肝星細胞で小胞体ストレス依存的なアポトーシスを引き起こす. 第 9 回小胞体ストレス研究会、徳島市、2014.7.4-5 (若手研究者優秀発表賞受賞)

Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Kenta Yamada, Seiji Takashima, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata: Moyamoya disease-associated gene mysterin is essential for vascular-neural and muscle development in zebrafish. 第 20 回小型魚類研究会、東京都、2014.9.20-21 (ポスター発表)

Janine Kirstein, Daisuke Morito, Taichi Kakihana, Munechika Sugihara, Anita Minne, Mark S. Hipp, Carmen Nussbaum-Krammer, F. Ulrich Hartl, Kazuhiro Nagata, Richard I. Morimoto: Loss of redox homeostasis by trans-compartmental stress and ageing. Canada-Germany Neuroscience Workshop, Berlin (Germany), 2015.10.16 (口頭発表)

森戸大介、Janine Kirstein-Miles、垣花太一、杉原宗親、Mark S. Hipp、F.Ulrich Hartl、Richard Morimoto、永田和宏:老化・疾病による小胞体レドックス恒常性の低下. 第 9 回臨床ストレス応答学会大会、岡山市、2014.11.1-2(口頭発表とポスター発表)

Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Kenta Yamada, Seiji Takashima, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata: Mysterin, a novel

hybrid. AAA+ ATPase/ubiquitin ligase hybrid protein, is essential for vascular-neural and muscle development in zebrafish 新学術領域「ユビキチン制御」若手シンポジウム、京都市、2014.11.11 (口頭発表)

川崎邦人、潮田亮、伊藤進也、池田一雄、真砂有作、永田和宏:

Hsp47 欠損は肝星細胞で小胞体ストレス依存的なアポトーシスを引き起こす. 第 87 回日本生化学会大会、京都市、2014.10.15~18 (口頭発表とポスター発表)

萩原誠智、杉浦仁美、夏目徹、稲葉謙次、永田和宏:新規小胞体膜タンパク質 TMX5 による Wnt3a 生合成調節機構. 第 87 回日本生化学会大会、京都、2014.10.15-18 (口頭発表とポスター発表)

潮田 亮、川崎 邦人、永田 和宏:還元酵素 ERdj5 を介した小胞体恒常性維持機構の解明. 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜市、2014.11.25-27 (口頭発表とポスター発表)

小谷友理:ATPase/E3 リガーゼ mysterin による zebrafish の形態形成制御. 第 23 回関西おさかな勉強会、京都市、2014.12.5 (口頭発表)

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 C R E S T 「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「オートファジーの集学的研究分子基盤から疾患まで」

課題名:オートファジーが関与する小胞体品質管理機構の解明、研究代表者:潮田亮、取得年度:H26-27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チリンによる欠陥・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チリンの構造と機能、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：新規巨大タンパク質ミスチリンの機能解析、研究代表者：森戸大介、取得年度：H26 年(1 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
なし

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」外部評価委員

永田和宏：日本学術会議（細胞生物学）連携会員

永田和宏：日本学術振興会 特別推進研究審査委員

永田和宏：日本学術振興会 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：文部科学省 科学研究費補助金審査委員（基盤 S）

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域」審査委員

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金評価委員

永田和宏：文部科学省 科研費特定領域研究「ユビキチンネオバイオロジー：拡大するタンパク質制御システム」（岩井班）外部評価委員

永田和宏：科学技術振興機構 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：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：国際高等研究所 研究推進会議委員

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：大阪大学蛋白質研究所 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：日本細胞生物学会 幹事、常任編集委員

永田和宏：日本生化学会 評議員

永田和宏：日本結合組織学会 評議員

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

潮田亮：第 66 回日本細胞生物学会年会 プログラム委員

4) 受賞等

森戸大介、西川幸希、山崎悟、宝関淳、北村朗、小谷友理、金城政孝、高島成二、藤吉好則、永田和宏：第 61 回生化学会近畿支部例会、優秀発表賞受賞

小谷友理、森戸大介、山崎悟、山田健太、高島成二、平田普三、永田和宏：第 61 回生化学会近畿支部例会、優秀発表賞受賞
潮田亮：第 9 回小胞体ストレス研究会、若手研究者最優秀発表賞受賞

川崎邦人：第 9 回小胞体ストレス研究会、若手研究者優秀発表賞受賞

5) その他 研究室メンバー他の写真



発生細胞生物学研究室

Laboratory for 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)。

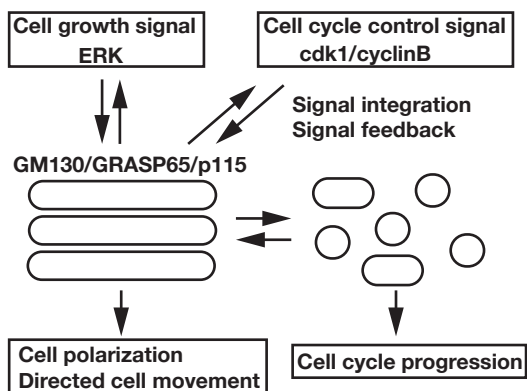


Fig. 1. Golgi appoints as a platform of signal transduction
The Golgi apparatus changes its structure and localization in response to the cell growth signal and the cell cycle control signal. Conversely, the information of the structure and the function of the Golgi apparatus feedback to the signal transduction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

本年度は特に GM130 の構造に関する研究を中心に行った。GM130 はゴルジ体シス側の細胞質側に局在する表在性膜タンパク質である。ゴルジ体の膜上で膜骨格としてゴルジ体の構造維持に働くだけでなく、ゴルジ体へやってきた輸送小胞を係留し、膜融合を促進する働きも持つと考えられている。アミノ酸配列から、GM130 の分子の 60% 以上の部分が 90% 以上の確率でコイルド・コイル構造を取っているものと予測される。コイルド・コイルと予測される部分の配列は p115 や Uso1p と類似しているが、p115 や Uso1p はコイルド・コイル構造を持つホモ 2 量体であり、棒状の構造とすることが明らかにされているため、GM130 も棒状の構造をとるホモ 2 量体であると考えられてきた。しかしながら、生化学的解析と電子顕微鏡による解析から、GM130 は同方向に 4 分子が集合した柔軟性のある、ひも状の構造を持つことが明らかとなった。また、N 末端部分が閉じた I 型 (Fig. 2, open) と開いた Y 型 (closed) の 2 つの構造を持つことも明らかとなった。以上の結果から、GM130 の構造が p115 細胞質因子の結合によって変化し、会合状態や機能が変化する可能性が示唆された。

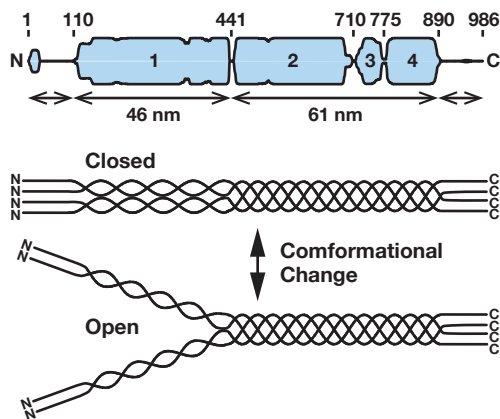


Fig. 2. Structure of GM130

GM130 is proposed to function in maintaining the Golgi structure and also tethering vesicles to the Golgi membrane for fusion. We found that GM130 is a parallel homo-tetramer in a flexible rod-like structure with open (Y-shaped) or closed (I shaped) N-terminal conformations. The interaction of controller molecules may affect the N-terminal conformation and the function.

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 mainly focused on the first subject (Fig. 2). GM130 is a cytoplasmic peripheral membrane protein localizing on the *cis*-side of the Golgi apparatus. GM130 is proposed to function as a membrane skeleton maintaining the structure of the Golgi apparatus and as a vesicle tether that facilitates vesicle fusion to the Golgi membrane. More than 60% of the GM130 molecule is believed to exist as coiled-coil structures with a probability above 90%, according to its primary amino acid sequence. The predicted coiled-coil regions were similar to p115 and Uso1p, both of which form a coiled-coil homo-dimer. Therefore, GM130 has long been thought to form a homo-dimer in a rod-like shape. However, our biochemical and electron microscopical analyses revealed that GM130 is a parallel homo-tetramer in a flexible rod-like structure with I- and Y-shaped conformations. The structure of the N-terminal region may interchange between open (branched or Y-shaped) and closed (non-branched or I-shaped) conformations, possibly with the help of associated molecules. This conformational change may alter the oligomeric state of the GM130 molecules and the

function of GM130 in vesicle tethering and maintenance of the Golgi structure.

4. 論文, 著書など(Publications)

Soonthornsit, J., Yamaguchi, Y., Tamura, D., Ishida, R., Nakakoji, Y., Osako, S., Yamamoto, A. and Nakamura, N. (2014). Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. *Exp. Cell Res.* **328**, 325–339.

Ishida, R., Yamamoto, A., Nakayama, K., Sohda, M., Misumi, Y., Yasunaga, T. and Nakamura, N. (2015). GM130 is a parallel tetramer in a flexible rod-like structure with N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. *FEBS J.* *in press*

5. 学会発表など(Meeting Reports)

石田竜一, 安永卓生, 山本章嗣, 中山和久, 吉村信一郎, 原田彰宏, 中村暢宏. Rab1のGM130結合とその生理的意義. 第66回日本細胞生物学会大会, 奈良市, 2014.6.11–13

Jeerawat Soonthornsit, Nobuhiro Nakamura. Low cytoplasmic pH reduced ER-Golgi transport and induces disassembly of the Golgi apparatus. 第66回日本細胞生物学会大会, 奈良市, 2014.6.11–13

6. その他特記事項(Others)

1) 外部資金(Research Grants)

科学研究費補助金・基盤研究(C)(Grant in Aid for Scientific Research (C), JSPS 2013-2015)

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)

2) 論文査読(Paper Referee)

Journal of Cell Science 1件

Scientific Reports 1件

3) 研究費等審査(Grant Referee)

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

日本学術振興会 科研費委員会審査委員・専門委員 平成25年12月1日-平成26年11月31日 (Board Member, Grant in Aid for Scientific Research, JSPS)



2014.3.3 @ ICHOYA, Nishihonganji-mae

2014 Laboratory Members: (From the left) 土田圭吾 Keigo Tsuchida (B4), 佐々木沙織 Saori Sasaki (B3), 檜尾友伸 Tomonobu Hio (B4), Jeerawat Soonthornsit (D2), 河村実里 Misato Kawamura (B3), 中村暢宏 Nobuhiro Nakamura (Prof.), 石田竜一 Ryuichi Ishida (PPD), 大迫志帆 Shiho Ohsako (B4)

神経回路発生研究室

Laboratory of Neural Network Development

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。本研究室では、脳に生じる現象の制御機構を分子レベルで明らかにすると共に、脳全体の発生を統御する遺伝プログラムの解明を目指している。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。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、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、そこに放出され拡散し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マトリックスを構築しているのか、またマトリックスの構造が分子的に均一なのか、それとも特定の領域に分れているのか不明な点が多い。本研究室では、シナプス間隙に存在する Hig タンパク質 (図1) を解析の出発点として、シナプス間隙を視点に据えたシナプスの分化機構の解明を目指している。

a) シナプス間隙マトリックスを構成するタンパク質群の同定と機能の解明

活動性の低下を示す変異の原因遺伝子として同定された *hikaru genki (hig)* 遺伝子は、CCPドメインを複数もつ Hig タンパク質をコードしている。この Hig タンパク質を解析の出発点として、シナプス間隙マトリックスを構成する新規分子を同定し、それらのシナプス分化・機能における役割を解明する。

b) シナプス間隙の構造を含めたシナプスの新しいモデルの構築

シナプス間隙マトリックスを構築する分子の分布を解析し、特定の分子の局在に領域性がある場合は、その領域とアクティブゾーンやベリアクティブゾーンとの関係性を明らかにする。その上で、シナプス間隙を含めたシナプスの新しいモデル像を提出する。

教授 浜 千尋

Prof. Chihiro Hama, Ph. D.

助教 中山 実

Assist. Prof. Minoru Nakayama, Ph. D.



2. 本年度の研究成果

まず最初に、以下の3点を明らかにし、その成果を *J. Neurosci.* 誌に発表した (図1参照)。

① Higは、全てのシナプスではなく、コリン作動性シナプスの間隙に局在する。

② Higは、細胞外に分泌、拡散し、コリン作動性シナプスの間隙にトラップされる。驚くことに、Higをグリア細胞で発現させても、コリン作動性シナプスの間隙に局在する。

③ Higはコリン作動性シナプスの分化を制御している。その欠損により、シナプス後膜上のアセチルコリン受容体 (AChR) サブユニットD α 6とD α 7の局在量が減少し、逆に後部内の足場タンパク質であるPSD95ホモログのDLGの量は増加する。

本年度は、さらに以下の(1)~(3)を明らかにした。

(1) Higのシナプス間隙への局在機構

① Higのシナプス間隙への局在のためには、少なくとも3種のAChRサブユニットD α 5、D α 6、D α 7が必要である。

② さらに、Higの局在のためには、第二のシナプス間隙マトリックスタンパク質であるHasp(Hig-anchoring scaffold protein、旧称Dig)が必要である (次ページ図2参照)。

(2) Haspについて

① HaspはHigと同様にCCPDメインを複数もち、分泌、拡散したのち、コリン作動性シナプスの間隙にトラップされる。

② *hasp*変異体は*hig*変異体と同様に活動性の低下を示す。

③ HaspとHigは免疫沈降により共沈することから複合体を形成し得る。

④ Haspのシナプス間隙への局在には、HigとAChRサブユニットを必要としない。

以上の結果は、HigとHaspを含むマトリックスの形成において、Haspをシナプス間隙につなぎとめる新たな因子が存在することを示している。また、さらに注目すべき点とし

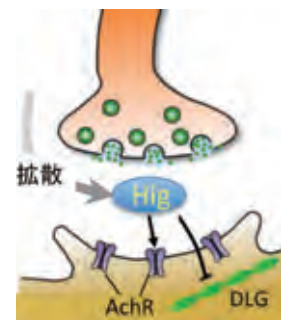


図1

て、HigとHaspは同一シナプスの間隙内に近接して局在するが、超高解像度レーザー顕微鏡(SIM)を用いた解析により、互いに重ならず、異なるコンパートメントに存在することが明らかになってきた。



図2

Hig の局在化機構

Hasp と AchR サブユニットが Hig の局在化に必要である。

(3) *hig* サプレッサー変異について

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種の変異体を分離した。その内1種の全ゲノム配列決定を行ったところ、変異が *AchRDα5* 遺伝子に生じていた。さらに、もう1種の *Dα5* 遺伝子を調べたところ、異なる塩基に変異が検出された。このことは、Hig と AchR サブユニット *Dα5* が密接に関連し、両者の相互作用が他のシナプス分子の局在や機能に影響を与えていることを示唆している。シナプス間隙マトリックスとシナプス後膜のインターフェイスで起こる分子間の相互作用を明らかにするために、さらに解析を続ける必要がある。

3. Research projects and annual reports

How the brain executes a variety of neural function still remains enigmatic. We are studying molecular mechanisms by which neuronal events 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 currently focuses on the mechanisms underlying synaptic differentiation, analyzing the mutants that show reduced locomotor behaviors.

Research Project:

Identification and function of novel synaptic matrix proteins.

The *hig* (*hikaru geneki*) gene, identified by a mutant phenotype of reduced locomotor activity (Hoshino *et al.*, Neuron 1993), encodes a secretory protein with multiple CCP domains. This Hig protein localizes to the synaptic clefts in the brain (Hoshino *et al.*, Development 1996). The goal of this project is to identify proteins that constitute synaptic matrix, and to reveal how those proteins are organized in the matrix.

Annual reports:

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

The synaptic cleft is a narrow but crucial space for neurotransmission and serves as an interface involved in 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 geneki (Hig), 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 capture 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 *Dα6* and *Dα7* were significantly decreased. Consistently, the *hig* mutant flies showed resistance to an AchR agonist, spinosad, which causes lethality by activating specifically *Dα6* among AchR subunits, suggesting that the loss of Hig compromises the synaptic activity mediated by *Dα6*. These results indicate that Hig is a specific component of synaptic cleft matrix for cholinergic synapses and regulates the postsynaptic organization in the CNS.

In addition to Hig, we have identified another component of synaptic cleft matrix, Hasp (Hig-anchoring scaffold protein). The loss of this protein causes reduced locomotor activity as do *hig* mutations, and notably Hasp is required for Hig to localizes to synaptic clefts. Thus, Hasp as well as AchR subunits function in capturing Hig, suggesting sequential processes of synaptic matrix formation.

4. 論文, 著書など

Nakayama, M., Matsushita, F., Hama, C.

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

The Journal of Neuroscience. 2014. **34**, 13872-13877.

Featured Article として巻頭に紹介された。

5. 学会発表など

Nakayama, M., Hama, C.

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

第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25-27

6. その他特記事項

1) 外部資金

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 共同研究(A1)

課題名:電子顕微鏡を用いたシナプスタンパク質 Dig の局在解析

研究代表者:浜 千尋

取得年度:H22-24年(3年)

文部科学省 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク

課題名:ローランド型てんかんの原因解明を目指したショウジョウバエモデルの解析

2) 学外活動

- ・ 文部科学省 脳科学研究戦略推進プログラム
中間評価委員
- ・ 日本学術振興会 科学研究費委員会審査第二部会委員

3) その他

理化学研究所客員主管研究員



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

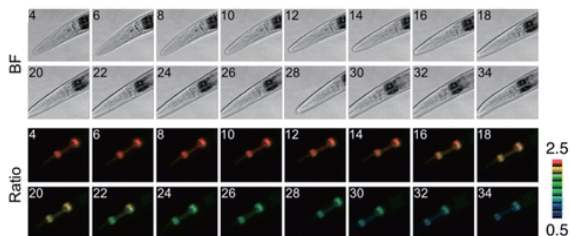


図 1 ATP センサータンパク質発現線虫。ATP 濃度を FRET ratio で評価する。麻酔剤の添加による ATP 濃度減少がわかる。

一方で、生命がエネルギーを変換して利用する過程は、老化や老化に伴う疾病と深い関係がある。寿命を変化させる遺伝子の中には、エネルギー代謝関係の酵素が沢山あり、エネルギー摂取量そのものが寿命を規定することも報告されている。我々は、エネルギー代謝の中心物質である ATP の細胞内濃度と寿命との関係を、分子イメージングという手法で解明する研究に着手した。その結果、加齢、麻酔効果、代謝制御と個体内の ATP レベルとの間にある相関が見られることを見つけた。このように、生

体エネルギー学の視点から老化・寿命の問題に取り組んでいる。

以上の研究背景に基づき、本研究室では下記の点について研究を展開している。

1) V-ATPase の回転触媒機構の解明

我々は、生化学、生物物理学 (1 分子観察)、構造生物学の手法を用いて、生体内で最も重要で創薬ターゲットでもある V-ATPase の機能・構造の解明を進めている。回転触媒機構によるエネルギー変換やイオン輸送機構の解明、V-ATPase を標的とした創薬につながる知見を得ることが目的である。

2) 個体および細胞での ATP レベルイメージング

ATP はその重要性から一定のレベルに保たれていると考えるのが自然だが、直近の研究成果は、ATP そのものがシグナル因子として働いていることを示唆する。ATP の産生・消費およびそのレベル変化と寿命や麻酔効果との関連を線虫 *Caenorhabditis elegans* や培養細胞を材料にして明らかにする。

3) 回転モーターを造る。

V-ATPase の V_1 部分は、ATP を分解して中心にある軸を回転させる。なぜ回転力 (トルク) が発生し、1 方向に回るのか、については解決すべき問題として残っている。軸そのものにトルクを発生させる要因があるのか、それとも軸を取り囲む固定子の構造変化が回転力発生の主要因なのかを明らかにしたい。そこで、ドメイン交換の手法により、キメラ V_1 を作成し回転力発生に必要な領域やドメイン間相互作用を調べる。回転分子モーターの設計原理を明らかにし、逆方向に回転する、もしくはトルクを数倍出す人工回転分子モーターを作成する。将来のナノマシンの駆動部の設計・作成に繋げる。

2. 本年度の研究成果

1) V_1 -ATPase が回転する際に、ADP が触媒サイトに留まることにより阻害型になる。これを ADP 阻害と呼ぶ。好熱菌由来の V_1 は、この阻害によってほぼ不可逆的に不活性化するが、腸球菌由来の V_1 は、この阻害に陥らず連続的に ATP を分解する。アミノ酸配列の相同性が 70% 以上と高く、構造もほぼ同じであり、この違いがどこに起因するかは未解明であった。そこでドメイン交換によ

り、両方のドメインもつキメラ型 V_1 を作成し、それぞれのキメラ V_1 の ADP 阻害への感受性を調べた。触媒サブユニットの N 末領域 (NT ドメイン)、ヌクレオチド結合ドメイン (NB 結合ドメイン)、C 末ドメイン (CT ドメイン) をドメイン交換したが、NB ドメインだけを腸球菌にしても ADP 阻害に感受性を示した。C 末ドメインのみの交換でも同じ性質を示したが、NB および CT ドメインを腸球菌のものに変換すると ADP 阻害不感受性になった。このことから両ドメインの相互作用が ADP 阻害感受性に重要な役割を果たすことが示された。さらに、このキメラはリン酸に対するアフィニティーが高くなっており、リン酸が ADP に先立って取れることで ADP 阻害が起こりやすくなることが明らかになった。(文献 3)

2) V_1 部分の軸の変異体を作成し、発生するトルクを測定した。その結果、軸の球状部分である F サブユニットが完全なトルク発生に必須であることが明らかになった。一方で、ほぼ棒状した軸でも半分のトルクが出たことから、棒に付属しているループ等がトルク発生に関与していないことが示唆された。(文献 2)

3) 加齢および麻酔作用と ATP 濃度変化の関係

老化・寿命研究において最も実績のあるモデル生物である *C. elegans* を材料とし、加齢に伴う ATP 濃度変化の有無、ATP 濃度と老化や細胞・個体死との直接関係の有無を調べた。あるメタボライトにより ATP レベルが大幅に減少し、かつ寿命が伸びることが示された。また、麻酔作用により ATP 濃度が減少することが示された。

3. Research projects and annual reports

1. Molecular basis of ADP inhibition of V-ATPase

Reduction of ATP hydrolysis activity of vacuolar-type ATPase/synthase (V_0V_1) as a result of ADP inhibition occurs as part of the normal mechanism of V_0V_1 of *Thermus thermophilus* but not V_0V_1 of *Enterococcus hirae* or eukaryotes. To investigate the molecular basis for this difference, domain-swapped chimeric V_1 consisting of both *T. thermophilus* and *E. hirae* enzymes were generated, and their function was analyzed. The data showed that the interaction between the nucleotide binding and C-terminal domains of the catalytic A subunit from *E. hirae* V_1 is central to increasing binding affinity of the chimeric V_1 for phosphate, resulting in reduction of the ADP inhibition. These findings together with a comparison of the crystal structures of *T. thermophilus* V_1 with *E. hirae* V_1 strongly suggest that the A subunit adopts a conformation in *T. thermophilus* V_1 different from that in *E.*

hirae V_1 . This key difference results in ADP inhibition of *T. thermophilus* V_1 by abolishing the binding affinity for phosphate during ATP hydrolysis.

2. ATP sensing system in whole nematode

Using a single-molecule technique, we observed the motion of the rotary motors. To obtain the torque values, we then analyzed the measured motion trajectories based on the fluctuation theorem, which states that the law of entropy production in non-equilibrium conditions and has been suggested as a novel and effective method for measuring torque. The measured torque of A_3B_3D was half that of the wild-type V_1 , and full torque was recovered in the mutant V_1 , in which the F-subunit was genetically fused with the D-subunit, indicating that the globular-shaped F-subunit reinforces torque generation in V_1 .

4. 発表、著書など

*Corresponding author

1. Nakanishi A., Kishikawa J., Tamakoshi, M., *Yokoyama K. (2014)

The ingenious structure of central rotor apparatus in V_0V_1 ; key for both complex disassembly and energy coupling between V_1 and V_0 . *PLoS One* **10**: accepted.

2. Kishikawa J, Seino A, Nakanishi A, Tirtom NE, Noji H, Yokoyama K., Hayashi K. (2014) F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase. *Eur Biophys J.* **43**, 415-422

3. Kishikawa J., Nakanishi A., Furuike S., Tamakoshi M., *Yokoyama K. (2014) Molecular basis of ADP inhibition of V_0V_1 . *J.Biol.Chem.* **289** 403-412

5. 学会発表など

招待講演、シンポジウム等

1. 横山謙: Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase. 2014 ATPase symposium, 東大, 5.14-15

2. 横山謙: V_1 と V_0 間の回転力の伝わり方. 2014 分子モーター討論会, 阪大, 6.19-20

3. 横山謙: The ingenious structure of central rotor apparatus in V_0V_1 ; torque transmission mechanism in the central rotor of V_0V_1 . 2014 日本生物物理学会年会 シンポジウム, 札幌, 9.19-20

学会発表

1. 岸川 淳一、中西 温子、波多野 友香、横山 謙: ドメインスワッピングによる V-ATPase の機能解析/ Functional analysis of V-ATPase using domain swapping techniques. 第 14 回日本蛋白質化学会年会 於 ワークピア横浜/横浜産産ホール 6.25-27

2. Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi:
Molecular basis of ADP-inhibition of V type
ATPase/synthase, European Bioenergetics Conference
2014 於 ポルトガル/リスボン大学 7.12-13
3. BaBa Mihori, Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi,
Nao Takeuchi, Shou Furuike, Ken Yokoyama:
Torque generation mechanism in V_1 motor
2014 日本生物物理学会年会, 札幌, 9.19-20

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究補助金 (挑戦的萌芽研究、26650039)

課題名: 1分子 V_0V_1 によるプロトン輸送の測定

研究代表者: 横山 謙 取得年度:H26-27 (2年)

科学研究補助金 (基盤研究B、24370059)

課題名: 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 取得年度 H24-26 (3年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動 科学研究補助金審査員

H24, H25年度 科学研究補助金の第一段審査を行った。

4) 受賞等 なし

5) その他 なし



生命資源環境学科

生命資源環境学科

【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ミクロからマクロな視点を備えた生物学までを教育・研究の根本に据えている。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たっており、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 年より応用特別研究で本格的な卒業研究に取り組む。生命資源環境学科独自の取り組みとして、卒業研究の終わりに卒業研究発表会を行っている。現在は、教員 1 名が、学生 3 ～6 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。卒業後は、大学院へ進学および食品、製薬、バイオ関連企業、公務員などへの就職をしている。

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

教授 金子 貴一

Prof. Takakazu Kaneko, ph.D



1. 研究概要

植物の細胞内や細胞間隙には、微生物が共生することがある。その微生物の多くは、通常、宿主となる植物に害をもたらすようなダメージを与えることがないことも知られている。これまでに、共生可能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。このような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により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る。

2. 本年度の研究成果

(1) 単細胞性シアノバクテリア・ミクロシスティスは外来性 DNA の侵入に対して多数の防御遺伝子を持っている。そのため、ファージとバクテリアの共進化を研究するための良いモデルとなる。この研究ではファージ感染由来培養液から単離した2系統のファージ耐性変異体の解析をおこなった。耐性に関わる変異を決定するには発現タンパク質解析をおこない、耐性株と感受性株を比較した。可溶性画分にちがいはみられなかったが、約 90 kDa のタンパク質が感受性株の疎水性画分特異的にみとめられた。PCR によりその遺伝子全長の塩基配列を決定し、ISP90と名付けたが、ISP90は既知のドメインをもたない膜結合タンパク質であると推測された。ゲノム上のこの領域について、種内多様性を塩基配列レベルで調べたところ、変異は検出されなかった。またこの領域はゲノミックアイランド内にある可能性が示唆されており、ファージから受ける生存選択圧の獲得に関わるのかもしれない。

(2) 近年、近縁系統内バクテリアの複数ゲノムが解読されるようになった。それらのデータ研究より明らかになった

ことから、実験レベルでの研究を展開するには、よく整備されたゲノムデータベースの存在が欠かせない。それらを達成するため、シアノバクテリア用の CyanoBaseと根粒菌/エンドファイト用の RhizoBase をこれまでに開発してきた。いずれのデータベースも対象生物全遺伝子のアノテーション情報の表示と利用に焦点が当てられて開発されており、手動アノテーションの情報が常時更新されている。本プロジェクト(TogoAnnotation システム)では、特定分野の専門家により文献で報告されている遺伝子名、遺伝子産物名、機能情報があつめられ、これらをデータベース情報に対応・反映させた。データベースではインターフェースとストレージが提供されており、文献リンク情報についてはデータベースの Geneview ページに表示されるように設計した。現状では、参照した文献の数としては CyanoBase で 5285 件、RhizoBase で 1216 件となっている。

3. Research projects and annual reports

Diversified microorganisms are able to colonize the intercellular, and sometimes also intracellular, spaces of plant tissues, without causing apparent damage to the host plant. 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) The cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, contains a large number of defense genes. Thus, it is a good model to study the co-evolution of phage and

bacteria. Here, we isolated and characterized two phage-resistant *M. aeruginosa* mutants that came from a phage intermediate-sensitive culture. To determine the mutation conferring resistance, a protein expression pattern analysis was performed comparing phage-sensitive and -resistant sub-strains. There were no apparent differences in expression patterns in the soluble fraction; however, a 90kDa protein in the hydrophobic fraction from the phage-sensitive sub-strain was observed. Using PCR, the entire sequence encoding the protein was determined. ISP90 contained no conserved domains and was predicted to be a membrane-associated protein. No mutations were detected in the nucleotide sequences coding ISP90 and diversification of ISP90 regions within this species were observed. Diversification of ISP90 regions within this species suggests a possible genomic island that may be subjected to selective pressures from phages.

(2) To understand closely examined genomes of some related bacteria, using comprehensively curated reference databases are important. We have developed CyanoBase for cyanobacterial genomic research, and RhizoBase for Rhizobia/endophytic bacteria. Both databases focus on the representation and reusability of reference genome annotations, which are continuously updated by manual curation. Domain experts have extracted names, products and functions of each gene reported in the literature. To ensure effectiveness of this procedure, we developed the TogoAnnotation system offering a web-based user interface and a uniform storage of annotations for the curators of the CyanoBase and RhizoBase databases. The results of these intensive annotations are displayed on the GeneView pages of each database. The number of references investigated for CyanoBase increased from 2260 in our previous report to 5285, and for RhizoBase, we perused 1216 references.

4. 論文, 著書など

T. Yoshida, R. Kamiji, G. Nakamura, T. Kaneko, Y. Sako:
Membrane-like protein involved in phage adsorption associated with phage-sensitivity in the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*. 2014. **34**, 69-75

T. Fujisawa, S. Okamoto, T. Katayama, M. Nakao, H. Yoshimura, H. Kajiya-Kanegae, S. Yamamoto, C. Yano, Y. Yanaka, H.

Maita, T. Kaneko, S. Tabata, Y. Nakamura: *Nucleic Acids Research*. 2014. **42**, D666-D670

5. 学会発表など

金子貴一、杉谷翔、原田龍一、平川英樹、川原田泰之、Elena Simona Radutoiu、佐藤修正: ミヤコグサエンドファイト *Rhizobium* sp. KAW12のゲノム解析. 第24回植物微生物研究交流会、佐賀市、2014.9.19-21

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(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)

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か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言われている。シロイヌナズナの近縁種を用いて動原体配列がどのように置換しているのか、動原体配列の違いが実際に染色体の分離に影響を与えるのかを解析している。

2) 転移因子の進化パターンの解析

転移因子は多くの生物でゲノムの大部分を占めるなど染色体の構造を考える上で非常に重要な要素である。転移因子が生存上重要な遺伝子に挿入することで生物に有害な効果をもたらすこともあり、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。順逆交配およびF1の減数分裂時の伝達率を次世代シーケンス技術を用いた網羅的な解析で明らかにしようとしている。

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ファミリーの遺伝子のうち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ものについて、その制御機構の解明をめざしている。

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、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。本年度はアブラナ科の植物を用いた網羅的なインプリンティング遺伝子の同定をおこなっている。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、オルガネラ由来配列が相同性依存的にメチル化される可能性を示唆している(図 1)。現在、この制御を起こす原因について解析を進めている。

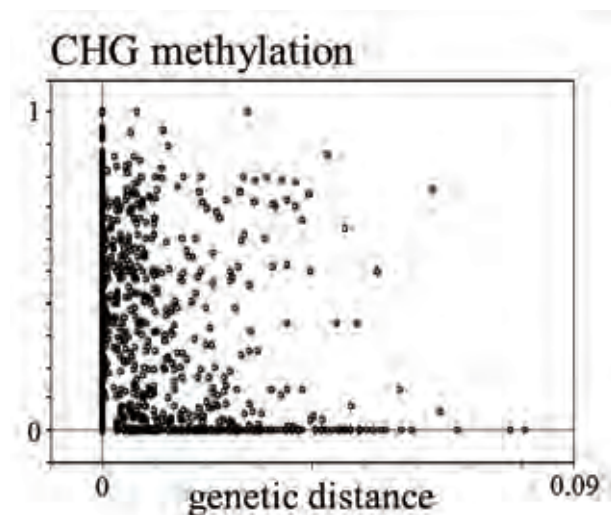


図1 オルガネラ由来配列のメチル化レベル
(縦軸はメチル化のレベル、横軸は挿入時期の推定値)

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 VANDAL family transposons. We found antisilencing factor in VANDAL family transposon and analyse its mechanisms in various members of the groups.

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. We are determining imprinted gene candidate in different Brassicaceae species to compare conservation and variation of the inprinted gene repertoire.

4) Evolution of nuclear transferred cytoplasmic genome DNAs

We analysed patterns of organelle originated DNA fragments in several plant species. We found age dependent methylation that could be regulated by RNAi independent manner. The findings will contribute understanding of general mechanisms about genome defense against invasive DNA fragments.

4. 論文, 著書など

T. Yoshida, H.Y. Furihata, A. Kawabe: Patterns of genomic integration of nuclear chloroplast DNA fragments in plant species. *DNA Research*, 21, 127-140.

A. Kosugi, J. Tamaru, K. Gotou, H.Y. Furihata, A. Shimizu, A. Kawabe, E. Harada: Metal accumulation by Arabidopsis halleri subsp. gemmifera at a limestone mining site. *Aust. J. Bot.* in printing.

5. 学会発表など

Aki Kosugi, Jun Tamaru, Kazumi Goto, Akifumi Shimizu, Akira Kawabe, Emiko Harada: Metal accumulation of Arabidopsis halleri ssp. gemmifera in a limestone mining site. 8th International Conference on Serpentine Ecology, Sabah Malaysia, 2014. 6. 9-13.

河邊昭、吉田貴徳: ゲノムインプリンティングによって制御される type 1 MADS 遺伝子の分子進化に及ぼす遺伝子重複の重要性. 日本遺伝学会第86回大会, 長浜市, 2014.9.17-19

吉田貴徳、降旗初佳、樽谷芳、角谷徹仁、河邊昭. 核内オルガネラ様配列のDNAメチル化修飾とその遺伝様式. 日本遺伝学会第86回大会, 長浜市, 2014.9.17-19

薄伊納、吉田貴徳、河邊昭: Brassica 属植物の type I MADS-box 遺伝子群のインプリンティングと進化様式の解明. 日本遺伝学会第86回大会, 長浜市, 2014.9.17-19

辻野裕大、吉田貴徳、降旗初佳、河邊昭: シロイヌナズナと近縁種の葉緑体ゲノムから核への移行パターンの解析. 日本遺伝学会第86回大会, 長浜市, 2014.9.17-19

吉田貴徳、降旗初佳、角谷徹仁、河邊昭: Epigenetic modification and molecular evolution of nuclear integrated organelle DNA fragments in plant species. 第38回内藤コンファレンス「生物システムの物質的基盤」、札幌市, 2014.10.7-10.

吉田貴徳: 核内オルガネラ様配列の分子進化とDNAメチル化の解析. 国立遺伝学会研究集会「オルガネラゲノムに支配される生命現象」、三島市, 2014.11.7

小杉亜希、田丸潤、後藤和美、降旗初佳、清水顕史、河邊昭、原田英美子: ハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* ssp. *gemmaifera*) とその類縁植物を用いた重金属超集積機構の解明に向けての研究. 近畿作物・育種研究会第178回例会, 京都, 2014.11.22.

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轍の分子機構

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: H26年(1年)

2) 学外活動 Genetica: 編集委員

3) その他 なし

植物分子発生生物学研究室

Laboratory of Plant Developmental Biology

准教授 木村 成介

Associate Prof. Seisuke Kimura, Ph. D.



1. 研究概要

生物の形の多様性が生じる仕組みを、「発生」「進化」「環境」の3つの観点から理解しようとするのが生態進化発生学である。植物分子発生生物学研究室では、植物の形の多様性、特に葉の形の多様性に興味を持ち、生態進化発生学を核とした研究を進めている。具体的には以下の4つの研究を展開している。

(1) 葉の形態の表現型可塑性の研究

北米に分布する半水生植物 *Rorippa aquatica* は、生育環境に応答して葉の形態を変化させる表現型可塑性を示す。この植物は、水没すると葉身が針状になった羽状複葉（ギザギザの葉）を発生する一方、陸上では生育環境に依存して単葉（丸い葉）から複葉まで様々な形の葉を発生する。このような葉形の変化は、水の抵抗を軽減したり、効率良く光合成を行なうために役立っていると考えられ、発生と環境の相互作用を理解し、生態進化発生学研究を推進するための最良のモデルとなる。そこで私達は、*R. aquatica* の表現型可塑性のメカニズムの研究を進めている。



図1 *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学的研究

自然界にはさまざまな形の植物がいる。その中でも葉の形は大きな変化に富み、植物の形を特徴づけているといっよい。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) 植物の栄養繁殖機構の研究

植物の高い再生能力は古くから知られており、多くの植物が栄養繁殖により増殖する。*R. aquatica* は、水分状況さえ適切であれば、葉の断面に複数の不定芽を形成して再生する。栄養繁殖の分子メカニズムについては不明な点が多く、特に葉の断面からの再生についてはほとんど研究がされてこなかった。そこで、こん植物をモデルにして、栄養繁殖機構を明らかにするための研究を進めている。

(4) 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

本年度は、葉の形態の表現型可塑性の発現に重要な遺伝子を同定するために、大規模なトランスクリプトーム解析をおこなった。これまでの研究により、*R. aquatica* は、低温もしくは強光条件下では葉が複葉になり、高温もしくは弱光条件下では葉が単葉になることがわかっていた。また、北米大陸の南部由来の地域集団のJ株は、北部由来のA株と比較して葉形変化の程度が著しく低い。そこで、まず、さまざまな温度(20, 25, 30°C)および光強度(60, 120E)でA株とJ株を生育させ、発生初期の葉原基を含む茎頂をサンプリングしてmRNA-seq解析を行った。得られたリードは、トランスクリプトーム参照配列にマッピングして、遺伝子発現解析を行った。*R. aquatica* の葉形は環境変化に応答して連続的に変化するので、葉の形態変化と相関して発現が変動する遺伝子群を同定すれば、重要な遺伝子が単離できる。そこで、葉の形態を定量化し、遺伝子発現プロファイルとの相関分析を行った。その結果、複葉の発生に関与する遺伝子などの興味深い遺伝子群が同定された。現在これらの遺伝子の機能解析を行っている。

(2) 葉の形態の多様性の進化発生学的研究

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。

ミズナとミズナのF₂を対象にしたQTL解析の結果、ミズナのミズナの葉の形態の違いには5つの遺伝子座が関与していることがわかった。そのうち1つの遺伝子座には、ジベレリン合成酵素の遺伝子が座乗しており、実際ミズナの葉原基にジベレリンを添加すると葉が丸くなったことから、ジベレリン合成酵素がミズナとミズナの葉形変異の原因の1つとなっている可能性が示唆された。現在、RAD-seqによるQTL解析により、詳細な遺伝子座の解析を行っている。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) 植物の栄養繁殖機構の研究

*R. aquatica*の葉断片からの再生の仕組みを明らかにするため、走査型電子顕微鏡による観察を行った。その結果、葉の切断から8日ほどで維管束周辺にカルスが形成され、14日ほどで不定芽が形成されることがわかった。また、細胞分裂やカルス誘導に働く遺伝子の発現をqRT-PCRにより解析したところ、切断後、3日目に発現が上昇していることがわかった。今後は、トランスクリプトーム解析により、栄養繁殖に重要な遺伝子を同定する計画である。

(4) 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。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。これまでの研究で、SOG1がATMによるリン酸化により活性化することがわかってきた。SOG1には5箇所のリン酸化部位(SQモチーフ)が存在しているが、そのうち2箇所のリン酸化がSOG1の機能に重要であることを明らかにした。また、リン酸化部位や他のドメイン構造などのアミノ酸配列の詳細な比較から、SOG1は植物の陸上への進出と並行して獲得された可能性が示唆された。

3. Research projects and annual reports

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

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

Plant can alter their development, physiology and life history depending on environmental conditions. This fundamental property is called phenotypic plasticity. The North American lake cress, *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. We investigate the mechanism of the heterophylly of lake cress. To understand global transcriptional alternations associated with heterophylly, we have performed transcriptome analysis. RNA was extracted from shoot apices from plants grown various environmental condition and used for mRNA-seq analysis. We identified the genes which expression levels are correlated with leaf shape changes and are trying to reveal the function of these genes.

(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, 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.

We have developed 83 CAPS markers and performed QTL (quantitative trait loci) analysis for leaf shape variation. The results suggested that the leaf shape variation is controlled by four QTLs. One of the major QTLs was detected on chromosome 10 and synteny analysis revealed that homolog of *GA20ox3* gene, which is involved in gibberellin biosynthesis, is located near this QTL. Application of gibberellin to Mizuna made the leaves simplified, suggesting that *GA20ox3* is responsible for leaf shape variation between Mizuna and Mibuna.

(3) Developmental studies on the mechanisms of vegetative propagation of Lake cress

R. aquatica can produce plantlets from leaf fragments that are striped off their stems without any external application of plant hormones. To reveal the mechanism of vegetative propagation in *R. aquatica*, we performed developmental and molecular analysis. SEM observation suggested that calli form on the surface of section around midrib in about 7 days after cutting of the leaves and the calli might originate from vasculature tissues.

(4) Analysis of genome maintenance mechanisms of plants

Arabidopsis SOG1, which is unique to plants, is a master transcriptional regulator of the DNA damage response. We showed that SOG1 is activated by AtATM through post-translational phosphorylation. Also we found that phosphorylation of at least two sites of SOG1 is required for its function.

4. 論文, 著書など

José Antonio Aguilar-Martinez, Naoyuki Uchida, Brad Townsley, Donnelly Ann West, Andrea Yanez, Nafeesa Lynn, Seisuke Kimura, Neelima Sinha: Transcriptional, post-transcriptional and post-translational regulation of *SHOOT MERISTEMLESS* gene expression in Arabidopsis determines gene function in shoot apex. *Plant Physiology*, in press

Hokuto Nakayama, Naomi Nakayama, Sumer Seiki, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Neelima Sinha, Seisuke Kimura: Regulation of the KNOX-GA gene module induces heterophyllic alternation in North American lake cress. *The Plant Cell* **26**: 4733-4748 (2014) (記事で紹介、表紙に採用)

Akiko Nakamasu, Hokuto Nakayama, Naomi Nakayama, Nobuhiko J. Suematsu, Seisuke Kimura: A developmental model for branching morphogenesis of lake cress compound leaf. *PLOS ONE* **9**: e111615 (2014)

Anthony Bolger, Federico Scossa, Marie E. Bolger, Christa Lanz, Florian Maumus, Takayuki Tohge, Hadi Quesneville, Saleh Alseekh, Iben Sørensen, Gabriel Lichenstein, Eric A. Fich, Mariana Conte, Heike Keller, Korbinian Schneeberger, Rainer Schwacke, Itai Ofner, Julia Vrebalov, Yimin Xu, Sonia Osorio, Saulo Alves Aflitos, Elio Schijlen, Josè M. Jiminèz-Gomèz, Malgorzata Rynhajlo, Seisuke Kimura, Ravi Kumar, Daniel Koenig, Lauren R. Headland, Julin N. Maloof, Neelima Sinha, Roeland C. H. J. van Ham, Renè Klein Lankhorst, Linyong Mao, Alexander Vogel, Borjana Arsova, Ralph Panstruga, Zhangjun Fei, Jocelyn K. C. Rose, Dani Zamir, Fernando Carrari, James J. Giovannoni, Detlef Weigel, Björn Usadel, Alisdair R. Fernie: The genome of the stress tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* **46**: 1034-1028 (2014)

稲垣麻美、内山幸伸、金井良博、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? - 細胞内局在の検討 - *京都産業大学総合学術研究所報* **9**号: 87-94(2014)

Kaoru O Yoshiyama, Seisuke Kimura, Hisaji Maki, Anne B. Britt, Masaaki Umeda: The role of SOG1, a plant-specific transcriptional regulator, in the DNA damage response. *Plant Signaling & Behavior* **9**: e28889 (2014)

Hokuto Nakayama, Kenji Fukushima, Tatsuya Fukuda, Jun Yokoyama, Seisuke Kimura: Molecular Phylogeny Determined Using Chloroplast DNA Inferred a New Phylogenetic Relationship of *Rorippa aquatica* (Eaton) EJ Palmer & Steyermark (Brassicaceae) - Lake Cress. *American*

Journal of Plant Sciences **5**: 48-54 (2014)

5. 学会発表など

The role of SOG1; a master regulator of the DNA damage response, Kaoru (Okamoto) Yoshiyama, Shohei Yamaoka, Takayuki Kohchi, Seisuke Kimura, Marchantia Workshop 2014, Kobe University, 2014.12.8-10

QTL 解析による京野菜のミズナとミブナに見られる葉形変異の遺伝学的解析、川勝弥一、上ノ山華織、五十嵐香里、中山北斗、矢野健太郎、久保中央、木村成介、第7回 Evo-devo 青年の会「変化する環境と発生への衝撃」、国立遺伝学研究所、2014.10.11-12

植物に特異的な DNA ダメージ応答因子 SOG1 の制御メカニズム、愿山(岡本)郁、木村成介、日本遺伝学会第86回大会、長浜バイオ大学、2014.9.17-19

非均一な成長場におけるチューリングパターンの挙動とそれを元に形成される分岐構造について、中益朗子、末松 J 信彦、木村成介、第11回生物数学の理論とその応用、京都大学、2014.9.16-19

RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を用いた *Rorippa aquatica* における異形葉性の分子基盤の解明、中山北斗、市橋泰範、坂本智昭、倉田哲也、木村成介、日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス、2014.9.12-14

京野菜であるミズナとミブナに見られる葉形変異の QTL 解析、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78回大会、明治大学生田キャンパス、2014.9.12-14

複葉に見られる分岐構造の非対称性形成に関する理論的なアプローチ、中益朗子、末松信彦、木村成介、日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス、2014.9.12-14

葉断面から再生する *Rorippa aquatica* の栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、Ali Ferjani、木村成介、日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス、2014.9.12-14

ダイコンの品種間に見られる葉形の変異に寄与する遺伝子の同定、久保俊彰、上ノ山華織、川勝弥一、五十嵐香里、矢野健太郎、木村成介、日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス、2014.9.12-14

環境に応じて葉形を変化させる植物 *Rorippa aquatica* を用いた葉形制御機構の解明、中山北斗、中山尚美、小島美紀子、

榎原均, Neelima Sinha, 木村成介, 植物形態学会第 26 回大会, 明治大学生田キャンパス, 2014.9.11

QTL 解析による京野菜のミズナとミブナに見られる葉形変異の遺伝学的解析, 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, 植物形態学会第 26 回大会, 明治大学生田キャンパス, 2014.9.11

Detection of leaf morphological trait loci in Mizuna and Mibuna by QTL analysis, Yaichi Kawakatsu, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Nakao Kubo, Kentaro Yano, Seisuke Kimura, The 25th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2014), The University of British Columbia, Vancouver, Canada, 2014.7.28-2014.8.1

Developmental and molecular mechanism of the heterophylly in North American lake cress (*Rorippa aquatica*; Brassicaceae), Hokuto Nakayama, Naomi Nakayama, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Neelima Sinha, Seisuke Kimura, The 25th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2014), The University of British Columbia, Vancouver, Canada, 2014.7.28-2014.8.1

Behavior of Tuning Pattern on Non-uniform Growing Filed, and Asymmetric Branched Patterns Generated by The Anisotropic Growth, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J. Suematsu, Seisuke Kimura, The Joint Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology and the Society for Mathematical Biology (JSMB SMB 2014), Osaka, Japan, 2014.7.28-2014.8.1

The regulatory mechanism of SOG1; A master regulator of the DNA damage response, Kaoru (Okamoto) Yoshiyama, Junya Kobayashi, Seisuke Kimura, Plant Genome Stability and Change 2014, Asilomar Conference Center, California, USA, 2014.7.17-20

Theoretical Approach for the Mechanisms Underlying the Heterophylly of Lake Cress (*Rorippa aquatica*), Akiko Nakamasu, Hokuto Nakayama, Nobuhiko J. Suematsu, Seisuke Kimura, 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, WINC AICH (Nagoya, Japan), 2014.5.27-30

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, 木村成介, 東京理科大学応用生物科学専攻セミナー, 東京理科大学野田キャンパス, 2014.5.19

Detection of leaf morphological trait loci in Mizuna and Mibuna by QTL analysis, Yaichi Kawakatsu, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Nakao Kubo, Kentaro Yano, Seisuke Kimura, 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山大学五福キャンパス, 2014.3.18-20

Transcriptome analysis using RNA-seq of *Rorippa aquatica*, an emerging model of heterophylly, Hokuto Nakayama, Tomoaki Sakamoto, Yasunori Ichihashi, Tetsuya Kurata, Seisuke Kimura, 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山大学五福キャンパス, 2014.3.18-20

植物ゲノムの恒常性維持に働く DNA 損傷応答因子のマスターレギュレーター SOG1 の制御メカニズム, 愿山(岡本)郁, 小林純也, 木村成介, 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山大学五福キャンパス, 2014.3.18-20

Theoretical Approach to Elucidate the Mechanisms Underlying the Heterophylly of Lake Cress, Akiko Nakamasu, Hokuto Nakayama, Nobuhiko J. Suematsu, Seisuke Kimura, CDB Symposium 2014, Regeneration of Organs: Programming and Self-Organization, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, 2014.3.10-12

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)

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)

平成26年度笹川科学研究助成

課題名:ミズナとミブナに見られる葉形変異の遺伝学的・発
生学的解析

研究代表者:川勝弥一(D1)、取得年度:H26年(1年)

2)受賞等

日本遺伝学会奨励賞(岡本郁),2014.9.17

3)その他

The Plant Cell 誌に発表した論文が、in brief(紹介記事)で紹介され、また、12月号の表紙に選ばれました。



博士後期課程1年の川勝弥一の研究プロジェクトが、平成26年度の植物科学グローバルトップ教育推進プログラム(奈良先端科学技術大学院大学)の課題に採択されました。



集合写真

動物分子生態学研究室

Laboratory of Animal Molecular Ecology

准教授 高橋 純一

Associate Prof. Jun-ichi Takahashi, Ph. D.



1. 研究概要

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

2. 本年度の研究成果

エゾオオマルハナバチの室内飼育コロニーによるトマト訪花試験

トマトハウスの受粉用昆虫として1991年にセイヨウオオマルハナバチが輸入されたが、帰化による生態系への影響が問題となり、2006年に特定外来種に指定された。新規トマト就農者は本種による授粉ができないため、北海道ではトマト生産の大きな問題になっている。北海道在来種のエゾオオマルハナバチを対象にトマトハウス用花粉交配種として実用化を進めるにあたり、室内飼育による増殖技術の開発、系統選抜および地域間の遺伝子構造の把握を目的とした遺伝学的解析、トマトハウスでの訪花実験を行った。飼育方法に関しては、既存法を変更することで増殖可能であった。ミトコンドリア DNA による解析から、地域間で遺伝的隔離は起きていないことが示された。トマトハウスでの訪花試験により、セイヨウオオマルハナバチと比較して訪花能力は同等以上であることが示唆される結果を得た。これらの結果をまとめると、エゾオオマルハナバチは、セイヨウオオマルハナバチに代わる有望な代替在来種であることが示された。



トマトの花に訪花するエゾオオマルハナバチ

日本で飼養されているセイヨウミツバチの系統解析

日本で飼養されているセイヨウミツバチ *Apis mellifera* の系統とアフリカ化ミツバチやアフリカ系統が侵入してきたときの半別法としてミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 及び塩基配列解析の適用性の検討を行った。ヨーロッパ及びアフリカと日本各地の12地域のミツバチ群を使用し、ミトコンドリア DNA の COI-COII 間を特異的に増幅する PCR を行ったところ PCR 産物長の違いで亜種間を識別できた。日本のセイヨウミツバチは、すべての個体が *A.*

mellifera ligstica の C 系統と一致していたため PCR と電気泳動によりアフリカ系統のセイヨウミツバチ *A. mellifera scutellata* と識別可能であることがわかった。M 系統のセイヨウミツバチは輸入されている可能性もあるため、もし M 系統のハプロタイプが見つかった場合には、PCR-RFLP と塩基配列の解析の方法を併用することによりセイヨウミツバチの遺伝構造やアフリカ産と欧州産のセイヨウミツバチの識別が可能であることが明らかになった。

静岡県桶ヶ谷沼におけるベッコウトンボ集団の遺伝的多様性について

2008年に同地から採集された脱殻20個の組織片から DNA 抽出を行い、ミトコンドリアの系譜を推定した。COI 遺伝子から COII 遺伝子にまたがる領域について11個のハプロタイプが検出された。2008年において少なくとも11個の母系列が受け継がれていたことが明らかになった。サンプル数に比して大きな数字であるので遺伝的多様性が比較的良好に保たれていた可能性が高い。

バシコルトスタン共和国産ミツバチのミトコンドリア DNA の全長解析(岩口健太郎4年次生)

ロシア連邦のバシコルトスタン共和国は養蜂が盛んな地域である。そこで飼養されているミツバチ(通称バシキールビー)は、低温耐性に優れていることが報告されている。本研究室では、国立バシコルトスタン農業大学バイオテクノロジー・獣医学部とバシキールビーの養蜂・農業利用を目的とした遺伝学的解析を進めている。本研究では、バシキールビーの系統的な位置を明らかにするためミトコンドリア DNA の全長解析による系統地理学的解析を行った。得られた配列のうち非コード領域は、セイヨウミツバチのグループに特徴的な配列構造を持っていることがわかった。セイヨウミツバチの種内系統解析の結果から、バシキールビーはロシア地域及びコーカサス地方の *A. m. caucasia* と近縁であるが、遺伝的には分化していることが示唆された。さらにミトコンドリア DNA の全長解析が終了している *A. m. ligstica*、アルジェリアの *A. m. intermissa*、南アフリカの *A. m. scutellata*、シリアの *A. m. syriana* と比較をしたところ、セイヨウミツバチ内でのミトコンドリア DNA の遺伝子構造は保存性が高いことが明らかになった。

対馬に侵入したツマアカスズメバチが生物多様性に与える影響(高橋稜一4年次生)

東南アジアに広く自然分布しているツマアカスズメバチ(*Vespa velutina*)は、2000年代前半に中国からヨーロッパや韓国に侵入し、ミツバチの捕食、人への刺傷、農作物の食害、近縁在来種の減少といった影響を与えている。2012年には、本種の働き蜂が長崎県対馬市で初めて捕獲されている。ミツバチの天敵であるスズメバチの帰化は、養蜂被害だけでなく、希少な生態系を形成している対馬では、生物多様性への影響も懸念される。本研究では、ツマアカスズメバチの対馬における生活史、帰化状況、侵入経路の推定、在来のミツバチやスズメバチへの影響を調査し、本種の帰化による対馬での生態学的リスク評価を行った。島内での分布調査により、2013年は44%、2014年は68%の調査地点で本種が確認され、分布は北部に集中していた。2013年に本種の21個の巣を採集・分析したところ、繁殖個体が見つかったことから既に島内で定着していることが確認された。侵入経路を特定するために東南アジアの13ヶ所と韓国・対馬の84個体のミトコンドリアDNAのCOI遺伝子を解析したところ、15個のハプロタイプが見つかった。対馬個体群のハプロタイプは、韓国と中国浙江省のハプロタイプと完全に一致したことから、中国から韓国を経由して侵入したことが推定された。本種による養蜂被害を確認するため捕食行動の観察したところ、ミツバチの巣の状態により3種類の方法で捕食していた。ミツバチの捕食量を推定すると、本種の巣1つあたり年間1,000個体以上を捕食するためミツバチ群が死滅する原因になることが示唆された。また、キイロスズメバチ女王蜂の受精嚢内精子DNAを解析すると、本種との種間交尾が33%確認され、交雑・遺伝子汚染が危惧された。これらの結果から、本種の対馬での帰化は、養蜂被害や生物多様性の減少を引き起こす可能性が高いことから、侵入方法の特定と早急な防除方法の確立が必要である。



ミトコンドリアDNA解析によるミツバチヘギイタダニの侵入経路の推定(原田レオナ4年次生)

ミツバチヘギイタダニ(*Varroa destructor*)は、アジアに分布するトヨウミツバチを宿主とする外部寄生性のダニである。セイヨウミツバチが、20世紀に養蜂種としてアジア地域に導入されるようになると、抵抗性のないセイヨウミツバチに宿主転換をするようになった。本種は吸血性のため被寄生個体は小型化や奇形化といった直接的な被害のほかに、ミツバチの病原微生物の媒介を行い、重寄生になるとセイヨウミツバチ群は死滅する。世界的には、

ミツバチ群の死滅要因のうち約20%が本種によるものであると推定されている。国内では、本種の寄生が原因で起こるバロア病は、家畜伝染病予防法において監視伝染病に指定されている。本種は、セイヨウミツバチに対して病原性の強弱が異なる2つの系統が知られている。世界各地で大きな被害を発生させている致死型の系統は、セイヨウミツバチの輸出入経路から推定すると、日本、韓国、中国のいずれかに由来すると考えられている。今回、世界各地で重篤な被害をもたらしているミツバチヘギイタダニの致死型の起源を推定するために、ミツバチ群の寄生状況とミトコンドリアDNAの遺伝子型から致死型の起源と分散経路の推定を行った。

3. Research projects and annual reports

Genetic structure of apicultural honeybee Apis mellifera in Japan

The apicultural honeybee *Apis mellifera* L. has been introduced for about hundred years in Japan. We sequenced the non-coding intergenic region between COI and COII mitochondrial genes from 12 populations collected through Japan. About 50 different haplotypes have been reported for the non-coding region of *A. mellifera*. This study detected *A. mellifera ligstica* type in Japan, which we consisted haplotype C1. These results suggested that PCR product only was distinguished from African haplotype. In addition PCR-RFLP and sequencing of the non-coding region increased the reliability of diagnostic when found other haplotype from Japan.

A preliminary report on the genetic diversity of a highly endangered dragonfly, Libellula angelina Selys, 1883, in the Okegaya-numa Pond, Shizuoka, Japan

Libellula angelina is one of the most endangered dragonfly species in Japan. To conduct some conservation genetic study, the genomic DNA extracted from exuviae, not from tissues of living individuals, seems to be useful because the effect on the fitness of individual is as small as possible. In this study, we observed the genetic diversity of *L. angelina* in the Okegaya-numa Pond population based on the sequence of mitochondrial DNA fragment (829 bps). Eleven haplotypes were obtained from 20 samples. Thus, as much as 11 maternal lineages in the pond were succeeded to the adults of the year 2008. This is rather large number in consideration of the sample size.

4. 論文, 著書など

1. Takeuchi T, Kiyoshi T, Takahashi J, Nomura T, Tsubaki Y. Genetic differentiation in the endangered myrmecophilous butterfly *Niphanda fusca*: a comparison of natural and secondary habitats. Conservation Genetics inpress. DOI: 10.1007/s10592-015-0717-1
2. 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, Shizuoka, Japan. *Tombo*. 2014. 5, 61-63
3. 高橋純一 日本におけるミツバチの減少原因について - 本日にミツバチたちは消えたのか. *環境と健康*. 2014. 2, 12-22.
4. 田中美子, 高崎摩依子, 瀧谷崇大, 高橋純一, 廣野由里子, 竹内実 日本国産蜂蜜によるマクロファージと好中球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*. 2014. 13, 1-16.
5. 野村哲郎, 高橋純一, 竹内剛 不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率の評価. *京都産業大学先端科学技術研究所所報*. 2014. 13, 17-23.
6. 高橋純一, 竹内実, 松本耕三, 野村哲郎 日本で飼養されているセイヨウミツバチの系統. *京都産業大学先端科学技術研究所所報*. 2014. 13, 25-37.

5. 学会発表など

1. 竹内剛, 清拓哉, 高橋純一. 授粉用昆虫としてのエゾオオマルハナバチの適性. 第59回日本応用動物昆虫学会, 山形市. 2015.3.26-28.
2. 高橋純一, 竹内剛, 中川修二郎, 手塚俊行, 野村哲郎. エゾ



オオマルハナバチの室内飼育コロニーによるトマト訪花試験. 第150回日本昆虫学会近畿支部会. 大阪市. 2014.12.14.

3. 高橋純一(4年次生), 清拓哉, 高橋純一. 対馬に侵入した外来種ツマアカスズメバチ (*Vespa velutina nigrithorax*) の帰化状況とミツバチの捕食行動. 第150回日本昆虫学会近畿支部会. 大阪市. 2014.12.14.
4. 高橋純一. 札幌市立大通高等学校. 札幌市. 2014.11.13.
5. 西田誠(3年次生). 全国学生養蜂サミット. 文部科学省知の拠点整備事業. 名古屋市. 2014.10.12.

6. 高橋純一. 京都産業大学岐阜県同窓支部会. 岐阜市. 2014.10.4.
7. 高橋純一. 第4回養蜂スタートアップ講座(箕面公園昆虫館). 大阪市. 2014.9.6.
8. 高橋純一. 社団法人ふくい農林水産支援センター. 福井市. 2014.8.26.
9. 高橋純一. 第3回養蜂スタートアップ講座(箕面公園昆虫館). 大阪市. 2014.8.23.
10. 高橋純一. 第2回養蜂スタートアップ講座(箕面公園昆虫館). 大阪市. 2014.8.2.
11. 高橋純一. 第1回養蜂スタートアップ講座(箕面公園昆虫館). 大阪市. 2014.7.19.
12. 高橋純一. 沖縄県養蜂組合総会. 読谷村. 2014.7.17.
13. 高橋純一. 栃木県養蜂組合総会. 那須塩原市. 2014.7.8.
14. 高橋純一. 京都府立須知高等学校. 丹波町. 2014.5.29.
15. 高橋純一. 農林水産省消費・安全局動物衛生課家畜衛生講習会. つくば市. 2014.5.22.

6. その他特記事項

1) 外部資金

1. 科学研究費補助金 基盤研究 C 侵略的外来種ツマアカスズメバチの帰化状況と生態情報にもとづいた防除法の確立 研究代表者: 高橋純一, 平成 26-28 年度(3年)
2. 環境省 環境研究総合推進費 若手枠 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, 平成 24-26 年度(3年)
3. 科学研究補助金 基盤研究 B 代表 野村哲郎 選抜育種による北海道産マルハナバチの高受粉能力系統の作出 研究分担者: 高橋純一, 平成 24-26 年度(3年)
4. 科学研究補助金 基盤研究 B 代表 土田浩治 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, 平成 24-26 年度(3年)
5. 財団法人日本自然保護協会 対馬に侵入した外来種ツマアカスズメバチによる在来生態系に与える影響調査 研究代表者: 高橋純一, 平成 26-27 年度(2年)
6. 社団法人日本養蜂協会 蜂病検査システムの確立とミツバチ死亡事例の調査 研究代表者: 高橋純一, 平成 25-26 年度(2年)
7. 株式会社スジョン・ジャパン ミツバチ飼料へのカシス粉末添加試験による影響調査 研究代表者: 高橋純一, 平成 25-26 年度(2年)
8. 東京農業大学生物資源ゲノム解析センター「生物資源ゲノム解析拠点」公募共同研究 代表 木村澄 日本在来種ニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) の全ゲノム解読 研究分担者: 高橋純一, 平成 25-27 年度(3年)

2) 知財権等

アピタミン(ミツバチ用補助飼料)日本配合飼料㈱との委託研究

日本配合飼料㈱との委託研究『養蜂用ビタミン・ミネラル混合飼料の開発:2012年9月1日~2013年3月31日』として、ミツバチ不足に対応するための添加飼料ビタミン剤のアピタミンを開発・試験を行い2014年に上市



<http://www.nippai.co.jp/service/specialty/pdf/apitamin.pdf>

3) 学外活動

高橋純一 社団法人養蜂産業振興会:理事

高橋純一 みなべ・田辺地域世界農業遺産推進協議会:専門委員

高橋純一 農林水産省消費・安全局動物衛生課家畜衛生講習会:養蜂担当講師

高橋純一 財団法人自然環境研究センター:マルハナバチ利用方針検討会委員

高橋純一 蜜蜂医薬品開発協議会:副会長

高橋純一 みつばち協議会:委員

高橋純一 京都府養蜂組合:顧問

高橋純一 和歌山県養蜂組合:顧問

4) 受賞等

1. 高橋純一(4年次生) 第2回生命資源環境学科卒業研究発表会 優秀賞 2015.3.2.



5) その他

1. 高橋研究室. 京都府立植物園「私の好きな木」ブース設置. 2014.11.9.

2. 高橋研究室. 京都府立植物園「私の好きな木」ブース設置. 2014.5.3.



左上:中濱奏絵(修士)、卒業論文発表会(4年次生). 右上:岩口健太郎、左下:高橋稜一、右下:原田レオナ.



ゼミ夏合宿 in 立山. 左から:上田康徳、西田誠、若宮健、唐井大輝、西本愛.

タンパク質構造生物学研究室

Laboratory of Protein Structural Biology

教授 津下 英明

Prof. Hideaki Tsuge, Ph.D

助教 鶴村 俊治

Assit. Prof. Toshiharu Tsurumura



1. 研究概要

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

タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要不可欠なものとなりつつある。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、宿主のタンパク質を修飾し、宿主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 ウイルスによって 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ばと考えられる。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) その他の複合体の構造生物学研究

2. 本年度の研究成果

(1) 我々の研究室は、細菌の分泌する ADP リボシル化毒素を研究の主題として長らく研究を行ってきた。イオタ毒素-アクチン複合体結晶構造は、このタイプの毒素では初めてのヒト基質タンパク質複合体である(PNAS 2008, PNAS 2013)。さらに現在 C3 exoenzyme の結晶構造解析を進めている。C3 は RhoA のアスパラギンを特異的に ADP リボシル化することが知られている。1987 年に発見された C3 は、その特異性から Rho GTPase の機能を探るツールとして多くの生化学の研究室で使われ、RhoA, Rac1, Cdc42 の機能分担がわかってきた。Rho GTPase はその GTP 結合型と GDP 結合型で、構造が変化し、シグナル伝達スイッチとして働く。昨年度の 4 回生(江村)が、C

3 が修飾した ADP リボシル化 RhoA の結晶構造解析を行い、その修飾された構造を高い分解能で明らかにした(図 1)。この研究は、生命資源環境学科の卒業研究発表会で最優秀賞を受賞した(平成 26 年 2 月)。また、今年の研究室配属の 4 回生(戸田)により、C3-RhoA 複合体の結晶構造解析が進められている。論文投稿準備中(平成 26 年 12 月)の複合体構造論文は ADP リボシル化毒素の研究においてマイルストーンとなる重要な報告である。これらに研究は、プロジェクト助教の鶴村および研究員の吉田の強力なサポートで行われている。

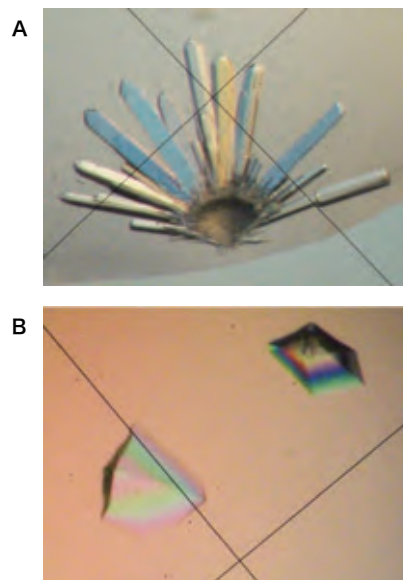


図1 (A) ADPリボシル化されたGTP結合型RhoAの結晶
(B) ADPリボシル化されたGDP結合型RhoAの結晶

(2) 長らくインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造研究を進めてきた。今年、同じ3種のサブユニットからなるサケアネミアウイルス由来の PB2 タンパク質の機能と構造を明らかにするために、その発現系の構築と、タンパク質精製を行った(4回生 竹内、村田)。

(3) 他大学との共同研究により、*Aeromonas sobria* 由来のセリンプロテアーゼ ASP について研究を進めた。既知のセリンプロテアーゼは必ずその N 末端にプロ配列を持ち、これがプロ配列以降に続く触媒ドメインのフォールディングに必須の役割を担っている。その一方で ASP はプロ配列を持たず、

その代わりに ORF2 という別のタンパク質がフォールディングに必須であることが示唆されていたが、その詳細なフォールディング機構は分かっていなかった。そこで我々はまず、ASP と ORF2 の複合体の構造を X 線結晶構造解析により決定した(図 2A,B)。その結果、ORF2 と ASP の結合様式は既知のセリンプロテアーゼとプロ配列の結合様式に非常に似ていることが明らかになった。さらに生化学実験により、ORF2 の N 末端、C 末端共に ASP のフォールディングに大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。最終的に、ASP と ORF2 のように触媒ドメインとプロ配列に相当するドメインが別のタンパク質として発現されるセリンプロテアーゼはグラム陰性菌に広く存在し、新たなファミリーを形成していることを示した(図 2C)。投稿した英語論文は改訂中である(平成 26 年 12 月)。

他大学との共同研究により、シアノバクテリア由来のペルオキシダーゼ DyP の生化学と構造研究を行っている。他大学との共同研究により、博士課程の学生の Toniti により、シアノバクテリア由来の Glutamine 合成酵素の 12 量体の構造研究と、その調節機構研究が進んでいる。さらに、システムの嶋本、中山との共同研究で、新規の GFP の構造と機能の研究が進んでいる。

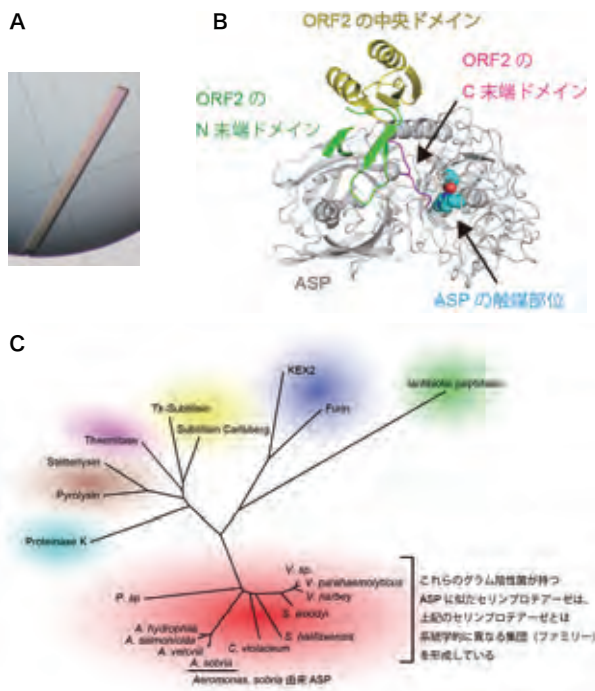


図2 (A) ASP-ORF2複合体の結晶 (B) ASP-ORF2複合体の構造 (C)セリンプロテアーゼの系統樹

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) We have been studying Actin ADP-ribosylating toxin (ADPRT) such as iota toxin from *C.perfringens* which ADP-ribosylates Arg-177 of α -Actin for many years. In 2013, 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 and proposed the strain-alleviation model for the reaction. In this family, this complex is only available structure. Now we are trying to study another ADP-ribosylating toxin C3 which modifies RhoA. C3 has long been used to study the diverse regulatory functions of Rho GTPases. However, how C3 recognizes its substrate and ADP-ribosylation proceeds is still poorly understood. We are trying to reveal the complex structure of C3-RhoA.

(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. Though we have been revealed structures of PB2 domain (PB2 middle (PLoS One 2013) and C-terminal (JBC 2009)), we furthermore would like to reveal the function and structure of whole RNA-polymerase complex. Now we are trying to study the similar RNA-polymerase complex in sake anemia virus.

(3) The main syndrome caused by infection with *Aeromonas* is gastroenteritis, though in severe cases sepsis may occur. One of the toxic factor expressed by *Aeromonas* is serine proteinase. We have identified the novel serine protease from *Aeromonas sobria* (ASP), which lacks a propeptide. Instead, ORF2, a protein encoded just downstream of *asp*, appears essential for proper ASP folding. The mechanism by which ORF2 functions remains an open question, as it shares no sequence homology with any known intramolecular propeptide or other protein. We revealed the crystal structure of the ORF2-ASP complex. Furthermore we found that ASP and its homologs form a novel family of subtilases having an external chaperone. Together with biochemical data, we are trying to publish in 2015.

4. 論文著書など

• Tsurumura T, Qiu H, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a surface mutant of the middle domain of PB2 from human influenza A (H1N1) virus. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 70(Pt 1):72-5.(2014)

• Tsurumura T, Tsuge H.

Substrate selectivity of bacterial monoacylglycerol lipase based on crystal structure. *J Struct Funct Genomics.* 15(3):83-9.(2014)

・ Tsuge H, Tsurumura T.

Reaction Mechanism of Mono-ADP-Ribosyltransferase Based on Structures of the Complex of Enzyme and Substrate Protein. *Curr Top Microbiol Immunol.* 384:69-87. (2014)

・ 鶴村俊治, 津下英明

修飾酵素と基質タンパク質の反応前後における複合体結晶の作製と構造に基づく反応機構—ウェルシュ菌イオタ毒素 Ia によるアクチンの修飾機構— *日本放射光学会誌* Vo. 27, No. 5, p233-240. (2014)



5. 学会発表など

・ Yayoi Tsumori, Toshiharu Tsurumura, Hideaki Tsuge: Visualization of actin mono-ADP-ribosylation in iota toxin and actin complex structure. 2014 ASBMB annual meeting (SanDiego), 2014 4.26-30

・ 鶴村俊治, 津守耶良, 秋こう, 津下英明: 「ウェルシュ菌毒素 Ia による actin の ADP リボシル化機構」 第 61 回日本生化学会 近畿支部年会、京都産業大学 (京都)、2014. 5. 17

・ 吉田徹, 津下英明, 久堀徹, 菅野靖史: 「Dye-decolorizing peroxidase の触媒サイクルと基質結合部位」 第 61 回日本生化学会 近畿支部年会、京都産業大学 (京都)、2014. 5. 17

・ 津下英明: 「タンパク質の構造の見方・使い方: 細菌毒素による翻訳後修飾の構造生物学」 徳島大学薬学部大学院特論 (徳島大学)、2014. 7. 30 (招待講演)

・ 戸田暁之, 江村晃太, 吉田徹, 津守耶良, 鶴村俊治, 津下英明: 「ADP リボシル化 RhoA の構造とそのシグナル伝達への影響」 日本生化学会、京都国際会館(京都)、2014.10.15-18

・ 津下英明: 「細菌感染症因子とホストタンパク質複合体の構造生物学 勝沼信彦先生とご一緒した12年間の健康科学研究所での思い出」、第 7 回共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウム 勝沼信彦名誉教授追悼記念講演会、徳島大学疾患酵素学研究センター (徳島) 2014.11.14 (招待講演)

・ 津下英明

「ADP リボシル化 RhoA の立体構造に基づく阻害機構」 ビタミンB研究協議会、大阪工業大学うめきたナレッジセンター (大阪)、2014.11.22

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

課題名「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 年 (2 年)

文部科学省 戦略的研究基盤研究支援事業

課題名「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 年 (5 年)

科学研究費助成事業・若手研究 (B)

課題名「ピロリ菌発がん因子 Tip α の構造と活性の相関」

研究代表者: 鶴村俊治, 取得年度: H26-27 年 (2 年)

(2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member (2014-2018)

Journal of Crystallography (Hindawi) Editorial board

Advances in Biology (Hindawi) Editorial board

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

(3)第61回 生化学会 近畿支部会 京都産業大学開催に研究室として協力



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、次世代シーケンサーを活用したゲノム解読、ゲノムの変異や進化機構の解明などの基礎的研究から、遺伝子組換え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)については、これまで外部資金で実施されてきた同名のプロジェクトが平成25年3月に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ぎ、現在も継続している。一方、平成26年4月に新たな外部資金が採択されたことを受け、4)ゲノム解読を基盤とする高等植物ミトコンドリアゲノムの包括的研究、というプロジェクトを開始した。

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。とりわけ葉緑体の遺伝子組換えの技術開発は、重点的に実験を進めており、栽培タバコの葉緑体への遺伝子導入方法が確立されたことを受けて、最近ではパンコムギ、レタス、トマトなど他の作物で、葉緑体の遺伝子組換え体を作成しようとしている。これまでタバコでは、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) を効率的に除去できる植物を育成することに成功した。一連の研究により、非生物学的ストレスに強い植物を育成する1つの方法を提示できたものと考えている。

上記2)および4)のプロジェクトでは、雄性不稔と稔性回復システムの分子機構ならびにその多様性形成メカニズムを包括的に研究している。雄性不稔とは、植物体は正常に生育するものの、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

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr.

助教 高橋 亮

Assist. Prof. Kiyoshi Takahashi, Dr. Sci.



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。また、ダイコンに雄性不稔をもたらすことが知られている *Brassica maurorum* など複数のアブラナ科野生種のミトコンドリアゲノムの解読も行っている。

なお3)のプロジェクトでは、細胞質置換コムギという希少な材料を用いて、コムギの近縁種であるエギロ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、植物のグルタチオンの濃度を高める実験を行っている。一昨年、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。また翌年、これら組換え体を自殖させて多数の種子を得て、T₁ 系統を確立した。これらの組換え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ず、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。

このタバコの実験結果を受けて、今年度はレタスの葉緑体に GSH1 をコードする遺伝子を導入することを試みた。方法は昨年レタスの葉緑体へ初めて遺伝子 (フェリチン) を導入することに成功した方法に従った。すなわち無菌的に 4~5 週間生育させたレタス (品種“キングクラウン”) の葉へ、計 65 ショットのパーティクルボンバードメントを行った。その結果、約 2 ヶ月後、2 つのカルスが得られ

た。しかし、一方のカルスはガラス化してしまいシュートは得られなかった。もう一方のカルスからは、計 8 つのシュートが得られたものの、2 つがガラス化、また 1 つが順化の段階で枯れた。最終的に、1 つのカルスに由来する 5 個体の組換え体が得られた。現在、詳細な特徴付けのため、組換え体を自殖させて T₁ 系統の種子を得ようとしている。

植物の栽培・管理を最適化させるため、平成 26 年度も国内の共同利用・共同研究拠点で共同研究を実施している。具体的に鳥取大学乾燥地研究センターでパンコムギのアカダルマ及び Bob White 両品種を栽培してもらい、形質転換実験に使用する外植片(開花後 2 週間の未熟胚)を 11 月~12 月に入手できる体制を構築した。またトマトは、一昨年、筑波大学の形質転換植物デザイン研究拠点から導入した、子葉を出発材料とする効率の良い培養・再分化系を用いている。しかしながら、パンコムギとトマトについては、これまで組換え体が得られていない。

上記3)のプロジェクトについては、昨年引き続き *Triticum monococcum*, *Aegilops searsii* 及び *Secale cereale* の細胞質を持つ置換コムギ 3 系統について、ミトコンドリアのゲノム解読を進めている。また4)のプロジェクトとの関連で、栽培・野生オオムギ各 1 系統、雄性不稔・可稔タマネギ各 1 品種のミトコンドリアのゲノム解読にも着手している。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した課題を研究テーマとした大学院生、学部生がいなかったため、目立った進展はなかった。

3. Research projects and annual reports

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

- 1: Production of transplastomic plants.
- 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. As the result on this, transplastomic lettuce containing ferritin and *gsh1* gene have been successfully produced.

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.

Inspired by the interesting results obtained from the second and the third projects, we have planned to do the fourth project named "Comprehensive studies on the plant mitochondrial genome using the next-generation sequencer". In this project, mitochondrial genomes of several crops such as barley, rye and onion have been analyzed.

4. 論文, 著書など

- Y. Tanaka, M. Tsuda, K. Yasumoto, T. Terachi, H. Yamagishi (2014): The complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oleracea* and analysis of coexisting mitotypes. *Current Genetics* **60**, 277-284
- X. Gong, C. Guo, T. Terachi, H. Cai, D. Yu (2014): Tobacco PIC1 mediates iron transport and regulates chloroplast development. *Plant Mol Biol Rep*. DOI 10.1007/s11105-014-0758-5.

5. 学会発表など

- 寺地 徹: 葉緑体の遺伝子を組換える. 京都産業大学創立50周年記念事業リエゾンオフィスシンポジウム(招待講演), 京都市, 2014.7.12
- 辻 雅之, 植村 香織, 森田 重人, 山本 真紀, 寺地 徹: 葉緑体の遺伝子組換えタバコ作出の過程で得られた斑入り系統の解析I. 斑入りの温度感受性. 第126回日本育種学会講演会, 都城市, 2014.9.26-27

山岸 博, 田中 義行, 寺地 徹: クロガラシ(*Brassica nigra*)におけるミトコンドリアゲノムの全塩基配列. 第126回日本育種学会講演会, 都城市, 2014.9.26-27

岡部 真弥, 房 相佑, 山岸 博, 寺地 徹: *Brassica maurorum*の細胞質を持つ雄性不稔ダイコンのミトコンドリアゲノムの解読. 第126回日本育種学会講演会, 都城市, 2014.9.26-27

山本一皓, 寺地 徹, 山岸 博: ダイコン品種間における核遺伝子*msh1*の塩基配列. 第126回日本育種学会講演会, 都城市, 2014.9.26-27

辻村 真衣, 森 直樹, 山岸 博, 寺地 徹: 4倍性コムギのミトコンドリアゲノムのタイプを変更する核ゲノム領域の特定. 第126回日本育種学会講演会, 都城市, 2014.9.26-27

植村 香織, 辻 雅之, 森田 重人, 山本 真紀, 寺地 徹: 葉緑体の遺伝子組換えタバコ作出の過程で得られた斑入り系統の解析II. 葉緑体DNA分子の性状. 第126回日本育種学会講演会, 都城市, 2014.9.26-27

寺地 徹: 植物のゲノムにみられる共生と競争. 朝日地球環境フォーラム2014(招待講演), 千代田区, 2014.10.2



6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費助成事業・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)

科学研究費助成事業・基盤研究(B)

課題名: ゲノム解読を基盤とする高等植物ミトコンドリアゲノムの包括的研究

研究代表者: 寺地 徹, 取得年度: H26-28年(3年)

科学研究費助成事業・基盤研究(C)

課題名: 日本産ダイコンの多様性に果たす野生ダイコンの遺伝的役割の解明

研究分担者: 寺地 徹, 取得年度: H26-28年(3年)

鳥取大学 乾燥地研究センター 共同研究

課題名: 葉緑体形質転換に適した緑色カルスを形成するコムギ実験系統の開発

研究分担者: 寺地 徹, 取得年度: H26-27年(2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

教授 野村 哲郎

Prof. Tetsuro Nomura, Ph.D



1. 研究概要

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

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

1) 動物集団の遺伝的多様性の評価方法の開発とその応用

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。また、開発した方法を和牛集団の遺伝的多様性維持のために応用している。

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

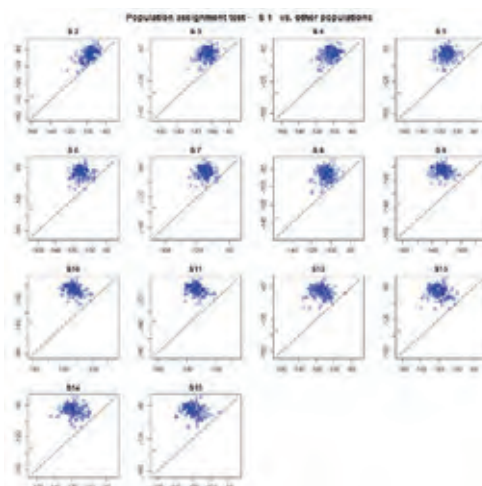
日本で普通に見られるナミテントウやその近縁種の鞘翅斑紋を支配する遺伝子の地理的分布に関する調査、家畜の血統記録を用いた遺伝的多様性の調査を行っている。

2. 本年度の研究成果

1) 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

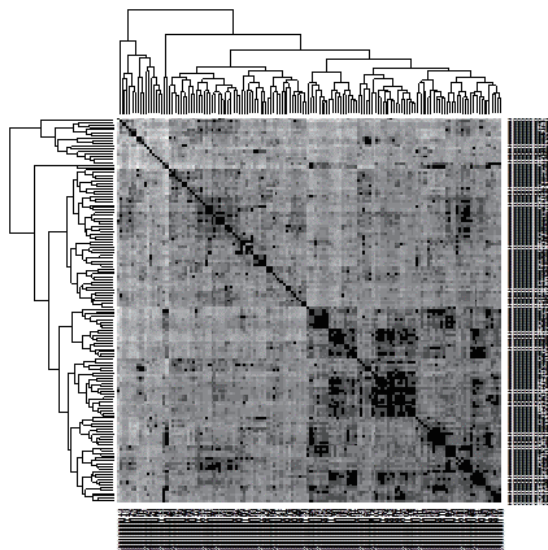
性が激減していることが指摘されている。遺伝的多様性を維持・回復させるためには、品種内に遺伝的に分化した系統を再構築することが有効であると言われている。そこで SNP 情報を用いて品種内に系統を再構築するための手法を開発した。開発した手法は、まず各系統のコアとなる個体群を設定し、新たな候補個体は SNP 情報を用いた判別分析によって適切な系統に割り振るものである。この方法を利用して、黒毛和種の系統再構築の可能性を検討した。



平成20年以前に生まれた黒毛和種雄牛の SNP 情報から 15 個のコア系統(S1-S15)を設定した。つぎに、平成21年以降に生まれた種雄牛を判別分析によりコア系統に分類した。図は、分類の精度を調べるために、S1 に分類された個体群を、S2-S15 に属する確率を横軸に、S1 に属する確率を縦軸にしたグラフにプロットした結果である。

2) DNA 情報を用いた褐毛和種集団の構造解析

熊本県で飼養されている褐毛和種の繁殖雌牛144頭の SNP 情報(約50,000座)を用いて、集団の遺伝的多様性の評価、集団構造の解明を目指して、研究を進めている。今年度は、ハプロタイプの推定、連鎖不平衡の解析を行った。



推定された第1染色体のハプロタイプを基にした
褐毛和種繁殖雌牛144頭の類縁関係

3) 統計遺伝学を応用したミツバチおよびマルハナバチの選抜育種

今年度は、不完全に隔離された繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率を、近交係数および遺伝的改良量の面から評価した。数値計算の結果、養蜂施設の隔離係数が80%程度なら、十分な遺伝的改良量が望めることが示された。ハチ類の育種における遺伝的改良量の予測式についても理論的背景を与えた。



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る。

4) 盲導犬の繁殖コロニーの長期的維持に関する遺伝学的研究

盲導犬の繁殖コロニーを長期的に維持するための最適な集団規模、世代間隔などを試算した。今後、国内の盲導犬の育種について、全国規模での選抜計画の立案を目指して、研究を進める予定である。



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 DNA information

In the Japanese Black 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 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 SNP data of the Japanese Black cattle.

2: *Studies on population structure in Japanese Brown cattle using a whole genome SNP panel.*

Population structure of Japanese Brown cattle was studied using SNP information. In the study, 144 cows were genotyped using the Illumina BovineSNP50 beadchip. We estimated haplotypes of the cows taking the half-sib family structure into account. The extent of linkage disequilibrium was estimated over whole genome. We will extend the study to estimating the effective population size and genetic diversity.

3: *Application of statistical genetics to honeybee and bumblebee breeding*

Efficiency of selective breeding in a partially isolated bee yard was theoretically evaluated, in terms of the inbreeding coefficient and genetic gain by selection. Numerical computation showed that even in a bee yard with the isolation coefficient of 80%, a remarkable genetic gain will be obtained by an appropriate selection program. Theoretical background of prediction equation of genetic gain in a bee population was also given by extending the theories shown in the present study.

4: *Studies on long-term management of guide dog breeding colonies*

Long-term maintenance of guide dog breeding colonies is required for stable production of dogs with high guide performance. We estimated an optimum breeding structure to maintain a guide dog colony using population genetic theories.

4. 論文・著書など

Takeuchi, T., Takahashi, J., Kiyoshi, T., Nomura, T., Tsubaki, Y. (2015) Genetic differentiation in the endangered myrmecophilous butterfly *Niphanda fuca*: a comparison of natural and secondary habitats. Conservation Genetics (in press)

野村哲郎・高橋純一・竹内 剛 (2014). 不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率の比較. 京都産業大学先端科学技術研究所所報. 第 13 号. 17-23.

5. 学会発表など

Nomura T. Long-term colony management. Guide Dog Breeder's Workshop. May 13-14, 2014. Fuji Harness, Fujinomiya, Japan.

野村哲郎. SNP 情報を用いた黒毛和種の系統再構築の可能性. 第 18 回和牛育種・改良問題公開セミナー. 2015.1.9. 京都.

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 基盤研究(B) 「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」(代表)

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

農林水産省独立行政法人評価委員会農業分科会会長

全国和牛登録協会 育種推進委員独立行政法人 家畜改良センター 肉用牛評価技術検討会委員

独立行政法人 家畜改良センター 肉用牛改良問題専門委員会委員

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, editor

3) その他

なし

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、チオレドキシソ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。チオレドキシソ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ソ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ソは、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ソをはじめとする活性酸素種消去系酵素へ反応に必要な電子を供給する、チラコイド内腔への還元力供給経路へ電子を渡す、などさまざまな場面において機能している。これらの構造の異なる多くの標的タンパク質を、チオレドキシソ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ソ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

准教授 本橋 健

Assoc. Prof. Ken MOTOHASHI, Ph. D.

助教 桶川 友季

Assist. Prof. Yuki OKEGAWA, Ph. D.

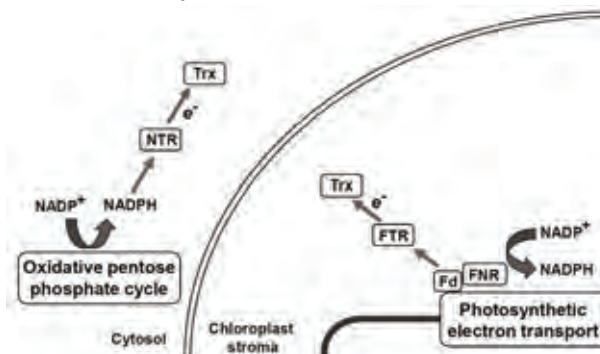


内側（チラコイド内腔）のレドックス状態変化はほとんど知られていない。私たちは、チラコイド内腔にもチオレドキシソ様タンパク質が局在することを証明し、これがチラコイド内腔で機能していることも明らかにした。還元力の蓄積のないチラコイド内腔で、チオレドキシソのような酸化還元タンパク質が機能するためには還元力の供給が必要である。チラコイド内腔で必要となる還元力をストロマから伝達する分子メカニズム、およびその生理学的な意義を明らかにする。

2. 本年度の研究成果

1) 葉緑体チオレドキシソの *in vitro* 還元系の再構成

高等植物の葉緑体では昼と夜で大きなレドックス状態の変化が起こる。このレドックス状態変化は酵素活性の調節などに利用されている。チオレドキシソはレドックス状態の変化に応じて、調節タンパク質のジスルフィド結合を還元し、その酵素活性を制御している。葉緑体のチオレドキシソが調節タンパク質のジスルフィド結合を還元する際には、還元反応に電子を必要とし、その電子は光合成電子伝達系から供給される。チオレドキシソの反応メカニズムを知るためには、チオレドキシソによる調節タンパク質のジスルフィド結合の還元を生化学的に解析することが必要となる。

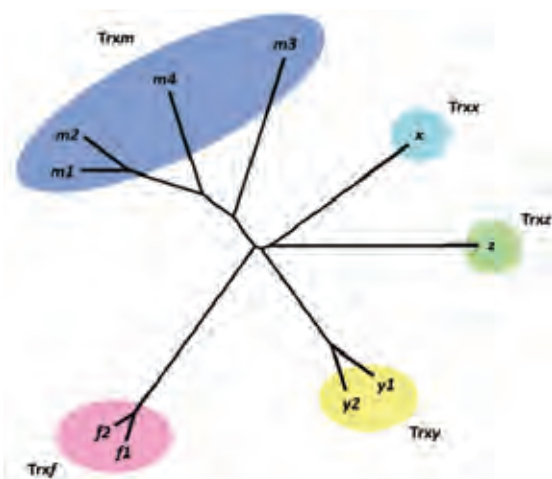


これまで、葉緑体チオレドキシソのジスルフィド結合還元反応を *in vitro* 実験で解析しようとする、還元剤である DTT、または葉緑体光合成電子伝達系を用いた複雑な還元システムを使用することしかできなかった。DTT は強い還元剤であり、また、光合成電子伝達系を用いたチオレドキシソ還元系は、*in vitro* 生化学実験を行うには複雑で扱いにくい方法であった。そこで、細胞質型のチオレドキシソの還元システムに注目した。このシステムは、NADPH とチオレドキシソ還元酵素 (NTR) だけでチオレド

キシンの *in vitro* 還元系を構築できる。葉緑体5グループ10種類のチオレドキシンを調製し、NADPHとNTRによる *in vitro* ジスルフィド結合還元実験系を構築し、生化学実験に用いることができるシステムを整えた。

2) 葉緑体ストロマにおけるチオレドキ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



Arabidopsis 葉緑体 Trx-familyの分子系統樹

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 型チオレドキシンに関しては、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は野生型と同等であるにもかかわらず、炭酸固定反応に影響が見られた。解析を進めると、カルビンサイクル酵素の光還元を支障をきたしていることがわかった。これまで、レドックス制御を受ける酵素群は、主に f 型チオレドキシンによって行われると信じられていたが、今回の実験は、それを覆す結果となっている。現在、その原因について、より詳細な分子メカニズムの解明を進めている。

3. Research projects and annual reports

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

Plants have photosynthetic ability to convert carbon dioxide into organic compounds, especially sugars, as unique feature. The photosynthesis in higher plants occurs in chloroplasts which are comprised of multilayered membranes, and pushes forward carbon

dioxide fixation. Chloroplasts have various regulation mechanisms of photosynthesis that is an important function for plants. Particularly, we focus on redox regulation in modulation system of higher plant chloroplast, and have major two research projects as follows:

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

The redox state of higher plant chloroplasts fluctuates widely under light and dark conditions. In the light, reducing equivalents are produced from photosystem and used to produce the reductant NADPH. NADPH is further used for the reduction of CO₂ in the chloroplast stroma. A portion of the reducing equivalents is also utilized for reduction of stroma thioredoxins. Thioredoxins transfer reducing equivalents 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. Deficiency of Trx m impaired plant growth through decrease in the CO₂ assimilation rate.

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

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

reducing equivalent transfer system across the membrane.

4. 論文, 著書など

K. Motohashi, Y. Okegawa: Method for enhancement of plant redox-related protein expression and its application for *in vitro* reduction of chloroplastic thioredoxins. *Protein Expr. Purif.* **101**, 152-156 (2014)

5. 学会発表など

桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナのTrx *m*変異株はカルビンサイクル酵素の光活性化を減少させ、植物の成長阻害を引き起こす 第56回日本植物生理学会年会, 東京都世田谷区, 2015. 3.16-18

本橋健, 桶川友季: 葉緑体レドックス関連タンパク質発現系の改良と葉緑体チオレドキシンの*in vitro*還元システムへの応用 第86回日本生化学会, 京都市, 2014.10.15-18

桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナの*m*型チオレドキシノックダウン株におけるチオール酵素のレドックス状態の解析 第86回日本生化学会, 京都市, 2014.10.15-18

桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナにおける*m*型Trxの標的タンパク質の解析 第5回日本光合成学会年会, 奈良市, 2014. 5.30-31

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

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)

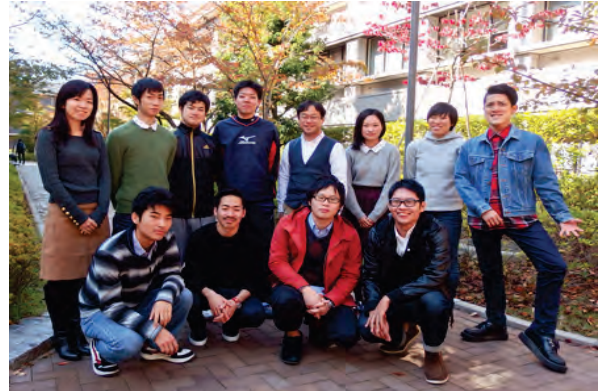
学術研究振興資金(日本私立学校振興・共済事業団)

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)

物質・デバイス領域共同研究拠点(一般研究)

課題名: 植物の機能調節を担うレドックス制御因子の機能解析
研究代表者: 本橋健, 取得年度: H26 年度 (1年)

2) その他 研究室メンバーの写真



植物育種学分野

Lab. Plant Breeding

教授 山岸 博

Prof. Hiroshi Yamagishi, Dr. Agr



1. 研究概要

植物の育種においては、近年、高い生産性と均一性を具備した F_1 品種育種の重要性が急速に増大している。たとえば 20 世紀後半の世界的な「緑の革命」を推進した原動力の 1 つは、トウモロコシにおける F_1 品種の急速な普及であった。このような高い育種効果を有する F_1 育種においては、確実かつ効率的に F_1 種子を採種することが極めて重要な意味を持つ。効率的な F_1 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子実の F_1 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性に対する稔性回復遺伝子が存在し、雄性不稔性が表現型として最終的に発現するかどうかは、ミトコンドリアの遺伝子と核の稔性回復遺伝子の相互作用によって決定される。

このため、細胞質雄性不稔性を植物の F_1 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能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出し、タイプの異なる雄性不稔系統を 2 系統得た。これらを用いてキャベツ類の実用的な雄性不稔系統の開発を進めるとともに、体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構造を解析することにより、雄性不稔のメカニズムを明らかにしようとしている。

3) 細胞質置換によるダイコンおよびナスの雄性不稔の開発

宇都宮大学、佐賀大学および野菜茶業研究所との共同研究で、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し、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「大阪四十日」のミトコンドリアについて全ゲノムの塩基配列を得た。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6世代 (BC₆) 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、BC₅ 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とが認められた。このような、部分可稔化の原因を調査するとともに、さらに戻し交雑を進めて、実用的な雄性不稔系統を開発しようとしている。

また、上記の体細胞雑種とその後代に特有のミトコンドリアゲノムの構造を、他のアブラナ科植物のミトコンドリアと比較するために、多くのアブラナ科植物でミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した。すなわち、体細胞雑種の一方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。その結果、キャベツのミトコンドリアゲノムは 219,952bp であり、従来の報告 (Chang et al. 2011) とは異なることが明らかになった。また世界で初めてクロガラシ (*Brassica nigra*) のミトコンドリア全ゲノム (232,145bp) を決定した。このクロガラシのミトコンドリアゲノムの詳細な解析から、クロガラシおよびそれを細胞質親として成立した複2倍体種のアビシニアガラシ (*Brassica carinata*) には、ミトコンドリアゲノムの種内分化が存在することを見出した。その発見に基づき、*B. carinata* の成立は2つの系列を経て起こったことを明らかにした。

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。その結果、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。

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、ナスの花粉稔性回復遺伝子の単離を目標とする研究を進めている。現在までに、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 BC₅ progenies. The BC₅ progenies were segregated into completely male sterile plants and partially fertile plants. However, all the BC₅ progeny plants had the identical structure of mitochondrial genome. Further back-crosses and observation of pollen fertility are now undertaken.

In order to compare the mitochondrial genome of the somatic hybrids, we determined whole sequences of mitochondrial genomes of *Brassica oleracea* (cabbage) and *Brassica nigra* (black mustard). Both the findings that the mitochondrial genome of *B. oleracea* possesses 219,952bp and that the genome of *B. nigra* is assembled into a 232,145bp circular sequence are the first reports in the world.

3) CMS of radish and eggplant by cytoplasm substitutions.

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

4. 発表論文

H. Yamagishi, S. R. Bhat: Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. *Breeding Science* **64**, 38-47

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～ 杉山産業化学研究所年報 (平成25年度), 109-127 (総説)

Y. Tanaka, M. Tsuda, K. Yasumoto, T. Terachi, H. Yamagishi: The complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oleracea* and analysis of coexisting mitotypes. *Current Genetics* **60**, 277-284

H. Yamagishi, Y. Tanaka T. Terachi: Complete mitochondrial genome sequence of black mustard (*Brassica nigra*; BB) and comparison with

Brassica oleracea (CC) and *Brassica carinata* (BBCC). *Genome* **57**, 1-6 (2014) dx.doi.org/10.1139/gen-2014-0165

5. 学会発表など

山岸 博、田中義行、寺地 徹: クロガラシ (*Brassica nigra*) におけるミトコンドリアゲノムの全塩基配列。日本育種学会第126回講演会、宮崎県、2014. 9. 26-27

辻村真衣、森 直樹、山岸 博、寺地 徹: 4倍性コムギのミトコンドリアゲノムのタイプを変更する核ゲノム領域の特定日本育種学会第126回講演会、宮崎県、2014. 9. 26-27

岡部真弥、房 相佑、山岸 博、寺地 徹: *Brassica maurorum* の細胞質を持つ雄性不稔ダイコンのミトコンドリアゲノムの解説。日本育種学会第126回講演会、宮崎県、2014. 9. 26-27

山本一皓、寺地 徹、山岸 博: ダイコン品種間における核遺伝子 *msh1* の塩基配列変異。日本育種学会第126回講演会、宮崎県、2014. 9. 26-27

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: H26 (1年)

2) 学外活動: 農林水産省委託プロジェクト研究「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のための技術開発」運営委員
日本育種学会幹事

3) その他

副学長 (2014年9月まで)

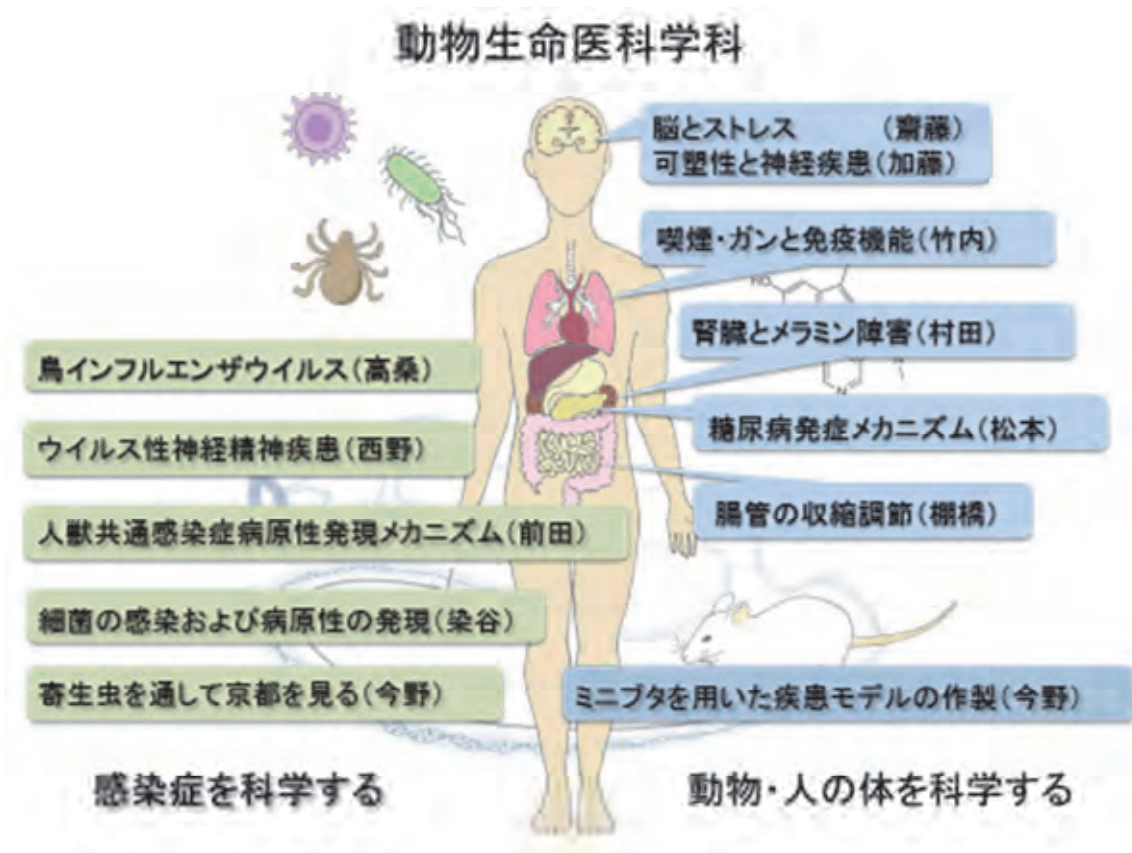


動物生命医科学科

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る。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る。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る。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る。また、京都府、京都市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る。



【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ある。本学科は、定員 35 名に対して 11 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る。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う。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る。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る。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ぶ。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む。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 26 年度は 18 名もの合格者を輩出している。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る。

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

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に変化する。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を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た。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。その結果、脳成長ホルモンは、Arc(シナプス活性の強化に作用)の発現調節を介して過活動-低活動を制御することがわかった。Arcは、てんかん発作時に発現が亢進することが知られている。それ故、脳成長ホルモンシグナル系は、てんかん発作閾値を下げて発作を亢進する時に、Arcを活性化しシナプス活性を強化する可能性が考えられた。以上の知見は、平成26年9月、*Experimental Brain Research*に報告した。

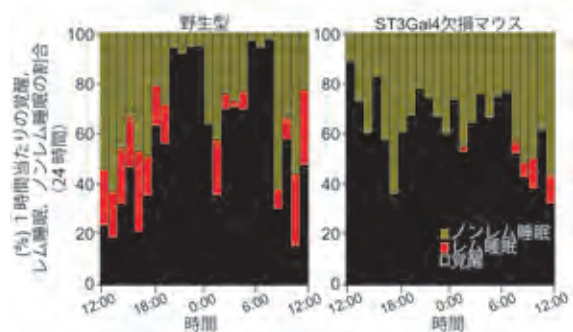
さらに、20種のシアル酸転移酵素のひとつ、ST3Gal4が側頭葉てんかんの原因分子であることを見つけた。それは、ST3Gal4を欠失したマウスが、扁桃体(情動中枢)へのてんかん誘導刺激に応答しない、てんかんを発症しないマウスであることを証明したことによる。この知見は、平成26年12月、*Journal of Neurochemistry*に報告した。

今後さらに、てんかん発症に関わるシアル酸転移酵素と Arc を含む成長ホルモンシグナル系の発現機構や、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く。

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

てんかん患者の30%が、睡眠障害、うつ、不安障害を含む神経精神障害を示し、薬剤の副作用がその原因のひとつと考えられているが、そのメカニズムは不明である。一方で、シアル酸転移酵素(ST3Gal4)を欠損したマウスは、てんかん発症を消失した副作用として、睡眠障害(図1)、うつ、不安障害を発症するマウスであった。これは、ST3Gal4を欠失したマウスがてんかん発症と、うつ、不安障害といった神経症状の分子基盤の解明に役立つモデルとなることを示す。以上の知見も、先に記した平成26年12月、*Journal of Neurochemistry*に報告した。現在、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。

図1. ST3Gal4を欠失したマウスの睡眠障害。



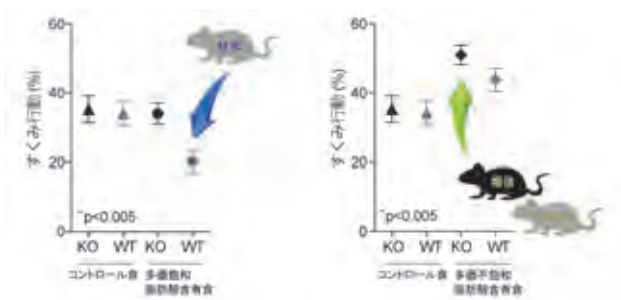
(図1解説,横軸は, 昼の12時から翌日の12時までの24時間を, 1時間間隔の棒グラフで示している。縦軸は, 各1時間当たりの覚醒, レム睡眠, ノンレム睡眠の時間割合を示している。野生型は, 0時~4時の間, 昼寝を示している。一方で, 欠損マウスは, 睡眠のリズムが平坦であると共に, レム睡眠が著しく少なくなった。)

3) ストレス性情動系障害への飼料摂取効果の検討

食べた油脂は消化吸収された後, 脳にも運ばれ, エネルギー源あるいは, 膜構造等に利用される。1) に記したように, 脂質代謝に関わる成長ホルモンは, 脳の神経細胞で発現し, てんかん発作や活動量を調節する。しかし, てんかんを発症しないシアル酸転移酵素 (ST3Gal4) 欠損マウス脳では, その発現量が低い。そこで, ST3Gal4 が脂質代謝系を調節し情動機能に作用することを調べるために, 脂肪酸組成を変えた油脂を含む飼料を, 離乳後のマウスに1ヶ月半 (成長期) 与え, 情動行動試験をおこなった。その結果, 餌から摂取する油脂が多価不飽和脂肪酸の場合, 欠損マウス (KO), 野生型マウス (WT) 共に, 著しい恐怖文脈記憶の増強を示すが, 多価飽和脂肪酸の場合は野生型マウスのみ恐怖文脈記憶を減弱した (図2)。油脂の行動への影響に関する知見は, 平成27年3月, *PLOS ONE* に報告した。

食餌として日々取り入れている油脂の組成が違えば, 脳の情動記憶が変わることを証明した。また, うつや不安障害 (シアル酸転移酵素 (ST3Gal4) 欠損マウス) を持つと, 油脂の効果が変わることも示すことができた。以上の知見は, 食餌を介した脂質代謝が情動記憶に影響すること, さらには, シアル酸修飾を介することで, 脂質代謝が変化し, その変化が神経障害に発展する可能性を提案する。今後, この代謝付加による情動行動システムの解明を目指して, 研究を進めて行く。

図2. 異なる油脂を含む餌が与える文脈恐怖記憶への影響。



(図2解説, 油脂中の脂肪酸組成はもちろんのこと, 餌に含まれているすべての物質の組成が明らかである AIN93G を基本にしている。多価飽和脂肪酸含有食には, パルミチン酸とステアリン酸といった多価飽和脂肪酸とオレイン酸からなる油脂 (チョコレート油脂) を18%含む。その一方で, 多価不飽和脂肪酸含有食では, ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの多価不飽和脂肪酸を含む魚油18%を用いて作成している。すくみ行動が高いと, 恐怖記憶が亢進していることを示す。)

4) ボツリヌス毒素によるてんかん発作抑制機構の解明

ボツリヌス毒素による難治てんかんの治療効果を検討したところ, てんかん発作を示すマウスの50%が大発作を完全に消失した。ボツリヌス毒素がもたらす, 異常な神経可塑性の抑制がどのようなメカニズムで生じるのかを明らかにし, さらにはヒト難治てんかん治療につながること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。成長ホルモンは, その受容体と activity regulated cytoskeletal-associated protein (Arc, シナプス活性の強化に作用) の発現量を調節し, 過活動-低活動に影響する結果を得た。この知見を平成26年9月, *Experimental Brain Research* に報告した。

2) シアル酸修飾が制御する情動系神経回路の応答機構の解明

シアル酸転移酵素 (ST3Gal4) を欠損したマウスは, てんかん発作を示さない一方で, 睡眠障害, うつ・不安障害, 環境適応不全等の精神神経症状を示した。また, 脂質代謝に関わる成長ホルモンの脳内発現量の低下も示した。これは, ST3Gal4 が成長ホルモンの発現量を調節し, 情動行動に影響することを示す。この知見は, 平成26年12月, *Journal of Neurochemistry* に報告した。

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、うつや不安様症状に影響を与えることがわかった。食餌として取り入れる油脂の組成が違えば、その代謝の変化により脳の情動記憶を変えてしまうことが示唆された。平成 25 年 8 月における特許出願に続いて、平成 27 年 3 月に *PLOS ONE* に報告した。

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 that the expression of growth hormone was up-regulated along neural circuits during the epileptogenesis. The administration of the hormone into the hippocampus markedly enhanced the progression of kindling. Then, we investigated whether there is a growth hormone signal system in the brain, and this signal system is deeply related to the development of neuropsychiatric disorders. Finally, the infusion tests of growth hormone and the receptor antagonist demonstrated that the expression level of *Arc* mRNA was strongly correlated with locomotor activity level and that the correlation was completely discriminable among vehicle-,

growth hormone-, and the receptor antagonist-groups. It was reported in *Experimental Brain Research* for evaluating the presence of brain growth hormone signal system in emotional behaviors.

Second, we previously demonstrated that the sialyltransferase ST3Gal IV was upregulated within the neural circuits during epileptogenesis, in contrast, recently that kindling stimulation failed to evoke epileptic seizures in ST3Gal IV-deficient mice. Approximately 80% of these mice failed to show tonic-clonic seizures with stimulation, whereas all littermate wild-type mice showed tonic-clonic seizures. This indicates that the loss of ST3Gal IV does not cause epilepsy in mice. It was reported in *Journal of Neurochemistry*.

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. The sialyltransferase ST3Gal IV gene-deficient mice showed emotional symptoms including an anxiety disorder, an environmental adjustment disorder, sleep disturbance, and hormonal homeostatic disorder. Furthermore, 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 indicate that ST3Gal IV modulates side effect of epilepsy and is associated with growth hormone signaling. These were included in the above *Journal of Neurochemistry*. Present our approach is to find the acceptor substrate that receives sialylation by ST3Gal IV and investigate molecular mechanisms in development of emotional side effect of epilepsy via ST3Gal IV and the acceptor substrate.

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

It has long been known that dietary fatty acids improve some limbic and cortical functions in humans. However, the mechanisms underlying their influence on brain function and metabolism remain unknown. Presently, mice were fed pellets made from control feed AIN93G powder containing 18% fish oil, soybean oil, or a mixture of 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-palmitoyl glycerol (POP) and 1-stearoyl-2-oleoyl-3-stearoyl glycerol (SOS), plus 2% soybean oil from 4 weeks old. After reaching adulthood, they were subjected to fear conditioning test to measure

cognitive anxiety. Contextual fear memory decreased in wild-type mice fed the POP-SOS diet but increased in ST3Gal IV-deficient mice fed the fish oil diet. These findings indicate that response to contextual fear was different between wild-type and the deficient mice. The fear memory was improved in WT mice that consumed POP-SOS but was aggravated in the deficient mice that consumed fish oils. Oil-rich diets differentially modulate anxiety and depression in normal and anxious mice. We applied for a patent in August, 2013 and reported in the PLOS ONE in March, 2015. Next, we aim to investigate lipid metabolic mechanisms that were generated from food and correlation of the metabolism with emotional behaviors.

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

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

4. 論文, 著書など

1. Srimontri P, Endo S, Sakamoto T, Nakayama Y, Kurosaka A, Itohara S, Hirabayashi Y, Kato K. (2014) Sialyltransferase ST3Gal IV deletion protects against temporal lobe epilepsy. *J Neurochem*. 131: 675-687.
2. Srimontri P., Hirota H., Kanno H., Okada T., Hirabayashi Y. and Kato K. (2014) Infusion of growth hormone into the hippocampus induces molecular and behavioral responses in mice. *Exp Brain Res*. 232:2957-2966.

5. 学会発表など

1. 加藤啓子, パイトゥーンシーモントリー (2014) てんかん〜うつ・不安障害の発症に関わるシアル酸転移酵素について 第142回関西実験動物研究会 12月5日 京都大学楽友会館 (口頭)
2. パイトゥーンシーモントリー, 廣田暖奈, 加藤啓子 (2014) 行動量や探索行動に影響する成長ホルモンのArc発現量の調節 第142回関西実験動物研究会 12月5日 京都大学楽友会館 (口頭)

3. パイトゥーンシーモントリー, 廣田暖奈, 平林義雄, 加藤啓子 (2014) Growth hormone modulates Arc signaling correlated with behavioral response. 成長ホルモンによるArc発現量の調節は, 行動量や探索行動に影響する。第37回神経科学会 9月12日パシフィコ横浜 (ポスター, ショートトーク)
4. Paitoon Srimontri, Yoshiaki Nakayama, Akira Kurosaka, Shogo Endo, Toshiro Sakamoto, Shigeyoshi Itohara, Yoshio Hirabayashi, and Keiko Kato (2014) Sialyltransferase ST3Gal IV is involved in temporal lobe epilepsy and its associated disorders. International Symposium on Glyco-Neuroscience January 9-11 in Awaji Yumebutai International Conference Center. (poster)

6. その他特記事項

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

実験動物医学専門医総務部員

5) その他

ホームページ

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



動物生体機能学分野の工学では、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周囲の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、あるいは大きなストレス刺激を受けると、脳の扁桃核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、ストレスで障害を受けた脳神経系の再生と機能回復法の開発につなげたいと考えている。

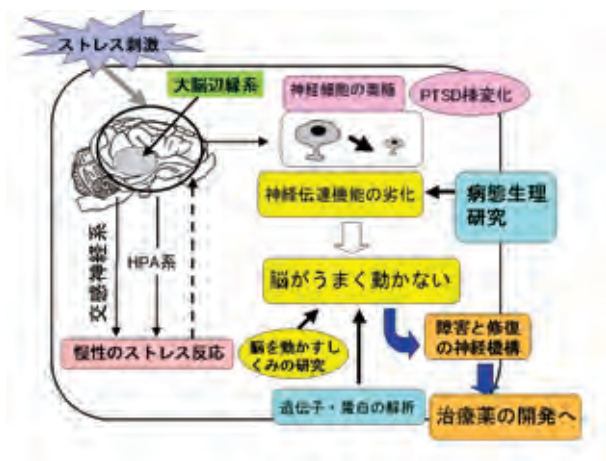


図1. 本研究の概略

2. 本年度の研究成果

1) 脳におけるストレス反応の調節メカニズム

視床下部－下垂体－副腎 (HPA) 軸は生体のストレス反応の中心的な役割を果たしている。脳の中でHPA軸の活動

図1. 本研究の概略

2. 本年度の研究成果

1) 脳におけるストレス反応の調節メカニズム

視床下部－下垂体－副腎 (HPA) 軸は生体のストレス反応の中心的な役割を果たしている。脳の中で HPA 軸の活動を調節する神経ネットワークがあるが、その詳細については不明な点が多く残されている。私達の研究室では、扁桃核から信号を受け取り、室傍核などに信号を伝える仲立ちの役割をもつ分界状床核に注目している。現在、麻酔したラットを用いて、分界状床核によるHPA軸の活動調節のしくみを解析している。

は、扁桃核から信号を受け取り、室傍核などに信号を伝える仲立ちの役割をもつ分界状床核に注目している。現在、麻酔したラットを用いて、分界状床核によるHPA軸の活動調節のしくみを解析している。

2) 初代培養細胞に対するストレスホルモンの影響

副腎皮質ホルモンなどのストレスホルモンが脳に与える影響を調べるため、マウス大脳由来の初代培養細胞を用いた研究を行っている。これまでに、コルチコステロンやその誘導体をマウス大脳由来の初代培養細胞に投与した際の神経細胞における影響を調べた。今年度は、神経細胞に加えて、神経膠細胞 (グリア細胞) に対する影響を調べている。神経膠細胞は神経細胞が正常に機能する上で重要な役割を果たしている。ストレスによるうつ病などの病態を考える上で、ストレスホルモンの神経膠細胞に与える影響を解析することが不可欠である。

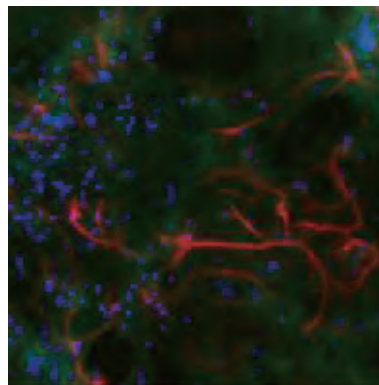


図1. マウス大脳由来の初代培養細胞の蛍光顕微鏡像。神経膠細胞の一つである星状膠細胞 (アストロサイト; 赤) が混在する。

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

をに加え、刺激部位の違いにより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ることを確認した。また、同様に鼻に求心性刺激を加え、大脳皮質一次体性感覚野の表面から、直接、血流変化と酸素ヘモグロビンレベル変化を測定したところ、鼻の刺激位置の違いに応じて、誘発電位の場合と同様、体性感覚野内で血流と酸素ヘモグロビン濃度が変化する位置が異なることをとらえた。この結果は、大脳皮質表面で神経活動を反映する血流変化や酸素ヘモグロビン濃度変化を、直接、測定できることを実証するとともに、活性化した脳の部位を脳血流と酸素ヘモグロビンレベル変化から特定できることを示している (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. Intense or chronic activation of both systems may increase a risk for anxiety and stress disorders. We are examining neurobiological signs which reflect influence by 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) Study on regulatory mechanisms by bed nucleus of stria terminals of the HPA axis

The purpose of this study is to examine how bed nucleus of stria terminals (BNST) regulates activity of the HPA axis to secrete corticosteroids. In the anesthetized rats, we are examining spatial differences within the BNST to stimulate or inhibit corticosteroid secretion.

2) Investigation of influence of stress hormones on primary cultured neuronal and glial cells

We have used the primary culture of neuronal and glial cells from the fetal brain of mouse in order to investigate influence of such stress hormones as glucocorticoids and mechanisms of neuronal degeneration by stress hormones at the cellular level. It is well-known that glial cells have an important role for supporting activity of neuronal cells. To understand how stress induces neurological disorders such as depression, we are examining influence of corticosterone on cultured astrocytes as well as neuronal cells.

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

Using miniature pigs, we validated the fNCI system in a direct cortical measurement. By comparing functional mapping with somatosensory-evoked potential (SEP) measurements in the brain cortex, our study shows the fNCI system realized a direct cortical hemodynamic measurement

with a spatial resolution compared to that of SEP mapping on the rostral region of the pig brain. (Joint research with Jichi Medical University and Chuo University).

4. 発表論文、著書など

Minako Uga, Toshiyuki Saito, Toshifumi Sano, Hidenori Yokota, Keiji Oguro, Edmi Edison Rizki, Tsutomu Mizutani, Takusige Katura, Ippeita Dan, Eiju Watanabe. (2014) Direct cortical hemodynamics mapping of somatotopy of pig nostril sensation by functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI). **Neuroimage 91: 138-145**

西野佳以・齋藤敏之 (2014) 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. **京都産業大学先端科学技術研究所報** 13: 169-180

5. 学会発表など

(学会発表)

齋藤敏之: ブタにおける鼻の機能と関連した脳神経活動の解析. 第 91 回日本生理学会大会、鹿児島大学、鹿児島市、2014.3.16-18

Minako Uga, Toshiyuki Saito, Daisuke Tsuzuki, Hidenori Yokota, Keiji Oguro, Edmi Edison Rizki, Tsutomu Mizutani, Ippeita Dan, Eiju Watanabe. Functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI) of the miniature pig brain : the comparison of hemoglobin species. Neuroscience 2014, Nagoya, 2014 September 11-13

Minako Uga, Toshiyuki Saito, Hidenori Yokota, Keiji Oguro, Edmi Edison Rizki, Tsutomu Mizutani, Katura, Ippeita Dan, Eiju Watanabe. The development of functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI): the direct cortical hemodynamic mapping of the miniature pig's somatosensory area. fNIRS 2014 Montreal, Canada, 2014 October 10-12

(新聞発表)

日経産業新聞 2014 年 1 月 22 日 「脳の働き 7 mm 感覚で特定—電気信号と血流で 腫瘍手術に応用へ」

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:茨城県立医療大学医科学センター学外共同研究員

齋藤敏之:日本生理学会評議員

齋藤敏之:日本獣医学会評議委員

齋藤敏之:日本生理学会認定生理学エデュケーター

4) 受賞等 なし

5) その他

(学内)・教職課程教育センター運営委員会・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

・大阪府立大学との学術連携に基づく講義の実施



研究室メンバーとの集合写真

細菌学研究室

Laboratory of Bacteriology

助教 染谷 梓

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



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。当研究室では、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の病原体を媒介する可能性がある。今年度も、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回のマダニの採集を継続し、調査地においては、フタゲチマダニとキチマダニが優先種であり、季節によって優先種が入れ替わることを明らかにした(図1)。また、マダニの分布と野生動物との関係を明らかにするため、調査地における野生動物の生息状況を赤外線カメラを設置して調査した。その結果、調査地にはさまざまな野生動物が生息していることが明らかとなった(図2)。

薬剤耐性菌は、細菌感染症の治療の際、使用できる抗菌薬が制限されるなど、多くの問題となる。家畜への抗菌薬の使用により出現した耐性菌が食肉に付着し、人へと伝播する可能性が示唆されている。そこで、本研究室では、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。その結果、検体採取場所により、耐性である薬剤に特徴があることが示された。現在、これらの耐性菌の耐性メカニズムの解明に取り組んでいる。



図1 マダニの採集



図2 調査地で観察された野生動物

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 (Fig. 3). 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. *E. coli* isolated from the swab samples obtained from the barn tied pigs and cattle for slaughter were resistant to ampicillin, gentamicin, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline and showed multidrug resistance.



Fig. 3 Tick on the plant.

4. 論文, 著書など

染谷梓:リケッチア、クラミジア. 動物微生物学検査学. PP.19-20.
近代出版 (2014)

Someya, A., Fukushima, R., Yoshida, M., Tanahashi, Y.,
Prapeuk, T., Iizuka, R., Hiram, H., Matsuda, A., Takahashi, S.,
Kurita, G., Kimura, T., Seo, M., Funaba, M., Nishino Y.: A
study on Borna disease virus infection in domestic cats in Japan.
J. Vet. Med. Sci. 76:1157-60 (2014)

伊藤亜希、岡本奈津実、米島万有子、染谷梓、前田秋彦:京都市市街地における蚊の調査. *京都産業大学総合学術研究所報* 9:95-107 (2014)

Fernández, I. V., Okamoto, N., Ito, A., Fukuda, M., Someya, A.,
Nishino, Y., Sasaki, N., Maeda, A.: Development of a novel
protocol for generating flavivirus reporter particles. *J. Virol. Methods.* 208:96-101 (2014)

Someya, A., Ito, R., Maeda, A., Ikenaga, M.: Detection of
ricketsial DNA in ticks and wild boars in Kyoto City, Japan.
J Vet Med Sci. in press

5. 学会発表など

Someya, A., Ikenaga, M., Ohnishi, O., Konno, M., Fernandez, I.
V., Nishino, Y., Maeda, A.: Detection of spotted fever group
ricketsiae in Kyoto city, Japan. The 12th Japan-Korea
International Symposium on Microbiology (XII-JKISM).
Tokyo, Japan. 2014.3.25

Someya, A., Kozono, S., Ito, A., Okamoto, N., Ikenaga, M.,
Maeda, A.: Tick prevalence and detection of spotted fever
group rickettsiae in Kyoto city, Japan. International Union of
Microbiological Societies Congress 2014 (XIVth International
Congress of Bacteriology and Applied Microbiology). Montreal,
Canada. 2014.7.27-8.1

6. その他特記事項

1) 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

染谷梓:京都府農林水産技術センター畜産センターとの共同
研究

2) その他

第 2 回京都市×京都産業大学共同シンポジウム「身近に潜む
微生物の脅威とその対策～マダニが引き起こす感染症～」講師

北自衛消防隊連絡協議会講習会「細菌による感染症の話」
講師



研究室メンバー

感染症学研究室

Laboratory of Infectious Disease

教授 高桑 弘樹

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



1. 研究概要

現在、世界中で鳥インフルエンザウイルスなどの新興・再興感染症の発生が多数報告されており、人を含む動物に被害をもたらしており、感染症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継続している。その結果、H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスがカルガモから分離された。この H5N6 亜型ウイルスの系統解析により、全ての分節がその後中国のアヒルから分離された H5N6 亜型ウイルスと近縁であった。その後、周辺諸国での同型ウイルスの発生が起こった。国内においても、本年11月に島根県安来のコハクチョウから H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離し、その後、国内各地で同型ウイルスの分離や発生が報告された。H5N8 亜型ウイルスは、東アジアのみならずヨーロッパでも同時期に発生が報告されている。どちらの亜型株も、鶏に対して高い病原性を示すのに対し、カモ類に対しては病原性が比較的強く、カモ類に対する病原性の低さから、拡散されたと考えられた。

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.*

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 Vietnam. An H5N6 virus was isolated in 2014 from a Spot-billed Duck that is resident in the southern part of its range from Pakistan and India to southern Japan. Phylogenetic analyses revealed that HA genes of almost the H5 virus was classified into clade 2.3.4.6. This isolate had a close phylogenetic relationship to H5N6 viruses isolated in South China in 2014. These findings suggest that these H5N6 viruses are circulating and are being maintained in the East, South East and South Asia regions including Vietnam and China. In November 2014, a highly pathogenic H5N8 virus was isolated from tundra swan in Japan. The HA genes were more closely related to H5N8 viruses in Europe and Asia. These H5N6 and H5N8 virus showed high pathogenicity to chickens while moderate pathogenicity to domestic ducks. Taken together, these results also support that wild ducks such are playing a significant role in the spread and maintenance of avian influenza in the Asia regions including Vietnam.

4. 論文、著書など

1. Kocsis, K., Knapp, L., Gellért, L., Oláh, G., Kis, Z., Takakuwa, H., Iwamori, N., Ono, E., Toldi, J., Farkas, T. Acetyl-L-carnitine normalizes the impaired long-term potentiation and spine density in a rat model of global ischemia (2014) *Neuroscience*, **269**, 265-272.

5. 学会発表など

木下佳紀、雨森貴郁、中村雄哉、藪田淑子、堀田こずえ、Mai T.Q. Le、曾田公輔、笛吹達史、山口剛士、山城哲、小野悦郎、伊藤壽啓、大槻公一、高桑弘樹：ベトナム北部の野生のカモカ

ら分離されたH5N6亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの
解析. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌市, 2014.9.9-12

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

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)

感染症研究国際ネットワーク推進プログラム科学技術イノベーション創造推進費

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」
(野鳥の調査及び分離ウイルスの性状解析)

研究代表者:森田公一(分担), 取得年度:H26年(1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:2014年12月08日

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

発明者:大槻 公一、高桑 弘樹、藪田 淑予、西野 佳以、染谷 梓

3) 学外活動 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:H25-26年(2年)

4) 受賞等 なし

5) その他 なし

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、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

教授 竹内 実

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



ルギーを発症させることで知られているスギ花粉がある。日本スギ花粉 (*Cryptomeria japonica* pollen) は、カギ状の突起 (パピラ) を有する単粒球形の形状で、I 型の過敏症を引き起こすことで知られている。しかし、スギ花粉とその成分が生体に吸入されてからの肺免疫系に及ぼす影響については十分な解明はされていないため、スギ花粉による肺の初期免疫応答反応についても研究をしている。

3) 天然成分の免疫作用とその応用について

① 蜂蜜

天然成分には様々な生理活性が知られており、蜂蜜は、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。

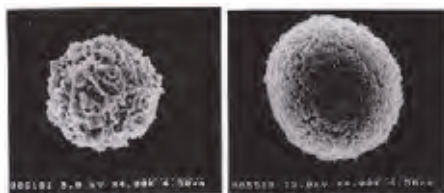
しかし、免疫作用の機構については十分に解明されていないため、そのメカニズムと有効成分について研究している。



2. 本年度の研究成果

タバコ主流煙暴露により肺マクロファージを介した抗体産

生の抑制が認められ、その抑制は抗体産生の初期で認められ、既に抗原刺激を受けた後期の段階では抑制されなことが解明された。未熟な B 細胞機能が抑制され、成熟した抗体産生細胞には影響を与えないことが確認された。喫煙により、特に未熟な B 細胞の増殖反応が抑制されることが解明された。その抑制機構には、喫煙により肺胞マク



ロファージの初期の反応である貪食機能の抑制が関係し、ヘルパー T

細胞への抗原提示作用が抑制されることが証明された。また、喫煙により肺胞マクロファージの貪食機能の抑制は、細胞内に取り込まれたタバコ粒子により、細胞内部構造を複雑化させ、細胞表面にあるひだ状の偽足が消失していることが電子顕微鏡により確認された。

天然成分に関しては、アフリカ産蜂蜜であるジャングルハニーに肺胞マクロファージのサイトカイン mRNA 発現を増強する作用が認められた。また、好中球の貪食作用に対する増強効果も認められた。アガリクス茸熱水抽出液もマクロファージのサイトカイン mRNA 発現を増強する作用が認められた。これらの天然成分物質は、マクロファージの活性化を介して好中球の細菌への移動性を早め、貪食作用を高め、細菌感染を防御する可能性が示唆された。

LPS による肺の初期免疫応答に関しては、LPS の気管支内投与により、肺胞マクロファージが Toll Like Receptor(細菌認識受容体:TLR)を介して刺激され、IL- β が産生され、肺胞マクロファージにオートクラインに作用し、その後、好中球の走化因子が産生されることが確認され、肺胞腔内に好中球が誘導されることが示唆された。

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

Masaaki Sakura, Yoichi Chiba, Emi Kamiya, Ayako Furukawa, Noriko Kawamura, Masanao Niwa, Minoru Takeuchi, Yasushi Enokido, Masanori Hosokawa. Differences in the Histopathology and Cytokine Expression Pattern between Chronological Aging and Photoaging of Hairless Mice Skin. *Modern Research in Inflammation*, 3: 82-89, 2014.

高橋純一、竹内実、松本耕三、野村哲郎 日本で飼養されているセイヨウミツバチの系統 京都産業大学先端科学技術研究所報 第13巻, 25-37, 2014

棚橋靖行、川原瑞穂、遠藤英輔、竹内実 喫煙によるマウス気管支平滑筋の収縮および弛緩活性への影響 京都産業大学総合学術研究所報 第9巻, 227-234, 2014,

田中美子、高崎摩依子、瀧谷崇大、高橋純一、廣野由里子、竹内実 日本国産蜂蜜によるマクロファージと好中球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報 第13巻, 1-16, 2014

川副彩香、竹内実 Lipopolysaccharide (LPS) による肺炎症の誘導機構と喫煙の影響 京都産業大学論集 自然科学系列 第43号, 39-73, 2014.

5. 学会発表など

M. Takeuchi, Y. Hirono, Y. Tanaka, S. Inoue, Y. Tanahashi, M. Sakura Tobacco Smoke Exposure Alters Immune Functions Mediated With DNA Damage In Alveolar Macrophage (AM). 19th Congress of the APSR, 13-16 November 2014

Maiko Takasaki, Yuriko Hirono, Masaaki Sakura and Minoru Takeuchi. Effect of Cigarette Smoke Exposure on Ant-tumor activity of Alveolar Macrophages. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 25-27 September 2014

M. Takeuchi, A. Kawazoe, Y. Hirono, K. Sasaki, Y. Tanahashi, M. Sakura Effect of Cigarette Smoking on Lipopolysaccharides (LPS)-Induced Lung Inflammation Mediated by Neutrophils European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2014, 7-11 June 2014

M. Takeuchi, Y. Hirono, Y. Tanaka, K.E. Pinkerton Effect of Honey on Immunological Functions of Alveolar Macrophages in Mice ATS 2014 International Conference (ATS 2014), 16-21 May 2014

M. Takeuchi, A. Kawazoe, A. Takiguti, Y. Hirono, K. Sasaki, Y. Tanahashi, M. Sakura The Mechanism of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Lung Inflammation and Effect of Honey GulfThoracic Congress 2014, 13-15 March 2014

竹内実 ミツバチと蜂蜜と健康 京都中央診療所月例研修会, 京都, 2014.11.18 (講演)

竹内実 蜂蜜のひみつ 動物感謝デー in KYOTO, 京都, 2014.11.9 (講演)

Minoru Takeuchi ニュージランドマオリ研修会 The study of honey in Japan Hakone, 2014.11.7 (講演)

竹内実 ハチミツの話, 京都産業大学初心者養蜂講座, 箕面, 2014.10.11 (講演)

竹内実 ハチミツの効能, 京都府立須知高校, 京都, 2014.5.29 (講演)

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: 喫煙による肺マクロファージへの影響とアレルギー発症の関連について

研究代表者: 竹内実, 取得年度: H26-28年(3年)

2) 学外活動

京都府獣医師会理事

京都府府民公開事業推進委員

京都中央診療所倫理委員

科学研究費専門委員会審査委員

Pulmonology 雑誌編集委員, WJR 雑誌編集委員など

3) 受賞等

京都府獣医師会 功労賞受賞, 2014.5.24

4) その他

NHK あさいち 講師として出演, 2014.4.8

研究室:

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

研究室メンバー



研究室同窓会(2014年9月6日)



薬理学研究室

Laboratory of Pharmacology

准教授 棚橋 靖行

Assoc. 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受容体を刺激すると、平滑筋細胞内のCa²⁺濃度([Ca²⁺]_i)が増加し、最終的に筋は収縮する(Figure 1)。ムスカリン受容体刺激による[Ca²⁺]_iの上昇は、細胞内ストアからのCa²⁺放出と電位依存性Ca²⁺チャネルを介した細胞外からのCa²⁺流入に由来する。このCa²⁺チャネルを介したCa²⁺流入は、ムスカリン受容体刺激により非選択的陽イオンチャネルが開口し、それに伴って起こる膜の脱分極が引き金となって惹起される。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および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、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および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。

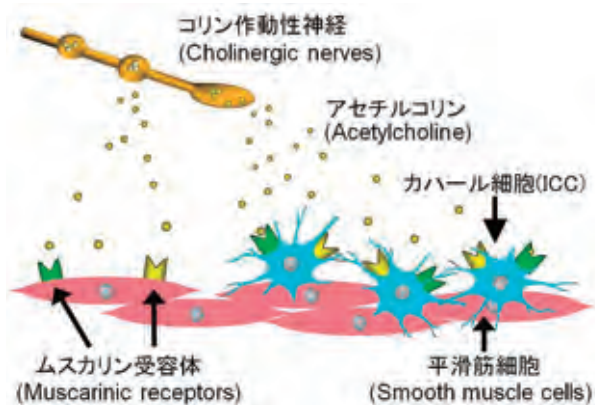


Figure 1. Regulation of gut motility by cholinergic nerves

(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)により、マウスにタバコ煙を暴露して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

これまでに当研究室では、腸管平滑筋細胞においてムスカリン受容体刺激によりATP感受性K⁺(K_{ATP})チャネルの活性が抑制されることを明らかにしており、同抑制機構が陽イオンチャネルの開口とともに膜の脱分極に寄与していることを示唆している。K_{ATP}チャネルはKir6およびSURサブユニットから構成されていることがよく知られており、これまでにKir6にはKir6.1とKir6.2、SURにはSUR1とSUR2のアイソフォームの存在が報告されている。本年度は、マウス小腸平滑筋細胞標本において、Kir6およびSURの各アイソフォームの発現についてRT-PCRおよび蛍光免疫染色法により検討した。また、非選択的陽イオンチャネルの阻害薬として知られるSKF96365が小腸平滑筋細胞に発現するK⁺チャネルのうちK_{ATP}チャネルおよび電位依存性K⁺チャネルの活性を抑制することを明らかにした。

(2) 喫煙による気管支平滑筋収縮機能への影響

マウス気管支平滑筋リング標本において、経壁電気刺激によるコリン作動性収縮反応を記録する方法を確立した。現在、喫煙による同収縮反応への影響について本格的な実験に着手している。

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 M₁, M₂, M₃, M₄ and M₅. In gastrointestinal smooth muscles, two subtypes of muscarinic receptor, M₂ and M₃, are found with no measurable quantities of other subtypes. As shown in Figure 1, stimulation of M₂ and M₃ receptors by ACh increases in the intracellular concentration of Ca²⁺ [Ca²⁺]_i, resulting in the smooth muscle contractions. The increase in [Ca²⁺]_i results from Ca²⁺ release from internal stores and Ca²⁺ entry into the cell through L-type voltage-gated Ca²⁺ channels achieved by depolarization due to activation of non-selective cationic channels. Recently, it has been suggested that interstitial cells of Cajal (ICC), which exist in the myenteric and deep muscular plexus and express muscarinic receptors, are involved in the regulation of gut motility. However, roles of M₂ and M₃ receptors and ICC in regulating the gut motility by ACh remain to be elucidated in detail. Therefore, we are addressing the above issue using the M₂ or M₃ muscarinic receptor knockout (KO) mice and ICC deficient mice.

(1) Mechanisms of gastrointestinal motility.

Our previous studies suggested that muscarinic receptors can inhibit the activity of ATP sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels, which can contribute to the membrane depolarization. K_{ATP} channels are composed of Kir6 and SUR subunits. Although two Kir6 genes (Kir6.1 and Kir6.2) and two SUR genes (SUR1 and SUR2) have been identified, little is known about the molecular identity of subunits which can be responsible for K_{ATP} channels in intestinal smooth muscle cells. Thus, we tried to identify the Kir6 and the SUR isoforms expressed in mouse small intestinal smooth muscle cells by RT-PCR and immunofluorescent staining. In addition, we investigated effects of the non-selective cationic channel blocker SKF96365 (SKF) on the current through K_{ATP} channels, voltage-gated K⁺ channels (K_V), and Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse small intestinal

smooth muscles. Our results indicate that SKF can inhibit the K_{ATP} channels as well as the K_V channels.

(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 tried to record changes of mechanical activity in response to electrical field stimulation (EFS) of mouse bronchial ring preparations. We successfully recorded EFS-induced cholinergic contractions. Now, we investigate effects of cigarette smoke exposure on the EFS-induced cholinergic contractions.

4. 論文、著書など

A. Someya, R. Fukushima, M. Yoshida, Y. Tanahashi, T. Prapeuk, R. Iizuka, H. Hirami, A. Matsuda, S. Takahashi, G. Kurita, T. Kimura, M. Seo, M. Funaba, Y. Nishino: A study on Borna disease virus infection in domestic cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **76(8)**, 1157-60

棚橋靖行、川原瑞穂、遠藤英輔、竹内実: 喫煙によるマウス気管平滑筋の収縮および弛緩活性への影響. 京都産業大学総合学術研究所所報、**9**、227-234

5. 学会発表など

M. Takeuchi, A. Kawazoe, A. Takiguti, Y. Hirono, K. Sasaki, Y. Tanahashi, M. Sakura: The Mechanism of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Lung Inflammation and Effect of Honey. GulfThoracic Congress 2014, Dubai, 13-15 March 2014.

M. Takeuchi, A. Kawazoe, Y. Hirono, K. Sasaki, Y. Tanahashi, M. Sakura: Effect of Cigarette Smoking on Lipopolysaccharides (LPS)-Induced Lung Inflammation Mediated by Neutrophils. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2014, Copenhagen, 7-11 June 2014.

棚橋靖行、王班、村上友梨、海野年弘、松山勇人、小森成一：マウス小腸平滑筋細胞に発現するK⁺チャンネルに対するSKF96365の抑制効果。第56回日本平滑筋学会総会，横浜市，2014.8.6-8

永野宏、祖父江由希、松山勇人、齋藤正一郎、酒井洋樹、棚橋靖行、山田真久、Wess Jurgen、小森成一、海野年弘：M2ムスカリン受容体サブタイプを介したバソプレシンの分泌調節機構。第157回日本獣医学会学術集会，札幌市，2014.9.9-12

鈴木香澄、松山勇人、棚橋靖行、北澤多喜雄、山田真久、Jurgen Wess、小森成一、海野年弘：マウス結腸輪走筋におけるコリン作動性神経-平滑筋間の情報伝達を仲介するムスカリン受容体サブタイプ。第157回日本獣医学会学術集会，札幌市，2014.9.9-12

棚橋靖行、王班、村上友梨、海野年弘、松山勇人、小森成一：マウス小腸平滑筋細胞に発現するK⁺チャンネルに対するSKF96365の抑制効果。第157回日本獣医学会学術集会，札幌市，2014.9.9-12

Takeuchi, Y. Hirono, Y. Tanaka, S. Inoue, Y. Tanahashi, M. Sakura: Tobacco Smoke Exposure Alters Immune Functions Mediated With DNA Damage In Alveolar Macrophage (AM). 19th Congress of the APSR, Bali, 13-16 November 2014.

6. その他特記事項

1) 外部資金

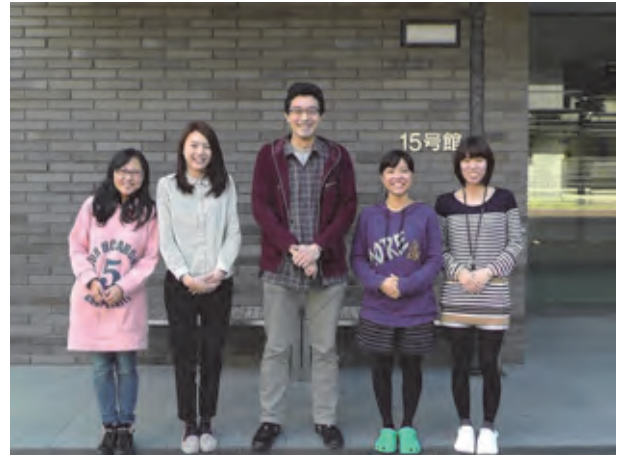
学術研究助成基金・若手研究(B)

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）

2) その他

1. 担当講義：動物医科学概論、化学通論A、薬理学・毒性学、実験動物学・毒性学実習、科学英語Ⅱ、応用特別研究1、応用特別研究2
- ii. 京都産業大学オープンキャンパス動物生命医科学科模擬実験：腸の運動調節メカニズムの謎に迫る(2014.8.2)



ウイルス学研究室

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る、サイトカイン等の液性因子の産生が誘導されると間接的な障害が引き起こされる。このような感染個体における様々な影響が、いわゆる発病である。私達の研究室では、動物/人獣共通のウイルス感染症、特に神経ウイルス症に注目している。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いため、困難な感染症として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り研究を行っている。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が、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く、特にヒトでは病原性も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研究を行っている。

2. 本年度の研究成果

「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」

ストレスによる過剰な副腎皮質ホルモン(CORT)の分泌は、脳の海馬や前頭前野において神経変性や萎縮をおこし、さらに心的外傷後ストレス障害(PTSD)等の脳機能障害にむすびつくと考えられている。本研究では、ストレスに起因すると思われる脳の調節系の破綻に絡む何らかの潜

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino,

DVM, Ph.D



在性因子の一つとしての向神経性ウイルスに焦点をあて、ストレスとウイルス性脳機能障害発症との関連性を明らかにすることを目的とした。

ボルナ病ウイルス(Borna disease virus: BDV)は、動物に持続感染し運動障害、行動学的異常などの神経症状を引き起こす向神経性ウイルスである。野外では不顕性感染している動物が多く存在するが、感染動物が発症するメカニズムは明らかではない。本年度の研究では、過剰なストレスがBDV感染動物に与えられた場合の脳障害(発症)について調べるための培養細胞モデルとして、マウスの大脳皮質神経初代培養細胞を作製し、BDVを感染した後、CORTあるいはカイニン酸添加による影響について解析した。その結果、BDV感染大脳皮質神経初代培養細胞にCORTを添加すると、神経細胞へのウイルスの拡散速度が早くなった。また、カイニン酸を添加すると、感染細胞の細胞障害率が上がった。これらの結果から、CORTはBDV感染神経初代培養細胞におけるウイルス伝播性を亢進すること、カイニン酸はBDV感染神経細胞に対しより強く興奮刺激を与える可能性が示唆された。以上の結果から、BDVが持続感染している動物において過剰なストレスが与えられると、脳内のウイルス感染が広がること、ウイルス感染細胞では神経伝達物質であるカイニン酸受容体やAMPA型グルタミン酸受容体を介するシグナル伝達が増強される可能性が示唆された。

3. Research projects and annual reports

Recently, number of patients tends to increase suffering from such neuronal dysfunction as major depression, and post-traumatic stress syndrome (PTSD). Severe or repeated-stress possibly causes the brain malfunction possibly due neuronal degeneration and atrophy in the prefrontal cortex and hippocampus caused by prolonged secretion of glucocorticoid. However, factors remain to be unevaluated yet to cause the neuronal dysfunction under stressful condition. One possibility may be viral infection in the brain, which is inapparent infection and does not cause any disease in individuals yet. The purpose of this study is to examine and to evaluate whether viral infection may cause apparent damage in zinc-containing neurons in the brain of the animals that are exposed to stress hormone.

Borna disease virus (BDV) is a neurotropic virus that infects persistently; BDV infection induces behavioral abnormality and movement disorders. Inapparent infection has been reported in many species of animals, but precise mechanism underlying onset of neurological disorders is not known yet. BDV infection may modulate stress-induced encephalopathy. Thus, the present study examined effects of corticosterone or kainic acid in mouse primary cerebral cortex neurons infected with BDV. Treatment with corticosterone increased invasion of BDV into neurons, and kainic acid increased the ratio of neuronal damage in infected with BDV. These results suggest that corticosterone upregulates transmission efficiency of BDV in neurons and that kainic acid exposure enhances neuronal excitotoxicity induced by BDV infection. High amount of corticosterone during stress may widespread BDV replication in the brain, and enhance signal transduction mediated by kainic acid receptor and AMPA receptor.

4. 論文、著書など

- Someya, A., Fukushima, R., Yoshida, M., Tanahashi, Y., Prapeuk, T., Iizuka, R., Hirami, H., Matsuda, A., Takahashi, S., Kurita, G., Kimura, T., Seo, M., Funaba, M. and Nishino, Y. A study on Borna disease virus infection in domestic cats in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** 76:1157-1160, 2014.
- Fernández, VI., Okamoto N., Ito A., Fukuda M., Someya A., Nishino Y., Sasaki N., and Maeda A. Development of a novel protocol for generating flavivirus reporter particles. **J. Virol. Methods.** 208: 96–101, 2014.
- Murakami M., Ohi M., Ishikawa S., Shirai M., Horiguchi H., Nishino Y. and Funaba M. Adaptive expression of uncoupling protein 1 in the carp liver and kidney in response to changes in ambient temperature. **Comp. Biochem. Physiol. A.** in press.
- 西野佳以、齋藤敏之. 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. 京都産業大学先端科学技術研究所所報、第13号、pp.69–80. 2014

5. 学会発表など

- 西野佳以: ウイルス学の基本. 京都産業大学創立50周年記念事業、第2回京都市×京都産業大学共同シンポジウム、2014.1.18 (京都市) (シンポジウム)

- Someya A., Ikenaga M., Ohnishi O., Konno M., Fernandez I.V., Nishino, Y. and Maeda A.: Detection of spotted fever group rickettsiae in Kyoto city, Japan. 第12回日韓国際微生物シンポジウム、2014.3.24 (Tokyo) (シンポジウム)
- 染谷梓、福島涼子、吉田倫子、棚橋靖行、Tangmunkhong Prapeuk、飯塚玲子、平見博、松田敦志、高橋俊一、栗田吾郎、木村享史、瀬尾美鈴、舟場正幸、西野佳以: 東京近郊のイエネコにおけるボルナ病ウイルス感染症疫学調査. 第7回日本ボルナウイルス研究会、2014.3.26 (京都市)
- 伊藤亜紀、イゴール ベラド・フェルナンデス、岡本奈津実、染谷梓、西野佳以、佐々木宜哉、前田秋彦: フラビウイルスレポーターウイルス粒子の簡易作出法の開発. 第21回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会、2014.11.9 (横浜市)

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)

2) 知財権等

特許: 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

発明者: 大槻公一、高桑弘樹、藪田淑予、西野佳以、染谷梓

出願 2013-110849 (2013/05/27)

公開 2014-227409 (2014/12/08)

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、ならびに合同会議 (計2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」、2014.6.23)のコーディネーター

京都産業大学附属高等学校との高大連携授業(KSUサイエンス講座「ウイルスをふやしてみよう」)(2014.7.25)の担当



研究室のクリスマス会

環境衛生学研究室

Laboratory of Environmental Hygiene

1. 研究概要

私たちの身の周りには、数え切れない程、様々な微生物が存在する。その中には、いろいろな動植物やヒトに感染して病気を引き起こすものもあれば、そうでないものもある。また、腸内細菌のように動物の腸内で食物の消化を助けるものや、恐らくは動植物の進化の過程で重要な役割を担っているであろうものまで存在する。この様に、私たちの周りに存在する微生物は動物や植物と相互に影響し合っており、生態学的マイクロコスモスやマクロコスモスを形成している。

本研究分野では、微生物の中でも特に「動物からヒト」あるいは「ヒトから動物」に感染する人獣共通感染症（人畜共通感染症、動物由来感染症または Zoonosis）を引き起こす病原微生物についての病原性の発現メカニズムや自然環境中での存在様式の解明、公衆衛生対策のための基礎的な研究を行っている。具体的な研究対象は、蚊やマダニ等の節足動物が媒介する人獣共通感染症である（図 1）。近年の地球温暖化に伴う媒介蚊の生息範囲の拡大と、それに伴う各種の節足動物媒介性感染症の流行域の拡大が危惧されている。日本においても、海外で流行するウイルスや細菌等病原体の侵入と、その国内流行への対策が急務となっている。そこで、本研究室では以下の研究テーマについて研究を行っている。

(1)蚊およびマ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の開発

(2)蚊およびマ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

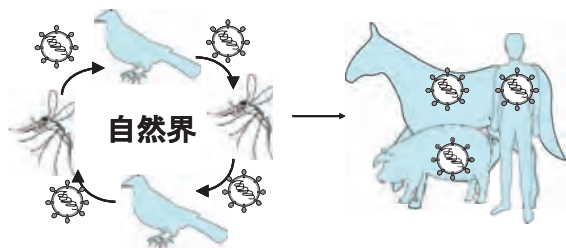


図 1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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

教授 前田 秋彦

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



2. 本年度の研究成果

(1)蚊およびマ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、新規検査法の開発

京都市環境衛生研究所の池永、伊藤研究員および立命館大学の中谷准教授と同等博士研究員の米島さん、麻生大学の二瓶客員研究員、関西野生動物研究所の川道美枝子先生、三宅慶一獣医師、北海道大学の好井健太郎准教授との共同研究として行っている。蚊やマ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。媒介する伝染病は蚊やマ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マ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、京都市内で蚊やダニを採取し、その種類を古典的な形態学的鑑別法に従って鑑別した。さらに、マダニが保有する病原微生物（フラビウイルスやリケッチア、トゴトウイルス等）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。また、2013 年に私たちの研究室で分離したトゴトウイルス (THOV) の検出検査抗体を作製した。

(2)蚊およびマ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

京都市のマダニから分離したトゴトウイルスの Vero E6 細胞での感染様式を解析した。感染の初期では、ウイルスの RNA 合成に必要な RNA 合成酵素が合成されていた。また、感染後期では、ウイルスの粒子合成に必要なウイルスの構造蛋白質が合成されていることが明らかとなった。

3. Research projects and annual reports

Research projects

Many micro-organisms exist surrounding of natural environment. Some of them infect to plants, and some do to animals including human. They cause unique diseases to their host, but the others do not. Some live in animal intestine and help food-digestion of host animals. Or some have a role for host 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, we focus on 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 these vector-borne diseases
- (2) Molecular biology 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 these vector-borne diseases

We collected mosquitoes, which are the vector of many mosquito-borne diseases, at several fixed observation points in Kyoto city, Japan. We then tried to detect pathogens within the arthropods. As the results showed no evidence existing of pathogens within mosquitoes captured in Kyoto city, was obtained

We also conducted surveillance of tick-borne pathogens at north part of Kyoto city. We collected many species of ticks, and examined pathogens within ticks. We detected several viruses by reverse transcription-polymerase reaction. We also isolated THOV from a tick captured in the studying area. It is a first case of THOV isolation in Japan. We also made anti-THOV antibodies for serological diagnostic tool for THOV.

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

We newly isolated THOV in Japan, 2013. In this year, we characterized the mechanism of THOV infection to Vero E6 cells. In early infection of THOV, the viral polymerase proteins were produced in the cells. In the late of THOV infection, viral structural proteins were produced. These results clearly showed the process of THOV replication in cultured cells.

4. 論文, 著書など

- I. Velado Fernández, N. Okamoto, A. Ito, M. Fukuda, A. Someya, Y. Nishino, N. Sasaki, A. Maeda: Development of a novel protocol for generating flavivirus reporter particles. *J. Virol. Methods* 208, 96-101
- 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
- 伊藤重希, 岡本奈津実, 米島万有子, 染谷梓, 前田秋彦: 京都市市街地における蚊の調査. *京都産業大学総合学術研究所報* 9, 95-107

5. 学会発表など

- 岡本奈津実, 好井健太郎, 中尾亮, Robert Klaus Hofstetter, 藪智子, 益本大輝, 染谷梓, 前田秋彦: Thogoto virus 様ウイルスのダニからの分離. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.11.10-12
- 伊藤重希, イゴール ベラド フェルナンデス, 岡本奈津実, 染谷梓, 西野佳以, 佐々木宣哉, 前田秋彦. フラビウイルス レポーター ウイルス粒子の簡便作出法の開発. 第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 横浜, 2014.11.9
- A. Someya, S. Kozono, A. Ito, N. Okamoto, M. Ikenaga, A. Maeda: Tick prevalence and detection of spotted fever group rickettsiae in Kyoto city, Japan. International Union of Microbiological Societies Congress 2014 (XIVth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology), Montreal, Canada, 2014.7.27-2014.8.1
- A. Someya, M. Ikenaga, O. Ohonishi, M. Konno, I. Velado Fernandez, Y. Nishino, A. Maeda: Detection of spotted fever group rickettsiae in Kyoto city, Japan. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology (XII-JKISM), Tokyo, 2014.3.24-25

6. その他特記事項

1) 外部資金

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)

3) 学外活動

前田秋彦: 日本バイオセーフティー学会誌編集委員

前田秋彦: 日本脳炎ウイルス生態学研究会評議員



ラボのメンバー(松の浦, 2014.9)

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いると推定されており、社会上非常に大きな問題となっている。肥満を防げればよいが、現代社会は逆に肥満を生む社会構造となっており、肥満増大を押さえるのはかなり困難な状況にある。そのような状況に鑑み、なぜ肥満が2型糖尿病を誘発するかを明らかとし、肥満になっても2型糖尿病を防げるような予防薬、治療薬の開発がより必要な状況にあると考えられる。然るに肥満に伴いなぜ2型糖尿病を発症するのか、その発症メカニズムに関してはほとんど分かっていない。創薬のためにはその肥満に伴い2型糖尿病を発症せしめる、真の原因遺伝子の特定が必須である。

しかしヒトは遺伝的に大いなるヘテロ集団であり、環境要因も様々で、兄弟といえども成人後の生活習慣は全く異なっていることが多い。従って、ヒトでの直接的な遺伝解析が望ましいのであるが、今回のテーマのような、肥満に伴う2型糖尿病の発症機構という、遺伝と環境の複雑に入り交じった研究を行うには、より単純化した実験系、遺伝的に均一な集団を持った実験動物を利用するしか方策がない。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。

とはいえ、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



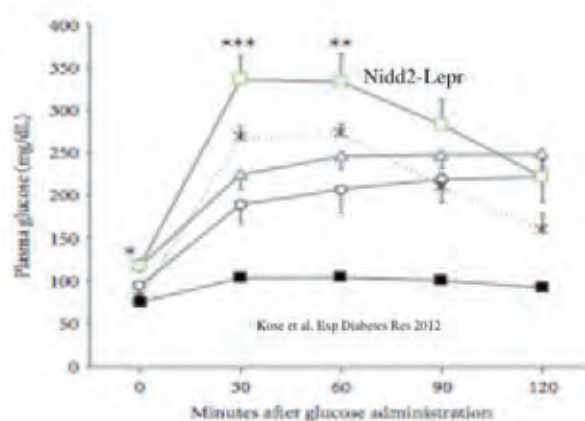
の肥満下における動作を研究することが初めて可能となるからである。

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 ラットに比較して 50mg/dL 程度高い血糖値を示し、肥満による影響を確認した。一方、その肥満ラットに Nidd2, 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、OGTT 60 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 OGTT 120 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 とコントロール系統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 遺伝子座領域内と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 5 つ見いだされた。さらなる詳細な解析の結果、そのうちの 3 遺伝子は肥満とは関連の無い事が判明し、候補から除外し、最終的に 2 遺伝子が候補遺伝子として残った。これらのいずれかか、あるいは両方が肥満に伴う 2 型糖尿病発症に寄与する原因遺伝子であると考えられた。

一方、Nidd6 領域内の遺伝子発現を比較したところ、多数の遺伝子が有意差を示し、その方法ではさらなる絞り込みが難しいことが判明した。現在、別の解析方法を検討している。

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を引き起こさないことが判明した。さらに、グルコース比率の高い菜の花ハチミツについても検討したところ、予想に反して、ハチミツ投与群の血糖値は砂糖投与群よりも有意に低く出ており、ハチミツの効果が糖尿病状態でも良い方向に効いていると考えられる結果が得られた。また、血中コレステロール、中性脂肪は各投与群に有意差はなかったが、遊離脂肪酸はハチミツ投与群で有意に低く出ており、中性

脂肪代謝に関わる酵素群に影響を与えている可能性が考えられた。詳細な検討はこれからとなる。

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。

3. 遺伝子発現からの解析

主として肝臓と脂肪における遺伝子発現を各群で比較した。その結果、脂肪代謝等生体の各種の反応に関与する Pparg 発現に特徴が見られた。即ち、ローヤルゼリー投与群では肝臓内 Pparg 発現は有意に下がり、脂肪内では逆に有意に増大した。これらのことからローヤルゼリーは Pparg の発現調節を通し肝臓内糖新生を抑えグルコース放出を抑え、他方、肥満脂肪細胞に作用し、それらを正常細胞へと誘導していると推定される結果を得た。

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(2014 年度分)

1. Use of *Drosophila* as an evaluation method reveals *Imp* as a candidate gene for type 2 diabetes in rat locus *Niddm22*. Kawasaki, K., Yamada, S. Ogata, K., Saito, Y., Takahama, A., Yamada, T., Matsumoto, K. and Kose, H. J. Diabetes Res. Ivol. 2015, Article ID 758564, 8 pages, 2015.
2. 90-Day Oral Toxicities and Modifications on Azoxymethane-induced Carcinogenesis of 2-Tetradecylcyclobutanone as a Radiolytic Product of Stearic Acid in F344 Rats. Sato, M., Takahashi, T., Hafez, E., Takasu, C., Uehara H., Yamakage, K., Kondo T., Matsumoto, K., Furuta, M., and Izumi, K. J. Toxicol. Pathol. 28 (2) In press.

5. 著書および総説(2014 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(2014年度分)

1. 戦略的モデル動物作製による、肥満に伴い糖尿病を発症させる原因遺伝子の解明。佐々木大樹等、第

29 回日本糖尿病・肥満動物学会 京都 2015. 2. 13-14

2. 肥満に伴う 2 型糖尿病発症原因遺伝子解明と発症機構研究。古藤 惇等、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会 京都 2015. 2. 13-14
3. KK-Ay 肥満性糖尿病マウスへのローヤルゼリー経口投与による血糖値への影響。渡谷 理沙、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会 京都 2015. 2. 13-14

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 年生へ特別講義を数回行う。19 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。18 名が難関の実技に見事合格した。



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あるいはそれらの反応生成物メラミンシアヌレートが濾過・排泄経路上の細胞の形態や機能に何らかの影響を与えている可能性が高い。今年度は、その可能性について、マウス由来の培養株化糸球体濾過細胞(ポドサイト:a mouse kidney podocyte cell line: CLS Cell Line 社)を用いた in vitro 実験で検証した。

具体的には、メラミン、シアヌル酸およびメラミンシアヌレート結晶(針状)を添加濃度や時間を変えてポドサイトと反応させ、その際の細胞の形態変化、および網目状スリットタンパク

質のネフリン(分子量 138 Kda)、およびポドシン(42 Kda)の発現状態について、それぞれ光学顕微鏡による観察と SDS-PAGE および Western blotting 法を用いて解析した。

いずれの物質も細胞の形態には目立った変化をもたらさなかった(図1)。一方、メラミン、シアヌル酸それぞれ単独添加では、ポドサイトのスリットタンパク質発現には影響しなかったが、メラミンシアヌレート針状結晶添加により、それらのタンパク質の発現が減少した(図2)。

これらの成績から、メラミンあるいはシアヌル酸それぞれ単独では、添加細胞に障害を及ぼさないものの、それらの反応生成物メラミンシアヌレートは細胞の機能を傷害する可能性が示唆された。その傷害機序については、今後の検討課題である。

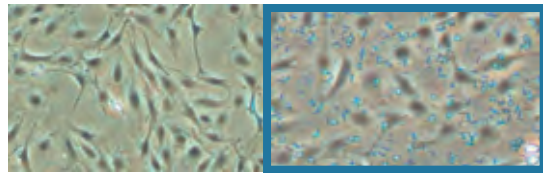


図1 : メラミンシアヌレート添加のポドサイト(右) 非添加(左)と比べて顕著な形態的差異は認められない。

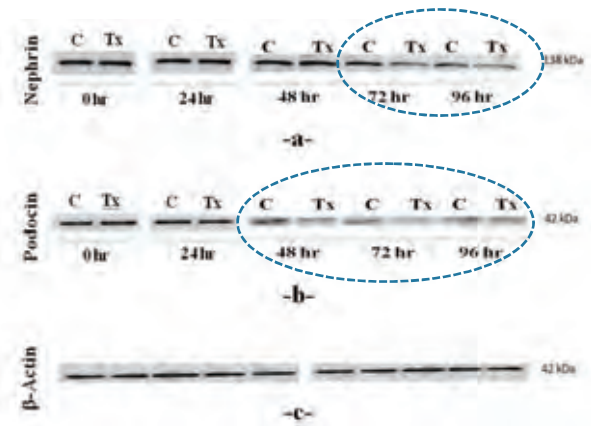


図2 : メラミンシアヌレート添加によるポドサイトのスリットタンパク質ネフリン(a)とポドシン(b)の発現の変化

C: 非添加対照 Tx: 添加および0~96の数字は培養時間
囲み(破線楕円)の処置群ではTxがCに比べて減少している。
βアクトニン(c)は loading control

(原図: S. Taksinoros, 本学工学研究科博士学位論文、2014)

2) 簡易・迅速なメラミンスクリーニング法の確立

本年度は実施しなかった。次年度以降に課題を継続する。

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 effects of melamine, cyanuric acid and melamine-cyanurate on expression of nephrin and podocin by mouse podocytes:*

Treatments with melamine or cyanuric acid alone did not induce any significant difference on the levels of nephrin and podocin expression between the treatment and control groups. In contrast, melamine-cyanurate (needle type) supplementation significantly reduced the level of both filter proteins. However, no morphologic abnormalities of podocytes were evident after any of the treatments.

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 (2014): An *In Vitro* Study on the Mechanism of Formation of Rounded Melamine Cyanurate Crystals with Special Reference to Melamine-Triggered Urolithiasis in the Kidney: 博士論文工甲第 17 号(京都産業大学)

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

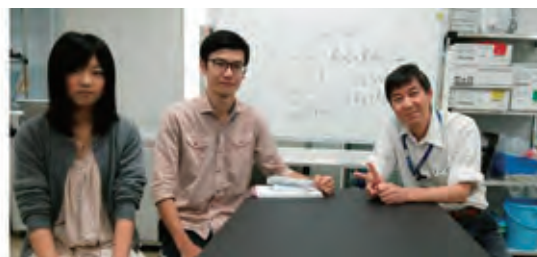
3) その他

- ・「京都動物愛護憲章制定シンポジウム」での基調講演
「日本人の動物愛護観一昔と今一」(2014.09.21)
(於:京都市中京区 新風館)
- ・栄養衛生学研究室の構成(2015年3月現在)
大学院博士前期課程学生 1名
学部4年生 2名
学部3年生 5名
(備考:大学院博士後期課程1名は2014年9月
博士学位(生物工学)を取得して修了)

S. Taksinoros (2014年9月修了)と村田



応用特別研究(4年生)の一風景



2014 年度 動物実験教育訓練および動物慰霊祭

動物実験教育訓練

本学では、毎年、春、秋学期の年 2 回、本学動物実験委員会主催で、動物実験のための教育訓練、動物実験の総論（実験動物の役割、取扱、動物愛護、関連法規等）の説明と動物実験施設の利用講習が行われています。2014 年度は、春学期は 4 月 9 日に開催され、20 名、秋学期は 9 月 19 日に開催され、112 名の参加者がありました。

動物慰霊祭

本学では、毎年、本学動物実験委員会主催の動物慰霊祭が執り行われています。2014 年度は、2 月 7 日に心光院村橋邦彦住職の読経のもと、多くの学生、教職員約 100 名が出席して、教育、研究のために犠牲となった動物に供養を行いました。

写真



平成26年度「京都産業大学・大阪府立大学 教育研究連携協定」 に関する教育連携事業 報告書

平成27年3月24日

平成22年（2010年）1月に大阪府立大学と「教育研究連携協定」を締結後、毎年いくつかの連携事業を試みてきた。本年度の取り組みを以下に記す。

1. 食品衛生管理学

（獣医学科5年次（選択）：30回のリレー講義中の1回授業担当）

講師：村田英雄（京都産業大学・総合生命科学部・動物生命医科学科）

日時：10月31日（金曜日）14:35～16:05

講義室：りんくうキャンパス中医学者2階第1講義室（B-211）

講義テーマ：マイコトキシンとメラミンについて

2. 応用動物科学B

（獣医学科5年次（選択）：30回のリレー講義中の1回授業担当）

講師：齋藤 敏之（京都産業大学・総合生命科学部・動物生命医科学科）

日時：平成27年1月21日（水曜日）14:35～16:05

講義室：りんくうキャンパス中医学者2階第1講義室（B-211）

講義テーマ：神経系に置ける恒常性維持

サブテーマ：脳神経機能と糖質コルチコイド，室傍核神経の活動調節

3. 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻オープンセミナー（8）

演者：齋藤 敏之（京都産業大学・総合生命科学部）

日時：平成27年1月21日（水曜日） 16:30～

会場：りんくう学舎 第1講義室

演題：ブタの脳を用いたトランスレーショナルリサーチに向けて

次年度も引き続き教育連携を進めていくこととする。

以上
（文責加藤）

2014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)
2014.01.08	動物生命医科	矢野 健一 先生 (独)農業生物資源研究所 動物生産生理機能研究ユニット	バイオフォーラム「アニマルウェルフェア:基礎研究からのアプローチ」(世話人:齋藤 敏之)
2014.02.18	生命システム	猪子 英俊 博士 東海大学 名誉教授 ジェノダイブファーマ(株)代表取締役 京都大学IPS細胞研究所 アドバイザー	生命科学セミナー「ゲノム時代の個人差対応医療におけるHLAの重要性とHLAタイピング法の進展」(世話人:伊藤 維昭)
2014.03.24	生命システム	福田 利文 氏 東北大学 大学院 薬学研究所	生命科学セミナー「リボソームをハブとしたmRNAとタンパク質の品質管理機構」(世話人:永田 和宏)
2014.03.25	生命システム	Dr. David Ron University of Cambridge (UK)	バイオフォーラム「Protein folding homeostasis in the Endoplasmic Reticulum」(世話人:永田 和宏)
2014.04.17	生命資源環境	石橋 豊隆博士 Assistant Professor, Division of Life Sciences, Hong Kong University of Science and Technology (香港科技大学)	生命科学セミナー「RNAポリメラーゼIIの転写伸長メカニズムの1分子解析」(世話人:木村 成介)
2014.05.14	生命資源環境	Ali Ferjani博士(東京学芸大学生命科学研究科)	生命科学セミナー開催「Impact of excess pyrophosphate on plant metabolism and development:New functions of an old player」(世話人:木村成介)
2014.05.17	大学院 生命科学 研究科 工学研究科	山崎敏祐教授(立命館大学)、高島成二教授(大阪大学)、 酒井敏行教授(京都府立医科大学)、曾我朋義教授(慶應義塾大学)、 吉川正明博士(生命開発研究所)	第61回日本生化学会近畿支部例会開催(世話人:瀬尾美鈴)
2014.05.30 2014.05.31	生命システム	Richard I.Morimoto教授(アメリカ・ノースウェスタン大学)、 Bernd Bukau教授(ドイツ・ハイデルベルグ大学)、伊藤維昭教授(京都産業大学)、 遠藤斗志也教授(京都産業大学)、John Walker教授(イギリス・ケンブリッジ大学)、 吉田賢右教授(京都産業大学)、谷口直之グループディレクター(理化学研究所)、 Ten Feizi教授(イギリス・インペリアルカレッジロンドン)、 福井成行教授(京都産業大学)、大隅良典教授、(東京工業大学)、 田中啓二所長(東京医学総合研究所)、近藤寿人教授(京都産業大学)、 Paul J.Scotting准教授(イギリス・ノッチンガム大学)、 八杉貞雄教授(京都産業大学)	国際シンポジウム「Cutting-edge of Life Sciences(生命科学の最前線)」開催(世話人:永田和宏)
2014.06.19	生命資源環境	鷲谷いづみ教授(東京大学大学院農学生命科学研究科)	バイオフォーラム「サクラソウとマルハナバチの保全生態学」(世話人:高橋純一)
2014.06.27	動物生命医科	萩原克郎教授(博士(獣医学)酪農学園大学獣医学群)	バイオフォーラム「家畜におけるボルナ病の疫学」(世話人:西野佳以)
2014.07.24	生命システム	小田裕香子博士(京都大学ウイルス研究所)	第166回細胞生物学セミナー 生命科学セミナー開催「上皮細胞におけるトリセルラージャンクションの分子構築および機能」(世話人:永田和宏)
2014.9.16	生命システム	Dr. Ron Kopito (Stanford University, USA)	バイオフォーラム「Triage in the ER: Managing protein quality control decisions in the early secretory pathway」(世話人:永田和宏)
2014.10.17	生命システム	Prof. Chris Meisinger (Freiburg University, Germany)	バイオフォーラム「Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms」(世話人:遠藤斗志也)
2014.11.17	生命資源環境	Professor Vito Turk (Department of Biochemistry, Molecular and Structural Biology, J. Stefan Institute)	生命科学セミナー「Cysteine Cathepsins and Their Inhibitors: The Structure-Function relationship and Current Trends - Memorial Lecture for Professor Nobuhiko Katunuma」(世話人:津下英明)
2014.11.21	生命システム	吉田 秀郎 教授(兵庫県立大学大学院生命理学研究科生体物質化学Ⅱ講座)	バイオフォーラム「小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答」(世話人:黒坂光)
2014.12.11	生命資源環境	矢野 健太郎 准教授(明治大学 農学部)	バイオフォーラム「有用植物遺伝資源の高度利用化に向けたシステムズ・バイオロジーの確立」(世話人:河邊昭)
2014.12.25	生命システム	後藤 史門 博士(弘前大学 研究機関研究員)	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 「Assembly因子が関与する細菌リボソーム生合成の過程」(世話人:中山秀喜)

HP掲載月	関係学科	関係者	トピック内容
1	動物生命医科	宇賀 美奈子 研究員・渡辺 英寿 教授(自治医科大学 先端医療技術開発センター) 檀 一平太 教授(中央大学 研究開発機構) 齋藤 敏之 教授(京都産業大学 総合生命科学部)	総合生命科学部 齋藤 敏之教授らのグループが脳表面から光で直接脳血流変化を計測する新技術の開発に成功
1	生命システム	茶谷悠平 客員研究員	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
1	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!
2	生命資源環境	生命資源環境学科 学生	第1回 生命資源環境学科 卒業研究発表会開催
3	生命システム	森戸 大介(京都産業大学)、西川 幸希(名古屋大学)、寶 関 淳(京都大学)、北村 朗(北海道大学)、小谷 友理(京 都産業大学)、木曾 和美(京都産業大学)、金城 政孝 (北海道大学)、藤吉 好則(名古屋大学)、永田 和宏(京 都産業大学)	京都産業大学 総合生命科学部 永田和宏 教授らの研究グループが モヤモヤ病の発症に関わるタンパク質ミスレリンの構造を解明
4	生命システム	マブハサンAKM(京都産業大学、現・ダッカ大学)、橋本 亜樹(京都産業大学)、前川由佳(京都産業大学)、松本尚 士(京都産業大学)、玖島将太(京都産業大学)、井尻貴之 (京都産業大学)、深見泰夫(神戸大学)、佐藤賢一(京都 産業大学)	総合生命科学部 佐藤賢一教授らの研究グループがアフリカツメガエル卵細胞の受精メ カニズムに新たな仮説を提唱
4	生命システム	熊崎 薫(東京大学大学院理学系研究科 生物化学専攻 博士課程2年) 千葉 志信(京都産業大学総合生命科学部 准教授) 石谷 隆一郎(東京大学大学院理学系研究科 生物科学専 攻 准教授) 塚崎 智也(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエ ンス研究科 准教授・JST さきがけ研究者) 瀧木 理(東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 教授)	総合生命科学部 千葉志信 准教授らの研究グループが共同研究により タンパク質を細胞膜に組み込むメカニズムを解明
5	学部全体		平成26年度 総合生命科学部奨励金授与式を挙りました
5	学部全体		京都産業大学 総合生命科学部 第61回 日本生化学会近畿支部例会開催
7	生命システム 動物生命医科	板野直樹教授、今野兼次郎助教	板野直樹教授と今野兼次郎助教らの国際共同研究グループが、がん幹細胞性制御 の新たな機構を解明 Journal of Biological Chemistryの"Paper of the Week"に選定され ました
9	生命資源環境	岡本郁(京都産業大学)	総合生命科学部 木村研究室 岡本郁 学振特別研究員が、2014年度の日本遺伝学会奨 励賞を受賞しました
9	生命システム	スントンスィット・ジラワット(京都産業大学)、山口陽子 (金沢大学)、田村大介(金沢大学)、石田竜一(京都産業 大学)、中小路暢公(京都産業大学)、大迫志帆(京都産業 大学)、山本章嗣(長浜バイオ大学)、中村暢宏*(京都産 業大学)(*責任著者)	発生細胞生物学(中村)研究室の大学院生スントンスィットさんが、細胞を酸性培養液 に浸すとゴルジ体がバラバラになることを発見
10	生命システム	川根公樹(京都産業大学)	川根 公樹 准教授がJSTの戦略的創造研究推進事業「さきがけ」に採択されました。
10	生命システム	中山実(京都産業大学)、松下史弥(京都産業大学)、浜千 尋(京都産業大学、責任著者)	浜 千尋教授、中山 実助教のグループがシナプスの新しい分化機構を発見。The Journal of Neuroscienceの "This Week in The Journal" に選ばれました。
10	生命資源環境	西田誠(京都産業大学)、高橋純一(京都産業大学)	高橋研究室の3年次生西田誠さんが全国学生養蜂サミットに参加、研究活動について 発表しました。
11	生命資源環境	中益朗子(京都産業大学、日本学術振興会特別研究員- PD)、中山北斗(京都産業大学、日本学術振興会特別研 究員-SPD)、中山尚美(エジンバラ大学)、末松信彦(明治 大学)、木村成介(京都産業大学)	生命資源環境学科の木村成介准教授らの研究グループが、植物の複葉に見られる分 岐構造の形成過程を数理モデル解析で再現。
12	生命資源環境	中山北斗(日本学術振興会、京都産業大学)、中山尚美 (University of Edinburgh)、Sumer Seiki(University of San Francisco)、小島美紀子(理化学研究所)、榎原均(理化学 研究所)、Neelima Sinha(University of California,Davis)、 木村成介(京都産業大学)	木村成介准教授と中山北斗研究員らの国際共同研究グループが、植物が周囲の環境 に応じて葉の形を変化させる異形葉性のメカニズムを解明

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5号 2014（平成26年）

発行日 2015（平成27）年7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/>