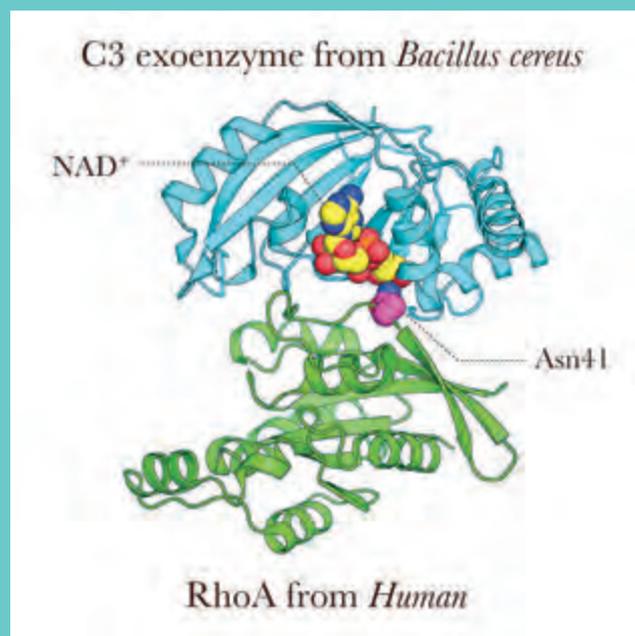


# 京都産業大学総合生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences  
Kyoto Sangyo University



《第6号》

2015  
平成27年

### 【セレウス菌 C3 exoenzyme とヒト small GTPase RhoA 複合体の結晶構造】

ボツリヌス菌やセレウス菌が持つ、C3 毒素は RhoA の Asn41 を ADP リボシル化することで、RhoA のシグナルスイッチとしての機能を失わせる。C3 は RhoA 特異的であり、同じ Rho ファミリーであり Asn41 を持つ Rac1、Cdc42 などは修飾しない。

C3-NADH-RhoA(GTP) および C3-NADH-RhoA(GDP) の複合体の結晶構造を初めて明らかにしたことで、その特異性の理解が進み、さらに Cdc42 を C3 の良い基質へ変換することに成功した。

(戸田 (資源 2 期生)、鶴村、吉田、津下ら : JBC 2015 290:19423-32)

## 目 次

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 卷頭言                         | 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   |
| 2015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                    | 17  |
| 黒坂光 教授 (学部長)                | 19  |
| 近藤寿人 客員教授                   | 22  |
| 佐藤賢一 教授                     | 26  |
| 嶋本伸雄 客員教授                   | 30  |
| 瀬尾美鈴 教授                     | 33  |
| 千葉志信 准教授                    | 37  |
| 中田博 教授                      | 40  |
| 永田和宏 客員教授                   | 43  |
| 中村暢宏 教授                     | 49  |
| 浜千尋 教授 (副学科主任)              | 52  |
| 横山謙 教授 (学科主任)               | 55  |
| 生命資源環境学科                    |     |
| 生命資源環境学科の教育研究活動             | 61  |
| 金子貴一 教授 (副学科主任)             | 63  |
| 河邊昭 准教授                     | 66  |
| 木村成介 准教授                    | 69  |
| 高橋純一 准教授                    | 74  |
| 津下英明 教授 (学科主任)              | 79  |
| 寺地徹 教授                      | 82  |
| 野村哲郎 教授 (副学部長)              | 85  |
| 本橋健 教授                      | 88  |
| 山岸博 教授                      | 91  |
| 動物生命医科学科                    |     |
| 動物生命医科学科の教育研究活動             | 97  |
| 加藤啓子 教授                     | 99  |
| 齋藤敏之 教授 (副学科主任)             | 102 |
| 染谷梓 准教授                     | 105 |
| 高桑弘樹 教授                     | 107 |
| 竹内実 教授 (学科主任)               | 109 |
| 棚橋靖行 准教授                    | 112 |
| 西野佳以 准教授                    | 114 |
| 前田秋彦 教授                     | 116 |
| 松本耕三 客員教授                   | 118 |
| 村田英雄 教授                     | 121 |
| 2015年度 動物実験教育訓練および動物慰霊祭     | 123 |
| 2015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

総合生命科学部が開設されて6年が経ちました。2010年の学部開設以来、新学部の教育と研究に邁進する日々を送るなか、2014年4月には生命科学研究科博士前期課程を、2016年4月には同研究科博士後期課程を開設するに至りました。短いようで長い6年の歳月を経て、総合生命科学部は、博士前期・後期課程を擁するようやく一人前の学部・研究科へと成長しました。

この3月には本学部の第3期の卒業生を送り出しました。第3期生の就職状況は過去2年と同様に良好でした。また、博士前期課程では記念すべき第1期生が卒業しました。就職希望者は全員無事就職を決めることができ大変喜んでおります。学部、大学院の就職活動が良好なのも、学生自身の頑張りのもとより、教員および職員の熱心なサポートの賜物と心より感謝しております。卒業生にはこれから社会に出て学部、研究科で学んだことを存分に活用し、それぞれの分野をリードする人材に成長することを期待します。また、新設の博士後期課程には内部進学生2名、タイからの留学生1名の合計3名を迎え、入学定員を充足することができました。

学部教育では、文部科学省の採択事業である「理系グローバル人材育成事業」の第1期生が、短期留学科目「海外サイエンスキャンプ」において、シリコンバレーで学びました。この科目は単なる語学留学ではなく、当地での研修や大学での授業など多彩なプログラムを経験するもので、留学を経験した学生は見違えるほど逞しくなりました。さらに、TOEICを用いた実学英語教育との連携も強め、学部全体で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取り組んでいます。また、本学部からの申請が「日本・アジア青少年サイエンス交流事業」（さくらサイエンスプラン）の科学技術交流活動コースに採択されて、マヒドン大学（タイ）の若手研究者10名を迎えました。この2週間にわたる活動を通じて、活発な研究と国際交流ができました。さらに、動物生命医科学科の16名の学生が実験動物1級技術者認定試験に合格者したことも重要なニュースです。合格上位者は本学部の学生が独占し、成績優秀者として日本実験動物協会から表彰を受けました。

研究面では、教員の多くが科学研究費等の外部資金を獲得しています。特筆すべきは、遠藤教授の研究課題が大型研究種目である「特別推進研究」に採択されたことでしょうか。平成27年度の新規採択課題はわずか14件であり、ここ数年を見ても私立大学からの採択例はありません。本学部の研究課題はこの他にも、基盤研究（S）、新学術研究、基盤研究（B）などに採択されており、本学部の研究力が高く評価されていることの裏付けであると考えられます。

このように本学部の昨年度の活動を振り返ると、教育・研究の両面において優れた成果をあげていることがわかります。しかし、その一面、教育成果の目に見える形での発信、研究環境のさらなる整備、受験生の獲得など学部として取り組まなければならない課題があります。これらの課題に34人の教員、14人の研究助教、さらに多くの研究員、嘱託職員等の協力のもと果敢にチャレンジし、学部の魅力を外部に積極的に発信し、学部をさらに発展させていく所存です。

総合生命科学部教員研究室一覧

| 学科     | 役職    | 職名    | 氏名              | スタッフ等名簿     |      |                              |  |  |            |
|--------|-------|-------|-----------------|-------------|------|------------------------------|--|--|------------|
|        |       |       |                 | 助教(3月まで)    | 講師   | 研究助教(4月以降)                   | 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            |             |      |                              | Chanmee Theerawut (3月まで)                                 | Chanmee Theerawut (4月から)   |            |
|        |       | 教授    | 遠藤斗志也           | 元島史尋<br>河野慎 |      | 河野慎                          | 柚木芳<br>須賀比奈子(8月まで)<br>丹羽一(12月から)<br>中嶋晶子<br>鈴木純子<br>角田千香 | 元島史尋(5月から)<br>須賀比奈子(9月から)<br>松本俊介(学振PD)<br>荒磯裕平(学振PD)<br>渡邊康紀(学振PD)  |            |
|        |       | 准教授   | 川根公樹            |             |      |                              | 前田昭宏(3月まで)<br>田中学(4月から)<br>坪井秀憲(7月から)                    |  |            |
|        | 学部長   | 教授    | 黒坂光             | 中村直介        |      | 中村直介                         |  | 肥塚靖彦<br>中山喜明(4月から)   | 高橋由衣(3月まで) |
|        |       | 客員教授  | 近藤寿人            | 石井泰雄        |      | 石井泰雄                         | 小西博郷   | Claire BOTTET (7月まで)   |            |
|        |       | 教授    | 佐藤賢一            | 井尻貴之        |      | 井尻貴之                         |  |  |            |
|        |       | 客員教授  | 嶋本伸雄            | 中山秀喜        |      |                              |  | Sahil Batra(2月から3月)<br>奈良重俊<br>中山秀喜(4月から)<br>入倉大祐(4月から)<br>山崎朋美(4月から)  |            |
|        |       | 教授    | 瀬尾美鈴            |             | 浅野弘嗣 |                              |  | 上野信洋<br>清水昭男(7月から)   | 清水昭男(6月まで) |
|        |       | 准教授   | 千葉志信            |             |      |                              | 千葉直美<br>藤原圭吾   | 由良隆  |            |
|        |       | 教授    | 中田博             | 秋田薫         |      | 秋田薫                          |  | 河野正孝<br>村上憲<br>石田有希子(3月まで)<br>谷田周平(3月まで)   |            |
|        |       | 客員教授  | 永田和宏            | 潮田亮         |      | 潮田亮                          | 伊藤進也<br>森戸大介<br>山本洋平<br>石田玉美子<br>福田泰子<br>木曾和美            | Shoshana Bar-Nun<br>(3月から5月)<br>Denisse Sepulveda Alvarado<br>(10月から)  | 川崎邦人       |
|        |       | 教授    | 中村暢宏            |             |      |                              | 石田竜一(3月まで)   |  |            |
|        |       | 副学科主任 | 教授              | 浜千尋         | 中山実  |                              | 中山実  |  |            |
|        | 学科主任  | 教授    | 横山謙             |             |      | 岸川淳一                         | 中西温子(3月まで)   | 中西温子(4月から)   |            |
| 生命資源環境 | 副学科主任 | 教授    | 金子貴一            |             |      |                              | 板倉学(11月から)   |  |            |
|        |       | 准教授   | 河邊昭             |             |      | 川邊隆大                         | 吉田貴徳(学振PD)<br>吉田初佳(9月まで)                                 |  |            |
|        |       | 准教授   | 木村成介            |             |      | 坂本智昭                         | 岡本郁(学振PD)<br>中山北斗(学振PD)<br>中益朗子(学振PD)                    | 上ノ山華織(3月まで)  |            |
|        |       | 准教授   | 高橋純一            |             |      |                              |  | 藤本卓矢(3月まで)   |            |
|        | 学科主任  | 教授    | 津下英明            | 鶴村俊治        |      | 吉田徹                          | 鶴村俊治   | 鈴木俊治(5月から)   | 津守耶良(9月まで) |
|        |       | 教授    | 寺地徹             | 高橋亮         |      | 高橋亮                          | 高橋亮<br>塚谷真衣  | 山本真紀   | 植村香織       |
|        | 副学部長  | 教授    | 野村哲郎            |             |      |                              |  |  | 小原真美       |
|        | 教授    | 本橋健   | 桶川友季            |             | 桶川友季 |                              | 泉井桂  |  |            |
|        | 教授    | 山岸博   | 高橋亮             |             | 高橋亮  | Gyawali Yadav Prasad<br>村上陽子 |  | 谷口ますみ(6月から)  |            |
| 動物生命医科 |       | 教授    | 加藤啓子            |             |      | 藤田明子                         |  | 北村元隆   | 渡邊裕子       |
|        |       | 助教授   | 今野兼次郎<br>(3月まで) |             |      |                              |  |  |            |
|        | 副学科主任 | 教授    | 齋藤敏之            |             |      |                              |  | 岩崎方子(8月から)   |            |
|        |       | 准教授   | 梁谷梓             |             |      |                              |  | 西井真理(9月から)   |            |
|        |       | 教授    | 高桑弘樹            |             |      |                              |  |  |            |
|        | 学科主任  | 教授    | 竹内実             |             |      |                              |  | 石田喬裕<br>佐倉正明<br>泉千加<br>今江清朝<br>土佐祐輔(4月から)<br>西野康子(4月から)<br>伊藤隆起(3月まで)<br>池永充宏(3月まで)<br>川崎成人(3月まで)<br>杉江真理子(3月まで)<br>田邊輝雄(3月まで)<br>村北佳史(3月まで)<br>渡辺正義(3月まで) | 田中美子       |
|        |       | 准教授   | 棚橋靖行            |             |      |                              |  |  |            |
|        |       | 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            |             |      |                              |  |  |            |
|        | 教授    | 村田英雄  |                 |             |      |                              |  |  |            |

総合生命科学部事務室スタッフ名簿

| スタッフ等名簿   |  |
|---|--|
| 大学院生  | その他  |
| Ontong Pawaraid(D3)<br>望月 信利(M2)  |  |
|   | 植田 依里(大学院委託生)<br>宋 紀瑤(大学院委託生)<br>石坂 直也(大学院委託生) |
|   |  |
|   |  |
| 飯田 英明(D2)<br>西川 裕貴(M2)  |  |
| Ksenia Pavlovna Shcherbakova(D3)  |  |
| 吉田 亜佑美(D3)<br>近藤 真菜美(M2)<br>松島 章子(M1)   |  |
|   |  |
| 森 勇伍(D3)<br>田中 涼太(D1)<br>溝上 侑也(M2)  | 永原 秀剛(大学院委託生)<br>荻田 祐司(大学院委託生)                 |
| 小谷 友理(D3)<br>杉原 宗親(M2)<br>上垣 日育(M1)<br>坂田 健志朗(M1)<br>藤井 唱平(M1)  |  |
| Jeerawat Soonthomsit(D3)<br>大迫 志帆(M1)   |  |
|   |  |
| 竹内 奈央(M1)<br>馬場 みほ里(M1)   |  |
|   |  |
| 辻野 裕大(M2)<br>ハク イナ(M2)  |  |
| 川勝 弥一(D3)<br>天野 瑠美(M2)<br>久保 俊彰(M2)<br>三好 彩央里(M1)<br>中濱 奏絵(M2)<br>高橋 稜一(M1)                           |  |
| Waraphan Tonity(D2)<br>竹内 理子(M1)<br>村田 晴香(M1)   |  |
| 大森 健人(M2)<br>阿部 ころも(M1)<br>出雲谷 遥(M1)<br>中村 由衣(M1)   |  |
|   |  |
| 奥島 輝也(M2)<br>越野 将典(M1)<br>茨木 亮多(M2)<br>金山 純子(M2)<br>向井 章人(M2)<br>軸 屋 恵(M1)<br>前田 貴文(M1)               |  |
| タケノガイ シホコ(D1)<br>廣田 暖奈(M2)<br>織田 弥加(M1)<br>薄 美有(M1)   |  |
|   |  |
| 小野 隆祐(M2)<br>上西 美緒(M1)<br>オウ ハン(M1)<br>木下 香菜子(M1)   |  |
|   |  |
| 木下 佳紀(M2)<br>雨森 貴郁(M1)  |  |
|   |  |
| 高崎 摩依子(M2)<br>渡谷 理沙(M2)<br>宇野 真由奈(M1)<br>三輪 奈緒子(M1)   |  |
|   |  |
| 河北 尚輝(M1)<br>伊藤 亜希(M2)<br>岡本 奈津美(M2)<br>古藤 惇(M2)<br>佐々木 創平(M1)<br>脊戸 優(M1)<br>佐々木 大樹(D3)<br>加島 圭悟(M2) |  |

| 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)(3月まで)   | 島部 知美  |
| 教学センター課員(総合生命科学部担当)(4月から)   | 岡田 賢   |
| 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)(2月から) | 飯田 康子  |
| 教学センター契約職員(総合生命科学部担当)(6月から) | 石野 都   |
| 教学センター契約職員(総合生命科学部担当)(8月から) | 有麻 智絵  |
| 教学センター契約職員(総合生命科学部担当)(1月まで) | 伊原 和美  |
| 教学センター契約職員(総合生命科学部担当)(3月まで) | 橋本 智子  |
| 教学センター嘱託職員(日本科学未来館・実験室事務補助) | 伊藤 君枝  |
| 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)           | 吉岡 倫世  |
| 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)           | 村木 直子  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)           | 早瀬 麻耶  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)           | 猪子 朋子  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)           | 山岡 沙織  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)(4月から)     | 上ノ山 華織 |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)(6月から)     | 渡邊 晴代  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)(9月から)     | 古賀 由希恵 |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)(3月まで)     | 久富 利恵  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)(3月まで)     | 西村 香里  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)(3月まで)     | 吉田 哲治  |
| 教学センター嘱託職員(実験補助員)(2月まで)     | 奥村 昌美  |
| 教学センター特定職員(実験補助員)(7月まで)     | 佐々木 瑛峰 |
| 教学センター特定職員(RI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                     | 川根 公樹          |
| 省エネルギー推進委員会                 | 遠藤 斗志也         |
| 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) | 中田 博           |
| ダイバーシティ推進委員会                | 瀬尾 美鈴<br>西野 佳以 |
| 教育支援研究開発センター運営委員会           | 黒坂 光           |
| 学部 FD/SD推進ワーキンググループ         | 野村 哲郎          |
| 大学院 FD/SD推進ワーキンググループ        | 野村 哲郎          |
| ラーニングコモンズ運営委員会              | 高橋 純一          |
| 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                   | 横谷 梓           |
| 障がい学生支援委員会                  | 千葉 志信          |
| 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<br>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             | 野村 哲郎          |
| 教職課程教育センター運営委員会             | 本橋 健之<br>齋藤 敏之 |
| 国際交流推進委員会                   | 山岸 博           |
| 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               | 瀬尾 美鈴          |
| 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          |

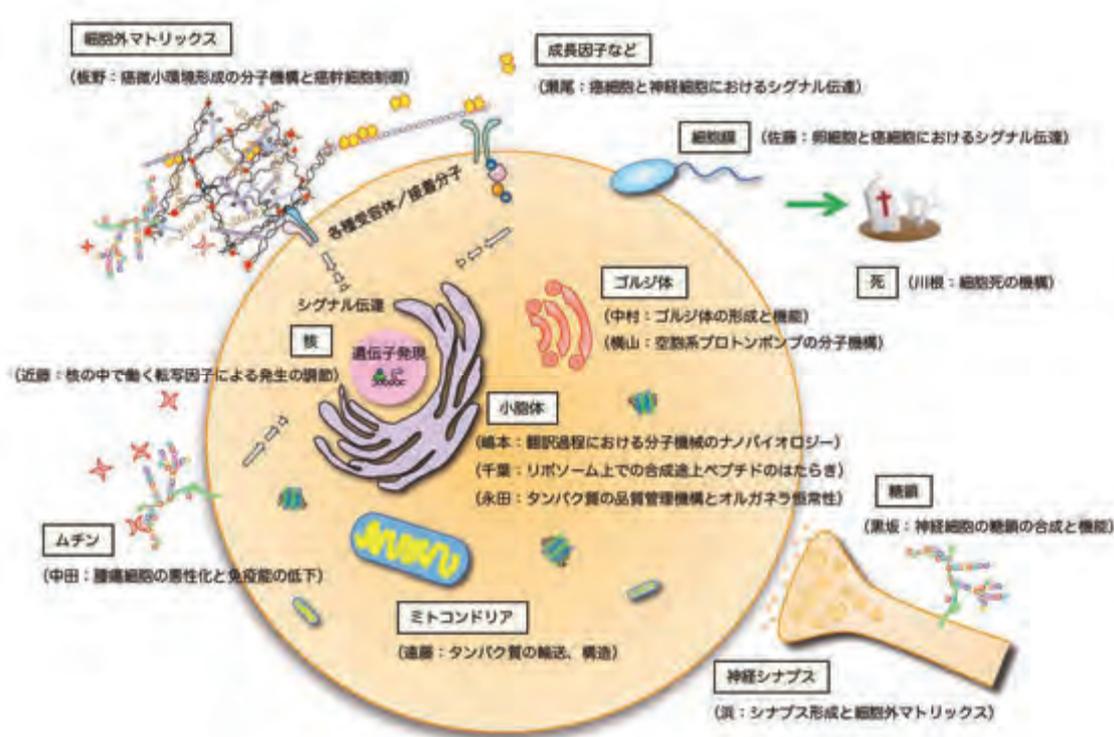
# 生命システム学科

## 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。

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。1年次秋学期から2年次にかけて、知識の定着と思考力を高めるために双方向的な演習科目に取り組む。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3期生(平成24・西暦2012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                                       |
| 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                                       |
| 再生医科学           | 3    | 川根、近藤                                    |
| 薬理学             | 3    | 板野                                       |
| 生命システム演習Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ   | 1, 2 | 横山、黒坂、中村、佐藤                              |
| 生命科学演習Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ | 1    | 川根、板野、黒坂、横山、千葉、中村                        |
| 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、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 |

(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: ヒアルロン酸合成機構の解明とアンチエイジング技術への展開

関節機能の低下が原因で寝たきりになる高齢者が増えている。この要因として、関節でクッションや潤滑の役割をするヒアルロン酸の減少がある。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcA)が、 $\beta$ -1,3と $\beta$ -1,4結合で交互に連結した2糖ユニットの繰り返し構造からなる高分子多糖であり、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、ヒアルロン酸合成機構の全容解明に取り組み、その研究を通じて、アンチエイジングへの技術展開を目指す。

#### 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。

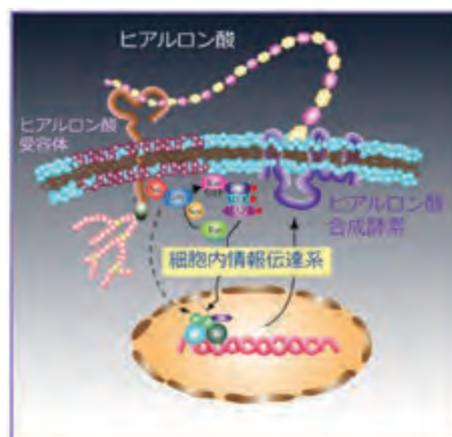


図1. ヒアルロン酸合成とシグナル伝達

### 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、進行性乳癌を高率に発症させることを明らかにしてきた。ヒアルロン酸の過剰な産生の結果、細胞質のUDP-N-アセチルグルコサミンとUDP-グルクロン酸が基質として多量に消費されるため、細胞内糖ヌクレオチド代謝が変化すると考えられる。そこで我々は、安定同位体と質量分析を駆使して、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞における糖ヌクレオチド代謝の変化について研究した。そして、ヒアルロン酸の過剰産生によって、細胞質糖ヌクレオチドの代謝流束が変化することを明らかにした。この結果は、癌進展における細胞内糖ヌクレオチド代謝の生理的重要性を示唆している。

### 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  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 linkages (Figure 1). Our laboratory discovered the first mammalian HA synthase (HAS) gene and has been thoroughly investigating the mechanism of HA biosynthesis ever since. Recently, we succeeded in establishing an in vitro reconstitution system using a recombinant HAS protein and developed a screening system for compounds that have HAS activation potential. Our future challenge is therefore to understand the entire mechanism of HA biosynthesis and apply this knowledge to developing innovative anti-aging technologies.

#### 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 HAS2 transgenic mouse model demonstrated that HA overproduction caused rapid development of aggressive breast carcinoma at a high incidence. Because excess HA production consumes large quantities of the cytosolic UDP-*N*-acetylglucosamine and UDP- glucuronic acid as substrates, overproduction of this polysaccharide may alter networks for the nucleotide sugar metabolism, which in turn affects cellular glycosylation status and the dynamics of the extracellular matrix. In this study, we applied a stable isotope-assisted tracing and MS profiling to investigate the changes in intracellular sugar nucleotide levels in HAS2-overexpressing breast cancer cells and revealed that HA overproduction significantly altered the metabolic flux of intracellular nucleotide sugars, suggesting the physiological significance of changes in intracellular sugar nucleotide levels during cancer progression.

### 4. 論文, 著書など

T. Chanmee, P. Ontong, K. Kimata, N. Itano: Key roles of hyaluronan and its CD44 receptor in the stemness and survival of cancer stem cells. *Front Oncol.* 5:180. doi: 10.3389/fonc.2015.00180. eCollection 2015.

### 5. 学会発表など

板野直樹 ヒアルロン酸産生によるがん幹細胞の代謝プログラミング BMB2015 神戸, 2015.12.4. (ワークショップ)

望月信利, 東出実歩, チャンミー シーラウト, オントン パーフレッド, 板野直樹 タンパク質 O-GlcNAc 修飾による上皮-間葉転換の制御 BMB2015 神戸 2015. 12.2

板野直樹 がん幹細胞制御因子としてのヒアルロン酸 第74回日本癌学会学術総会 名古屋, 2015.10.10. (シンポジウム)

オントン パーフレッド, チャンミー シーラウト, 板野直樹 ヒアルロン酸過剰産生は上皮間葉転換を誘導してがん幹細胞性

の獲得を促進する 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会 大阪、2015.7.23.

Itano, N., Chanmee, T., Ontong, P., Mochizuki, N., Kongtawelert, P., Konno, K. Excessive hyaluronan production promotes acquisition of cancer stem signatures. International Society for Hyaluronan Sciences 10th International Conference (Hyaluronan 2015) Florence, Italy, 2015. 7. 11. (招待講演)

## 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: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

第 24 回日本がん転移学会学術集会優秀ポスター賞

オントン パワーレッド

受賞論文題目:「ヒアルロン酸過剰産生は上皮間葉転換を誘導してがん幹細胞性の獲得を促進する」



### 5) その他

岡山大学非常勤講師 (2015年4月1日～2016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、細胞内の及び細胞外環境からの要請とシグナルに従い、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じて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 1000 種類を越えるタンパク質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ぬ。細胞内にはこうしたミトコンドリア合成やその構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、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。またオルガネラは各々が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) 外膜トランスロケータ TOM 複合体の構造機能解析

ミトコンドリア外膜の TOM 複合体は、約 1000 種類ものミトコンドリアタンパク質の入り口として機能する「タンパク質専用の外膜透過装置」である。しかし TOM 複合体は高分解能の精密構造がいまだに決定されておらず、各タンパク質がどのように集

教授 遠藤斗志也

Prof. Toshiya Endo, Ph. D.



助教 河野 慎

Assist. Prof. Shin Kawano, Ph. D.

合して複合体をつくり、各タンパク質がどのように前駆体タンパク質を効率よく膜透過させるかなどの問題は未解決であった。今回、*in silico* の構造予測と *in vivo* 部位特異的光架橋法を組み合わせて、TOM 複合体のサブユニット間相互作用をマッピングし、複合体の全体構造を明らかにした。

複合体の中心サブユニット Tom40 がつくる円筒構造の内側は、前駆体タンパク質が外膜を透過するための通り道として機能し、プレ配列を持つ親水性前駆体およびプレ配列を持たない疎水性前駆体用に、別々に最適化された通り道が用意されていた。Tom40 の N 末端領域は円筒構造内を貫通して膜間部側でシャペロンタンパク質を集め、疎水性前駆体を効率良く受け渡していた。さらに TOM 複合体には Tom40 から成る孔が 3 つの完成型と、孔が 2 つの準備型の 2 つの状態があり、それらを可逆的に変換することで新しい Tom40 を古い Tom40 と入れ替え、完全な機能をもつ複合体を維持していることが示唆された。こうして、TOM 複合体が多様な前駆体タンパク質を効率よく取り込むための膜透過装置として働く構造的基盤がはじめて明らかになった。

### 2) ミトコンドリア外膜-内膜間での脂質輸送の構造生物学的解析

ミトコンドリア機能に必須の脂質カルジオリピンの原材料のリン脂質ホスファチジン酸は ER で作られ、ER からミトコンドリアの外膜へ、さらに外膜から内膜へと運ばれ、内膜上の一連の酵素によりカルジオリピンへと変換される。最近ホスファチジン酸の外膜から内膜への輸送に Ups1-Mdm35 が関わる事が示されたが、その機構は不明であった。そこで、X 線結晶構造解析により、Ups1-Mdm35 複合体およびそのホスファチジン酸結合型の立体構造を決定した。その結果、Ups1 に Mdm35 が抱きつくように結合することで Ups1 の立体構造が安定化されていること、Ups1 にはプラスに荷電した深い「ポケット」が形成されており、ホスファチジン酸は Ups1 のポケットに頭部から入り込んで、ポケット内のプラスの電荷を持つアミノ酸残基に静電的相互作用により結合していることが分かった。ポケットの入り口には、オメガグループと呼ばれる柔軟性に富んだループ構造があって、これがポケットに蓋をしてホスファチジン酸

を水から隔離することで、Ups1 が外膜から内膜へと、水の区画を越えてホスファチジン酸を運ぶことを可能にしていることもわかった。

次に Ups1-Mdm35 複合体の立体構造に基づいて Ups1 と Mdm35 を共有結合で繋ぎ、両者が解離できない形に固定した。すると Ups1 は膜への結合が弱くなり、ホスファチジン酸の Ups1 への積込みや荷下ろしが遅くなり、結果としてホスファチジン酸の輸送能力が低下した。したがって、ホスファチジン酸の外膜から内膜への効率的な輸送には、Mdm35 の解離を伴った Ups1 の膜への結合が重要であることが示唆された。このように二つのタンパク質の結合・解離により脂質の輸送が制御されるメカニズムはこれまでに例がなく、新規のメカニズムであると言える。

### 3. Research projects and annual reports

Eukaryotic cells are highly compartmentalized into membrane-bounded organelles with distinct functions. Mitochondria fulfill central functions in cellular energetics, metabolism and signaling. The TOM complex in the outer membrane (OM) imports most mitochondrial proteins, however, its architecture is unknown. To define the architecture of the TOM complex, we mapped the interactions of the channel protein Tom40 with preproteins in transit and other  $\alpha$ -helical subunits by *in vivo* and *in organello* site-specific photocrosslinking. The translocator contains three Tom40  $\beta$ -barrel channels sandwiched between a central  $\alpha$ -helical Tom22 receptor cluster and external regulatory Tom proteins.

Preproteins in transit were located inside the  $\beta$ -barrel pore of Tom40 and not in the interstitial space between Tom40 molecules. Besides, positively charged presequences of preproteins were found to follow an acidic path on the inner wall of the Tom40 pore, whereas carrier proteins interact with mostly hydrophobic residues, thereby Tom40 can handle and chaperone diverse classes of preproteins by providing distinct translocation paths. At the TOM channel exit, small chaperones were recruited, which promotes an efficient transfer of hydrophobic preproteins to the chaperones for the downstream transport process.

We also found that the functional, preprotein-translocating mature trimeric TOM

complex exchanges with a dimeric TOM complex isoform that lacks Tom22. This dynamic exchange between dimeric and trimeric forms provides the means for template-driven assembly of new subunits through their exchange for old subunits. Dynamic coupling of  $\alpha$ -helical receptors,  $\beta$ -barrel channels and chaperones thus generates a versatile machinery that transports ~1,000 different proteins.

Organelle functions strictly rely on the organelle-specific lipid compositions, as well. How hydrophobic phospholipid molecules can traverse aqueous compartments to shuttle between different membranes is a critical question concerning the mechanism of membrane biogenesis. Recently, Ups1 in the mitochondrial intermembrane space (IMS) was shown to mediate phosphatidic acid (PA) transfer between the mitochondrial OM and inner membrane (IM) in cooperation with Mdm35. However, how Ups1 and Mdm35 cooperate to recognize PA and drive transport of PA from the OM to IM by traversing the aqueous IMS remained unclear.

To gain mechanistic insights into how Ups1 with Mdm35 exerts its PA transfer activity, we determined the X-ray crystal structures of Mdm35 and the Ups1-Mdm35 complex with and without PA. Surprisingly, two distinct polypeptides of Ups1 and Mdm35 form a single compact domain, and the Ups1-Mdm35 complex contains a deep pocket that can accommodate a lipid molecule and an  $\Omega$  loop likely functioning as a lid for the pocket. The structure of the Ups1-Mdm35 complex with PA shows that the PA molecule binds to the pocket in a head-in manner to interact with positively charged residues in the pocket. Parallel liposome binding and lipid transfer assays by using Ups1 mutants with Mdm35 show that Arg residue at the bottom of the pocket and the  $\Omega$ -loop lid are critical for the PA transfer activity and that conserved Lys residues around the entrance of the pocket are important for binding to cardiolipin-containing liposome and PA transfer. The crystal structures of Ups1-Mdm35 with and without PA provide a basis for understanding the molecular mechanism of phospholipid transfer within mitochondria.

#### 4. 論文, 著書など

T. Shiota, K. Imai, J. Qiu, V. L. Hewitt, K. Tan, H. Shen, N. Sakiyama, Y. Fukasawa, S. Hayat, M. Kamiya, A. Elofsson, K. Tomii, P. Horton, N. Wiedemann, N. Pfanner, T. Lithgow, T. Endo: Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science* **349**, 1544-1548 (2015)

(featured by D. Mokranjac and W. Neupert: Architecture of a protein entry gate (*News and Views*), *Nature* **528**, 201-202 (2015))

Y. Watanabe, Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo: Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria. *Nature Commun.* **6**, Article number: 7922 (2015)

D. Maruyama, T. Endo, and S. Nishikawa: BiP3 supports the early stages of female gametogenesis in the absence of BiP1 and BiP2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* **10** e1035853 (2015)

A. Takano, T. Kajita, M. Mochizuki, T. Endo, and T. Yoshihisa: Cytosolic Hsp70 and co-chaperones constitute a novel system for tRNA import into the nucleus. *eLife* **4**, e04659 (2015)

#### 5. 学会発表など

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria from proteins and lipids (招待講演), Seminar at National Tsing Hua University, Hsinchu City, Taiwan, 2015.2.26

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria from proteins and lipids Seminar at Institute of Biomedical Sciences (招待講演), Seminar at Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 2015.3.2

Toshiya Endo: Croslinking approaches in membrane biology (招待講演), TAMPTing Seminar 3, Amsterdam, The Netherlands, 2015.3.16-18

Yasushi Tamura, Yasunori Watanabe, Shin Kawano, and Toshiya Endo: Structural and mechanistic insight into phospholipid transfer via mitochondria (招待講演), Progress 100: Kyushu-U and Stanford-U Joint Research and Education Program First Symposium: From Genes to Human Diseases, 九州大学, 福岡, 2015.3.16-17

Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis from the viewpoints of protein and lipid trafficking (招待講演), Mitoclub Seminar at MPI, Cologne, Germany, 2015.3.19

Toshiya Endo: Machineries for transport of proteins and lipids for mitochondrial biogenesis (招待講演), EMBO Conference on

Mechanisms and regulation of protein translocation, Dubrovnik, Croatia, 2015.3.21-25

遠藤斗志也: ミトコンドリア生合成に関わる分子装置の構造と機能 (招待講演), 第15回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム「細胞内の蛋白質の一生: 新生から死に至るまで」, 徳島, 2015.6.24-26

渡邊康紀, 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也: Ups1-Mdm35複合体による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説明 (ポスター), 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島, 2015.6.24-26

河野慎, 遠藤斗志也: ERMES複合体によるリン脂質輸送の構造基盤 (ポスター), 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島, 2015.6.24-26

西川周一, 加藤詩織, 杉山智之, 野本美佳, 多田安臣, 山本雅也, 遠藤斗志也: シロイヌナズナ小胞体品質管理欠損株は特異的な細胞膜受容体様キナーゼの機能欠損のため花粉成熟が異常となる (招待講演), 第67回日本細胞生物学会年会 シンポジウム「作って壊して~植物は細胞壁で考える」, 東京, 2015.6.30-7.2

河野慎, 渡邊康紀, 田村康, 遠藤斗志也: 膜間リン脂質輸送の構造生物学 (招待講演), 第67回日本細胞生物学会年会 シンポジウム「ミトコンドリアが魅せる新境地-拡大を続けるミトコンドリアワールド」, 東京, 2015.6.30-7.2

吉久徹, 小林小夏, 佐藤大典, 稲田利文, 遠藤斗志也: 酵母 HAC1 mRNAの特異な翻訳制御とRNA品質管理回避 (招待講演), 第67回日本細胞生物学会年会 ワークショップ「生命現象を指させるオルガネラの多彩な機能」, 東京, 2015.6.30-7.2

西川周一, 加藤詩織, 杉山智之, 野本美佳, 多田安臣, 山本雅也, 遠藤斗志也: シロイヌナズナ小胞体品質管理欠損株は特異的な細胞膜受容体様キナーゼの機能欠損のため花粉成熟が異常となる (ポスター), 第67回日本細胞生物学会年会, 東京, 2015.6.30-7.2

小島理恵子, 梶原秀, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体テザリング複合体ERMES構成因子欠損株のマルチコピーサプレッサー解析 (ポスター), 第67回日本細胞生物学会年会, 東京, 2015.6.30-7.2

田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリア-小胞体結合因ERMES複合体形成におけるミトコンドリアダイナミクスの役割 (ポスター), 第67回日本細胞生物学会年会, 東京, 2015.6.30-7.2

吉久徹, 小林小夏, 佐藤大典, 稲田利文, 遠藤斗志也: 酵母 HAC1 mRNAの特異な翻訳制御とRNA品質管理回避 (ポスター), 第67回日本細胞生物学会年会, 東京, 2015.6.30-7.2

吉久徹, 梶田拓弥, 望月誠, 遠藤斗志也, 吉久徹: tRNAの核内輸送における細胞質Hsp70・コシャペロン系の機能, 第17回日本RNA学会年会, 札幌, 2015.7.15-17

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria from proteins and lipids (招待講演), The Crash Seminar from Japan by the former JSPS program officers: Biological Science 2015 in Japan, Zurich University, Botanical Garden, Zurich, Switzerland, 2015.10.28

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria from proteins and lipids (招待講演), Seminar at Biocenter, University of Basel, Biocenter, Basel, Switzerland, 2015.10.29

Toshiya Endo: How the cell makes mitochondria from proteins and lipids (招待講演), Seminar at ETH, ETH, Zurich, Switzerland, 2015.10.30

遠藤斗志也: ミトコンドリア生合成のためのタンパク質と脂質の交通 (招待講演), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会) シンポジウム「オルガネラバイオロジー: 細胞の構造と機能の新しい姿」, 神戸, 2015.12.1-4

河野慎, 遠藤斗志也: Mdm12とMmm1によるリン脂質輸送メカニズムの解明 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

小島理恵子, 梶原秀, 遠藤斗志也, 田村康: ERMES複合体の機能に関連する新規遺伝子の同定 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

渡邊康紀, 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也: Ups1-Mdm35複合体の結晶構造から明らかになったミトコンドリア膜間のリン脂質輸送機構 (口頭発表+ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

石坂直也, 塩田拓也, 田村康, 遠藤斗志也: Tom22のミトコンドリア局在化におけるPor1の役割の解明 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

古田詩唯奈, 遠藤斗志也, 田村康: 試験管内リン脂質輸送実験系を用いたミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送因子の検索 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

植田依里, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアクリステジヤンクシオン形成に関与するMic19の輸送機構の解析 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

高野晃, 梶田拓弥, 望月誠, 遠藤斗志也, 吉久徹: 出芽酵母の主要な細胞質Hsp70であるSsa2pは, tRNAの核内輸送体として働く (口頭発表+ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

西川周一, 丸山大輔, 山口友輝, 東山哲也, 遠藤斗志也: 小胞体分子シャペロンによる植物有性生殖過程の核膜融合の制御 (招待講演), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会) ワークショップ「受精を支える分子とそれを取り巻く分子環境」, 神戸, 2015.12.1-4

沢里克宏, Michael Moser, 佐藤諒, 田村康, 遠藤斗志也, 西山賢一: タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素MPIaseのin vivoにおける機能解析 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

両角勇紀, 久田萌子, 遠藤斗志也, 田村康: 出芽酵母を用いたミトコンドリア-液胞間新規テザリング因子の遺伝学的探索 (口頭発表+ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

鈴木万葵, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア低分子キャリアータンパク質Hem25の機能解析 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

柚木-江崎芳, ラーマンバイチュル, 石丸雄基, 河野慎, 遠藤斗志也: ミトコンドリア内膜透過装置構成因子Tim50の相互作用解析 (ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送反応の再構成実験系の確立 (口頭発表+ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

Jiyao Song, 田村 康, 吉久 徹, 遠藤斗志也: Analysis of outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial protein (口頭発表+ポスター), BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015.12.1-4

## 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・特別推進研究

課題名:ミトコンドリア生合成を司る細胞内統合的ネットワークの解明

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:H27-31 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)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名:ミトコンドリア外膜トランスロケーターによるタンパク質輸送の構造・機能研究

研究代表者:荒磯裕平, 取得年度:H27-29 年度 (3 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名:ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 と TIM22 複合体の構造生物学的解明

研究代表者:松本俊介, 取得年度:H27-29 年度 (3 年)

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名:GPCR のアロステリックリガンド:細胞応答測定による親和性解析法とリガンド探索

研究代表者:須賀比奈子, 取得年度:H26-28 年度 (3 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名:ペルオキシソーム形成過程のペルオキシソーム膜蛋白質特異的輸送の構造生物学的研究

研究代表者:丹羽一, 取得年度:H25-27 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

遠藤斗志也:BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) (2015.12.1-4) 大会長

## 4) 受賞等

渡邊康紀:若手優秀発表賞, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会)

## 5) その他 なし

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

「タンパク質と脂質の交通を基軸とするミトコンドリア生合成の分子機構の統合的解明」では、タンパク質の配送に関わるトランスロケータやその補助因子の精密構造の決定、精密構造に基づく各因子の機能メカニズムの解明をめざすとともに、これまでほとんど手が付いていなかった脂質の配送と組成維持に関わる因子の同定とその機能の解明をめざしている。そのために構造生物学的手法に習熟し、実績のある研究員として、河野慎研究助教を配置いただき、研究を推進している。ポストゲノム時代に入って、遺伝子工学やゲノム情報解析については自動化、ハイスループット化が進みつつあるが、一方でタンパク質やオルガネラについて機能をもった形で精製・調製し、それらを用いて *in vitro* で機能解析を行い、構造情報を取得する、さらにはその情報に基づいて逆遺伝学的手法により *in vivo* 機能の解析を行うことの重要性がますます高まりつつある。こうした手法を学生が習得するには、きめ細かい指導と時間が必要であるが、すでに本研究に参画している学部学生 7 名と大学院生 (委託生) 2 名について、河野助教の指導により、こうした研究手法と研究の実際に直接触れることができ、教育効果があがっている。次世代の生命科学研究や技術開発を担う人材育成への貢献が期待される。



27 年 9 月 研究室 (+CREST チーム) のリトリート(新潟)

# 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ことを目指す。

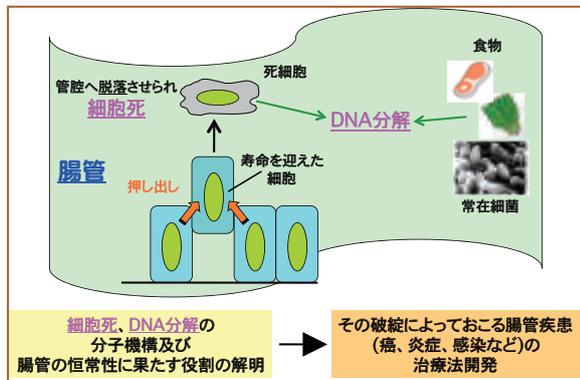


図1. 腸管での細胞死とDNA分解

## 2. 本年度の研究成果

(1)細胞脱落に関与する遺伝子の候補を得るため、マウス小腸上皮を用いたマイクロダイセクションとそれに続くマイクロアレイ解析を行い（図2）、絨毛頂端部で遺伝子発現が上昇する遺伝子、減少する遺伝子をそれぞれ百数十個抽出した。(2)また、細胞脱落を司る遺伝子を同定するため、ショウジョウバエ腸上皮を用いたRNAiスクリーニングの一次スクリーニングを開始した（図3）。(3)さらに、細胞脱落の実行機構を明らかにするため、ヒト及び

准教授 川根公樹

Associate Prof. Kohki KAWANE, Ph. D.



マウス上皮細胞株で細胞脱落が観察できる実験系を構築した。続いて、細胞脱落の理解に不可欠と考えられる、細胞接着タンパク質や細胞骨格タンパク質などの分子動態を可視化できる安定発現株を樹立した。

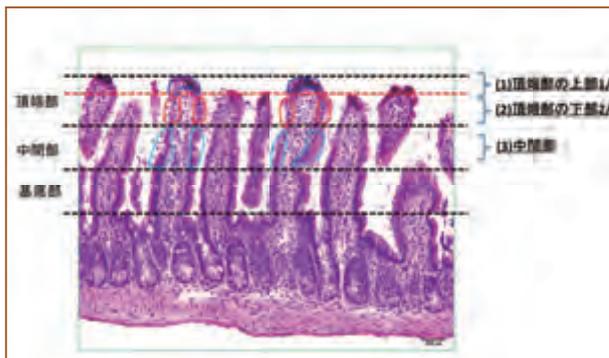


図2. マウスオルガノイドを用いた細胞脱落の解析  
マウス小腸の組織切片を用い、細胞脱落が起こる絨毛頂端部とその下部をマイクロダイセクションによって分離後、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変動を解析した。



図3. 一次スクリーニングで表現型を示した例

## 3. Research projects and annual reports

The homeostasis in gut is maintained by the balance of proliferation and death of epithelial cells with the rigid barrier function of epithelia. The impairment of either 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 disease in gut and develop novel treatments against them.

This year (1) we performed microdissection and microarray analysis by using the tissue sections of mouse intestine to select the candidate genes which may be involved in cell extrusion. Consequently we extracted each 100–200 genes which expression increase or decrease at the most apical region of intestinal villi. (2) We started the first screening step of RNAi screening by using *Drosophila* midgut to identify the responsible genes for cell extrusion. (3) To decipher the execution process of cell extrusion we designed live imaging experimental system on epithelial cell line and established stable transformants which enable the visualization of dynamics of some molecules including cell adhesion proteins and cytoskeletal proteins.

#### 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

#### 5. 学会発表など

川根公樹: Cell Death in Cellular Society. 熊本大学リエゾンラボ研究会・HIGOプログラム最先端研究セミナー, 熊本県, 2015.9.9

川根公樹: 細胞社会における細胞死. —細胞死に伴うDNA分解と上皮細胞の細胞終焉である細胞脱落—, 大阪大学微生物病研究所第23回ブリッジセミナー, 大阪府, 2015.11.6

#### 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)

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

研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H25- (使用期限H30年まで)

光科学技術研究振興財団 研究助成金

課題名: オルガノイド(腸組織培養)を用いたライブイメージング解析による、未解明の細胞間情報伝達により誘導される細胞死機構の解明

研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H27-29年 (2年)

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

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中村直介

Assist. Prof. Naosuke Nakamura Ph. D.

## 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 $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thr, Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thr, GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thr)を持つ糖鎖に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。この中で GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thr の糖鎖は、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-acetylgalactosaminyltransferase (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 *galnt9*, *galnt17* 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) ゼブラフィッシュ *galnt* ファミリーの発現解析

大きな遺伝子ファミリーを形成する *galnt* 遺伝子は、それぞれが組織特異的に発現し、各組織におけるムチン型 O-グリコシド型糖鎖の合成に関与していると考えられている。しかし、それぞれのアイソザイムの発現や、その機能に関する分析は十分でない。我々は *galnt* 遺伝子の網羅的な機能解析を目的として、まずゼブラフィッシュの発生初期における *galnt* 遺伝子の発現を解析した。

### 2) *galnt* 遺伝子変異体ゼブラフィッシュの作製

*galnt* 遺伝子の発現解析実験をもとにして、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて、変異体作製を試みた。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) ゼブラフィッシュ *galnt* ファミリーの発現解析

*galnt* 遺伝子ファミリーの網羅的な解析を目的として、ゼブラフィッシュアイソザイムの初期胚における発現解析を行った。ゲノム DNA 塩基配列をデータベース検索するこ

とで、ゼブラフィッシュは *galnt15*, *19* を除く 18 種類のアイソザイムを持つことが明らかとなった。我々はこれらすべてのゼブラフィッシュ *galnt* 遺伝子をクローニングして、正確な塩基配列を決定した。その情報に基づいて作製したプローブを用いて、whole mount *in situ* hybridization を行い、全アイソザイムの初期胚における発現パターンを決定した。その結果、それぞれのアイソザイムは互いに重複するものの、特異的な発現パターンを示すことを明らかにした。また、哺乳類において脳特異的に発現するアイソザイム (*galnt9*, *galnt13*, *galnt17*, *galnt20*) は、ゼブラフィッシュにおいても脳に強く発現していた (Fig. 1)。これらの機能欠失体の解析を通して、脳におけるアイソザイムの機能解明が期待できる。



Fig. 1. Analysis of *galnt* gene expression in zebrafish by WISH. Isozymes (*galnt9*, *13*, *17*, and *20*) highly expressed in mammalian brains were also expressed at high level in zebrafish brains.

### 2) *galnt* 遺伝子変異体ゼブラフィッシュの作製

我々がこれまでに単離・同定したゼブラフィッシュ *galnt* アイソザイムのうちで、特にその機能が分かっていないアイソザイムについて、ゲノム編集技術である CRISPR システムを用いて、その変異体作製を試みた。今年度は脳特異的に発現する *galnt17* に対して、CRISPR single guide RNA, Cas9 mRNA (あるいは Cas9 タンパク質) をゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションした。変異の導入は、インジェクション胚から調製したゲノム DNA を HMA (heteroduplex mobility assay) により解析した (Fig. 2)。インジェクション胚においては高分子領域にスミアなバンドが認められたことから、効率的なゲノム編集が起こったことが確認できた。今後は、網羅的な解析を目的として、この手法をもとに様々なアイソザイムの変異体作製に取り組む。

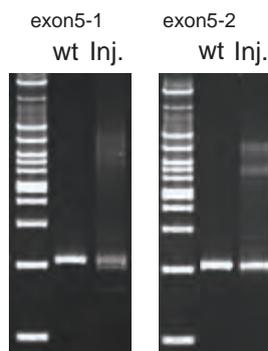


Fig. 2. HMA of zebrafish genome DNA obtained from embryos with or without injection of CRISPR/Cas9 RNAs.

### 3. Research projects and annual reports

We have been investigating roles of an O-linked sugar chain with the carbohydrate-protein linkage structure, GalNAc $\alpha$ 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, *galnt8*, *9*, *17*, and *18* make a unique subfamily that have characteristic amino acid substitutions in the catalytic domains and they show almost no detectable *in vitro* catalytic activity using typical mucin-type peptides as acceptor substrate. Among them, we have isolated *galnt9* and *17*, and demonstrated that they are brain-specific and biologically important for the neural differentiation in mammals. Based on these backgrounds, we have focused on the functions of *galnt* genes, and obtained the following findings.

#### 1) Analysis of zebrafish *galnt* genes during embryonic development

We have isolated all the zebrafish *galnt* genes, and determined their spatial and temporal expressions during the early development of zebrafish by *in situ* hybridization analysis. Our study demonstrated that, during early developmental stages, the isozymes had characteristics, although significantly overlapping, expression patterns in the embryos, and some of them exhibited developmental stage specific expression. We found that the isozymes with high expression in mammalian brains were also expressed in the zebrafish brain at high level (Fig. 2). These data indicate that zebrafish are the suitable model organisms for elucidating the function of mucin-type glycosylation in

the vertebrate brains through the analysis of mutant lines that lack brain-specific *galnt* genes.

#### 2) Production of *galnt* knockout zebrafish using CRISPR/Cas9

The information on the isozyme expression patterns, when used together with the gene knockdown/knockout technology, will help clarify the functions of the isozymes in zebrafish. We are generating zebrafish mutants lacking a *galnt* gene using CRISPR/Cas9. We have successfully obtained F1 hetero *galnt18a* mutants. Production of *galnt17* knockout zebrafish is also in progress. Sequences in *galnt17* exon 5 were chosen as CRISPR target sites to generate knockout zebrafish. Cas9 mRNA and single guide RNA (exon5-1 or exon5-2) were injected into zebrafish embryos of 1 to 2-cell stage. Genomic DNAs were extracted from 5 embryos with (Inj.) and without (wt) injection, and examined by heteroduplex motility assay (HMA). Presence of high molecular weight smear bands in the injected embryos indicates efficient genome editing activity of CRISPR (Fig. 2). To investigate the biological roles of the enzyme family, we are establishing mutant lines for the other isozymes using the CRISPR/Cas9 system.

#### 4. 論文, 著書など

なし

#### 5. 学会発表など

Nakayama, Y., Nakamura, N., Kurosaka, A.: Analysis of zebrafish polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase genes during embryonic development. 23rd International Symposium on Glycoconjugates, Split (Croatia), 2015.9.15-20  
 Nakayama, Y., Kato, K., Nakamura, N., Konishi, M., Kurosaka, A.: GALNT17/Wbscr17 knockout mice show decreased growth and hyperproliferation. 23rd International Symposium on Glycoconjugates, Split (Croatia), 2015.9.15-20.

中村直介, 中山喜明, 高橋由衣, 川合多美子, 辻本優季, 黒坂光: 第38回日本分子生物学会/第88回日本生化学会合同大会, 神戸市, 2015.12.1-4

#### 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: 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

研究代表者:黒坂 光, 取得年度:H26-28年(3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:H27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

高大接続授業: 東陵高校(2015.8.27), 長浜北高校(2015.11.5)

さくらサイエンスプラン: JSPS 採択事業. タイ国マヒドン大学獣医学部から若手研究者 10 名を総合生命科学部に受け入れた(2015.2.13~2.22)

理系英語 FD: 学内で行われた英語教育に関する FD 活動. 総合生命科学部における英語教育の取り組みについて解説(2015.2.3)

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

本制度により採用された研究助教は, 研究室の活動, 特に基礎特別研究, 応用特別研究などにおいて, 学部学生の分子生物学, 発生生物学に関わる知識, および小型魚類の胚操作などの高度な実験技術指導などを通じて, 学部学生の教育に大きく貢献した。

また, 他の研究室, あるいは他学科の大学院生, 学生に対しても, 研究打ち合わせ, 実験指導, さらにセミナーなどを通じて研究指導を行っており, 学部全体の研究レベルの向上に勤めている。

また, 分属前の学生に対しても, 生命システム実習などの必修授業科目における指導を通じて教育に貢献している。



ラボ集合写真. 図書館前にて.

## 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かが、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

Tamoxifen で活性化される Cre 組み換え酵素の遺伝子を floxed Sox2 遺伝子のホモ・ノックインマウスに導入し、原腸陥入開始直後から Sox2 の内胚葉での発現を阻害した。その結果、食道が気管化して、食道と気管の分離が異常になった。

エピブラスト幹細胞から直接に、胚の神経幹細胞株を樹立する技術を確立するとともに、Wnt シグナルの操作によって、神経幹細胞に中枢神経系のなかでの領域特性を付与することに成功した。これとも関連して、

エピブラスト幹細胞をある増殖因子の組み合わせでのもとで培養・継代すると、均一な細胞集団としての細胞株 SS が樹立され、SS をマトリゲルの中で増殖させようとして

教授 近藤寿人

Prof. Hisato KONDOH, Ph.D.

助教 石井泰雄

Assist. Prof. Yasuo ISHII, Ph.D.



増殖因子の組成を変更するとほぼすべての細胞が心筋に分化した。SS での遺伝子発現をマイクロアレイで解析すると、WT1 など心外膜前駆体で特徴的な遺伝子のセットを発現していた。SS 株は、世界ではじめて樹立された、心外膜前駆体の細胞株である。心外膜前駆体は心筋だけでなく血管系も生み出すことから、心疾患の細胞治療への貢献が期待されている。

エピブラスト幹細胞における遺伝子制御ネットワークを解析するために、多くの転写因子に関する ChIP-seq 解析をすすめたところ、OTX2 と ZIC2 の組み合わせによる転写制御が、エピブラスト状態を規定する上で重要であることがわかった。また、ZEB 因子群( $\delta$ EF1 と SIP1)が、エピブラスト状態やそれから神経系への遷移に関与することが示唆されたので、それらの因子に関する研究を再開した。

ウズラの Hensen 結節を st. 4 ニワトリ胚のさまざまに移植して、その発生能力を検討した。多くのケースで移植組織は自己発生し、古典的な「オーガナイザー」の性質を示すものではなかった。

ニワトリ胚の神経性網膜を長期間培養すると、水晶体が分化することから、分化転換の典型例とみなされてきた。しかし、培養条件下で Notch シグナルを阻害すると、神経分化と水晶体分化が同時に強く促進された。おそらく、神経性網膜には水晶体へ分化する潜在能力があるが、それが通常の胚発生では抑制されているのであろう。

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。血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF)ファミリーメンバーの VEGF-A が、心外膜に作用し ephrinB2 陽性の動脈様組織を形成させるユニークな活性をもつことを明らかにした。

### 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.

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 united organ.

To date, embryonic neural stem cell (NSC) lines have been established from ES cells via complex culture manipulations or from embryonic CNS that already have established specific subdomains. To gain insight into the mechanisms underlying embryonic NSC regionalization, we attempted to directly derive NSC lines from epiblast stem cells (EpiSCs). We reproducibly established NSC lines from EpiSCs via passages in a serum-free medium without activin but with EGF and bFGF. The NSC lines thus established produced neurons, astrocytes, and oligodendrocytes under appropriate culture conditions. We further established NSC lines with addition of either Wnt antagonist or Wnt agonist to the culture medium. Microarray analyses indicated that NSC lines established under low- and high-Wnt conditions had characteristics of anterior and posterior CNS, respectively.

We transplanted Hensen's nodes of quail to various areas of st. 4 chicken embryo area pellucida, and investigated their developmental potential and their effects on host tissues. The secondary embryonic structures are in large formed by self-development of the node graft, which is itself already regionalized.

Neural retinas (NR) of chicken embryos produce lens cells in culture. If lenses develop from the same precursor as retinal neurons, Notch signal inhibition would promote lens development in spreading cultures. We observed enhanced lens differentiation with accelerated process and massive lens tissue production that were concomitant with increased neuronal development, which strongly supports the common origin model of lens and retinal neurons.

Stem cell/progenitor cell lines, when established *in vitro* under particular culture conditions, become representative of different stages of the developmental process and allow in-depth molecular and cellular analyses that are not typically available in *in vivo* models. Culturing EpiSCs in a specific growth factor cocktail resulted in a homogeneous cell population

that is stably maintained and produced the cell line SS. The SS cells overtly differentiated into cardiac muscles when the growth factor cocktails were altered. Three major progenitors for embryonic cardiac muscles are known: first and second heart fields expressing Nkx2.5 and epicardial progenitors expressing Wt1 and Tbx18. Microarray analysis revealed that SS cells express high levels of Wt1 and Tbx18 but not Nkx2.5, indicating their epicardial nature. Gene expression profiles of SS cells reveal characteristics of these cells, including their expression of specific subtypes of collagen that validate the use of SS cells for the analysis of epicardial progenitors. Moreover, as epicardium also contributes to the development of blood vessels, it is a promising resource for cell therapy in cardiac diseases, for which SS cells may be an excellent *in vitro* model.

The epicardium is an important origin of coronary vessels of the heart. We found that the vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) has a unique activity to organize epicardium-derived cells to form ephrinB2-positive arterial-like tissues.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

Wang Z, Yasugi S, Ishii Y. Chx10 functions as a regulator of molecular pathways controlling the regional identity in the primordial retina. *Dev. Biol.* in press (2016).

Takemoto T, Kondoh H et al. R26-WntVis reporter mice showing graded response to Wnt signal levels. **Genes Cells** DOI: 10.1111/gtc.12364 (2016).

Yasumi T, Inoue M, Maruhashi M, Kamachi Y, Higashi Y, Kondoh H, Uchikawa M. Regulation of trunk neural crest delamination by  $\delta$ EF1 and Sip1 in the chicken embryo. **Dev Growth Differ.** 58(2):205-14. (2016)

Omilusik KD, Kondoh H, Goldrath AW. et al. Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8+ effector and memory T cell populations during infection. **J Exp Med.** 212(12):2027-39 (2015).

Porazinski S, Kondoh H, Furutani-Seiki M. et al. YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. **Nature.** 521(7551):217-21 (2015).

##### 著書

Kondoh H and Lovell-Badge R (eds.)

##### **Sox2: Biology and Role in Development and Disease**

Academic Press/Elsevier (2015) ISBN: 978-0-12-800352-7  
Chapter contributions

Kondoh H, Lovell-Badge, R. Chapter 1. Historical Perspectives (pp. 3-14)  
Uchikawa M, Kondoh H. Chapter 7. Regulation of Sox2 via Many Enhancers of Distinct Specificities (pp. 107-129)  
Kondoh H, Kamachi, Y. Chapter 8. SOX2-Partner Factor Interactions and Enhancer Regulation (pp. 131-144)  
Kondoh H, Uchikawa, M. Ishii, Y. Chapter 12. Multiple Roles for SOX2 in Eye Development (pp. 217-234)

## 5. 学会発表など

近藤寿人

Kondoh H, Matsuda, K, Mikami T., Andrabi M, Yamaguchi K, Shigenobu S. Two classes of Sox2-partner factor interaction involved in developmental gene regulation, as indicated by genome-wide ChIP-seq analysis. 48<sup>th</sup> Annual meetin of the Japanese Society of Developmental Biologists. Tsukuba, Japan, 2015.6.2-5.

Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Investigating mechanisms underlying lens differentiation from embryonic neural retina. 48<sup>th</sup> Annual meetin of the Japanese Society of Developmental Biologists. Tsukuba, Japan, 2015.6.2-5.

Kondoh H. Sox2-Pax6 interaction leading to lens development even via non-canonical pathway. Symposium: An eye on development. Heidelberg, Germany, 2015.6.25-26. (招待講演)

Kondoh H. Modeling the regionality of embryonic neural development in epiblast stem cells. Current trends in biomedicine workshop: **Development and adult neurogenesis in the central nervous system**. Baeza, Spain, 2015.10.5-7. (招待講演)

Kondoh H. Molecular and cellular mechanisms underlying lens transdifferentiation from embryonic neural retina. **Avian Model Systems 9**. Taipei, Taiwan, 2016.3.28-31. (招待講演)

飯田英明、石井泰雄、近藤寿人 神経性網膜から水晶体への分化転換の機構。第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015.12.1-4.

石井泰雄

Iida H, Yang T, Yasugi S, Ishii, Y. Multiple developmental timers coordinate vertebrate organ morphogenesis. 48<sup>th</sup> Annual meetin of the Japanese Society of Developmental Biologists. Tsukuba, Japan, 2015.6.2-5.

石井 泰雄、飯田 英明、八杉 貞雄: 低温条件下におけるニワトリ胚心臓発生のタイミング。日仏生物学会第182回例会、東京、2015.6.13.

石井泰雄、小西博郷: 鳥類胚冠状血管パターン形成における心外膜由来細胞の役割。日本動物学会 第86回大会、新潟、2015.9.17-19.

石井泰雄、小西博郷: 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は心外膜への作用を介して冠動脈形成を促進する。日仏生物学会第183回例会、京都、2015.12.19

## 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: エピプ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 発生生物学分科会委員長

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

理化学研究所

多細胞システム形成研究センター 運営委委員

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、2015.10.2-3.

日仏生物学会幹事

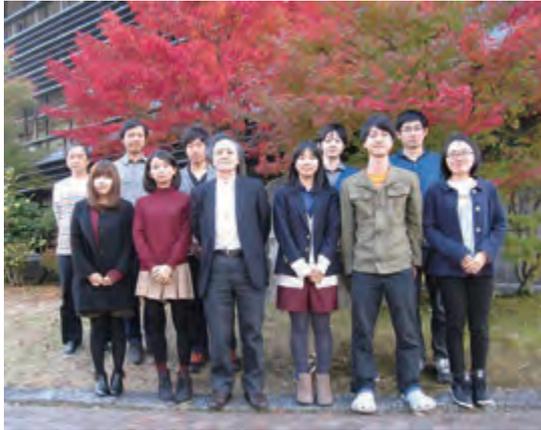
4) 受賞等 なし

5) その他 なし

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

本年度までは、石井泰雄博士が研究助教をつとめた。石井博士は、自らの研究課題である心外膜の発生能の研究を進める傍ら、近藤との共同プロジェクトであるエピプラスト幹細胞や条件的ノックアウトマウス胚を使ったSox2の研究を実施した。この研究プロジェクトに基礎特別研究生を積極的に参加させたが、石井博士は丁寧な研究指導を行い、多くの学生がしっかりと研究基礎力を身につけることができた。また石井博士は、ニワトリ胚操作のエキスパートでもあることから、2年次の学生を対象とした生物学実習でニワトリ初期胚の単離培養の指導を担当してもらった。この指導も素晴らしく、実習生たち

は、発生過程の素晴らしさについて深く感動し、生命科学へのモチベーションを高めていた。このように、石井泰雄研究助教の参加によって、研究グループとしての研究・教育活動が充実しただけでなく、総合生命科学部の教育にも大きな貢献ができた。



## 発生情報研究室

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

これらの研究を、2015 年度からは総合生命科学部教育研究活性化支援制度の研究課題「受精成立を保证する卵細胞膜システムの形成と機能」の一環として、生命科学部生命システム学コース修士2年生1名(西川裕貴)、生命システム学科4年生4名(荒井華菜香、小山智裕、吉川弥里、四ツ谷想羅)および同3年生4名(小川佳祐、小寺辰弥、堀江智裕、松本祐汰)を含むチーム体制で取り組んだ。

### 2. 本年度の研究成果

卵細胞プロジェクトにおける新たな知見の概要は、次のとおりである。

成熟前後における卵母細胞内 ATP の解析:ツメガエルの卵成熟に ATP 産生が重要であるかどうかを詳細に調べた。ツメガエルでは、未成熟な卵母細胞に *in vitro* で

教授 佐藤 賢一

Prof. Ken-ichi Sato, Ph.D.

研究助教 井尻 貴之

Assist. Prof. Takashi Ijiri, Ph.D.



ロゲステロンを加えるだけで成熟を誘導することができ、卵母細胞が成熟すると動物極周辺にホワイトスポットが現れるため、それを指標にして ATP 合成阻害剤が卵成熟に及ぼす影響を判断することができる。実際の手順は、ツメガエル未成熟卵母細胞に ATP 合成阻害剤をインジェクションした後にプロゲステロンを加えてホワイトスポットの出現を観察した。その結果、ツメガエルでは卵成熟時に酸化的リン酸化だけでなく解糖系も働いていることを示唆するデータが得られた(図1左)。さらに酸化的リン酸化

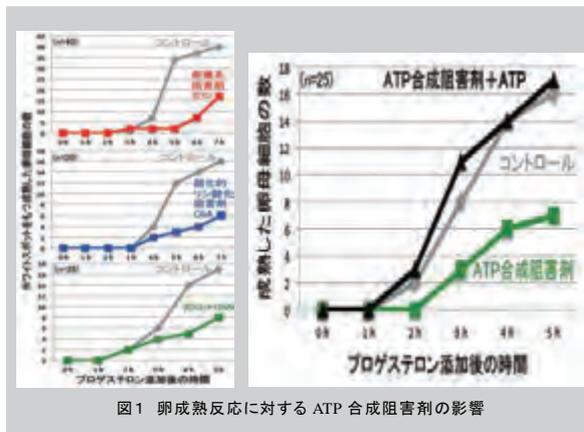


図1 卵成熟反応に対する ATP 合成阻害剤の影響

と解糖系を同時に阻害しても阻害効果は倍にならないことから、それらはリンクしていることが示された(図1左)。興味深いことに、この ATP 合成阻害剤の影響によるホワイトスポット出現の遅れは、ATP をインジェクションすることでレスキューされた(図1右)。これは ATP がツメガエルの卵成熟においてシグナル分子として働いている可能性も示唆している。

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

5637 細胞をモデル実験系として用い、同細胞の血清飢餓環境下でのアポトーシス抵抗性細胞増殖の分子メカニズムを明らかにするための研究を行った。先行研究が明らかにしていたこと、すなわち 5637 細胞の血清飢餓環境下でのアポトーシス抵抗性細胞増殖メカニズムにおいてチロシンキナーゼ Src によるタンパク質チロシンリン酸化シグナル伝達が重要な働きをしていることをふまえ、研究の焦点を次のとおり定めた。血清飢餓環境下にある 5637 細胞において Src と同様にリン酸化ならびに活性化状態にある上皮成長因子受容体(以下、EGFR)が Src によるチロシンリン酸化のターゲットであるかについて検

証すること、および同培養条件下で Src によるチロシンリン酸化の新規ターゲットタンパク質を同定し、その生理機能を検証すること、の以上2点である。1つ目の研究の焦点については、血清飢餓環境下で培養した 5637 細胞の可溶化タンパク質抽出液を用いた免疫化学的実験により、EGFR のチロシン残基 845 が Src 阻害剤 PP2 感受性のリン酸化部位であること、すなわち EGFR が Src によるチロシンリン酸化のターゲットであることを明らかにした。2つ目の研究の焦点については、同じく血清飢餓環境下で培養した 5637 細胞の可溶化タンパク質抽出液を用いた免疫化学的実験と質量分析実験により、分子サイズ約 120 kDa の focal adhesion kinase (以下、FAK) を Src によるチロシンリン酸化の新規ターゲットタンパク質として同定した。また、FAK の Src によるチロシンリン酸化部位としてチロシン残基 576/577/925 を、FAK と物理的に相互作用するタンパク質として EGFR ファミリーの一つである erbB2 タンパク質を、それぞれ同定することに成功した。さらには FAK 阻害剤 PF-271 や FAK ノックダウン細胞を用いた実験により、血清飢餓環境下における 5637 細胞の生存と増殖が FAK 活性に依存していることを示唆する結果を得た(図2)。以上の結果から、FAK が 5637 細胞

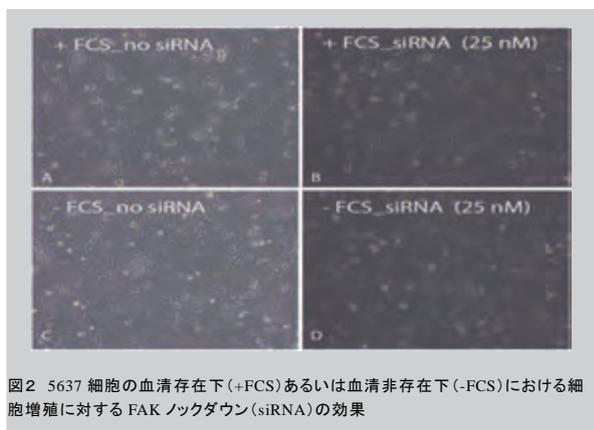


図2 5637 細胞の血清存在下 (+FCS) あるいは血清非存在下 (-FCS) における細胞増殖に対する FAK ノックダウン (siRNA) の効果

の血清飢餓環境下でのアポトーシス抵抗性細胞増殖の Src 依存的な分子メカニズムの中に位置付けられる鍵分子であることが示唆された。

### 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 performed in vitro oocyte maturation experiments with the use of progesterone (PG) as a maturation-promoting substance and *Xenopus laevis* fully-grown immature oocytes. We investigated the effect

of microinjection of chemical inhibitors that are expected to inhibit ATP production in certain event of energy metabolism processes within the oocyte cytoplasm. Results obtained so far suggest that ATP from both the oocyte glycolysis (GL) and oxidative phosphorylation (OP) are required for the PG-induced oocyte maturation, and that the oocyte GL and OP are functionally interrelated with each other.

In the *Cancer Cell Project*, we have been interested in addressing the molecular mechanism that connects the Src-dependent protein-tyrosine phosphorylation to the anti-apoptotic proliferation of human bladder carcinoma cell line 5637 under serum-starved culture conditions. A series of experiments was performed to examine whether the serum-starved 5637 cells require the Src activity for survival, proliferation and intracellular protein-tyrosine phosphorylation. PP2, a Src inhibitor, induced cell death that was accompanied by an increase in the activity of caspase 3/7 in cells that were serum-starved for 72 h. Indirect immunofluorescent study showed that serum starvation promoted a time-dependent increase in intracellular protein-tyrosine phosphorylation and that the phosphorylation events could be effectively inhibited by PP2. Immunoblotting studies demonstrated that serum starvation promoted tyrosine phosphorylation of not only formerly identified proteins such as epidermal growth factor receptor (EGFR), Src and  $\beta$ -subunit of c-Met, but also a novel protein of ~120 kDa, in a time-dependent manner and that all of these phosphorylation events could be inhibited by PP2. Immunoprecipitation and mass spectrometry studies demonstrated that the 120-kDa protein was focal adhesion kinase (FAK). Phospho-specific immunochemical analyses demonstrated that EGFR was phosphorylated on Y845 and FAK was phosphorylated on Y576/577 and Y925 in a PP2-sensitive i.e. Src-dependent manner in the serum-starved 5637 cells. A FAK-specific inhibitor PF-271 effectively decreased the viability of the serum-starved 5637 cells. These results suggest that FAK contributes to the survival and proliferation of serum-starved 5637 cells.

### 4. 論文, 著書など

Sato, K.: Fertilization and Protein-tyrosine Kinase Signaling: Are They Merging or Emerging? In *Reproductive and Developmental Strategies* (Kobayashi, Kitano, Iwao, and Kondoh eds. *Animal Diversity and Generality* series, Springer) in press.

Sato, K.: Practical Approaches, Achievements, and Perspectives in the Study on Signal Transduction in Oocyte Maturation and Fertilization: Focusing on the African Clawed Frog *Xenopus laevis* as an Animal Model. In *Animal Models and Human Reproduction* (Schatten and Constantinescu eds. Wiley) in press.

## 5. 学会発表など

Sato, K.: Egg membrane microdomain-associated uroplakin III- $\text{Src}$  system contributes to oocyte maturation and fertilization in *Xenopus laevis*. *Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, Asamushi*, 2015.6.15-18.

Ijiri, T.W., Kishikawa, J., Imamura, H., Sakiie, M., Ueno, S., Iwao, Y., Yokoyama, K., Sato, K.: Inhibition of ATP synthesis affects white spot occurrence and the increase of ATP during progesterone induced maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development, Plymouth, NH*, 2015.7.19-24.

佐藤 賢一: Egg membrane microdomain-associated uroplakin III- $\text{Src}$  system contributes to oocyte maturation and fertilization in *Xenopus laevis*. 第9回日本ツメガエル研究会, 秋田市, 2015.9.14-16.

岡 慎也、菊地 志朗、玖島 将太、磯崎 功明、三田 勇樹、井尻 貴之、佐藤 賢一: ツメガエル細胞膜を抗原とするモノクローナル抗体の作成と標的分子の同定 第86回日本動物学会大会, 新潟市, 2015.9.17-19.

井尻 貴之、嘉門 未紗、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一: アフリカツメガエル卵成熟に対するATP産生阻害の影響. 第86回日本動物学会大会, 新潟市, 2015.9.17-19.

西川 裕貴、佐藤 賢一: Src-dependent tyrosine phosphorylation contributes to anti-apoptotic cell proliferation in human bladder cancer cells. 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会の合同学会, 神戸市, 2015.12.1-4.

井尻 貴之、岸川 淳一、今村 博臣、崎家 真徳、上野 秀一、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一: ATP metabolism in *Xenopus laevis* oocytes: Is ATP yielded by glycolysis during maturation? 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会の合同学会, 神戸市, 2015.12.1-4.

## 6. その他特記事項(外部資金、学内外での諸活動)

科学研究費補助金・基盤研究(C)、課題名: 卵細胞膜マイクロドメイン UPIII- $\text{Src}$  システムの形成と生理機能、研究代表者: 佐藤 賢一, 取得年度:H27-29年

科学研究費補助金・基盤研究(C)、課題名: 卵細胞と精子のATP ライブイメージングから生殖細胞のエネルギー代謝の総合理解へ、研究代表者: 井尻 貴之, 取得年度:H27-29年

合同研究交流会 2015.2.?. 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(摂南大学理工学部)。

大学コンソーシアム京都第20回FDフォーラム 2015.3.1. 分科会コーディネータ(佐藤 賢一): 障がい学生支援FDの背景、現状および課題(同志社大学今出川キャンパス)。

卒業研究発表会 2015.3.7. 京都産業大学総合生命科学部6研究室での合同(京都産業大学・松の浦セミナーハウス)。

京都産業大学高等教育フォーラム(佐藤 賢一、王 戈、伊吹 勇亮、志賀 浄邦、山内 尚子、小林 慎一、柴 孝夫)事例報告・調査報告: ゼミ・研究室活性化にむけた全学および1研究室の取組み、成果および課題—学生が主体的に学び、真の実力を身につけて大学を巣立つために—、2015、Vol.5、pp.57-73.

大学コンソーシアム京都第20/21回FDフォーラム企画検討委員 2015.1.1~12.31. 佐藤 賢一

卒業研究中間発表会 2015.8.7. 京都産業大学総合生命科学部8研究室での合同(京都産業大学・松の浦セミナーハウス)。

合同研究交流会 2015.9.1. 島根大学隠岐臨海実験所広橋教貴准教授研究室、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(島根大学隠岐臨海実験所)。

京都産業大学むすびわざ講座(佐藤 賢一) 2015.10.10. 生命誕生の謎とカラクリ(京都産業大学むすびわざ館)。

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

井尻研究助教は2015年度において、生命システム英語購読 III(生命システム学科3年生)の分担担当教員として、また生命システム実習 I(同2年生)の補助担当教員として教育活動に従事した。これらの活動は当該授業科目における教育パフォーマンス(1教員あたりの指導学生数、S/T比で表される)を高いものとする、学部教育への「直接的な教育効果」をもたらした代表例である。また、井尻研究助教は発生情報研究室における研究活動を行いながら、同研究室に所属する基礎特別研究および応用特別研究の履修生(計8名)、大学院生命科学研究科の大学院生(1名)の日常的な学習活動を見守り、助言指導する活動を同時並行でおこなった。これらの活動は、2015年度が最終年の分属生が、学会発表をはじめとする外部での研究発表をはじめとした成果をえて卒業・修了できたことを含む、学部・大学院教育への「間接的な教育効果」をもたらした代表例である。



島根大隠岐臨海実験所での合同研究会(2015年9月撮影)



15号館と14号館の間にて(2015年10月撮影)

# ナノバイオロジー研究室

Laboratory of Nanobiology

教授 嶋本 伸雄

Professor Nobuo Shimamoto



## 1. 研究概要

現代生物学では、生体の働きをタンパク質などで出来た微小な機械の働きとして理解する。この機械の大きさは、1-100nmであり、その作用機構と生理的意義を、分子機械の動きや形の変化として理解することがナノバイオロジーだ。本研究室は遺伝子発現のナノバイオロジーを研究しており、バクテリアの生存戦略を対象として研究を行った。その過程で発明したB-maggio を使い、リボソームの存在形態と細胞死との関係を明らかにして、それらの調節を行う因子の作用機構の研究を行った。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) 超抗退色性GFP B-maggioを使った100Sリボソームの役割

タンパク質は細胞中で合成と分解を繰り返し(protein turnover)、常に適切なタンパク質組成を維持することが生存に必須と考えられているが、その証明は乏しい。バクテリアでも静止期から死滅期にかけてのprotein turnoverはほとんど研究されていない。そこで、高精度で生存大腸菌数を測定できる手法を開発し、昨年発明した**超抗退色性GFP B-maggio**をリボソームタンパク質と融合させ、リボソームの数的変化を生かしたまま測定できる様にした。リボソームはprotein turnoverの最大の基質であるからである。この

GFP(B-maggio)は明るいだけで無く、よく使われるGFPに比べて100倍以上退色が遅く、細胞内での蛍光基形成が早く、SDS電気泳動しても蛍光基が保存される。このことにより、定常期、死滅期のリボソームの数的変化観測が初めて可能になり、リボソームは中間体蓄積無しに一気に分解されること、死滅期生細胞は、一定のリボソーム数を持つことを発見した。

このことは、リボソームを経由するprotein turnoverが生存に重要な役割を果たすことを暗示する。また、定常期の一部で形成される100Sというリボソームは、kinetic trapによりprotein turnoverの速度を調節し、定常期を長くしているという遺伝学的証拠を得た(1)。

### 2) tmRNAと合成致死になる遺伝子の探索

tmRNAは、多くのATP依存プロテアーゼと共に、異常に翻訳されたタンパク質を分解しタンパク質の品質管理を行う。tmRNAとそれらのATP依存プロテアーゼ(AAA+proteases)の遺伝学を行ったところtmRNAの欠損と多くのプロテアーゼの欠損は合成致死になるという予想外の発見をした。教科書的には、生存機構はtmRNAによる未知の回路と各プロテアーゼ回路とが並列しているとされるが、AAA+proteasesは互いの分解によりネットワークを形成することと、上記リボソームの

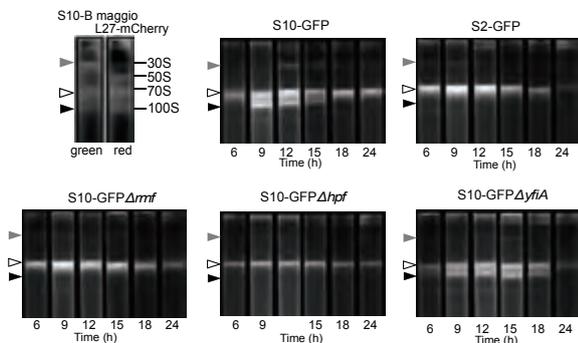


図1 染色体レベルでGFPを融合させたS10を持つ株の溶菌液の超遠心分析

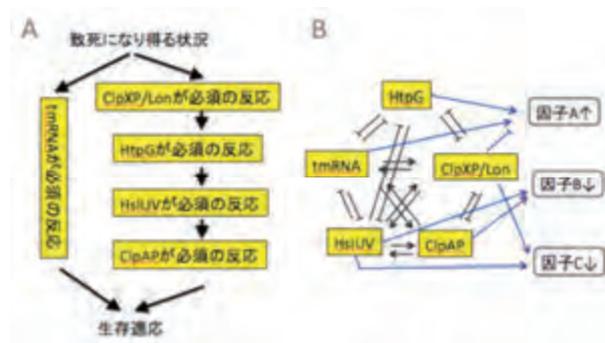


図2 A. 従来の遺伝学的解釈。各遺伝子機能の独立が暗黙に仮定されている。B. s各遺伝子機能が相互に関連する場合の解釈。

protein turnoverを考慮すると、複数の生死決定タンパク質の量がAAA+proteasesのネットワークで制御され、一部の生死決定タンパク質の分解がtmRNA依存をもつと考える方が自然である。事実、100Sリボソーム形成因子rmfは、低レベルではlonにより分解されるが、高レベルでは他のAAA+proteasesでも分解されていることを発見した(2)。

### 3. Research projects and annual reports

#### 1) Role of 100S ribosomes in protein turnover

Protein turnover is composed of protein degradation and synthesis or translation. It has been shown to exist in a growing bacterial cell. Therefore, it has been believed to exist as a more essential process in the stationary phase and the following decay period where no supply of amino acids from nutrients is expected.

In stationary state, 70S ribosomes are dimerized to be 100S ribosomes that are transcriptionally inactive. However, few studies deal the relationship among 100S formation, protein turnover, even the existence of protein turnover in stationary state and later. This study focuses on the role of 100S ribosomes in protein turnover in stationary phase and decay period.

In this study, ribosomal proteins S10 and S2 were each fused with GFP to track the fates of these proteins in the stationary growth phase and the following decay period in *E. coli*. The fused proteins localized mainly in the cytoplasm, and their amounts were proportional to the colony-forming unit. S10-GFP strains that lacked genes responsible for regulating 100S ribosomes and S2-GFP strain that were unable to form 100S both showed shortened stationary phases. This result indicates that these strains exhibit earlier death in the absence of 100S formation (S2-GFP, S10-GFP $\Delta$ rmf, and S10-GFP $\Delta$ hpf) and breakdown (S10-GFP $\Delta$ yfiA). Therefore, in addition to the mere presence of 100S, the correct timing of 100S formation and breakdown is required to maintain viability. This result also showed the presence of a time-consuming process that controls viability and the degradation of ribosome after 100S ribosomes has been dissociated. Whether or not 20 amino acids are effective to maintain viability was measured by supplying 20 amino acids at several time points. The results showed the correlation

between the amino-acid deficiency, degradation of ribosome, and viability. The obtained results cannot be interpreted just by the simple actions of 100S ribosomes and specific to stationary-state specific proteins but suggested the contribution of a synthetic cellular process. I here propose a model in which 100S acts as a tentative repository of ribosomes that are protected from degradation and provide a source of amino acids in later growth period. A new GFP that had been invented by my colleagues, B-maggio, was used in this study. Its brightness and especially the 100-fold resistance against photobleaching enabled semi-quantitative analysis for the first time by fusing gfp gene with chromosomal genes. In addition, the classic mixing-diluting method was improved to measure the colony-forming unit more accurately. This improved accuracy enabled the comparison between the unit with the amount of ribosome and the detection of amino acid deficiency at a stage of bacterial growth.

#### 2) Genes which are synthetic lethal with $\Delta$ tmRNA

In evolutionary selection, the survival of bacteria is as important as their growth, but the underlying mechanism is poorly understood. They are supposed to degrade unnecessary proteins to salvage amino acids for their survival, namely protein turnover. In *E. coli*, starvation of amino acids, or some other nutrients, synthesizes (p)ppGpp as an alarmone to stop cell division, and, consequently, to alter the expressions of many genes at the early-stationary phase. This response is an adaptation to a starving condition, even though does not determine cell death. Even after the level of (p)ppGpp returns to the background level at the mid-stationary phase, cells can still avoid death, if a fresh medium is added. The commitment to cell death occurs in the decay period following the stationary phase, and consequent irreversible decrease of the colony-forming unit (CFU) follows. Therefore, a defect of the survival mechanism will cause earlier and/or faster decay.

In this period, there are marginal sources of metabolites or energy, and thus the activities of metabolite- or energy-consuming molecular machineries are likely to be attenuated. One of the most energy-consuming machineries is the translation system composed of ribosome and its associated factors, and ribosome will stall in the deficiency of intact mRNA and amino acids. The tmRNA system rescues ribosome from stalling, which is caused by a mRNA lacking

stop codons (nonstop mRNA) or by the reduction of amino-acyl tRNAs. In such cases, tmRNA complexed with SmpB occupies the empty A-site of such ribosome. The nascent polypeptide is then tagged with AANDENYALAA encoded in *ssrA*, and rescues the ribosome from stalling by normal termination. Namely, the defective translation is reflected on the production of *ssrA*-tagged polypeptides. The *ssrA*-tagged polypeptide is degraded by several peptidases including AAA+ proteases with the help of specific chaperons. The degradation leads to the regeneration of amino acids, and thus it is a kind of protein turnover. Therefore, the *ssrA*-induced degradation can be considered to be a mechanism mitigating the deficiency of amino-acids by degradation of nascent polypeptides with their synthesis stalled. In fact, the deletion of *ssrA* causes a phenotype of colonies of a small size. In the decay period, deficiency of amino acids impairs translation, but tmRNA mitigates the impairment by tagging nascent polypeptides that are destined for degradation by several protein-turnover factors, such as ClpXP and ClpAP.

To test the significance of this degradation of *ssrA*-tagged polypeptides as a supply of amino acids, we genetically analyzed the relationships between *ssrA* and the genes of protein-turnover factors with a method developed against the false-positive selection due to the enhanced mutations by their deletions. Unexpectedly,  $\Delta ssrA$  and disruption of the genes encoding ClpXP, ClpAP, HslUV, and HtpG (HSP90) showed serious synthetic defects in viability. Therefore, tmRNA and the protein-turnover factors respectively form two redundant pathways that work in parallel in maintaining viability. In contrast,  $\Delta lon$  showed no synthetic effects with  $\Delta ssrA$ , suggesting either no relationship with viability or a member belonging to the tmRNA pathway.

#### 4. 発表論文

1. Shcherbakova, K., Nakayama, H., and Shimamoto, N. Role of 100S ribosomes in bacterial decay period. *Genes Cells* 20, 789-801 (2015). (査読有)

#### 5. 著書および総説

なし

#### 6. 招待講演、シンポジウム等

Nobuo Shimamoto, Ksenia Shcherbakova, and Hideki Nakayama

Fluorescence probe to study ribosomes in bacterial decay period 2015, "Asian and Oseanian Conference on Transcription

#### 7. 学会発表

中山秀喜、嶋本伸雄、静止期におけるtmRNA の役割、第5 回細菌学若手コロッセウム、高知大学農学部キャンパス、2011 年8 月  
 中山秀喜、嶋本伸雄: 静止していない大腸菌の stationary phase、第8回21世紀大腸菌研究会、長野県木曾郡南木曾町、5月、2011  
 中山 秀喜、嶋本 伸雄、tmRNAによるアミノ酸リサイクル、第34回日本分子生物学会年会、一般口頭発表/ポスター、横浜、12月  
 中山秀喜、吉田信介、嶋本伸雄、大腸菌のnon-planktonic な増殖と細胞多型、第34回日本分子生物学会年会、ポスター、横浜、12月

#### 8. その他特記事項

##### 1) 外部資金

非理場製作所(株) 共同研究

戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」

##### 2) 学外活動

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



# 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

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 VEGFR2 ではなく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明らかにした。VEGF-A 刺激により、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(A. Yoshida et al., *Biol. Open.*, 2015)。NRP1 の発現を抑制したがん細胞をヌードマウスに移植すると、リンパ節への転移が抑制された。このがん細胞に NRP1 を発現すると腫瘍の成長速度が増し、リンパ節への転移も回復した。NRP1 の細胞内ドメイン末端の 3 アミノ酸を欠損した変異体を発現させても、腫瘍の成長は抑制されたままで、リンパ節への転移も抑制された。以上の結果から、VEGF-A/NRP1 のシグナルが腫瘍の成長と転移を促進すると考えられる。(吉田: 博士学位論文)

### 2) 食道がんにおける FGFR3IIIc アイソフォームのがん悪性化メカニズムの解析

今までの研究で、食道がん患者のがん部位の組織染色によって、線維芽細胞増殖因子受容体 3 の選択的スプライシングアイソフォームである FGFR3IIIc の発現が上昇していること、FGFR3IIIc 陽性細胞で細胞増殖マーカー Ki67 が染色されることを示した。FGFR3IIIc アイソフォームの発現上昇ががん細胞の増殖促進に関わっているかを、モデル細胞として食道がん細胞株 EC-GI-10 細胞株を用いて、FGFR3IIIc を強制発現し検討した。まず、内在性 FGFR3 をノックダウンし、レンチウイルスベクターに

教授 瀬尾 美鈴

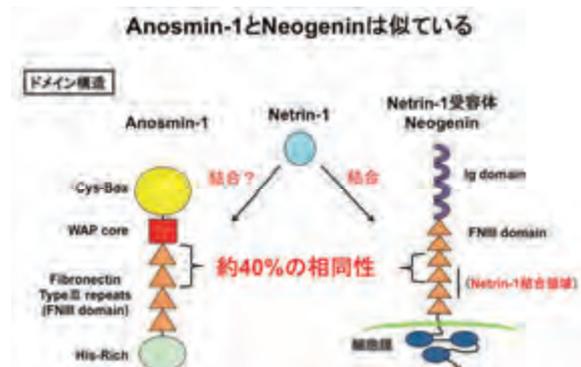
Prof. Misuzu Seo, Ph. D.



より FGFR3IIIc を発現すると増殖が促進した。さらに FGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤 AZD4547 で処理すると、FGFR3IIIc による増殖促進効果が抑えられたことから、FGFR3IIIc による細胞内シグナル伝達の活性化により増殖が促進していることが示唆された。(上野: 客員研究員)

### 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 ( $M^{-1}S^{-1}$ ) が上昇することが明らかになった(野生型:  $7.9 \times 10^4$ , S396L:  $13.5 \times 10^4$ , E514K:  $11.0 \times 10^4$ )。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 Neurite 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。(浅野: 特約講師)



#### 4) Anosmin-1の血管形成における受容体とシグナル伝達経路の解析

神経発生時には血管からの酸素や栄養供給が重要であり、軸索ガイダンス分子とその受容体は血管形成にも深く関わっている。先天性疾患 Kallmann 症候群の原因遺伝子 KAL-1 にコードされている Anosmin-1 は、分子量約 100kDa の分泌型糖タンパク質でヒト発生期において軸索ガイダンス分子として嗅覚神経に誘引シグナルを伝達し嗅球の形成に貢献している。しかし、Anosmin-1 が血管内皮細胞に及ぼす生理活性は報告されていない。そこで本研究では、Anosmin-1 が血管形成を促進することを示し、その受容体と下流のシグナル伝達を明らかにすることを目的とする。これまで自身が行った研究によって、HUVEC、bEnd3 細胞といった種と組織の異なる 2 種の血管内皮細胞において Anosmin-1 が PLC-PKC 経路を介して管腔形成を促進していることを明らかにした。(近藤:M2、松島:M1)

### 3. Research projects and annual reports

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

Neuropilin-1 (NRP1) is a vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) receptor that is expressed in several human cancer cell lines such as skin cancer, glioblastoma, and prostate cancer, transducing a proliferative signal in an autocrine manner. RNA interferences of VEGF-A or NRP1 suppressed cancer cell proliferation. Overexpression of NRP1 wild type restored shNRP1-treated cancer 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. A cell-penetrating oligopeptide that targets to GIPC1/Syx complex formation and inhibited the VEGF-A-induced RhoA activation, cancer cell proliferation, and invasion in vitro, tumor growth and lymph node metastasis in vivo. In conclusion, strategies to inhibit the VEGF-A/NRP1 signaling pathway are promising for the developing of new cancer therapeutic drugs.

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

In Japan, the 5-year relative survival rates for esophageal cancer patients are is approximately 30%,

suggesting that the esophageal cancer is has a poorer prognosis compared than that of most other cancers. Immunohistochemical analysis with anti-FGFR3IIIc antibody was performed to determine whether FGFR3IIIc was expressed in EC cells. We found that the cells expressing SCC-112, a tumor marker, were positively stained by FGFR3IIIc at an early stage (stage 0) of ESCC, and these cells were also shown to colocalize with Ki-67, a cell proliferation marker. To examine whether the enhanced expression of FGFR3IIIc promotes esophageal cancer cell proliferation, EC-GI-10 cells, an EC cell line, were used for *in vitro* proliferation analysis. The knockdown of endogenous FGFR3 in EC-GI-10 cells by siRNA (siFGFR3) significantly reduced cell proliferation. Interestingly, overexpression of FGFR3IIIc by lentiviral infection enhanced cell proliferation, whereas that of FGFR3IIIb did not. As an additional finding, the enhanced cell proliferation induced by FGFR3IIIc expression was significantly suppressed by AZD4547, an FGFR-specific kinase inhibitor, suggesting that upregulation of FGFR3IIIc promoted cell proliferation.

#### 3: Anosmin-1 enhanced Netrin-1-signaling.

Kallmann syndrome is characterized by hypogonadism due to GnRH deficiency, and a defective sense of smell related to the defective development of the olfactory bulbs and olfactory tracts. This syndrome is caused by mutations affecting the *KAL1* gene that encodes for the extracellular protein Anosmin-1. In this study, the role of anosmin-1 as a regulator for Netrin-1 signaling was tested. First, we tested whether Anosmin-1 and Netrin-1 bind directly by immunoprecipitation assay using the conditioned medium of Anosmin-1-Myc and Netrin-1-V5 expressed HEK293T cells. As a result, Anosmin-1 directly bound to Netrin-1. The binding affinity was analyzed by Biacore T-100. Soluble purified Anosmin-1 bound to immobilized Netrin-1 with the affinity (KD:5.2 nM). Next, to determine whether Anosmin-1 regulates Netrin-1 binding to its receptor, we performed in vitro binding assay using purified Anosmin-1 and Netrin-1. As a result, Anosmin-1 enhanced Netrin-1 binding to Neogenin than compared to Netrin-1 alone. Next, we examined the expression and localization of Anosmin-1 and Netrin-1 in chick embryonic brains using in situ hybridization or immunohistochemistry. Anosmin-1 mRNA expressed in mitral cell layer in the olfactory

bulb, Netrin-1 expressed in ventricle around the olfactory bulb. Anosmin-1 and Netrin-1 were co localized in olfactory bulb. These results suggested that Anosmin-1 may act as a regulator for the Netrin-1 signaling in developing brain, contributing to elongation pathway of the olfactory axons and the associated migration of GnRH neurons.

#### 4. 論文, 著書など

Ueno N, Shimizu A, Kanai M, Iwaya Y, Ueda S, Nakayama J, Seo KM\*. Enhanced expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 IIIc promotes human esophageal carcinoma cell proliferation. *J. Histochem. Cytochem.* **64(1):7-17** (2016)  
Yoshida A, Shimizu A, Asano H, Kadonosono T, Kondoh SK, Geretti E, Mammoto A, Klagsbrun M, Seo M\*. VEGF-A/NRP1 stimulates GIPC1 and Syx complex formation to promote RhoA activation and proliferation in skin cancer cells., *Biol Open(9):1063-76* (2015)

#### 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 シグナルの阻害はがん細胞の増殖と転移を抑制する。第62回日本生化学会近畿支部例会、草津、2015.5.16(口頭&ポスター発表)  
近藤真菜美、清水昭男、浅野弘嗣、瀬尾美鈴: 神経軸索ガイダンス分子 Anosmin-1 が血管内皮細胞におよぼす生理作用の解析。第62回日本生化学会近畿支部例会、草津、2015.5.16(口頭&ポスター発表)  
松島章子、近藤真菜美、清水昭男、浅野弘嗣、瀬尾美鈴: Anosmin-1 の血管形成におけるシグナル伝達経路の解析。第62回日本生化学会近畿支部例会、草津、2015.5.16(口頭&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 と結合する。第62回日本生化学会近畿支部例会、草津、2015.5.16(口頭&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19回日本がん分子標的治療学会学術集会、松山市、2015.6.10-12(口頭発表)  
吉田亜佑美\*、清水昭男、門之園哲哉、近藤科江、Michael Klagsbrun、瀬尾美鈴: VEGF-A/Neuropilin signal activates RhoA and promotes cancer growth and metastasis. *BMB2015*、2015.12.1-4(口頭発表)、

木田朱音、安木実悠、徳村脩人、清水昭男、浅野弘嗣、石井泰雄、瀬尾美鈴: カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 はニワトリ胚の嗅球と脳室において Netrin-1 と部分的に共局在する。 *BMB2015*、2015.12.1-4(ポスター発表)

松島章子、近藤真菜美、清水昭男、浅野弘嗣、瀬尾美鈴: Anosmin-1 の血管形成におけるシグナル伝達経路の解析。 *BMB2015*、2015.12.1-4(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: 誘引性軸索ガイダンス分子 Anosmin-1 は Netrin-1 シグナルを阻害する。 *BMB2015*、2015.12.1-4(ポスター発表)

上野信洋、清水昭男、金井陸行、岩谷勇吾、上田修吾、中山淳、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。 *BMB2015* (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)、2015.12.1-4(ポスター発表)

Ayumi Yoshida, Akio Shimizu, Hirotugu Asano, Michael Klagsbrun, Misuzu Seo. The cytoplasmic domain of NRP1 interacts with GIPC1 and Syx to induce tumor proliferation. *Sakuraサイエンスプラン*、京都産業大学総合生命科学部、2016.2.20 ポスター発表(英語)

#### 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: H27-29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: H19-27年(9年)

平成27年度女性研究者研究活動支援事業(一般型)

課題名: 京都産業大学型ポジティブ・アクションを軸とした研究者支援、責任者 大城光正学長、取得年度: H26-28年(3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

瀬尾美鈴: 京都府発明等功労者表彰審査委員として、第59回京都府発明等功労者の審査を行った。2015年3月

瀬尾美鈴：テレビ朝日「林修の今でしょ！講座」出演が

んの分子標的薬グリバックの紹介、2015年5月12日

瀬尾美鈴：ラジオKBS放送「竹内弘一のDeepにズキューン」出演、2015年7月14日～28日、15分4回

瀬尾美鈴：平成27年度ダイバーシティ推進室 副室長

吉田亜佑美：京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻・博士後期課程、学位取得

上野信洋：京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻・博士学位(論文博士)



瀬尾研究室の女子学生・大学院生(吉田、近藤、松島、木田、安木：2015年6月6日、京都産業大学交通広告7月掲載)



研究室写真：卒業記念アルバム用に撮影(2015年11月27日)



BMB2015 学会参加、神戸(2015年12月3日)



卒業研究発表会(2015年12月3日)

# タンパク質バイオジェネシス研究室

Laboratory of Protein Biogenesis

准教授 千葉 志信

Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.



## 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には機能する。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 活性が不足すると、それを補うべく、枯草菌ゲノムでコードされる二つの 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。なお、千葉研究室は 2014 年 4 月に発足以来、本学シニアリサーチフェローである伊藤維昭氏との協力関係の下、研究を遂行している。その研究上の関連性を考慮し、本年報では、伊藤維昭シニアリサーチフェローの活動のうち、当研究室の活動に関連する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。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 複合体と異なり、YidC は、チャンネルに依存しない機構でタンパク質を膜挿入していることが、以前の我々の研究から示唆されていた。今回我々は、YidC が、親水性の溝を膜内に形成し、それにより、本来疎水的環境であるはずの膜内に親水的な微小環境を作り出していること、また、その親水的な環境がタンパク質の膜組込に重要な役割を果たしていることを、生化学および、遺伝学的手法を用いて示した。この親水的な微小環境が、基質膜タンパク質の親水性領域の膜透過時のエネルギー障壁を低下させる役割を担っているものと思われる。

### (2)MifM は、枯草菌の2つの YidC ホモログの両方の活性を監視する

枯草菌の2つの YidC ホモログのうち、SpoIIIJ の活性変動を MifM と呼ばれるモニター因子が監視することを、我々は以前見出していた。今回、第二の YidC ホモログである YidC2 の活性も、MifM によってモニターされることが、遺伝学的な解析から示された。SpoIIIJ の活性低下に伴って誘導される YidC2 も、自己フィードバックによってその発現量が調節され、その結果、総体としての YidC 活性が適度に維持されているものと思われる。

### (3)枯草菌 MifM の構造解析

枯草菌 MifM は、C 末端付近に存在する翻訳アレストモチーフが、リボソームのペプチド排出トンネル内の成分と相互作用することでリボソームの翻訳活性を阻害し、自身の翻訳伸長をアレストするユニークな性質を持つ。ミュンヘン大学・Daniel Wilson 博士との共同研究により、クライオ電子顕微鏡を用いた MifM-リボソーム翻訳途上鎖複合体の構造解析を行った。その結果、MifM とリボソームトンネルとの相互作用、ならびに、MifM とリボソームの活性中心付近の残基との相互作用の様子が明らかとなり、MifM が、リボソームの活性に重要な残基の構造変化をブロックすることで自身の翻訳伸長を阻害するという機構が明らかとなった。

### (4)海洋性ビブリオが持つ新規アレスト因子の解析

ある種の海洋性ビブリオは、タンパク質分泌装置のアクセサリー因子として、2種類の SecDF 複合体を持つ。京大ウイルス研の森博幸准教授らは、この2種類の SecDF を環境の塩濃度に呼応して切り替える機構と、そこで中心的に働く制御因子 VemP を発見した。この VemP が、MifM や SecM と同様に、翻訳アレスト活性を持つ因子であったため、その分子機構解明のための共同研究を行い、VemP が、リボソームのペプチド転移反応を阻害することで翻訳伸長をアレストさせることを示す結果を得た。

### 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 undergo 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 chains are likely to play key roles.

### This year's accomplishments

#### 1) Channel-independent membrane protein insertion by YidC.

YidC has an "insertase" activity that mediates membrane protein insertion. Previous studies had suggested that YidC forms a cavity, rather than a protein-conducting channel in the membrane. We now demonstrated that the cavity provides a hydrophilic microenvironment in the otherwise hydrophobic membrane interior and that the hydrophilicity of the cavity is indeed important for the YidC functions. We propose that the hydrophilicity of the cavity serves to reduce energetic costs that are required for translocation of hydrophilic regions of substrates across the hydrophobic membrane.

#### 2) MifM monitors total YidC activities of *B. subtilis*.

Previously, we have shown that MifM monitors the activity of SpoIIIJ, the primary YidC homolog of *B. subtilis*. We now demonstrated that MifM also monitors that of YidC2, the secondary YidC homolog, such that the cells can maintain total YidC activity by feedback regulating the YidC2 level in response to overall cellular YidC activities.

#### 3) Structural basis of MifM-ribosome interactions

In collaboration with Dr. Daniel Wilson (University of Munich), the structures of the MifM-ribosome complexes were analyzed by cryo-electron microscopy. Our studies revealed that the MifM-ribosome interactions in the ribosomal tunnel lead to the stabilization of a non-productive conformation of the active center of the ribosome.

#### 4) Studies of VemP, a novel regulatory nascent chain in marine *Vibrio*.

Dr. Hiroyuki Mori and his colleagues (Kyoto Univ) identified a novel nascent polypeptide that arrests its own translation elongation and thereby mediates remodeling of the secretion machinery in *Vibrio alginolyticus*. We studied elongation arrest of VemP in vitro and found that the VemP nascent chain inhibits peptidyl transfer activity of the ribosome to arrest its own translation.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

Y. Chadani, T. Niwa, S. Chiba, H. Taguchi, K. Ito: Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2016) *in press*

E. Ishii, S. Chiba, N. Hashimoto, S. Kojima, M. Homma, K. Ito, Y. Akiyama, H. Mori: Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2015) **112**, E5513-E5522.

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) **6**, 6941.

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) **112**, 5063-5068.

\*S. Chiba, K. Ito: MifM monitors total YidC activities of Bacillus subtilis including that of YidC2, the target of regulation. *J. Bacteriol.* (2015) **197**, 99-107.

(\*corresponding author)

##### 総説

伊藤維昭 (2015) アレストペプチドを通してみえてきた, セントラルドグマを奏でる分子の自律性. 生化学87, 666-674(総説)

伊藤維昭 (2015) 遺伝情報の産物と言う側面に注目して蛋白質を観る. シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」第13回. 日本蛋白質科学会  
<http://www.pssj.jp/files/newsletters/15/13.pdf> (総説)

伊藤維昭 (2015) 新生鎖の生物学の始まり. NEWS LETTER Nascent chain biology #1. 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「新生鎖の生物学」(総説)

#### 5. 学会発表など

伊藤維昭, 千葉志信: 新生鎖が経験するダイナミズムが翻訳伸長に影響することについて考える 第3回 RIBOSOME MEETING 2015, 3, 17-18, 宮崎市

千葉志信, 千葉(下川)直美, 伊藤維昭: 枯草菌MifMとリボソームトンネルとの種特異的な相互作用 第3回 RIBOSOME MEETING 2015, 3, 17-18, 宮崎市

茶谷悠平, 丹羽達也, 千葉志信, 伊藤維昭, 田口英樹: 網羅解析により見出された翻訳アレストの普遍性とその生理学的意義 第15回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム 2015

千葉志信, Daniel Sohmen, 千葉(下川)直美, 伊藤維昭, Daniel Wilson: 枯草菌MifM翻訳途上鎖とリボソームとの相互作用様

式の解明 2015年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2015, 8, 27-27 滋賀県

Koreaki Ito: Arrest peptides illuminate molecular autonomy in execution of the central dogma 新学術領域「新生鎖の生物学」第2回若手ワークショップ 2015.9.28-30, 蔵王2015(招待講演)

Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of the membrane protein biogenesis pathway Nascent Chain Biology Meeting 2015 in Tokyo 2015, 10, 1 東京(招待講演)

Mori, H., Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K. and Akiyama, Y.: Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria MBM2015 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 2015.12.1-4. Kobe

石井英治, 千葉志信, 橋本成祐, 小嶋誠司, 本間道夫, 伊藤維昭, 秋山芳展, 森博幸: ビブリオ属細菌の低食塩環境への適応: アレストペプチドVemPによるSecDF発現制御の役割 MBM2015 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 2015.12.1-4. Kobe

伊藤維昭: 遺伝情報の翻訳に携わる分子の自律性 大阪大学微生物病研究所・大集談会 2015, 12, 11(招待講演)

#### 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)

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: グラム陽性菌ゲノム機能会議(滋賀 2015. 8. 27-28)を共催。

伊藤維昭: Member, Faculty of 1000(論文評価システム)

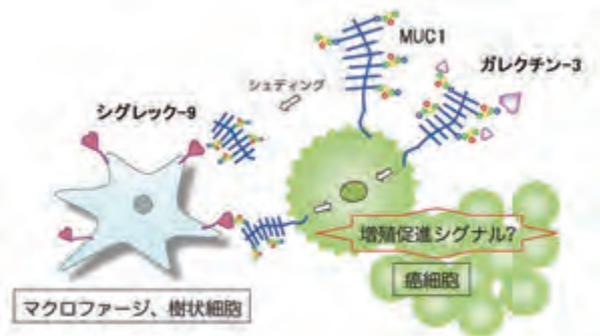
伊藤維昭: 生物遺伝資源に関する大腸菌小委員会及び NBRP 原核生物運営委員会委員

# 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-グリカンをもつ高分子の糖タンパク質である。正常な上皮組織では、新たに合成されたムチンは細胞のアピカル側に輸送されるが、癌化に伴う上皮組織の崩壊（極性の消失）により、ムチンは細胞表面全体に輸送されるようになる。上皮組織の崩壊により形成される癌組織微小環境においては、癌細胞と免疫細胞などを含む間質細胞が混在し、正常組織では見られない細胞間や細胞とマトリクス間の相互作用が可能となる。MUC1 は上皮性癌細胞に普遍的に発現している膜結合型ムチンであるが、癌組織微小環境の中で様々なレクチンと相互作用する可能性がある(図)。MUC1 へのレクチンの結合に伴うシグナル伝達による腫瘍悪性化作用を検討している。また、免疫細胞上に発現するシグレックなどのレクチンへの MUC1 の結合にともなう免疫抑制作用についても検討している。何故なら、多くのシグレック分子は ITIM を保持しているからである。このような研究を通じて、免疫細胞に発現するシグレック-9 のカウンターレセプターとしてプロヒピチンを見出したが、その生物学的意義についても検討中である。



## 2. 本年度の研究成果

### 1) MUC1 を介した Trop2 の誘導機構の解析

Trop2 は膜貫通タンパク質で腫瘍の悪性化に関与する分子として知られている。我々はヒト大腸癌細胞株の HCT116 細胞に MUC1 を発現させると Trop2 mRNA が著しく増加することを見出した。そこで、ルシフェラーゼアッセイにより Trop2 のプロモーター活性を HCT116/MUC1 細胞とコントロール細胞 (HCT116/Mock) を用いて測定したところ、前者の Trop2 プロモーター活性はコントロール細胞の 3.4 倍であった。これらの結果より、Trop-2 は MUC1 と関連するシグナル伝達により誘導される

教授 中田 博

Prof. Hiroshi Nakada, Ph. D.



助教 秋田 薫

Assist. Prof. Kaoru Akita, Ph. D.

ものと予想された。Trop-2 のプロモーター活性を担う領域の塩基配列を解析したところ、GC 含量が高いことがわかった。従って、転写因子 SP1 が Trop-2 の転写因子として働いている可能性が示唆された。予想どおり、SP1 阻害剤である Mithramycin A は Trop-2 の mRNA の発現を抑制した。また、Mithramycin A により処理した細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、Mithramycin A の濃度依存的に Trop-2 のプロモーター活性が減少した。次に、HCT116/MUC1 細胞のライセートより MUC1-CD を免疫沈降し、沈降物を電気泳動後、ウエスタンブロットした。免疫沈降物中に SP1 が検出され、MUC1-CD と SP1 両分子は相互作用することが示唆された。また、両細胞の核画分における SP1 は HCT116/MUC1 細胞の方が HCT116/Mock 細胞に比して約 2.3 倍であった。これらの結果は MUC-CD/SP1 複合体が細胞質で形成され、SP1 の核への移行が促進され、Trop-2 の発現を誘導している可能性を示唆している。

### 2) B 細胞表面におけるプロヒピチンの発現と生物学的意義

我々は以前に T 細胞株及び活性化された T 細胞は細胞表面にプロヒピチンを発現し、情報伝達の役割を果たしていることを見出した。同様の研究を B 細胞株である Daudi 及び Ramos 細胞を用いて行った。ビオチンで標識した細胞表面のタンパク質をストレプトアビジン-セファロースを用いて調製し、電気泳動に続き、ウエスタンブロットで解析したところ、細胞表面にプロヒピチンが検出された。また、これらの細胞の細胞表面におけるプロヒピチンの発現は免疫化学的にも確認された。しかしながら、マウス脾臓より調製された B 細胞の細胞表面には検出されなかった。しかし、LPS によりマウス脾臓 B 細胞を刺激すると 48~60 時間後に細胞表面に発現されることがわかった。次に、Daudi 細胞の細胞表面におけるプロヒピチンの分布を免疫化学的あるいはプロヒピチンに結合することが知られている蛍光標識したロカグラミドを用いて調べた。その結果、プロヒピチンは B 細胞受容体と共局在することがわかった。すなわち、B 細胞の情報伝達に関与することが示唆された。

抗 IgM (Fab')<sub>2</sub> 抗体で Daudi 細胞を刺激し、時間経過とともに細胞を回収した。抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロット後にリン酸化 ERK1/2 を検出した。刺激後約 10 分でリン酸化のレベルはピークとなり、ロカグラミド存在下ではシグナル伝達は抑制されることがわかった。今後、シグナル伝達におけるプロヒピチンの役割を明らかにしていく予定である。

### 3. Research projects and annual reports

Mucins are major components covering the luminal surfaces of the epithelial respiratory, gastrointestinal, and reproductive tracts, and high molecular weight glycoproteins with a number of O-glycans. Newly synthesized mucins are transported into the apical surface in normal epithelial cells. However, upon the loss of cell polarity through malignant transformation, they are transported to the whole cell surface. Tumor microenvironment is composed of tumor cells and stroma cells including immune cells. Eventually, new cell-cell and cell-matrix interactions occur in the tumor microenvironment. MUC1 is a membrane-bound mucin and expressed commonly in epithelial cells. Thus we speculated that MUC1 possibly interacts with some lectins present in the tumor microenvironment. We are studying on MUC1-mediated signaling triggered by the binding of lectins and resultant tumor progression. Furthermore, immune cells express a variety of lectins. Binding of MUC1 to a membrane bound lectin such as siglecs expressed on immune cells may induce immune regulation because many siglecs possess immune tyrosine inhibitory motif (ITIM). Through these studies, we found prohibitins as a counter receptor for siglec-9. Their biological significance is currently under study.

#### 1: Analyses of MUC1-mediated induction of Trop2

Trop2 is a membrane bound glycoprotein and known to be responsible for tumor progression. We found that level of Trop2 mRNA was prominently enhanced in human colon cancer cell line, HCT116 cells when MUC1 cDNA was introduced into the cell. Thus Trop2 promoter activity was estimated in MUC1 expressing HCT116 cells (HCT116/MUC1 cells) and control cells (HCT116/Mock cells) by luciferase assay. The activity in HCT116/MUC1 cells was estimated to be 3.4 fold compared with that in control cells. These results suggest that Trop2 may be induced through MUC1-related signaling events. Analyses of DNA region possessing the promoter activity of Trop2 expression revealed that this region highly contained GC. Thus, it is speculated that SP1 may play a role as a transcription factor of Trop2. Expectedly, mitramycin, a SP1 inhibitor, inhibited the expression of Trop2 mRNA.

Next, MUC1-CD was immunoprecipitated from the lysate of HCT116/MUC1 cells and the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting. SP1 was detected in the immunoprecipitates of MUC1-CD, suggesting the formation of MUC1-CD and SP-1 complex. The level of SP-1 in the nuclei was higher (~ 2.3 fold) in HCT116/MUC1 cells compared with HCT116/Mock cells. These results suggest that MUC1-CD/SP-1 complex was formed in the cytoplasm and transported into the nuclei, leading to enhance the transcription of Trop2.

#### 2. Expression of prohibitins on the surface of B cells and its biological significance

Previously we found that T cell lines and activated T cells express prohibitins on the cell surface and prohibitins play a role in signal transduction. Similar experiments were performed using B cell line, Daudi and Ramos cells. Cell surface proteins labeled with biotin were prepared by using streptavidin-Sepharose and subjected to SDS-PAGE and Western blotting. Prohibitins were detected on the surface of these cells. Expression of prohibitins on the surface of these cells were also observed immunochemically. However, primary B cells prepared from mouse spleen expressed no prohibitins on the cell surface. When mouse spleen B cells were stimulated with LPS, prohibitins were detected on the cell surface at 48-60 h after LPS stimulation.

Next, we examined the distribution of prohibitins on the surface of Daudi cells immunochemically or by using fluorescein-labeled Rocaglamid which is known to bind to prohibitins and revealed that prohibitins were co-localized with B cell receptor, suggesting that prohibitins may be related to signal transduction. Thus, signal transduction was examined using Daudi cells. Cell lysates were prepared from the cells treated with anti IgM (Fab')<sub>2</sub> antibody for various times and subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting. Phosphorylated ERK1/2 and ERK1/2 were detected with each antibody. Phosphorylation of ERK1/2 was peaked at 10 min after stimulation and inhibited by Rocaglamid.

#### 4. 論文, 著書など

F.Oura, Y.Yajima, M. Nakata, K. Taniue, T. Akiyama, H. Nakada, K.Yamamoto, Y. Fujita-Yamaguchi

Susceptibility to proteases of anti-Tn-antigen MLS128 binding glycoproteins expressed in human colon cancer cells. Biosci Trends. 2015.9(1), 49-55

Y.Mori, K. Akita, M. Yashiro, T. Sawada, K. Hirakawa, T. Murata, H.Nakada

Binding of Galectin-3, a  $\beta$ -Galactoside-binding Lectin, to MUC1 Protein Enhances Phosphorylation of Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) and Akt, Promoting Tumor Cell Malignancy.

J Biol Chem. 2015. 290(43), 26125-26140

#### 5. 学会発表など

森勇伍, 秋田薫, 中田博: MUC1 への galectin-3 の結合を介した情報伝達が癌悪性化機構を誘導する。第 34 回日本糖質学会, 東京都, 2015.7.31~8.2

中田博, 万木肇, 森勇伍, 秋田薫: シグレック-9 と新規カウンターレセプターとの相互作用がもたらす生物学的作用

Glyco-Immunology 2015, 東京都, 2015.8.19~20(招待講演)

中田博, 森勇伍, 秋田薫, 八代正和, 澤田鉄二, 平川弘聖: 癌組織微小環境における MUC1-レクチン相互作用による腫瘍悪性化 第 74 回日本癌学会, 名古屋, 2015.10.8~10(招待講演)

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

公益信託 医用薬物研究奨励富岳基金

採択された研究テーマ: 癌組織微小環境における MUC1 とレクチンの相互作用による腫瘍悪性化機構の解析と臨床的応用

##### 2) 知財権等 なし

##### 3) 学外活動

徳島大学非常勤講師、  
NEDO ビアレビューアー、

##### 4) 受賞等 なし

##### 5) その他 なし

#### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

教育課程において、とりわけ 3 年生の秋学期からの基礎特別研究や 4 年生での応用特別研究では、個々の研究テーマの遂行過程において教育を行う。また、アカデミアにおける実験科学は大学院生の教育・研究を通じて進展していく。研究員は学部におけるゼミ生や大学院生の教育・研究において、指導教員と学生・大学院生の間には位置し、要となる。従って、その成果を

示す具体的パラメーターは、大学院生数と彼らによる発表論文数と言える。年単位で効果を示すことは困難であるが、本研究室では研究員制度が導入されて以来、本学出身の修士課程卒業者は 10 名、博士取得者は 4 名を数える。彼らを筆頭著者とする論文数は 8 報である。



# 分子細胞生物学研究室

Laboratory of Molecular and Cellular Biology

教授 永田 和宏

Prof. Kazuhiro Nagata, Ph.D

助教 潮田 亮

Assist. Prof. Ryo Ushioda, Ph.D



## 1. 研究概要

分子細胞生物学研究室では、「タンパク質の一生」を大きな研究の枠として設定し、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。

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

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「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」という研究項目がスタートしたが、この研究は特にこの一年で大きな進展と成果を得ることができた。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、論文として投稿したところである。また Hsp47 に遺伝的変異を持つことによって骨形成不全症になる疾患について、その変異 Hsp47 の性状について解析し、論文としてまとめることができた。

### 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 ERdj5 という還元酵素が重要な役割を果たしていることをすでに報告したが、新たに、この ERdj5 がカルシウムポンプの活性を制御することによって、小胞体内のカルシウム恒常性維持を担っていることを発見し、論文として投稿しているところである。

### 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である ERdj8 を発見した。本年一年間でこの ERdj8 の役割に関する研究が著しく進展し、ERdj8 が小胞体膜からオートファゴソームの遊離するプロセスを阻害すること、そのことによってオートファゴソームの大きさの調節に関わっていることを明らかにすることができた。本研究によって、研究員の山本洋平は、学会および班会議で3つの賞を受賞した。

### 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ため、ゼブラフィッシュの系を用いて解析を進めた。その結果、*mysterin* は、血管形成だけでなく、筋肉の形成過程にも重要な関わりを持つことが明らかになった。

## 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

遺伝性骨疾患である骨形成不全症 (OI) はI型コラーゲンやI型コラーゲンの合成に関わるタンパク質の変異によって起こる。近年、Hsp47 の変異もヒトやイヌで骨形成不全症を引き起こすことが報告された。今回、Hsp47 OI 変異体である L78P と L326P 変異体の分子の特性を調べた。2つの OI 変異体は構造的に不安定であり、ユビキチンプロテアソーム系により分解されるため、Hsp47 の量が少ないことが分かった。また、OI 変異体の可溶性は野生型よりかなり低く、コラーゲン

に対する結合能も著しく低下していることが分かった。小胞体内の可溶性のHsp47の量の減少だけではなく、分子シャペロンとしてコラーゲンの合成に必須となるコラーゲンへの結合能の減少もまた骨形成不全症を引き起こす原因の一つであることが考えられた(S.Ito, K.Nagata *Biochem Biophys Res Commun.* 2016)。コラーゲンの異常蓄積を特徴とする線維化疾患においては、Hsp47は疾患の悪性化に関与している。肝線維化の進行過程でコラーゲンを過剰に産出する肝星細胞においてHsp47をノックアウトすると、細胞外マトリクス中のコラーゲン量が著しく減少し、アポトーシスが誘導されたことから、Hsp47が創薬標的となりうるということが分かった(K. Kawasaki et al., *J. Biol. Chem.*, 2015)。また、我々は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から、既にHsp47阻害化合物を得ていたが(特許所得済み)、今回、スクリーニング過程の再検討を行い、前回とは異なる構造式で特異性が向上した化合物を得た。この化合物を細胞へ投与するとコラーゲンの3重らせん構造が正しく形成されなかった。我々は、低分子化合物を用いてHsp47のシャペロン機能を細胞レベルで阻害することに成功した(論文投稿準備中)(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した還元酵素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じ、SERCA2との複合体形成を調節していることを明らかにした(論文投稿中)。また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い、候補分子の同定に成功した。その中で、新規の小胞体チオレドキシシン様タンパク質に着目し、in

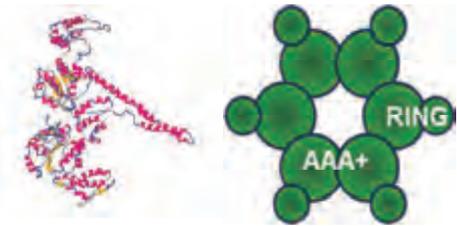
vitro および in vivo 解析を行い、新たな機能と特筆すべき機能調節機構を発見した。(文責:潮田)。

## 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。これまでに我々は小胞体膜に局在する新規タンパク質であるERdj8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ていた。さらに詳細な解析を行ったところERdj8はオートファゴソームが小胞体からリリースされる過程を負に制御する事を見出した。さらに、ERdj8の機能ドメインは小胞体内腔側に位置していることから、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している。現在これまでの結果に関して論文投稿の準備を行っている。今後、このERdj8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

これまでmysterinがゼブラフィッシュの生理的血管新生に関わることや(Liu, Morito et al., *PLOS ONE*, 2011)、mysterinが巨大なドーナツ状オリゴマーを形成し、ATPの結合・加水分解にともなって構造を変化させるメカノエンザイムであることなどを明らかにしてきた(Morito et al., *Sci Rep*, 2014)。Mysterinが血管以外の組織でも発現することから、血管新生以外の表現型について検討したところ、ゼブラフィッシュの速筋・運動神経形成にも必須であることが明らかとなった(Kotani, Morito et al., *Sci Rep*, 2015)。またmysterinの2つの酵素活性(ATPアーゼ活性・ユビキチンリガーゼ活性)の両方がこのような生理機能に重要であることも併せて明らかとなった。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.** Osteogenesis imperfecta (OI) is a genetic disorder characterized by fragile bones. Mutations in collagen specific molecular chaperone Hsp47, specifically L78P and L326P, lead to OI, yet these mutants are not fully characterized. We found that both Hsp47 mutants were structurally unstable that were degraded by the ubiquitin-proteasome system, and the collagen-binding ability of the mutants was significantly lower than that of the wild type. Thus, the molecular mechanism causing OI might not alone be a decrease in the amount of soluble Hsp47 in the ER but also a loss in the ability of Hsp47 to bind collagen and in chaperoning the procollagen folding (S.Ito, K.Nagata *Biochem Biophys Res Commun.* 2016). Liver fibrosis is characterized by abnormal collagen accumulation in the extracellular matrix of liver. In liver fibrosis, hepatic stellate cells (HSCs) produce collagen actively. In hsp47-KO HSCs, we confirmed that type 1 procollagen is accumulated in the ER resulting in causing apoptosis in HSCs, suggesting 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 reevaluated the inhibitor screening process and obtained a compound with improved specificity in a different structural formula from the previous. The triple helical structure of procollagen was not properly formed by administration to MEF cell of this compound.

**2: Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation and Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> pump on ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the ER (*Submitting*). Furthermore, we screened the interaction partner of ERdj5 to declare redox source of ERdj5. We focused on novel ER resident Thioredoxin interacting with ERdj5. We declared its new function and unique regulatory mechanism for ER redox homeostasis.

**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, ERdj8, 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 demonstrated that mysterin participates in the physiological angiogenesis during zebrafish embryogenesis (Liu, Morito et al., *PLOS ONE*, 2011) and that mysterin forms a huge toroidal oligomer and changes its overall structure through ATP-binding and hydrolysis (Morito et al., *Sci Rep*, 2014). Furthermore, we examined its biological significance in other than blood vessels, since mysterin is ubiquitously expressed throughout the animal body, and elucidated that mysterin is also necessary for proper formation of fast muscle and motoneurons (Kotani, Morito et al., *Sci Rep*, 2015). Interestingly, mysterin's two enzymatic activities such as ATPase and ubiquitin ligase activities were both necessary for its physiological function *in vivo*. Further studies on intracellular function of mysterin and the pathological mechanism are warranted.

#### 4. 論文、著書など

D.J. Klionsky, K.Nagata, R.Ushioda et al

Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring Autophagy(3<sup>rd</sup> edition) *Autophagy* in press

S. Ito , K. Nagata Mutants of collagen-specific molecular chaperone

- Hsp47 causing osteogenesis imperfecta are structurally unstable with weak binding affinity to collagen  
*Biochem Biophys Res Commun.* in press
- Y. Kotani, D. Morito, S. Yamazaki, K. Ogino, K. Kawakami, S. Takashima, H. Hirata, K. Nagata. Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. *Scientific Reports* 5:16161 (2015)
- 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.* 34(18):2334-2349 (2015)
- D. Morito & K. Nagata: Pathogenic Hijacking of ER-Associated Degradation: Is ERAD Flexible? *Mol Cell.* 59:335-344 (2015)
- A. Kitamura, K. Nagata & M. Kinjo: Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 16(3):6076-6092 (2015)
- 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.* 290(6): 3639-3646 (2015)
- 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.* 13(1):2 (2015)
- 潮田亮, 永田和宏: 蛋白質品質管理とその破綻に伴う小胞体ストレス応答. 別冊・医学のあゆみ レドックス UPDATE ーストレス制御の臨床医学・健康科学 (医歯薬出版) 59-63 (2015)

## 5. 学会発表など

### 招待講演、シンポジウム等

- 永田和宏: 細胞老化と病気. 京都産業大学創立 50 周年記念事業シンポジウム、京都市、2015.1.17
- 永田和宏: 科学と科学者のありかたを問うー来るべき時代に向けてー. 高等研創設 30 周年記念フォーラム、東京都、2015.2.21
- Kazuhiro Nagata: ERdj5, an ER-resident reductase, regulates the activity of SERCA2, a calcium ATPase, in a  $[Ca^{2+}]$ -dependent manner. EMBO conference "Molecular chaperones: From molecules to cells and misfolding diseases, Crete (Greece), 2015.5.12
- Kazuhiro Nagata: A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER-mitochondria contact site as a negative regulator for macroautophagy (Short Talk). EMBO Conference, Autophagy

signaling and progression in health and disease, 2015.9.9-12, Sardegna (Italy)

Kazuhiro Nagata: ERdj5 and Erdj8: Regulation of proteostasis and calcium homeostasis in the ER and negative regulation of macro-autophagy (Keynote Lecture). 7<sup>th</sup> Cell Stress Society International Congress "Stress and Health Molecule to Human, Huangshan (China), 2015.9.16

### 学会発表

- Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata. ERdj5-mediated ER homeostatic mechanism ER & Redox Club Meeting, 2015.4.15-17, Venice (Italy) (口頭発表)
- 伊藤進也、小川 浩二、竹内 恒、広川 貴次、吉田 将人、土井 隆行、五島 直樹、夏目 徹、永田 和宏. 線維化疾患治療に向けたコラーゲン分泌阻害剤の同定と解析. 第47回日本結合組織学会学術大会、2015.5.15-16、東京都
- 潮田亮. 還元酵素ERdj5を介した小胞体恒常性維持機構の解明 第1回1研4大学合同研究会、2015.5.18-19、千葉市 (口頭発表)
- 伊藤進也. コラーゲンのフォールディングに関する研究. 第1回1研4大学合同研究会、2015.5.18-19、千葉市 (口頭発表)
- 小谷友理. ATPアーゼ/ユビキチンリガーゼmysterinによるゼブラフィッシュ神経・筋肉の形態制御機構. 第1回1研4大学合同研究会、2015.5.18-19、千葉市 (口頭発表)
- 杉原宗親. Loss of redox homeostasis by trans-compartmental stress and ageing. 第1回1研4大学合同研究会、2015.5.18-19、千葉市 (口頭発表)
- 伊藤進也. コラーゲンの小胞体内膜近傍での効率的なフォールディング. 第1回細胞生物若手の会、2015.6.29、東京都
- 伊藤進也、永田 和宏. コラーゲンの小胞体内膜近傍での効率的なフォールディング. 第67回日本細胞生物学会大会、2015.6.30-7.2、東京都
- 小谷友理、森戸大介、山崎悟、荻野一豊、高島成二、平田普三、永田和宏. ATPアーゼ/ユビキチンリガーゼmysterinによるゼブラフィッシュ神経・筋肉の形態制御機構. 第67回日本細胞生物学会大会、2015.6.30-7.2、東京都
- Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Kazutoyo Ogino, Koichi Kawakami, Seiji Takashima, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata. Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. ZDB8 (The 8th Annual

Zebrafish Disease Models) Conference, 2015.8.23-26, Boston (USA)

Yohei Yamamoto, Shoshana Bar-Nun, Munechika Sugihara, Tomoe Takino, Kohei Hanafusa, Miyuki Sato, Richard I. Morimoto, Maho Hamasaki, Tamotsu Yoshimori, Kazuhiro Nagata. A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER mitochondria contact site as a negative regulator for macro autophagy

EMBO Conference, Autophagy signaling and progression in health and disease, 2015.9.9-12, Sardegna (Italy)

杉原宗親. 加齢・疾患による小胞体レドックス恒常性の破綻「新生鎖の生物学」若手ワークショップ、2015.9.28-30 (蔵王) (口頭発表)

藤井唱平、潮田亮、永田和宏. 小胞体レドックスによるカルシウム調整機構の解明 「新生鎖の生物学」若手ワークショップ、2015.9.28-30 (蔵王) (口頭発表)

上垣日育、潮田亮、永田和宏. 小胞体内腔還元酵素ERdj5の還元メカニズムの解明「新生鎖の生物学」若手ワークショップ、2015.9.28-30 (蔵王) (口頭発表)

Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata. Maintenance for ER homeostasis through disulfide reductase, ERdj5. JST CREST-PRESTO joint international symposium, 2015.11.5-6 (Tokyo)

山本洋平、瀧野友愛、杉原宗親、花房航平、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、Richard I. Morimoto、吉森保、Shoshana Bar-Nun、永田和宏. 新規小胞体膜タンパク質ERdj8が制御する小胞体からのオートファゴソーム解離機構. 第9回オートファジー研究会、2015.11.15-17、淡路市 (ポスター、口頭発表)

山本洋平、瀧野友愛、杉原宗親、花房航平、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、Richard I. Morimoto、吉森保、Shoshana Bar-Nun、永田和宏. A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER-mitochondria contact site as a negative regulator for macro-autophagy. 第10回小胞体ストレス研究会、2015.11.29-30 (淡路市)

森戸大介、小谷友理、西川幸希、山崎悟、高島成二、藤吉好則、平田普三、永田和宏. モヤモヤ病タンパク質ミスレリンの離合集散と血管・筋肉制御. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015.12.1-4、神戸

伊藤進也、永田和宏. I型コラーゲンの小胞体内膜近傍での効率的なフォールディング機構の解析. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015.12.1-4、神戸市

平山尚志郎、杉原宗親、櫻井靖之、森戸大介、家村俊一郎、夏目徹、永田和宏、村田茂穂. ユビキチン化を受けた構造異常タンパク質の核外排出分子機構の解析. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015.12.1-4、神戸市

## 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)

科学研究費補助金・基盤研究S

課題名：レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の研究、

研究代表者：永田和宏、取得年度：H24-28年 (5年)

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

課題名：小胞体恒常性維持機構：Redox, Ca<sup>2+</sup>, タンパク質品質管理のクロストーク、研究代表者：永田和宏、取得年度：H25-30年 (5年半)

武田科学振興財団・特定研究助成[ I ]

仮題名：細胞機能発現制御におけるオルガネラ恒常性とクロストークの重要性、研究代表者：永田和宏、取得年度：H27-30

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・新学術領域「新生鎖の生物学」

課題名：新生鎖による小胞体レドックス制御-新生鎖による還元力の獲得、研究代表者：潮田亮、取得年度：H27-28年 (2年)

科学研究費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」

課題名：N末端アレスト配列による巨大新生鎖の翻訳速度調節、研究代表者：森戸大介、取得年度：H27-28年 (2年)

科学研究費補助金・基盤研究C

課題名：モヤモヤ病タンパク質ミスレリンの細胞内機能、研究代表者：森戸大介、取得年度：H27-28年 (2年)

国立遺伝学研究所「共同研究(B)」

研究課題名:モヤモヤ病関連因子ミスレリンの in vivo 機能解析、  
研究代表者: 森戸大介、取得年度: H27年(1年)

## 2) 知財権等

発明者 : 永田和宏、山本洋平

名称: 細胞内の異常物質蓄積を伴う疾患の治療薬、バイオマーカー、診断薬、並びに、スクリーニング方法

## 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:日本学会会議(細胞生物学)連携会員

永田和宏:文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「新生  
鎖の生物学」アドバイザー

永田和宏:文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「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」外部評価委員

永田和宏:文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「オー  
トファジー専門委員会」主査、外部評価委員

永田和宏:文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「温度  
を基軸とした生命現象の統合的理解」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: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:Scientific Reports, Editor

永田和宏:DNA and Cell Biology, Editor

永田和宏:Cell Stress Society International, Senior Fellow

永田和宏:日本細胞生物学会 幹事、代議員、常任編集委員、  
名誉会員

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

## 4) 受賞等

山本洋平、瀧野友愛、杉原宗親、花房航平、濱崎万穂、佐藤美

由紀、佐藤健、Richard I. Morimoto、吉森保、Shoshana Bar-Nun、  
永田和宏、第9回オートファジー研究会、若手ベストポスター賞、  
若手ベストプレゼンテーション賞受賞

山本洋平、瀧野友愛、杉原宗親、花房航平、濱崎万穂、佐藤美  
由紀、佐藤健、Richard I. Morimoto、吉森保、Shoshana Bar-Nun、  
永田和宏、第10回小胞体ストレス研究会、ポスター大賞受賞

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

潮田助教は、ERdj5 の発見者であり、本研究室で行っている ERdj5 による小胞体恒常性維持機構研究の責任者である。ERdj5 が小胞体関連分解のみならず、カルシウムポンプの活性化を通じて、小胞体におけるレドックス、カルシウム、タンパク質の3つの恒常性維持に重要な働きをしていることを明らかにしている。国際的にも注目される研究であるが、潮田助教によって大学院生、学部学生がその研究に触れ、また研究の方法を学ぶことによって、世界の先端で研究を推進するとはどのようなことかを実感する格好の機会となっている。学生のそれぞれが自分のやっていることに自信を持つことが、大学教育、および研究にとってまず大切だと考えるが、その点において、潮田助教は十分にその役割を果たしている。



# 発生細胞生物学研究室

Laboratory for Cell and Developmental Biology

教授 中村暢宏

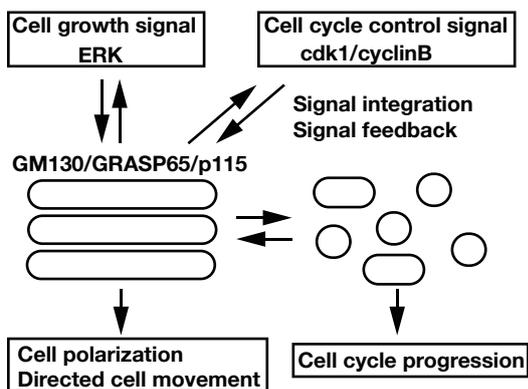
Prof. Nobuhiro Nakamura, PhD



## 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 YIPF1, YIPF2, YIPF6 の機能解析及びゼブラフィッシュでの GM130 の機能解析、またそのツールとして用いるゴルジ体を GFP 標識したトランスジェニックゼブラフィッシュ作成に進展が見られたので、以下に報告する。

(1) HeLa 細胞の YIPF1, YIPF2, YIPF6 を siRNA 処理によってノックダウンしたところ、通常の培養条件下ではゴルジ体の構造に有意な変化は観察されなかった。しかし、YIPF1, YIPF2, YIPF6 のノックダウン細胞では、低 pH 処理によるゴルジ体の分散化が有意に抑制されることを発見した。また、この抑制効果は YIPF1, YIPF2, YIPF6 が局在する medial-Golgi, trans-Golgi 及び TGN にのみ見られ、cis-Golgi はコントロール同様に分散していた。したがって、YIPF1, YIPF2, YIPF6 が低 pH 処理によるゴルジ体の分散化を誘導している可能性が示唆された。YIPF タンパク質群が輸送小胞の形成や、ゴルジ体からの管状小胞形成に関与している可能性が考えられる。

(2) GM130 mRNA を標的とするモルフォオリゴを 4 種合成し、ゼブラフィッシュ胚に導入して初期発生に与える影響を観察した。1 種は翻訳開始部位を標的とし、他 3 種はスプライシングサイトを標的とした。いずれのモルフォオリゴにおいても、表現形の強弱はあったが尾の身長

不全が観察された。また、頭部の形成不全や鰭の欠如などの表現形も観察された。これらの結果から、GM130の機能が初期発生時の体軸伸張過程や頭部組織、鰭の形成に重要であることが示唆された。

(3) 培養細胞でゴルジ体のマーカーとして用いられている *N*-acetylglucosaminyltransferase I と eGFP の融合タンパク質 (MAGT-eGFP) を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの作成を進めた。Hsc70 プロモーター下に MAGT-eGFP を発現する発現ユニットを構築し、1 細胞期の胚に微細注入し 0hpf で GFP 蛍光が観察できた胚 (GFP<sub>0+</sub>) を回収し成魚まで生育させた (F<sub>0</sub>, GFP<sub>0+</sub>)。F<sub>0</sub> 同士を掛け合わせて F<sub>1</sub> を作出し、さらに野生型と掛け合わせることによって、ヘテロ接合型のトランスジェニックゼブラフィッシュ F<sub>2</sub> (MAGT-eGFP / -) の作成に成功した。Whole mount 及び切片を作成して観察したところ、全身性にゴルジ体が標識されていることが明らかとなった。

### 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 report following three topics.

(1) *Analysis of the functions of YIPFs*: By knockdown experiment using siRNA, YIPF1, YIPF2 and YIPF6 were found to protect the Golgi apparatus from the disassembly induced by the low pH treatment. These results suggested that YIPF1, YIPF2 and YIPF6 function in the disassembly of the Golgi apparatus during the low pH treatment, most probably at the vesicle budding step.

(2) *Analysis of GM130 during the early development of zebrafish*: Knockdown of GM130 by morpholino induced mal-extension of tail, head region atrophy and the lack of fins. Therefore, GM130 was suggested to have important roles in these processes.

(3) *Production of transgenic zebrafish expressing N-acetylglucosaminyltransferase I - eGFP fusion protein (MAGT-eGFP)*: Using Hsp70 promoter, MAGT-eGFP expressing units were constructed and introduced in the zebrafish embryos. We successfully obtained heterozygous transgenic zebrafish F<sub>2</sub> (MAGT-eGFP / -) expressing MAGT-eGFP throughout whole body.

#### 4. 論文, 著書など (Publications)

**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.* 282, 2232–2244

**Cervigni, R.I., Bonavita, R., Barretta, M.L., Spano, D., Ayala, I., Nakamura, N., Corda, D. & Colanzi, A.** (2015). JNK2 controls fragmentation of the Golgi complex and the G2/M transition through phosphorylation of GRASP65. *J Cell Sci* 128, 2249–2260.

足立薫, 桜井延子, 高木征弘, 水口充, **中村暢宏** (2015). 理系グローバル人材育成のための学部横断の取組—グローバル・サイエンス・コースのカリキュラム開発. *高等教育フォーラム* 5, 83-94.

甲谷結未, **中村暢宏** (2015). グローバル・サイエンスコースにおけるルーブリックとe-ポートフォリオの開発と課題. *高等教育フォーラム* 5, 95-106.

#### 5. 学会発表など (Meeting Reports)

**Ryuichi Ishida, Nobuhiro Nakamura.** GM130 is a parallel tetramer in a flexible rod-like structure with N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. "*Molecular Membrane Biology*", *Gordon Research Conference*, Proctor Academy, Andover, NH, USA. 2015.7.12-17

足立薫, 桜井延子, **中村暢宏**. 理系学生のための合宿型集中英語講義—京都産業大学グローバル・サイエンス・コースにおける試み—. *第21回大学教育研究フォーラム*, 京都大学高等教育開発推進セミナー, 京都大学, 京都, 2015. 3. 13-14.

#### 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

武田科学振興財団, 2015 年度 特定研究助成

課題名: 細胞機能発現制御におけるオルガネラの恒常性とクロストークの重要性

研究代表者: 永田和宏, 共同研究者: 遠藤斗志也, 横山謙, **中村暢宏**, 取得年度: H27-30 年

##### 2) 知財権 (Patents)

該当なし

##### 2) 学会活動 (Activities in Academic Societies)

日本生化学会評議員 (2012.4~)

日本細胞生物学会評議員 (2014.4.1~)

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



#### 2015 Laboratory Members:

(From the left) 大迫志帆 Shiho Ohsako (M1), 山岡沙織 Saori Yamaoka (嘱託職員 Assistant), 佐々木沙織 Saori Sasaki (B4), Shaheena Shaik (外国人特別生 Foreign visitor), 河村実里 Misato Kawamura (B4), 桑折悠 Yu Kori (B3), 中村暢宏 Nobuhiro Nakamura (Prof.), 渡邊亮太 Ryota Watanabe (B3), 佐々木優里花 Yurika Sasaki (B3), Jeerawat Soonthornsit (D2), 村上涼一 Ryoichi Murakami (B3)

# 神経回路発生研究室

Laboratory of Neural Network Development

教授 浜 千尋

Prof. Chihiro Hama, Ph. D.

助教 中山 実

Assist. Prof. Minoru Nakayama, Ph. D



## 1. 研究概要

われわれが体を動かし、考え、そして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。

脳が機能をもつためには、神経細胞間の接続部であるシナプスが中心的な役割を担っている。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脳の機能発達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 20 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、膨大な数の研究が行われてきたシナプスの一部でありながら、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どのように編成されているのか未だ不明な点が多い。本研究室では、中枢のシナプス間隙に存在するタンパク質として初めて同定された 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)* 遺伝子がコードするタンパク質 Hig は、コリン作動性シナプスの間隙に局在する。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。

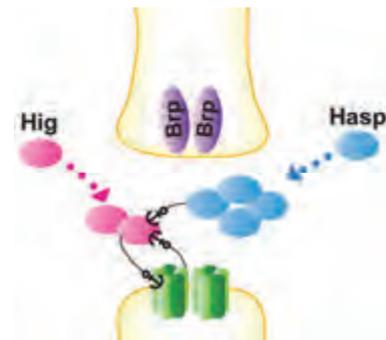
### b) シナプス間隙を含めたシナプス構造の新しいモデルの提出

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、そ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ペ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構造の新しいモデル像を提出する。

## 2. 本年度の研究成果

以下の点を明らかにし、その一部を The Journal of Neuroscience 誌に発表した。

① Hig と同様に CCP ドメインを多数もち、コリン作動性のシナプス間隙に局在する Hasp (Hig-Anchoring Scaffold Protein) を同定した。その変異では *hig* 変異と同様に、活動性および寿命が低下し、また、アセチルコリン受容体 Dα6 と Dα7 のシナプス後膜上に置ける局在量が半分に低下する一方で、シナプス後部内の DLG は増加していた。さらに、*hasp* 変異の脳では、シナプス間隙における Hig は消失していた。すなわち、Hasp は Hig のシナプス間隙への局在に必要であることが判明した。

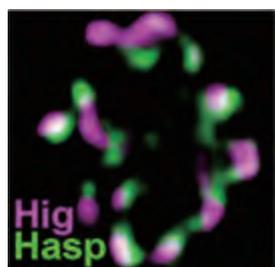


シナプス間隙における Hig, Hasp およびアセチルコリン受容体(緑)の局在機構

② Hig のシナプス間隙への局在には、Hasp だけでなく、アセチルコリン受容体 Dα5、Dα6 および Dα7 が必要である。これらの三重変異体では、Hig の局在量は野生型と比較して 20% に低下する。また、Hig と Hasp、Hig と Dα6 および Dα7 は免疫沈降により共沈することから、これらのタンパク質は複合体を形成していることが明らかとなった。

③ Hig と Hasp は共にコリン作動性シナプスのシナプス間隙に局在する。その分布を超高解像顕微鏡を用いて観察すると、Hig と Hasp は同じシナプス間隙内で異なる領域に存在することが明らかとなった。この異なる分子コンパートメントの機能については、既に明らかにされている Hig と Hasp の機能を反映していると考えられるが、さらにシナプス前部の基本構造であるアクティブゾーンおよびペリアクティブゾーンとの位置関係を解

明することにより、シナプス構造全体のモデルを提示していく必要がある。



シナプス間隙内で Hig と Hasp が形成するコンパートメント

- ④ Hasp は Hig と同様に、分泌性のタンパク質であり、細胞外に分泌されたのちにコリン作動性シナプスのシナプス間隙に特異的にトラップされる。このことは、Hasp をシナプス間隙に繋ぎ止める別のタンパク質が存在することを意味しており、そのタンパク質を同定していくことが今後の大きな課題である。
- ⑤ *hig* 変異のサプレッサー変異の原因遺伝子としてアセチルコリン受容体  $D\alpha 5$  遺伝子が同定された。*hig D\alpha 5* 二重変異体の脳では、 $D\alpha 6$  および  $D\alpha 7$  のシナプスにおける局在量が野生型に回復すること、また  $D\alpha 5$  を強制発現させると、少なくとも  $D\alpha 6$  の局在量が減少することから、 $D\alpha 5$  はシナプス間隙マトリックスと相互作用し、他のアセチルコリン受容体サブユニットの局在量を制御していることが示唆される。この仮説を今後検証し、その制御機構を解明していく必要がある。

### 3. Research projects and annual reports

**Research Project:** How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We study regulatory mechanisms of synapse differentiation at molecular levels, and also try 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 synaptic cleft matrix, identifying its components, analyzing the process of matrix formation, and revealing roles for matrix in synapse differentiation and brain functions.

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. Hig protein localizes to the synaptic clefts, forming matrix at cholinergic synapses, in the brain (Hoshino *et al.*, Development 1996; Nakayama *et al.*, J. Neurosci.

2014). The goal of this project is to identify new proteins that constitute synaptic matrix, and also to reveal how these proteins are organized in order to form functional matrix during synaptogenesis.

*Annual reports:*

*The matrix proteins Hig and Hasp exhibit segregated distribution within synaptic clefts and play distinct roles in synaptogenesis.*

We identified another matrix protein Hasp, which contains WAP and multiple CCP domains. Molecular genetic analysis revealed that Hasp diffuses extracellularly and is captured predominantly at synaptic clefts of cholinergic synapses. Furthermore, Hasp regulates levels of DLG and the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits  $D\alpha 6$  and  $D\alpha 7$  at postsynaptic terminals. Hasp is required for trapping of Hig, which is also secreted and diffused in the brain, at synaptic clefts of cholinergic synapses; however, Hig is dispensable for localization of Hasp at synaptic clefts. In addition, in the brains of triple mutants for the nAChR subunits  $D\alpha 5$ ,  $D\alpha 6$ , and  $D\alpha 7$ , the level of Hig, but not Hasp, was markedly reduced in synaptic regions, indicating that these nAChR subunits are required to anchor Hig to synaptic clefts. High-resolution microscopy revealed that Hasp and Hig exhibit segregated distribution within individual synaptic clefts, reflecting their differing roles in synaptogenesis. These data provide insight into how Hasp and Hig construct the synaptic cleft matrix and regulate the differentiation of cholinergic synapses, and also illuminate a previously unidentified architecture within synaptic clefts.

The synapse has been extensively studied because it is essential for neurotransmission. By contrast, the space between the synaptic terminals, the synaptic cleft, is still an undeveloped research area despite its ubiquity in synapses. In fruit fly brains, we obtained evidence that the matrix protein Hasp and the previously identified Hig, both of which are secreted extracellularly, localize predominantly to synaptic clefts of cholinergic synapses and modulate the levels of nAChR subunits on postsynaptic membranes. However, Hasp and Hig play differential roles in matrix formation and exhibit segregated distribution within synaptic clefts. These results reveal the molecular mechanisms of synaptic matrix construction and illuminate a molecular architecture within synaptic clefts previously unrevealed in any animal species.

#### 4. 論文, 著書など

M. Nakayama, E. Suzuki, S. Tsunoda, C. Hama:

The matrix proteins Hig and Hasp exhibit segregated distribution within synaptic clefts and play distinct roles in synaptogenesis. *J. Neurosci.* 2016, in press.

#### 5. 学会発表など

中山実, 鈴木えみ子, 角田慎一, 浜千尋:

ショウジョウバエのシナプス間隙に局在するマトリックスタンパク質 Hig と Hasp が示すコンパートメント形成と機能.

第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2015.12.1.

#### 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:シナプス構造の新しいモデル像

研究代表者:浜千尋, 取得年度:H27年

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名:シナプス間隙マトリックスによるコンパートメント形成とシナプス分化機構

研究代表者:浜千尋, 取得年度:H27-29年(3年)

##### 2) 学外活動

浜千尋: 文部科学省 脳科学研究戦略推進プログラム

最終評価委員

##### 3) その他

リエゾンオフィス主催シンポジウム

「脳は不思議だ-世界は脳でつくられる-」 むすびわざ館.

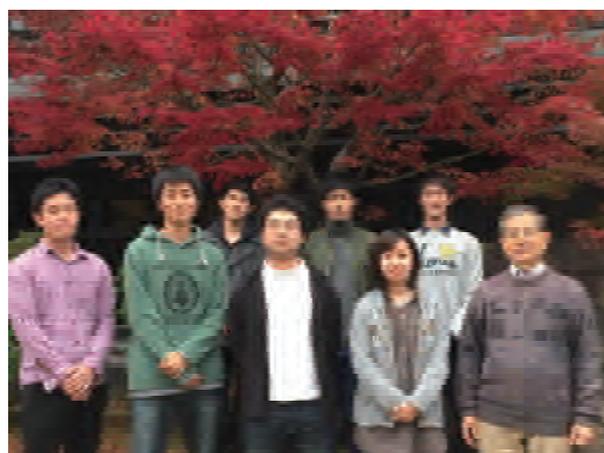
10.31.

#### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

支援制度により採用された助教の存在は、世界に向けて研究成果を発信するためには極めて重要であり、本学が大学の存立の柱として研究を重視する姿勢がこの制度に示されている。本学が平凡な大学ではなく型破りな挑戦を続けることを目標とする中で、ぜひとも支援制度を続け、さらに社会にアピールできる大学となることを期待したい。

支援制度により研究が活性化されることは、各分野の最新の知見を教員が意欲的に吸収することになり、活きた知識を学生に伝えることが可能となる。また、活発な研究環境の中でこそ、学部生や大学院生の教育研究活動が充実することは論を待たない。また、実験を主とする研

究は時間のかかる肉体労働であり、常に更新される多様な技術の集積として行われるものである。講義と学内外の活動、事務等に追われる教員には、技術に関する詳細なアップデートを自ら行うことは困難であり、技術を直に学生に伝えることも時間的に不十分である。そのため、助教の存在は、研究を進めるための直接的な推進力となるだけでなく、学生に対して日常的に詳細な技術指導を行うことを可能にするものであり、教育への貢献は非常に大きい。



# 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

助教 岸川淳一

Assistant Prof. Jun-ichi Kishikawa, 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。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理解が進んでいるが議論が分かれている点も多い。プロトン駆動力で回転する仕組みや、回転力を伝達する仕組み、回転力が発生する仕組みについても同様である。ちっぽけなタンパク質からなる分子機械がどうやってエネルギーを輸送や運動に変換し働くかは、とても興味深い問題であり、解決すべき生命科学の課題の一つである。

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-ATPase は膜外ドメインで ATP を加水分解する  $V_1$  部分と膜内剤ドメインでプロトン輸送を担う  $V_o$  部からなる。ATP 1 分子の分解で輸送されるプロトンの数、proton/ATP 比は、構造から 4 と推定されるが、その実測例はない。 $V_1$  と  $V_o$  間のエネルギー共役がタイトカルーズかを定めるために proton/ATP 比を実測することにした。pH センサーを直接リポソームに埋め込み、そこに  $V_oV_1$  を再構成した。pH センサーの蛍光変化から proton 輸送速度を計算し、 $V_oV_1$  の ATP 分解活性を実測することで proton/ATP 比を見積もったところ、理論値に近い  $\sim 3.8$  となった。このことから  $V_1$  と  $V_o$  間ではタイトにエネルギー共役していることが明らかになった。

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、本来の軸との配列相同性がない棒状分子でも同等のトルクが発生した。このことから、トルク発生には特定のアミノ酸残基間の相互作用が必要ないことが示された。今後、コイルドコイルの巻きの向きや、長さがことなる棒状分子でも回転子として働くかを調べていく。

### 3) 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* および神経芽腫細胞由来の Neuro 2A を材料とし、麻酔作用と ATP 濃度変化の関係を調べた。4 種類の全身麻酔剤により線虫、細胞とも ATP 濃度がすばやく下がるということが認められた。この原因を探るために、細胞を入れ物とした MASK assay 方によりミトコンドリアでの ATP 合成活性を調べたところ、麻酔剤の添加により、ATP 合成が阻害されることがわかった。膜電位プローブによりミトコンドリアの膜電位を調べたところ、麻酔剤により膜電位がほとんど消失することが明らかになった。これらの結果は、麻酔剤の作用点がミトコンドリアであることを強く示唆する。

## 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.](#) (2015)

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** e0119602 doi:10.1371

2. Hauer F, Gerle C, Fischer N, Oshima A, Shinzawa-Itoh K, Shimada S [Yokoyama K.](#), Fujiyoshi Y, Stark H (2015)

GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. **Structure**. pii: S0969-2126 (15)

00291-9. doi:10.1016/j.str.2015.06.029.

## 5. 学会発表など

招待講演、シンポジウム等

1. 横山謙: 回転分子モーターのトルク発生機構. 2015 第7回 膜輸送研究会 富良野, 12.27-29

学会発表

1. 足立慧、内橋貴之、今田勝巳、横山 謙、安藤敏夫: 高速原子力間顕微鏡の温度制御機構の開発と好熱菌 FliI の観察/Development of Temperature Controlled High-Speed AFM and Observation of FliI. 第 53 回日本生物物理学会年会 於 金沢大学 9.13-15
2. Atsuko Nakanishi, Nao Takeuchi, Jun-ichi Kishikawa, Kaoru Mistuoka, Ken Yokoyama: Single particle analysis of *Thermus thermophilus* V-ATPase using an electron microscopy ATPase/synthase, 第 53 回日本生物物理学会年会 於 金沢大学 9.13-15
3. BaBa Mihori, Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi, Nao Takeuchi, Shou Furuike, Ken Yokoyama: Torque generation mechanism in  $V_1$  motor 第 53 回日本生物物理学会年会 於 金沢大学 9.13-15
4. 井上勇木、岸川淳一、中西温子、船越勇機、今村博臣、

- 西川健一、藤川誠、横山謙：麻酔効果と細胞内 ATP レベルの関連 日本ミトコンドリア学会年会 福井 11.19-21
5. 平田かえで、岸川淳一、中西温子、木下一彦、飯田直樹、横山謙：V-ATPase の H<sup>+</sup>/ATP 比の測定 BMB2015 於 神戸ポートアイランド 12.1-4
6. 中西温子、岸川淳一、光岡薫、横山謙：クライオ電顕を用いた単粒子解析による V-ATPase 構造解析の試み BMB2015 於 神戸ポートアイランド 12.1-4
7. 井上勇木、岸川淳一、中西温子、船越勇機、今村博臣、西川健一、藤川誠、横山謙：麻酔効果と細胞内 ATP レベルの関連 BMB2015 於 神戸ポートアイランド 12.1-4
8. 馬場みほ里、岸川淳一、竹内奈央、中西温子、横山謙：V1 回転軸のアミノ酸配列と形状の必要性 第 41 回日本生体エネルギー研究会討論会 東京大学 12.21-23
9. 岸川淳一、中西温子、船越勇機、今村博臣、西村健一、藤川誠、横山謙：麻酔効果と細胞内 ATP レベルの関連 第 41 回日本生体エネルギー研究会討論会 東京大学 12.21-23

## 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 VoV1 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)

武田科学振興財団 特定研究助成 I

課題名：「細胞機能発現制御におけるオルガネラ恒常性とクロストークの重要性」共同研究者

研究代表者： 永田和宏 取得年度 H27-29 (3 年)

### 2) 知財権等 なし

- 3) 学外活動： 日本生物物理学会 分科会委員  
日本生体エネルギー研究会 常任幹事  
アメリカ生物物理学会  
日本生化学会  
日本分子生物学会  
日本タンパク質科学会

### 4) 受賞等 なし

### 5) その他 Faculty 1000 member Chemical Biology 部門

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

岸川研究助教は 2015 年度において以下の教育に関する業務を実施した。

- 必修科目である生命システム英語の指導教員の一人として英語教育に従事した。

- 必修科目である応用特別コンピューター演習の指導教員として、エクセルのマクロ作成等の比較的高度な内容を教えた。
- 生命システム実習 1 において実習補助業務に従事した。
- タンパク質科学において画像解析ソフトの使用法に関する演習指導を実施した。

以上の業務実施により、対面式に近いよりきめ細かい教育が可能になった。加えて、基礎特別研究、応用特別研究での実験指導により、4年生2名による学会発表が可能になった。

大学院生2名に対する実験指導、プレゼン指導にも関わり、その結果、学会発表3件、国際雑誌への投稿1件につながった。



# 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、9 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 年の秋セメスター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。卒業研究は、教員 1 名が、学生 3～5 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、坂本                            |
| 応用コンピュータ演習      | 1    | 金子、川邊                            |
| 生物学実験           | 1    | 木村、高橋（純）、本橋、桶川、坂本                |
| 生物数学            | 1    | 野村                               |
| 生物統計学           | 1    | 河邊                               |
| 生物学演習           | 1    | <u>奥山</u>                        |
| 化学演習            | 1    | <u>森本</u>                        |
| 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）                         |
| 科学英語 II         | 2    | 河邊、吉田（徹）                         |
| 化学実験            | 2    | 津下、 <u>老田</u> 、 <u>安井</u>        |
| 生命資源環境学実験・演習 I  | 2    | 金子、河邊、津下、寺地、野村、坂本、高橋（亮）、川邊、吉田（徹） |
| 植物生理学           | 2    | 本橋                               |
| 生体分子構造学         | 2    | 津下                               |
| 動物育種学           | 2    | 野村                               |
| 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                            |
| 生命資源環境学実験・演習 II | 3    | 木村、高橋（純）、本橋、山岸、桶川、川邊、坂本、高橋（亮）    |
| 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                               |
| 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    |

下線は非常勤講師

# 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

植物の体内と表面には、微生物が定着することが多い。通常、そのような微生物は、宿主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。定着可能な微生物は、これまでに多様な植物から分離されており、そのいくつかについては、宿主植物の生育促進、病害抵抗性や環境ストレス耐性を向上させることが報告されてきた。定着微生物がこのような特性を植物へ付与することは、農業生産にも有用であることから、多方面で研究が進められている。我々は、環境微生物、特に植物に関連した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。植物に定着する微生物の植物相互作用特性は、微生物系統と相関しないことも多く、近縁系統間でも様々であることから、要因が未解明の部分が多くある。また、環境ゲノム解析によると、培養未報告の微生物が、そのような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、植物と微生物が共存可能なしくみの解明を目標に研究を進める。

## 2. 本年度の研究成果

(1) *Bradyrhizobium* sp. DOA9 株は暖地型マメ科牧草 *Aeschynomene americana* から単離された根粒菌である。DOA9 株は広域宿主型の根粒形成を示し、その nod 遺伝子群は同じ科内の多くの株と分子系統的に遠い位置関係にある。ゲノム解読の結果は、DOA9 株のゲノムが、染色体と1つのプラスミドで構成されることを示していた。その染色体は *B. japonicum* USDA110 と似ており、プラスミドは BTAi1 株の pBBta01 と似ていた。プラスミドには、共生に関わる機能をもつ遺伝子が存在し、プラスミドの GC 含量が低い。これは、同族の共生アイランドの特徴と一致する。そのような DOA9 株ゲノム特徴は、根粒形成 *Bradyrhizobium* と光合成 *Bradyrhizobium* との中間的なものである。この特徴は DOA9 株が環境適応による進化の結果の果てに獲得したものと考えられる。

(2) TAC クローンは、有用な遺伝子工学ツールである。シロイヌナズナ染色体全体をカバーする高解像度の地図を、TAC ゲノムクローンをを使って構築した。TAC クローンライブラリは 10000 個以上のクローンからなり、そのうち 5937 が染色体にマップされた。これらのクローンは染色

体全体の 90%以上をカバーしている。さらに、*Arabidopsis* TAC Position Viewer (Java アプリケーション)を作成し、高解像度のマップ情報を表示するしくみを公開した。これらのリソースはポジショナルクローニング、変異体相補試験、形質転換の効率を高めるのに役立つ。

(3) マメ科植物の根粒菌との共生は、農業生産や窒素循環に重要である。この共生は通常の根粒菌との間で成立するが、幾つかの品種や系統では、特定の根粒菌に感染抑制を示し、正常な根粒を形成しない。ダイズの場合は、その制御に関わる因子が *Rj* 因子と呼ばれる。*Rj4* ダイズでは、根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 との共生が成立しない。*Rj4* 感染抑制システムを解明するため、USDA61 の原因遺伝子を同定した。その原因遺伝子の変異体は、*Rj4* ダイズに窒素固定能をもつ根粒を形成できるようになる。それらの変異体は6遺伝子に落ち、遺伝子はヒスチジンキナーゼ、転写因子、DNA 結合転写アクティベータ、ヘリクスターンヘリクス型転写因子、phage ショックタンパク質、システインプロテアーゼをコードしていた。システインプロテアーゼは *Xanthomonas campestris* の XopD エフェクタータンパク質と高い類似を示すことがわかった。

## 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) *Bradyrhizobium* sp. DOA9 is a bacterial strain isolated from the legume *Aeschynomene americana*. Strain DOA9 exhibits a broad host range, and more divergent nodulation genes compared with the other members of the *Bradyrhizobiaceae*. Genome analysis of DOA9 revealed that its genome comprised a single chromosome and a plasmid. The chromosome is extremely similar with that of *B.japonicum* USDA110, whereas the plasmid showed similarity with pBBta01 of strain BTAi1. The plasmid of DOA9 encodes genes related to symbiotic functions. The plasmid has also a lower GC content. These features suggest that the plasmid could be the origin of the symbiosis islands of other Bradyrhizobia. The DOA9 genome exhibited intermediate characteristics between general Bradyrhizobia and photosynthetic Bradyrhizobia, thus providing the evidence for the evolution of the *Bradyrhizobiaceae* during ecological adaptation.

(2) The *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) genomic transformation-competent artificial chromosome (TAC) clones have been valuable as the genetic tools. A high-resolution map extending over all *Arabidopsis* chromosomes was constructed with the genomic TAC clones. An *Arabidopsis* genomic TAC library consists with approximately 10,000 TAC clones harboring large genomic DNA fragments extending over the whole *Arabidopsis* genome. Mapped 5937 TAC clones are covering 90% of the *Arabidopsis* chromosomes. We present the large-scale data set of TAC clones with high-resolution mapping information as a Java application tool, the *Arabidopsis* TAC Position Viewer, which provides ready-to-go transformable genomic DNA clones corresponding to certain loci on *Arabidopsis* chromosomes. The TAC clone resources will accelerate genomic DNA cloning, positional walking, complementation of mutants and DNA transformation for heterologous gene expression.

(3) Symbioses between leguminous plants and rhizobia are of great importance to agricultural production and nitrogen cycling. While these mutualistic symbioses can involve a wide range of rhizobia, some legumes exhibit incompatibility with specific strains, resulting in ineffective nodulation. The formation of nodules in

soybean plants is controlled by several host genes, which are referred to as *Rj* genes. The soybean cultivar BARC2 carries the *Rj4* gene, which restricts nodulation by *Bradyrhizobium elkanii* USDA61. In order to clarify the mechanism for incompatibility in soybean varieties carrying the *Rj4* allele, the genetic loci in USDA61 were identified. The rhizobial mutants induce the development of nitrogen fixing nodules on the roots of *Rj4* soybean. Their responsible mutations were found inside six genes encoding putative histidine kinase, transcriptional regulator, DNA-binding transcriptional activator, helix-turn-helix-type transcriptional regulator, phage shock protein, and cysteine protease. The cysteine protease had a high degree of similarity with the type 3 effector protein XopD of *Xanthomonas campestris*.

#### 4. 論文, 著書など

- S.Okazaki, R.Noisangiam, T.Okubo, T.Kaneko, K.Oshima, M.Hattori, K.Teamtisong, P.Songwattana, P.Tittabutr, N.Boonkerd, K.Saeki, S.Sato, T.Uchiumi, K.Minamisawa, N.Teaumroong: Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid (2015) PLoS ONE, 2015. **10**, e0117392
- Y.Hirose, K.Suda, Y.-G.Liu, S.Sato, Y.Nakamura, K.Yokoyama, N.Yamamoto, S.Hanano, E.Takita, N.Sakurai, H.Suzuki, Y.Nakamura, T.Kaneko, K.Yano, S.Tabata, D.Shibata: The *Arabidopsis* TAC Position Viewer: A high-resolution map of transformation-competent artificial chromosome (TAC) clones aligned with the *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 genome. *Plant Journal*, 2015. **83**, 1114-1122
- O.M.Faruque, H.Miwa, M.Yasuda, Y.Fujii, T.Kaneko, S.Sato, S.Okazaki: Identification of *Bradyrhizobium elkanii* genes involved in incompatibility with soybean plants carrying the *Rj4* allele. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015. **81**, 6710-6717

#### 5. 学会発表など

- 南智之、按田瑞恵、大久保 卓、三井久幸、大坪嘉行、永田裕二、金子貴一、田畑哲之、津田雅孝、南澤究: 植物マイクロバイオームメタゲノム配列のマッピングによる *Methylobacterium* 属細菌集団の植物種依存性の解析. 第9回日本ゲノム微生物学会年会、神戸市、2015.3.6-8
- 日下部翔平、金子貴一、安田美智子、三輪大樹、岡崎伸、佐藤修正: *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株のエフェクターに対する反応のミヤコグサ系統間差の解析. 日本植物生理学会第56回年会、世田谷区、2015.3.16-18

辻村真衣、金子貴一、執行正義、出雲谷遥、寺地徹：雄性不稔  
タマネギのミトコンドリアゲノムの解読．日本育種学会 第128回  
講演会、新潟市、2015.9.11-12

日下部翔平、金子貴一、安田美智子、三輪大樹、岡崎伸、佐藤  
修正：ミヤコグサを用いた*Bradyrhizobium elkanii* USDA61株と  
の相互作用に関与する宿主側因子の解析．植物微生物研究  
会 第25回研究交流会、つくば市、2015.9.14-16

三輪大樹、Faruque Omar、増田幸子、安田美智子、金子貴一、  
佐藤修正、岡崎伸：根粒菌3型分泌系による根粒形成の制御  
機構．植物微生物研究会 第25回研究交流会、つくば市、  
2015.9.14-16

Faruque Omar、三輪大樹、安田美智子、増田幸子、藤井義晴、  
金子貴一、佐藤修正、岡崎伸：*Rj4*遺伝子型ダイズに根粒形成  
する*Bradyrhizobium elkanii* トランスポゾン変異体の解析．植  
物微生物研究会 第25回研究交流会、つくば市、2015.9.14-16

## 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.

研究助教 川辺隆大

Res. Assoc. KAWANABE, Takahiro.



### 1. 研究概要

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

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

本研究分野では具体的に次の3点について研究を進めている。

#### 1) 動原体領域の進化機構

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

いるのか、動原体配列の違いが実際に染色体の分離に影響を与えるのかを解析している。

#### 2) 転移因子の進化パターンの解析

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

#### 3) エピジェネティックな制御機構の進化に与える影響の解明

エピジェネティックな制御機構により遺伝子発現やクロマチン構造の変化が起こることが知られている。エピジェネティックな制御は配列の違いによらず表現形に差異をもたらすことが可能であるが、クロマチン構造の変化により進化パターンに影響を与えられる。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

本年度は転移因子の解析に関して、シロイヌナズナで転移活性が確認された T I R (Terminal Inverted Repeat)のない M U L E である V A N D A L ファミリーの転移機構の解明をおこなった。V A N D A L ファミリーは自身のメチル化レベルを低下させることにより再活性化することが明らかになった。この再活性化は配列特異的に起こっていることが示唆され、その制御機構の解明をめざしている。

またアブラナ属において、インプリンティング遺伝子の網羅的な同定をおこなった。インプリンティング遺伝子の候補が他の種と比較して数倍多いことが明らかになりゲノム重複との関連が示唆され、遺伝子重複とインプリンテ

イングの関係に関して解析を進めている。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。現在、この制御を起こす原因について解析を進めている。

シロイヌナズナの近縁種には重金属に耐性を示し、植物体内に蓄積する性質をもつものがみられる。シロイヌナズナの最も近縁な種の一つであるハクサンハタザオは亜鉛やカドミウムを蓄積することが知られている。タチスズシロソウ(図1)はハクサンハタザオと *A. lyrata* を両親種とする複二倍体である。タチスズシロソウの重金属に対する特性を野外と実験室内で調査し、ハクサンハタザオと同じく重金属蓄積能・耐性を持っていることを確認した。



図1 滋賀県彦根市に自生のタチスズシロソウ

### 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 determined imprinted gene candidate in *Brassica rapa* and found that the number of imprinted gene is much larger than that in other species. We compare conservation and variation of the imprinted gene repertoire and possible causes of differences among species.

#### 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

Kosugi A, Tamaru J, Gotou K, Furihata H, Shimizu A, Kawabe A, Harada E. Metal accumulation by *Arabidopsis halleri* subsp. *gemmifera* at a limestone mining site. *Aust. J. Botany* **63**: 134-140.

Furihata HY, Suenaga K, Kawanabe T, Yoshida T, Kawabe A. Gene duplication, silencing and expression alteration govern the molecular evolution of PRC2 genes in plants. *Genes and Genetic Systems*, accepted

Kosugi A, Nishizawa C, Kawabe A, Harada E. Zinc accumulation and vegetation ecology in the allotetraploid, *Arabidopsis kamchatica* ssp. *kawasakiana*. *Plant Biotechnology*, in printing

小杉亜希・高倉耕一・野間直彦・河邊昭・原田英美子「絶滅危惧種タチスズシロソウ(*Arabidopsis kamchatica* ssp. *kawasakiana*) 個体群の個体数推定」*地域自然史と保全* 印刷中

## 5. 学会発表など

Aki Kosugi, Chiaki Nishizawa, Akira Kawabe, Emiko Harada, Heavy metal accumulation and vegetation ecology in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica* subsp. *kawasakiana*, The Vth International Symposium on Metallomics, Beijing, China, September 9-12, 2015

河邊昭, 野生植物集団の遺伝的多様度と変異の維持機構、日本遺伝学会第 87 回大会、仙台、2015 年 9 月 24 日

薄伊納、吉田貴徳、河邊昭、*Brassica rapa* におけるゲノムインプリンティング候補遺伝子の探索、日本遺伝学会第 87 回大会、仙台、2015 年 9 月 25 日

河邊昭、降旗初佳、吉田貴徳、シロイヌナズナ属における葉緑体の RNA エディティングの種間変異、日本遺伝学会第 87 回大会、仙台、2015 年 9 月 26 日

## 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換の分子機構

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 B

課題名:核ゲノムに見られるオルガネラ由来配列を指標とした RNA 非依存的なメチル化機構の解明

研究代表者:河邊昭, 取得年度:H27年(1年)

### 2) 学外活動

Genetica:編集委員

### 3) 受賞等

Best paper award “Aki Kosugi, Chiaki Nishizawa, Akira Kawabe, Emiko Harada, Heavy metal accumulation and vegetation ecology in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica* subsp. *kawasakiana*, The Vth International Symposium on Metallomics, Beijing, China, September 9-12, 2015”

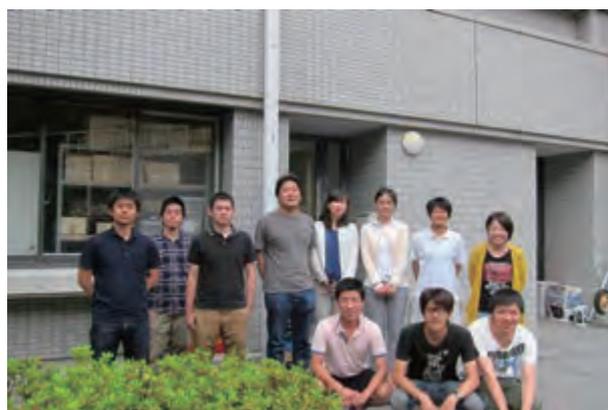
河邊昭 日本遺伝学会奨励賞受賞

### 4) その他 なし

## 7. 総合生命科学部教育研究活性化支援制度の教育効果

研究助教として川辺隆大が赴任し、研究教育にあたっている。研究助教の配置により学部学生や大学院生の実験や解析に関して教員の目が届かない部分をサポートすることが可能にな

っている。また実験手順の指示や研究結果の確認をより頻繁におこなうことが可能になり、研究の進展や方針の決定などが円滑におこなえている。実習・演習においても TA と嘱託職員に加えて研究助教が加わることで多くの学生によりの確な指示・指導をおこなうことが可能になっている。特に専門がより近い内容の実験において担当教員以外に深い知識を持っている研究助教の存在は受講生にとっていい効果を上げていると考えられる。



研究室集合写真 (2015年6月)

# 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.

助教 坂本 智昭

Assist. Prof. Tomoaki Sakamoto, 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ている。本研究では、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。特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、この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、*R. aquatica* のゲノム解析を開始した。*R. aquatica* には、表現型可塑性の程度が著しく異なる2つの地域系統(A株およびJ株)が存在する。そこで、A株およびJ株のゲノム配列を、イルミナ社の次世代シーケンサーであるMiSeqおよびNextSeq500で解析した。また、1分子リアルタイムDNAシーケンサーであるPac-bioでも解析中である。これまで得られたデータでK-mer頻度解析をおこなったところ、ゲノムサイズは460Mbase程度で、二倍体であると推定された。*R. aquatica* は、自然環境では種子を作らず、栄養繁殖により繁殖している。これまで、種子を作らない理由は三倍体だからではないかと推察されていたが、本研究により否定することができた。花粉は作られているので、種子ができないのはおそらく自家不和合性によるものと考えられる。今後、ゲノム配列が明らかとなれば、これまでに行ってきたトランスクリプトーム解析の結果と合わせて、葉の形態の表現型可塑性を明らかにしていきたい。

### (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。

ダイコンの切葉と板葉の品種を用いた遺伝学的解析を行ったところ、 $F_1$ 世代は全てが切葉となり、 $F_2$ 世代は切葉と

板葉がおよそ3:1に分離した。このことから、ダイコンの切葉と板葉の違いは、切葉が優性の1遺伝子座により制御されていると考えられた。そこで、RAD-seq解析によりマーカーを作成し、マッピングしたところ、6番染色体の短腕に座乗していることが明らかとなった。

ミズナとミズナは葉の形が異なるだけでなく、トライコーム(毛)が葉に生えるか生えないかに差がある。葉のトライコームの量についてQTL解析を行ったところ、9番染色体に座乗するGLABRA1(GL1)のホモログと連鎖していた。GL1は、トライコームの形成に必要な転写因子であるが、ミズナではこの遺伝子の転写量がミズナより多く、そのためにミズナのトライコームの量が多いと考えられた。現在、ミズナとミズナの葉の形態の違いについても、RAD-seqによるQTL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*の葉片からの再生は、葉片の基部側に近い断面からのみおこることから、葉の先端から基部側へのオーキシン極性輸送が栄養分体の形成に重要であると考えられた。そこで、オーキシンやその合成阻害剤などを添加する実験をおこなったところ、オーキシンが栄養分体の形成に必要なことや、オーキシンの極性輸送の存在が不定根の発生に重要であることを明らかにすることができた。現在、経時的なトランスクリプトーム解析により、再生に関わる遺伝子を単離することを目指して、実験を進めている。

### (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。SOG1に5箇所存在するSQ配列でのリン酸化が増えるにつれ、DNA修復因子の転写誘導や、細胞死誘導の効率が上昇すること、またSQ<sub>372</sub>のリン酸化は細胞周期の停止に重要であることを明らかにした。

## 3. Research projects and annual reports

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

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

Plant can alter their development, physiology and life history depending on environmental conditions, which 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 (Fig. 1). We investigate the mechanism of the heterophylly of lake cress. To understand the mechanism of heterophylly, we have started whole-genome sequencing analysis of *R. aquatica*, using illumine and PacBio platforms. We estimated the genome size of *R. aquatica* is around 460MB by K-mer analysis.

### (2) The evolutionary-developmental study on leaf shape

Cultivated vegetables show remarkable variation in leaf morphology and we are interested in genetic basis of this leaf shape variation. Most of varieties of Japanese Daikon radish (*Raphanus sativus*) have deeply dissected compound leaves, while some of the varieties have simple leaves with entire margin (Fig. 2). We have developed molecular markers by RAD-seq analysis and performed map-based cloning for the leaf shape variation. The results suggested that the leaf shape variation is controlled by one gene which is located on chromosome 6. We also performed QTL analysis of Japanese traditional leafy vegetable cultivars Mizuna and Mibuna (*Brassicca rapa* var. *nipposinica*) and revealed that the *GLABLA1* ortholog on chromosome 9 controls trichome number.

### (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. We investigated the relationship between phytohormone and plantlet formation and found that polar auxin transport has some important role in the process.

### (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 found that the transcriptional response of DNA repair genes and the programmed cell death is activated along with increased phosphorylation site of SQ in SOG1. We also showed that the phosphorylation of SQ<sub>372</sub> is required to arrest cell cycle. These results suggest that the site of phosphorylation in SOG1 determines the pathway of DNA damage response.

#### 4. 論文, 著書など

木村成介, 川勝弥一: 水菜と壬生菜の来歴について - 文献と遺伝子から探る葉形変化の歴史 - 京都産業大学論集人文科学系列, in press

Hokuto Nakayama and Seisuke Kimura: Leaves may function as temperature sensors in the heterophylly of *Rorippa aquatica* (Brassicaceae). *Plant Signaling and Behavior* **10**: e1091909 (2015)

Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Yurika Morohoshi, Yaichi Kawakatsu, Ali Ferjani, and Seisuke Kimura: A Decrease in ambient temperature induces post-mitotic enlargement of palisade cells in North American Lake-Cress. *PLOS ONE* **10**: e0141247 (2015)

Hokuto Nakayama, Kensuke Kawade, Hirokazu Tsukaya, and Seisuke Kimura: Detection of the cell proliferation zone in leaves by using EdU. *Bio-protocol* **5**: e1600 (2015)

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* **167**: 424-442 (2015)

Asuka Higo, Masaki Niwa, Katsuyuki Yamato, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Makoto Shirakawa, Motomu Endo, Shuji Shigenobu, Katsushi Yamaguchi, Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi and Takashi Araki: Transcriptional Framework of Male Gametogenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* **57**:325-338, (in press)

Daisuke Ikeue, Christian Schudoma, Wenna Zhang, Yoshiyuki Ogata, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Takeshi Furuhashi, Friedrich Kragler and Koh Aoki: A bioinformatics approach to distinguish plant parasite and host transcriptomes in interface tissue by classifying RNA-Seq reads. *Plant Methods* **11**:34,(2015)

Mitsutomo Abe, Hidetaka Kaya, Ayako Watanabe-Taneda, Mio Shibuta, Ayako Yamaguchi, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Israel Ausin, Takashi Araki and Carlos Alonso-Blanco: FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of *FLOWERING LOCUS T* and *FLOWERING LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1*. *Plant J* **83**:1059-1068,(2015)

Kim L Johnson, Sascha Ramm, Christian Kappel, Sally Ward, Leyser Leyser, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Michael

W Bevan and Michael Lenhard: The *Tinkerbell* (*Tink*) Mutation Identifies the Dual-Specificity MAPK Phosphatase INDOLE-3-BUTYRIC ACID-RESPONSE5 (IBR5) as a Novel Regulator of Organ Size in Arabidopsis. *PLoS One* **10**:e0131103,(2015)

Kaoru Kawafune, Yuichi Hongoh, Takashi Hamaji, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Shunsuke Hirooka, Shin-ya Miyagishima and Hisayoshi Nozaki: Two Different Rickettsial Bacteria Invading *Volvox carteri*. *PLoS One* **10**:e0116192,(2015)

Shojiro Tamaki, Hiroyuki Tsuji, Ayana Matsumoto, Akio Fujita, Zenpei Shimatani, Rie Terada, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata and Ko Shimamoto: FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **24**:112(8):E901-10, (2015)

#### 5. 学会発表など

京野菜であるミズナとミブナの葉形変異と育種の歴史の解析, 川勝弥一、農学中手の会、小田原、2015. 12. 12. (招待講演)

アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* にみられる葉断面からの栄養繁殖機構の解析, 天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、Ali Ferjani、木村成介、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートピアアイランド、2015. 12. 1-4

環境に応じて葉の形態を変化させる植物 *Rorippa aquatica* を用いた表現型可塑性の研究、中山北斗、坂本智昭、市橋泰範、藤江学、倉田哲也、木村成介、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートピアアイランド、2015. 12. 1-4.

環境に応じて葉の形態を変化させる植物 *Rorippa aquatica* を用いた表現型可塑性の研究、木村成介、第 59 回細胞のかたちと機能プロジェクト研究センターセミナー、広島大学、2015. 10. 19. (招待講演)

植物における DNA 損傷応答の統括因子 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 87 回大会、東北大学川内北キャンパス、2015. 9. 24-26.

Impact on Environment on Leaf Development: Studies on Heterophylly of *Rorippa aquatica*, Seisuke Kimura, IHB seminar, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan, China, 2015. 9. 17. (招待講演)

Diversity of leaf shape and its relation to environment, Seisuke Kimura, Institute of Hydrobiology, Chinese

Academy of Science, Wuhan, China, 2015.9.15. (招待講演)

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、五十嵐香理、中山北斗、八杉公基、工藤洋、永野敦、矢野健太郎、久保中央、木村 成介、日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ (新潟県)、2015.9.6-8.

水生シダ *Microsorium pteropus* とその変種の葉の形態に関わる枝分かれ構造の多様性について、三好彩央里、中益朗子、木村 成介、日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ (新潟県)、2015.9.6-8.

*Rorippa aquatica* の葉形制御機構の RNA-seq による網羅的解析、坂本智昭、中山北斗、市橋泰範、藤江学、倉田哲也、木村成介、日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ (新潟県)、2015.9.6-8.

アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* にみられる葉断面からの栄養繁殖の発生的解析、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、Ferjani Ali、木村成介、日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ (新潟県)、2015.9.6-8.

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、五十嵐香理、矢野健太郎、木村 成介、日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ (新潟県)、2015.9.6-8.

Theoretical analysis of asymmetric branched structures in dissected leaves, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J. Suematsu, Seisuke Kimura, 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba International Congress Center, 2015.6.2-5  
葉の枝分かれに見られる非対称性について、中益朗子、末松 J 信彦、木村成介、第 79 回形の科学シンポジウム、千葉工業大学、2015.6.12-14.

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、五十嵐香理、中山北斗、八杉公基、工藤洋、永野敦、矢野健太郎、久保中央、木村成介、日本育種学会第 127 回講演会 (平成 27 年度春季大会)、玉川大学、2015.3.21-22.

Developmental and molecular studies on the mechanism of vegetative propagation in *Rorippa aquatica*, Rumi

Amano, Hokuto Nakayama, Shizuka Gunji, Ali Ferjani, Seisuke Kimura, 第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015.3.16-18.

QTL analysis of leaf morphological traits in Japanese traditional leafy vegetables, Mizuna and Mibuna, Yaichi Kawakatsu, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Atsushi J. Nagano, Kentaro Yano, Nakao Kubo, Seisuke Kimura, 第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015.3.16-18.

Genetic analysis for natural variation in leaf shape of Daikon radish (*Raphanus sativus* var. longipinnatus), Toshiaki Kubo, Kaori Kaminoyama, Yaichi Kawakatsu, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Kentaro Yano, Seisuke Kimura, 第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015.3.16-18.

Molecular mechanism of SOG1 activation in response to DNA damage, Kaoru Yoshiyama (Okamoto), Seisuke Kimura, 第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015.3.16-18.

QTL analysis of leaf morphological traits in Japanese traditional leafy vegetables, Mizuna and Mibuna, Yaichi Kawakatsu, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Atsushi J. Nagano, Kentaro Yano, Nakao Kubo, Seisuke Kimura, The 35<sup>th</sup> Plant Biotechnology Symposium “International Plant Meeting in Kyoto - Messages from young scientists II-“, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 2015.1.16.

## 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

課題名:植物における生態進化発生学研究拠点の形成  
-統合オミックス解析による展開-

研究代表者: 木村成介、取得年度:H27-31年(5年)

科学研究費助成事業(挑戦的萌芽研究)

課題名:組換え実験で葉緑体に生じたミニサークルの複製  
機構の解明とベクターの開発

研究分担者: 木村成介、取得年度:H27-31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)

2)受賞等

特になし

3)その他

特になし



集合写真

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

教育研究活性化支援制度により配属されている研究助教の坂本博士は、1年生対象の生物学実験、基礎コンピューター演習、3年生対象の生命資源環境学実験・演習IIを担当した。演習や実験では一人一人の学生への対応が必要であり、また、実験科目は危険をともなう作業も多いので、研究助教のサポートが学生の教育に役に立った。

また、研究助教の坂本博士はバイオインフォマティクスが専門であり、特に次世代シーケンス解析についてはウエットからドライの解析まで一貫して高い技術を持っている。坂本博士は、その高い技術をもとに大学院生の研究指導だけでなく、基礎特別研究や応用特別研究の指導にもあたっており、学生教育に直接貢献している。

# 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におけるマイクロサテライト DNA ツールキット

ミツバチ科マルハナバチに属するエゾオオマルハナバチ *Bombus hypocrita sapporensis* は、特定外来種であるセイヨウオオマルハナバチの代替花粉交配用昆虫として注目されている。今回我々は、本種の農業利用を進めるための遺伝育種学的解析に必要なマイクロサテライト DNA マーカーの適用性を検討した。120 種類のマーカーのうち、57 種類が多型解析に利用できることがわかった。さらに 8 種類のプライマーは、マルチプレックス PCR による同時解析が可能であることを明らかにした。これらのツールキットを利用して女王蜂の受精嚢内から単離した精子 DNA の解析を行ったところ、交配雄蜂の遺伝子型を特定できることがわかった。

### ハチ類の系統維持のための交配様式の比較

ハチ類では、女王と働き蜂の両方において種々の形質に近交弱勢が生じる。また、近親交配による性決定遺伝子座のホモ接合化は繁殖能力を持たない 2 倍体の雄を生じ、巣の生産性が著しく低下する。ハチ類の系統維持において、このような近親交配の有害な影響を軽減するための交配として 4 つの交配様式を取り上げ、それらの下での近交係数と集団の有効な大きさを比較した。数値計算の結果から、巣内選抜とグループ交配を組み合わせ合わせた様式が、実用的観点から望ましいと考えられた。

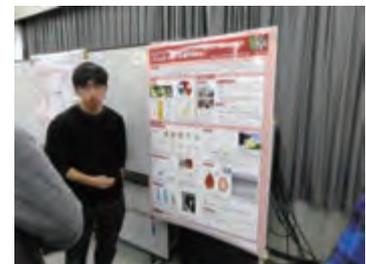
### 日本国産蜂蜜による好中球の走化活性に及ぼす影響

蜂蜜は蜜蜂により産生される天然成分で、食用としてだけでなく、健康維持や創傷、風邪、皮膚炎の治療薬として世界で広く利用されている。我々は、これまでにナ

イジェリア産の蜂蜜が免疫作用を示すことや、日本国産蜂蜜のマウス腹腔内投与により、細菌感染に重要な役割を果たしている自然免疫系の免疫細胞の 1 つである好中球が誘導されることを報告してきた。そこで今回、日本国産蜂蜜による好中球の走化活性の指標である方向性(Direction)と 移動速度(Velocity)に及ぼす影響について、ソバ、クリ、シロハナマメ、ミカン、トチ、フカ、レンゲ、アカシア、百花蜂蜜を用いて検討した。Direction は、蜂蜜 10 mg/ml の濃度で、ソバ、シロハナマメ、レンゲ蜂蜜で有意な増強、Velocity は、ソバ、アカシア、レンゲ蜂蜜で有意な増強が認められ、日本国産蜂蜜は好中球の走化活性を増強することが認められた。特に、レンゲ蜂蜜では反応 30 分後において、多くの好中球の遊走が確認された。以上より、日本国産蜂蜜は好中球の運動性(走化性)を促進することから、細菌感染においてすばやく感染部位に好中球を誘導し、感染予防に効果があることが示唆された。

### セイヨウミツバチの系統間における訪花行動の相違がイチゴ品質に及ぼす影響について(上田康徳 4 年次生)

日本ではハウス栽培用イチゴの 95%以上が、セイヨウミツバチ *Apis mellifera* による授粉によって生産されている。セイヨウミツバチは、アフリカ

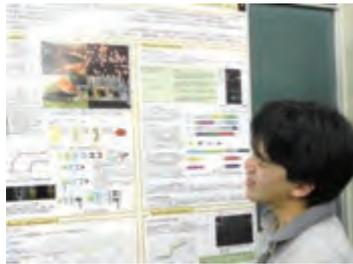


から欧州にかけて約 30 亜種が自然分布しており、このうち国内には 2 亜種が輸入されている。これまでイチゴの授粉に利用されているミツバチは、イタリア原産亜種の *A. mellifera ligstica*(通称イタリアン)である。もう 1 種は、東欧(アルプス南側)原産の *A. mellifera carnica*(通称カーニオラン)が試験的に輸入されているが、イチゴの授粉には利用されていない。カーニオランは、原産地の寒冷的な気候に適応しているためイタリアンよりも低温耐性に優れていることが知られている。そのためハウスイチゴの開花期である冬期の低温時や寒冷地での授粉用にカーニオランを導入することで生産性を改善できる可能性がある。そこで訪花活動をビデオカメラおよび目視によって観察調査し、生産されたイチゴの果実品質について評価す

ることで、2 亜種間の比較を行った。調査の結果、低温下の場合において、カーニオランはイタリアンに比べて訪花活動性が有意に高いことがわかった。花上滞在時間は、イタリアンの方が有意に高かったが、授粉率に有意差は見られなかったため、カーニオランの方が効率的であると思われる。イチゴの糖度は、イタリアン授粉は 9.9%、カーニオラン授粉は 10.3%となり、カーニオラン授粉の方が高い結果となった。さらに、それぞれのミツバチで授粉されたイチゴの嗜好試験を行ったところ、カーニオラン授粉の方が美味しいと回答した被験者の割合は有意に高い結果となった。これらの結果から、イチゴのハウス栽培において、冬期や寒冷地では、イタリアンよりもカーニオランを導入する方が、授粉効率が高くなることがわかった。さらにポリネーターの種類によって、果実の品質が向上する可能性を今回の試験で初めて示唆する結果を得ることができた。

#### LAMP 法によるセイウミツバチに感染するアメリカフソ病菌の迅速・高感度検出法の開発(西田誠 4 年次生)

フソ病は、セイウミツバチ (*Apis mellifera*) の幼虫に感染する深刻な病気の 1 つで、家畜伝染病予防法により家畜伝染病(法定伝染病)に定められ

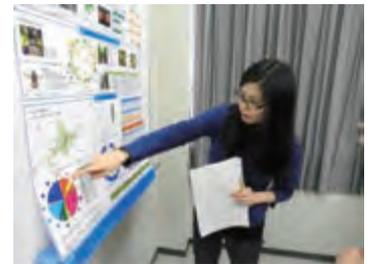


ている。フソ病は、*Paenibacillus larvae* が原因となるアメリカフソ病と、*Melissococcus plutonius* が原因となるヨーロッパフソ病の 2 種類が存在する。*P. larvae* は、芽胞を形成するグラム陽性の桿菌で *Paenibacillus* 属に分類されている。感染経路は、芽胞が付着した働き蜂が、幼虫に給餌をするときに摂食によって幼虫体内に侵入する。*P. larvae* は、幼虫の中腸から細胞内に侵入するときに蛋白分解酵素を分泌するため重感染幼虫は死亡する。また、*P. larvae* は、感染力が非常に高く、巣内で複数の個体が発症すると感染が全体に広がり防除する方法がない。そのためフソ病の防除は、感染が広がる前に検出し、隔離する必要があるが、現在フソ病検査は、PCR 法やミルクテストが用いられているが、判定まで時間がかかることや初期感染の検出感度が問題となっている。LAMP 法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)は、栄研化学社(株)により開発された鎖置換反応を利用した遺伝子増幅法である。反応時間は、60°C 付近の一定温度で、4 種類のプライマーを用いれば 40 分から 60 分で、さらに別に 2 種類のプライマーを加えることで 15

分から 30 分の短時間で結果を得ることができる。今回この LAMP 法を用いて、*P. larvae* に存在する遺伝子の胞子形成にかかわる stage V sporulation protein R(spoVR)遺伝子にプライマーを設計し、*P. larvae* を特異的に迅速・高感度で検出することに成功した。この結果は、ミツバチにおけるフソ病検査において、迅速・高感度で正確性の高い病性鑑定が可能となり、養蜂産業におけるミツバチの病気予防に貢献することが期待できる。

#### エゾオオマルハナバチにおけるトマト授粉試験と遺伝構造の解析(西本愛 4 年次生)

マルハナバチは、花粉媒介能力が高く、花蜜を分泌しないナス科植物の授粉用昆虫として利用されている。日本では、欧州原産のセイウオオマルハ



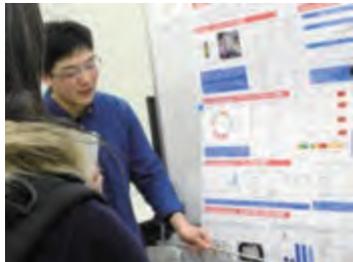
ナバチ *Bombus terrestris* が、トマトハウスの授粉に利用されているが、ハウスから逃げ出した女王蜂が帰化し、一部地域では優占種となり在来種との競争や帰化植物の繁殖を促進するため生態系への影響が問題となっている。そのため本種は特定外来生物に指定され、使用制限措置がとられており、北海道ではトマト農家の新規参入が実質的に不可能であることや、既存農家による新規ハウスを増設することができないことが、農業上の大きな問題となっている。そこで、セイウオオマルハナバチに代わる代替種に、在来種のエゾオオマルハナバチ *Bombus hypocrita sapporensis* を候補種として、トマトハウスでの授粉試験および DNA 育種を目的とした遺伝学的解析を進めている。トマトハウスでの各種授粉試験の結果、野生のエゾオオマルハナバチは、既存のセイウオオマルハナバチと同等の授粉能力を持っていることが分かった。また、ミトコンドリア DNA のシーケンス解析および RAD-seq 解析による集団遺伝構造の解析を行ったところ、集団内の遺伝的多様度は高いが、集団間の分化程度は低いことが示された。この結果から、野生集団は、被遺伝子汚染リスクの低い種であることがわかった。さらに、DNA 育種を行うため遺伝子地図の作成を目的に NGS による核ゲノムおよびミトコンドリア DNA 上のマイクロサテライト DNA マーカーと SNP マーカーの設計を行った。今後、これらの遺伝マーカーにより、優良形質に関連する遺伝子地図の作成、DNA 育種による高授粉能力系統への改良、改良系統によるトマトハウスでの生産性試験を進める予定である。

### ニホンミツバチ *Apis cerana japonica* の全ゲノム解析 (若宮健 4 年次生)

ミツバチは、ワーカーと呼ばれる多数の労働個体と生殖に特化した 1 匹の女王によって構成される社会性昆虫の 1 種である。これら社会性昆虫における社会性の進化および維持には、単独生活をしている動物にはない集団を制御するための分子メカニズムが存在することが予想される。近年、ゲノム解析技術の発展により、非モデル生物でも全遺伝情報を対象としたアプローチが可能となってきた。本研究では、日本在来種であるニホンミツバチ(*Apis cerana japonica*)において社会性に関する遺伝子基盤の探索を目的に、次世代シーケンズデータとバイオインフォマティクスを組み合わせた全ゲノムの解析を行った。解析の結果、ミトコンドリア全ゲノムは、13 個のタンパク質コード遺伝子、22 個の tRNA 遺伝子、2 個の rRNA 遺伝子および AT-rich region から構成される 15,917bp の全長配列からなり、ゲノム構造はミツバチ属内で良く保存されていることがわかった。核ゲノムの解析では、de novo アッセンブルを行い、ドラフトゲノム配列(コンティグ数:約 26 万 6 千本、総塩基数:約 2 億 2 千 5 百万 bp)の構築に成功した。構築した配列を対象に遺伝子領域予測プログラムを使用した結果、約 1 万 9 千個の遺伝子候補を推定することができた。その中から社会性の維持に関連していると思われる複数の遺伝子を見つけることができた。これらの遺伝子は、他種の先行研究により繁殖や労働分化時に遺伝子発現が変動することなどが報告されていることから、ニホンミツバチでも社会性の維持に重要な機能を持つことが予測される。さらに NGS データからは、1,000 個以上のマイクロサテライト DNA マーカーを作成することができた。今後、全ゲノムデータおよび開発した遺伝マーカーを利用し、遺伝子地図の作成や RNA-seq などの解析を組み合わせ、ニホンミツバチの社会性に関する新規遺伝子の探索と社会性の分子基盤の解明を行う予定である。

### 3. Research projects and annual reports

*Analysis the nest of asian hornet, Vespa velutina , found for the first time in Tsushima Island, Japan*



The Asian hornet, *Vespa velutina* was accidentally introduced into Korea and Europe, probably via an imports from China and cause many problems in the invaded area. This species was unconfirmed in Japan, however, some workers reported in Tsushima Island in 2012. And many mature nests were found in 2013. We collected the nest found for the first time in Tsushima Island and analyzed.

### *The complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee, Apis cerana japonica (Insecta: Hymenoptera: Apidae)*

In this study, we analyzed the complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee *Apis cerana japonica*. The mitochondrial genome of *A. c. japonica* is a circular molecule of 15 917 bp and is similar to that of *A. c. cerana*. It contains 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, two rRNA genes and one AT-rich control region. All protein-coding genes are initiated by ATT and ATG codons and are terminated by the typical stop codon TAA or TAG, except for the start codon of ATP8 which ends with C. All tRNA genes typically form a cloverleaf secondary structure, except for tRNA-Ser (AGN).

### *Complete mitochondrial genome of the Japanese bumblebee, Bombus hypocrita sapporensis (Insecta: Hymenoptera: Apidae)*

In the present study, we describe the complete mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus hypocrita sapporensis* from the Rebun Island, in Hokkaido, Japan. The mitochondrial genome of *B. hypocrita sapporensis* includes a circular molecule of 15 700 bp. It contains 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, two rDNA genes and an AT-rich control region. All protein-coding genes are initiated by ATA, ATG, and ATT codons and are terminated by the typical stop codon TAA or T, except for ND4L, which ends with TA. All tRNA genes typically form a cloverleaf secondary structure.

### *Genetic differentiation in the endangered myrmecophilous butterfly Niphanda fusca: a comparison of natural and secondary habitats*

*Niphanda fusca* is an endangered myrmecophilous butterfly inhabiting environments at early stages of succession. Most of its habitats are places where

succession is prevented by human activity. In some places, however, *N. fusca* lives in natural semi-bare areas, such as cliffs in mountains or grasslands around volcanos. We investigate the genetic structure of *N. fusca* in Japan and South Korea to address two questions. (1) Are populations in natural environments genetically different from those in secondary environments? and (2) Do populations in natural environments possess greater genetic diversity than those in secondary environments? The AMOVA results indicated that the populations in natural environments and those in secondary environments were differentiated to some extent; however, more than 80 % of genetic variation was found to occur within the same habitat type and within each population. We found no differences in genetic diversity between populations in the two environments. At present, we have not found a strong reason to consider populations in the two environments as different evolutionarily significant units. We think it is practical to conserve populations in natural environments at first, because in this case we need not manage habitats to protect *N. fusca*. We have only to inhibit habitat destruction. In contrast, in order to conserve populations in secondary environments, we would have to continue managing the habitats. This is far more difficult than inhibiting habitat destruction.

#### 4. 論文, 著書など

1. [Takahashi J](#), [Nishimoto M\(B4\)](#), [Wakamiya K\(B4\)](#), Takahashi M, Kiyoshi T, Tsuchida K, Nomura T. Complete mitochondrial genome of the Japanese bumblebee, *Bombus hypocrita sapporensis* (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *MITOCHONDRIAL DNA: RESOURCES* in press. DOI: [//dx.doi.org/10.1080/23802359.2016.1155423](https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1155423)
  2. [Takahashi J](#), [Wakamiya T\(B4\)](#), Kiyoshi T, Uchiyama H, Yajima S, Kimura K, Nomura T. The complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *MITOCHONDRIAL DNA: RESOURCES* in press. DOI [//dx.doi.org/10.1080/23802359.2016.1144108](https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1144108)
  3. Takeuchi T, [Takahashi J](#), Kiyoshi T, Nomura T, Tsubaki Y. Genetic differentiation in the endangered myrmecophilous butterfly *Niphanda fusca*: a comparison of natural and secondary habitats. *Conservation Genetics* 2015. 16:979-986.
  4. [高橋純一](#), [野村哲郎](#) ミツバチ・マルハナバチの育種. *昆虫と自然*. 2015. 50:42-45.
  5. [高橋純一](#) 対馬で猛威を振るうツマアカスズメバチの生態. *現代農業*. 2015. 12:222-225.
  6. [高橋稜一](#), 境良朗, 山村辰美, 清拓哉, [高橋純一](#) 対馬で初めて採集された外来種ツマアカスズメバチ(*Vespa velutina*)の成熟巣. *長崎県生物学会誌*. 2015.76:49-56.
  7. [野村哲郎](#), [高橋純一](#), 竹内剛 ハチ類の系統維持のための交配様式の比較. *京都産業大学先端科学技術研究所報*. 2015. 14:1-6.
  8. [高橋純一](#), [野村哲郎](#) エゾオオマルハナバチにおけるマイクロサテライトDNAツールキット. *京都産業大学先端科学技術研究所報*. 2015. 14:1-10.
  9. 田中美子, 高崎摩衣子, [高橋純一](#), 竹内実 日本国産蜂蜜による好中球の走化活性に及ぼす影響. *京都産業大学先端科学技術研究所報*. 2014. 14:1-12.
  10. [高橋純一](#) クロマルハナバチの使い方-トマトハウスでの花粉公開(ポリネーション)用クロマルハナバチ管理マニュアル-. 八代養蜂等振興推進協議会. 2016年3月. pp8.
  11. [高橋純一](#) PLA巣脾-環境保全型養蜂の実現に向けた生物分解性プラスチック資材-. (社)養蜂産業振興会. 2016年3月. pp4.
5. 学会発表など
1. [高橋稜一\(M1\)](#), 境良朗, 清拓哉, [高橋純一](#). 特定外来生物ツマアカスズメバチの在来昆虫類への影響について. 第76回日本昆虫学会・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会. 大阪市. 2016.3.26-29.
  2. [西本愛\(B4\)](#), [高橋萌](#), 土田浩治, 清拓哉, 竹内剛, [野村哲郎](#), [高橋純一](#) エゾオオマルハナバチにおける地域集団の遺伝構造について. 第76回日本昆虫学会・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会. 大阪市. 2016.3.26-29.
  3. [高橋萌](#), [西本愛\(B4\)](#), 清拓哉, [高橋純一](#), [野村哲郎](#), 土田浩治 エゾオオマルハナバチの北海道集団の集団構造に関する研究. 第76回日本昆虫学会・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会. 大阪市. 2016.3.26-29.
  4. [若宮健\(B4\)](#), [吉岡優奈\(B3\)](#), 清拓哉, 内山博充, 矢島俊介, 門脇辰彦, 木村澄, [高橋純一](#) アジアに分布するトウヨウミツバチの遺伝的多様性と系統地理学的解析. 第76回日本昆虫学会・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会. 大阪市. 2016.3.26-29.
  5. [高橋稜一\(M1\)](#), 境良朗, 山村辰美, [高橋純一](#) 招かざる侵入者ツマアカスズメバチ-その起源と対馬の自然に及ぼす影響について-対馬学フォーラム. 対馬市. 2015.12.14.
  6. [若宮健\(B4\)](#), [吉岡優奈\(B3\)](#), [高橋純一](#) 対馬のミツバチ-DNA からわかったこと-対馬学フォーラム. 対馬市. 2015.12.14.

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

1. 農林水産省 農食支援事業 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 27-29 年度(3 年)
2. 一般社団法人養蜂産業振興会 生物分解性巣脾の実証試験 研究代表者:高橋純一平成 27 年度(1 年)
3. 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)
4. 公益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)
5. 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 27 年度

### 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 京都府養蜂組合:顧問

### 4) 受賞等

1. 高橋稜一(M1) 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会・学生ポスター賞 2016.3.26-29.大阪市
2. 西田誠(4 年次生) 第 3 回生命資源環境学科卒業研究発表会 優秀賞 2016.2.28.
3. 若宮健(4 年次生) 第 3 回生命資源環境学科卒業研究発表会 優秀賞 2016.2.28.
4. 高橋稜一(M1) 第 1 回対馬学フォーラム 2015. 研究奨励賞 2015.12.14.



卒業式



WACE で発表



3 年次生の集合写真



対馬学フォーラムでの受賞

# 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 吉田 徹

Assit. Prof. Toru Yoshida, Ph.D



## 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。

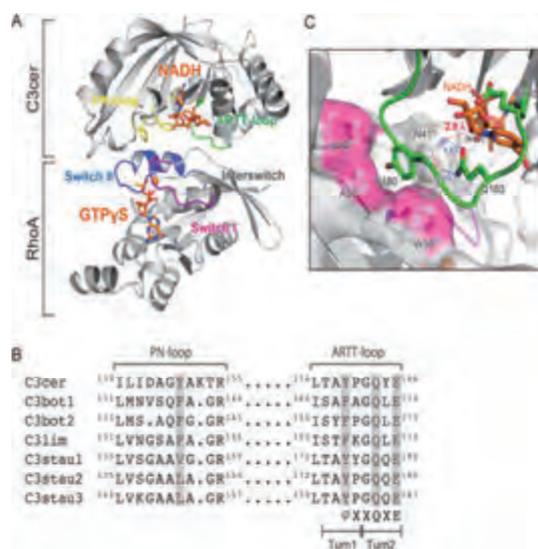
タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要不可欠なものとなりつつある。我々はX線結晶構造解析を主要な手段として、タンパク質複合体、特に感染症因子と宿主であるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治癒する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。ADPリボシル化毒素とそのヒト標的分子複合体の構造生物学:様々な病原微生物はADPリボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、宿主のタンパク質を修飾し、宿主のシグナル伝達系に影響を与える。この反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な反応状態での結晶構造解析を進めている。

## 2. 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(Ia)ー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)。今年、C3 exoenzyme とその基質 RhoA 複合体の結晶構造解析に成功した。

RhoA 特異的ADPリボシル化酵素 C3 は RhoA の Asn41 を特異的にADPリボシル化する毒素であり、1989 年に見出された。代表的な Rhoファミリー分子には RhoA, Rac1, Cdc42 があるが、C3 は RhoA のみをADPリボシル化する。この特異性を利用して、Alan Hall (メモリアルスローンケタリングがんセンター)らは、RhoA がストレスファイバーと接着斑を、Rac1 が葉状仮足を、Cdc42 が糸状仮足を、それぞれ誘導することを見出した。このような生物学的に重要な知見をもたらした C3 の RhoA に対する特異性に、RhoA の研究者を含む多くの研究グループが興味を抱いてきたが、C3 と RhoA の複合体の構造が明らかではないために、その相互作用とADPリボシル化の機構はよくわかっていなかった。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。4回生(戸田)が、C3 exoenzyme とその基質 RhoA 複合体の結晶構造解析を行い、複合体構造で明らかにした(図 A,B,C)。C3-RhoA 複合体の詳細な解析でわか

ったことは次の点である。(1) RhoA のシグナル伝達スイッチとして機能する可変領域(switch I と switch II)は RhoA(GDP)と RhoA(GTP)で大きく構造が異なることが知られていた。しかしながら、C3 が結合した複合体構造では C3-RhoA(GDP)および C3-RhoA(GTP)はどちらも同じ可変領域の構造をとる(switch I は単体の RhoA(GDP)と同じ、switch II は単体の RhoA(GTP)と同じ)。すなわち、C3 の結合により構造変化をおこす。その結果、RhoA(GDP)と RhoA(GTP)はどちらの状態でもADPリボシル化される。(2) C3 および RhoA の認識機構が初めて明らかになった。特に以下の点が興味深い。Ia と C3 はどちらも似た構造を持つADPリボシル化毒素であるが、その基質はアクチンの Arg177 と RhoA の Asn41 である。毒素には共通したADP-ribosylation turn turn loop (ARTT loop)があり、最初のターンに存在する疎水性側鎖が基質 RhoA の認識をし、次のターンに存在する QXE のグルタミンが修飾される RhoA Asn41 の認識に関わると予測されていた。一方 Ia では EXE であり、最初のグルタミン酸が修飾されるアクチンの Arg177 の認識に関わる、すなわち、修飾アミノ酸の選別は、このように行われていると予測されていたが、その実験的な証明はされていなかった。C3-RhoA の複合体構造は、Gln(QXE)が RhoA Asn41 と水素結合を形成して、特異的な認識をし、さらに、この近傍に NADH の NC1 が存在していることが明らかになった。この関係はADPリボシル化にとって理想的な関係であると考えられる(3) RhoA の C3 による認識領域がわかったことで、この点変異体を作り、活性消失を確認した。



また、基質とはならない Cdc42(RhoA と似た small GTPase)の点変異体を作り、4重変異体により ADP リボシル化の良い基質とすることに成功した。

この研究を行った4回生戸田は、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 27 年 3 月)。JBC に 6 月に発表した複合体構造論文は 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。

(2) *Aeromonas sobria* 由来のセリンプロテアーゼ ASP について研究を進めてきた。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。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。この内容は JBC に発表した。

共同研究により以下の研究を進めている。(1)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(2)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: 博士課程の学生 Toniti の研究テーマ(3)新規 GFP の構造と機能の研究

### 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) C3 exoenzyme is a mono-ADP-ribosyltransferase (ART) that catalyzes transfer of an ADP-ribose moiety from NAD<sup>+</sup> to Rho GTPases. C3 has long been used to study the diverse regulatory functions of Rho GTPases. How C3 recognizes its substrate and ADP-ribosylation proceeds are still poorly understood. Crystal structures of C3-RhoA complex reveal that C3 recognizes RhoA via switch I, switch II and interswitch regions. In C3-RhoA(GTP) and C3-RhoA(GDP), switch I and II adopt the GDP and GTP conformations, respectively, which explains why C3 can

ADP-ribosylate both nucleotide forms. Based on structural information, we successfully changed Cdc42 to active substrate with combined mutations in the C3-Rho GTPase interface. Moreover, the structure reflects the close relationship among Gln183 in the QXE-motif (C3), a modified Asn41 residue (RhoA) and NC1 of NAD(H), which suggests C3 is the prototype ART. The structures show directly for the first time that the ARTT-loop is the key to target protein recognition and also serve to bridge the gaps among independent studies of Rho GTPases and C3.

(2) 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 published in 2015.

### 4. 論文著書など

Tsuge H, Yoshida T, Tsurumura T.

Conformational plasticity is crucial for C3-RhoA complex formation by ARTT-loop. *Pathog Dis.* 73(9)(2015)

Toda A, Tsurumura T, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H.

Rho GTPase Recognition by C3 Exoenzyme Based on C3-RhoA Complex Structure.

*J Biol Chem.* 7;290(32):19423-32. (2015)

Kobayashi H, Yoshida T, Miyakawa T, Tashiro M, Okamoto K,

Yamanaka H, Tanokura M, Tsuge H.

Structural Basis for Action of the External Chaperone for a Propeptide-deficient Serine Protease from *Aeromonas sobria*.

*J Biol Chem.* 24;290(17):11130-43. (2015)

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. (2015)

## 5. 学会発表など

Hideaki Tsuge: Structural basis of Bacterial ADP-ribosyltransferase and Human Protein Complex. ETOX17(European Workshop on Bacterial Protein Toxins) (Braga), 2015 6.20-24(招待講演)

津下英明: 「ADPリボシル化酵素C3とRhoA複合体の構造とその認識機構」第441回ビタミンB研究協議会、ホテルコスモスクエア国際交流センター(大阪)、2014.9.4

戸田暁之、鶴村俊治、吉田徹、津守耶良、津下英明: 「Structural basis of ADP-ribosyltransferase C3 exoenzyme with RhoA complex」第53回日本生物物理学会、金沢大学(金沢)、2014.9.13-15

Toniti Waraphan, 吉田徹、鶴村俊治、津下英明、芦田裕之、高橋香代、澤嘉弘: 「ラン藻アナベナ由来 12 量体グルタミン合成酵素の結晶構造」第53回日本生物物理学会、金沢大学(金沢)、2014.9.13-15

吉田徹、小林秀丈、宮川拓也、田代充、岡本敬の介、山中浩泰、田之倉優、津下英明: 「Aeromonas sobria 由来プロペプチド欠損プロテアーゼの外部シャペロンによるフォールディング機構」日本生化学会、神戸ポートアイランド(神戸)、2015.12.1-4

竹内理子、吉田徹、津下英明: 「DNAライブラリーから発現量の多い可用性領域を迅速に選択する手法の開発」、日本生化学会、神戸ポートアイランド(神戸)、2015.12.1-4

## 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「ADPリボシル化毒素C3のRhoGTPase認識機構の解明」

研究代表者：津下英明、取得年度：H27-H29年(3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  $\alpha$  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) 受賞等

戸田暁之(4年次生) 第2回生命資源環境学科卒業研究発表会 最優秀賞 2015.3.2

## 7. 総合生命科学部教育研究活性化支援制度の教育効果

前述した、C3 exoenzyme とその基質 RhoA 複合体の結晶構造解析は、2期目の4回生、戸田によってなされたが、この研究は、総合生命科学部教育研究活性化支援制度、研究助教の吉田および前助教の鶴村の強力なサポートで行われた。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をJBCに発表し、さらに、6月にポルトガルで行われたETOX17で、津下が日本から唯一の招待講演を行い、この内容を報告した。「ADPリボシル化毒素として代表的なIaとその基質アクチンの複合体に続いて、もう一つの代表的なADPリボシル化毒素 C3 とその基質 RhoA の複合体が明らかになったことは重要な意義がある」とのコメントを頂いた。



研究室集合写真

## 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、その遺伝学的研究を行っている。なかでも、ここ数年は、次世代シーケンサーを活用した各種作物のミトコンドリアゲノムの構造解析、ミトコンドリアや葉緑体ゲノムと相互作用する核遺伝子の単離と解析、葉緑体の遺伝子組換えによる有用作物の作出の3つが研究の柱となっている。より具体的には、以下の5つのプロジェクトが進行中である。

- 1) オルガネラゲノムの研究成果を基盤とする有用植物の育成
- 2) ダイコンの雄性不稔・稔性回復システムの分子機構とその多様性形成メカニズムの解明
- 3) 細胞質置換コムギをモデルとした核とミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究
- 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
- 5) 組換え実験で葉緑体に生じたミニサークルの複製機構の解明とベクターの開発

このうち1)~3)については、以前、外部資金で実施されてきた同名のプロジェクト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、いくつかの実験を継続している。また、4)については、平成26年4月に科研費の基盤(B)が採択されたことを受け、同上センターの研究資源も活用しながら、大学院生とともに実験を行っている。一方、5)のプロジェクトは平成27年4月に科研費の挑戦的萌芽研究に採択され、実験を新たに開始した。

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が、長年の大きな目標である。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技術を駆使して、作物に新たな付加価値を与えようとしている。とりわけ葉緑体の遺伝子組換えの技術開発を重点的に進めてきたが、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、トマトの3種作物で、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)を効率的に消去できる植物を育成することに成功した。またグル

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr.

助教 高橋 亮

Assist. Prof. Kiyoshi Takahashi, Dr. Sci.



タチオン合成酵素の遺伝子(GS, gsh1)を葉緑体ゲノムに持つタバコも育成され、ある程度の特徴付けがなされている。これら一連の研究により、非生物学的ストレスに強い植物を育成する1つの方法として、この技術が有効なことを提示できたものと考えている。なおタバコおよびレタスでは、フェリチン遺伝子を葉緑体で強発現させることで、葉に含まれる鉄分を上昇させることにも成功した。

上記2)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。この性質はF<sub>1</sub>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ゲノムに、またその働きを抑える稔性回復遺伝子(Rf 遺伝子)が核ゲノム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古くから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。このことに関連し、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*, *B. fruticulosa* 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。

3)のプロジェクトでは、細胞質置換コムギという希有な材料を用いて、コムギの近縁種であるエギロブス属植物のミトコンドリアゲノムの構成を、また4)のプロジェクトでは、オオムギ、ライムギ、タマネギなどいくつかの作物のミトコンドリアゲノムの構成を、それぞれ次世代シーケンサーを活用して解明しようとしている。これにより個々の植物のゲノムの特徴を明らかにするとともに、植物の表現型に影響を与える遺伝子の特定、さらには当該植物の系統進化に関する新知見を得ようと考えている。

なお、5)のプロジェクトは、上記1)から派生したもので、APX を葉緑体ゲノムに導入した際に偶然生じた「斑入りを示す組換えタバコ」の解析がテーマである。興味深いことに、この組換え体では、葉緑体ゲノムが大小2つのサークルに分割されており、しかも小さいサークルのコピー数が異常に増加している。斑入りの強さと大小サークルの存在比に相関があることまではわかっているが、詳細な解析はこれからである。

## 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。3年前、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、T<sub>1</sub> 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。

この実験結果を受けて、昨年度からレタスの葉緑体に GSH1 をコードする遺伝子を導入することを試みている。方法はレタスの葉緑体へフェリチン遺伝子を導入する際に用いた方法による。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 個体の組換え体を得られ、今年度はこれら組換え体の詳細な特徴付けを行った。全 DNA を抽出し、PCR 解析を行った結果、葉緑体内に *gsh1* が導入されていることが分かった。また、サザン解析、ノーザン解析の結果でも、導入遺伝子から予想されるサイズのシグナルが検出された。しかし、SDS-PAGE、グルタチオン定量の結果では、野生型と組換え体の間に差がなかった。そこで、導入遺伝子の近傍を再度シーケンシングしたところ、*gsh1* と開始コドンの間に余分な 2 塩基が挿入されていることが判明した。現在、フレームシフトを修正したコンストラクトを使用して、レタス葉緑体ゲノムへの *gsh1* 導入を再度試みているところである。

植物の栽培・管理を最適化させるため、平成 27 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た。具体的には、鳥取大学乾燥地研究センターでパンコムギのアカダルマ及び Bob White 両品種を栽培してもらい、形質転換実験に使用する外植片(開花後 2 週間の未熟胚)を 11 月~12 月に入手できる体制を構築した。またトマトでは、筑波大学の形質転換植物デザイン研究拠点から子葉を出発材料とする効率の良い培養・再分化系を導入している。しかしながら、パンコムギとトマトについては、これまで組換え体を得られていない。

上記4) のプロジェクトについては、昨年からの実験を継続し、*Triticum monococcum*, *Aegilops searsii* 及び *Secale cereale* のミトコンドリアのゲノムの解読を終えた。また、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も、ほぼ完了している。なお、上記2) のプロジェクトについては、山形県のハマダイコン(野ダイコン)の調査を実施し、その中に、雄性不稔を示すオグラ型と、いわゆる正常型のミトコンドリアゲノムを、ヘテロプラスミックな状態で保持している個体を発見した。これまで数多くのハマダイコンを調査してきたが、このような個体は見たことがなく、新たな研究のシーードとして期待される。

## 3. Research projects and annual reports

We have performed the following five major research projects that are all related to plant organelle genomes:

- 1: Production of useful plants on the basis of organelle genome studies.
- 2: Studies on the molecular mechanism of the male-sterility/fertility restoration system in radish.
- 3: Comparative mitochondrial genomics of *Triticum* and *Aegilops* using alloplasmic lines of common wheat.
- 4: Comprehensive studies on the plant mitochondrial genome.
- 5: Molecular analysis on the replication mechanism of a mini-circle molecule found in chloroplast of transplastomic tobacco and development a new vector for chloroplast transformation.

The first project aims at producing various transplastomic plants that will be useful for human beings. Currently several transplastomic tobacco (containing genes like *apx*, ferritin, etc...) have been produced as a model plant, and experiments to produce transplastomic crops such as tomato, wheat and lettuce are underway. Transplastomic lettuce containing either ferritin or *gsh1* gene have been 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. Evolutionary aspect of the system is also drawing attention.

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 in the second and the third projects, we have started the fourth project. In the project, mitochondrial genomes of several crops such as barley, rye and onion have been analyzed. The fifth project is completely new. We have accidentally obtained a variegated transplastomic tobacco plant that contains dipartite chloroplast genome. This plant is expected to serve as a unique resource to study chloroplast DNA replication and to develop a new chloroplast transformation vector.

#### 4. 論文, 著書など

なし

#### 5. 学会発表など

軸屋 恵, 寺地 徹, 山岸 博: 栽培ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔遺伝子 (*orf138*) と総性回復遺伝子の変異. 日本育種学会 第128回講演会, 新潟市, 2015.9.11-12

植村 香織, 森田 重人, 山本 真紀, 高見 常明, 坂本 亘, 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 III. マルチパータイト構造をとる葉緑体ゲノム. 日本育種学会 第128回講演会, 新潟市, 2015.9.11-12

向井 章人, 山岸 博, 田中 義行, 寺地 徹: *Brassica oxyrrhina* のミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定. 日本育種学会 第128回講演会, 新潟市, 2015.9.11-12

辻村 真衣, 金子 貴一, 執行 正義, 出雲谷 遥, 寺地 徹: 雄性不稔タマネギのミトコンドリアゲノムの解読. 日本育種学会 第128回講演会, 新潟市, 2015.9.11-12

#### 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: 組換え実験で葉緑体に生じたミニサークルの複製機構の解明とベクターの開発

研究代表者: 寺地 徹, 取得年度: H27-29 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)

岡山大学 資源植物科学研究所 共同研究

課題名: 葉緑体の形質転換実験により得られた斑入りタバコ系統の温度ストレス応答に関する研究

研究代表者: 寺地 徹, 取得年度: H27 年 (1 年)

##### 2) その他

日本学術振興会 科研費審査委員(寺地)

Gene & Genetic Systems editor(寺地、高橋)

Breeding Science editor(寺地)

他大学講師:

京都府立大学大学院「植物バイオテクノロジー特論」(寺地)

筑波大学生命環境学群生物学類「理論集団遺伝学」(高橋)

#### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

研究助教(高橋)は生命資源環境学科の専門科目である科学英語 I、生命環境科学実験・演習を担当した。他の教員と分担して授業を運営することで、学部が謳うところの少人数教育を実践するのに貢献した。また、大学院の各種コロキウム、卒業研究発表会、ならびに当研究室で毎年実施している福井県立大学との合同セミナーなど、学部生・大学院生の発表の場において、彼ら彼女らに的確な質問や教育的なサジェスションを行なうことで、学部生・大学院生の研究力の向上に貢献した。遺伝学的背景から個々の研究テーマを解説する、研究室のパソコンをメンテナンスするなど、他の教員の目の行き届かない部分における彼の学生へのサポートは特に教育効果が高かった。



# 動物遺伝育種学研究室

Laboratory of Animal Genetics and Breeding

教授 野村 哲郎

Prof. Tetsuro Nomura, Ph.D



## 1. 研究概要

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

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

### 1) 動物集団の遺伝的多様性の評価方法の開発とその応用

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

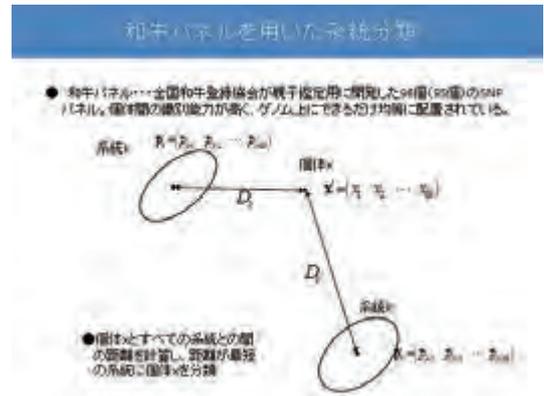
日本で普通に見られるナミテントウやその近縁種の鞘翅斑紋を支配する遺伝子の地理的分布に関する調査、家畜の血統記録を用いた遺伝的多様性の調査を行っている。

## 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

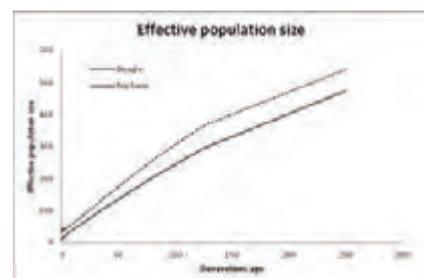
性が激減していることが指摘されている。遺伝的多様性を維持・回復させるためには、品種内に遺伝的に分化した系統を再構築することが有効であると言われている。そこで SNP 情報を用いて品種内に系統を再構築するための手法を開発した。開発した手法は、まず各系統のコアとなる個体群を設定し、新たな候補個体は SNP 情報を用いた判別分析によって適切な系統に割り振るものである。この方法を利用して、黒毛和種の系統再構築の可能性を検討した。



SNP 情報を用いた個体の系統分類の概念図

### 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、連鎖不平衡を利用して過去の集団の有効な大きさの推定を試みた。



過去の集団の有効な大きさの推定値

### 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、ハチ類の系統維持のための4つの交配様式の下での近交係数および集団の有効な大きさを比較した。数値計算の結果から、巢内選抜とグループ交配を組み合わせた様式が、実用的観点から望ましいと考えられた。



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、研究を進めている。



## 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. The historical effective population size was estimated from the distribution of linkage disequilibrium on the genome.

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

In bees, inbreeding depression is found both in queens and workers for various traits. Increased homozygosity at the complementary sex determination locus due to inbreeding also produces sterile diploid males and consequently reduces the productivity of the colony. We compared four mating systems to reduce the deleterious effects of inbreeding in maintenance of bee strains, in terms of the inbreeding coefficient and effective population size. Numerical computation showed that combination of within-colony selection and group mating is a practically recommended system.

#### 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* 16:979-986

野村哲郎・高橋純一・竹内 剛 (2014). ハチ類の系統維持のための交配様式の比較. 京都産業大学先端科学技術研究所所報. 第 14 号. 41-46.

#### 5. 学会発表など

野村哲郎. SNP 情報を用いた黒毛和種の系統再構築と遺伝的多様性の評価. 第 22 回和牛育種・改良問題公開セミナー, 2016.1.12. 京都.

野村哲郎. 生物資源としての和牛: 遺伝的多様性の意義と保全. 平成 27 年度 総合生命科学部シンポジウム, 2016.3.2. 京都.

野村哲郎. 遺伝と進化の正しい理解 —ダーウィンとメンデルが伝えたかったこと— 京都産業大学 リエゾンオフィス主催シンポジウム, 2016.3.5. 京都.

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業【発展融合ステージ】「生物多様性の保全に配慮した在来種によるトマト授粉用生物資材の開発」(分担)

##### 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、CO<sub>2</sub>固定が行われる。植物にとって光合成は非常に重要な機能であるため、様々な制御機構を備えている。私たちはこの中でも高等植物葉緑体におけるレドックス制御機構について、その生理機能と分子メカニズムの解明を目指し、研究を行っている。

葉緑体のレドックス制御機構では、チオレドキシシ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。チオレドキシシファミリータンパク質の生理学的機能の解析を中心として、以下の具体的な研究項目を設定し、研究を進めている。

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

葉緑体ストロマでは、光合成の行われる昼と夜とで大きくレドックス状態が変化する。光合成の行われる昼には、光合成電子伝達経路から生じる電子で NADPH を産生するため、ストロマ画分は還元的な状態にある。昼の還元的状態のときに葉緑体ストロマに局在するチオレドキシシは、カルビンサイクルなどの酵素を還元し活性化する、ペルオキシレドキシシをはじめとする活性酸素種消去系酵素へ反応に必要な電子を供給する、チラコイド内腔への還元力供給経路へ電子を渡す、などさまざまな場面において機能している。これらの構造の異なる多くの標的タンパク質を、チオレドキシシはどのように見分け、葉緑体内で混乱することなく相手タンパク質を認識し、必要な還元力(つまり電子)を供給しているのか、明らかにする。また、葉緑体中に複数のアイソフォームを持つチオレドキシシファミリータンパク質が植物葉緑体内でどのように使い分けられているのか、その分子機構、生理学的意義を明らかにする。

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明  
葉緑体は、外包膜、内包膜という二枚の膜に囲まれたオルガネラである。葉緑体は、さらにチラコイド膜と呼ばれる膜を持っており、形態上も複雑なオルガネラである。昼と夜とで大きくレドックス環境が変化する葉緑体ストロマ画分とは対照的に、チラコイド膜を隔てたチラコイドの内側

教授 本橋 健

Prof. Ken MOTOHASHI, Ph. D.

研究助教 桶川 友季

Reseach. Assoc. Yuki OKEGAWA, Ph. D.



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

### 2. 本年度の研究成果

#### 1) 葉緑体レドックス制御機構におけるチオレドキシシファミリータンパク質の *in vivo* での役割分担

葉緑体のチオレドキシシは、光合成の際に CO<sub>2</sub> 固定を担うカルビンサイクルの酵素を活性化することが知られている。また、植物の葉緑体には非常に多くの種類のチオレドキシシが存在することも分かっている。たとえばモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、5 グループ 10 種類ものチオレドキシシが存在する。しかし、実際の植物体内で、数多くのチオレドキシシがどのように酵素の活性化に働いているかは明らかでなかった。植物葉緑体でのチオレドキシシによる酵素活性制御機構の研究は、これまで試験管内での実験結果をもとに議論されており、SBPase は *m* 型ではなく *f* 型チオレドキシシによって制御されると考えられてきた。また、その他の酵素も *f* 型によって優先的に制御され、*f* 型チオレドキシシが酵素活性制御で中心的な役割を担うと信じられてきた。しかし、本研究の植物変異体を用いた解析で、実際の



Arabidopsis thaliana の *m* 型チオレドキシシ欠損変異株

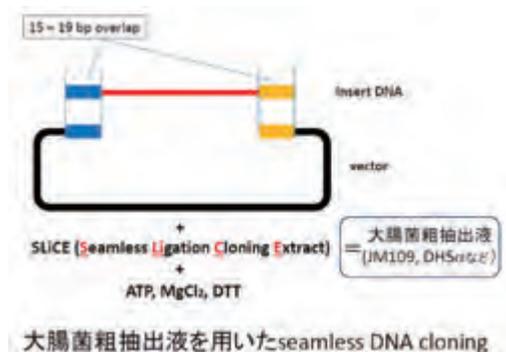
植物体内で SBPase は *m* 型チオレドキシンにより制御され、その機能欠損が植物の成長に大きく影響することがわかった。このことは、*in vivo* で植物体を用いてこの分野の研究を行うことの重要性を示している。

2) 葉緑体チオレドキシン光還元システムの *in vitro* での再構成

葉緑体レドックス制御を担うチオレドキシンは、その還元力を光合成電子伝達経路から得ている。これまで、チオレドキシンを *in vitro* で生化学実験する場合、チオレドキシンへの還元力供給は、主に DTT などの化学試薬を用いてきた。しかし、より生理的な条件で実験を行うためには、葉緑体で働いている電子伝達経路で行う必要がある。そのため、葉緑体のチラコイド膜を用いて、光依存的にチオレドキシンを還元するシステムを構築した。

3) 大腸菌粗抽出液を用いた効率的な seamless DNA クローニング法の開発

近年、制限酵素部位に依存しない seamless DNA cloning 試薬が様々なメーカーから市販されているが、それと同様のことを、研究室で通常使用している大腸菌株の粗抽出液を用いて行う方法を確立した。この方法は、研究室で使用している大腸菌株(JM109, DH5 $\alpha$ など)から粗抽出液を調製し、15-19 bp の相同塩基配列を付加した DNA 断片とベクターを混合し、37°C, 15 分間保温するだけで効率よく seamless DNA cloning できる。



### 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.

Thioredoxins regulate the activity of chloroplast enzymes by reducing disulfide bonds in a light-dependent manner. Previous *in vitro* studies indicated that f-type thioredoxins are the most efficient redox regulators; however, f-type thioredoxin mutants did not show any obvious phenotypes. We used *in vivo* studies to show that the more abundant m-type thioredoxins are more important regulators of Calvin Cycle enzymes. These results highlight the need for *in vivo* studies.

2: Development of a simple and efficient seamless DNA cloning method using the cell extracts from Escherichia coli laboratory strains.

Recently, various restriction endonuclease cleavage site-independent cloning methods that overcome the limitations associated with the lack of unique restriction enzyme sites have been described (the so-called "seamless cloning" method). Seamless DNA assembly kits have also become commercially available. Overlapping sequences present at the 5' - and 3' -ends of DNA fragments are combined by these methods *in vitro*. The SLiCE method can use extracts from the commonly available Escherichia coli laboratory strains as an alternative seamless cloning method; these extracts can be easily prepared in the laboratory. This method greatly reduces the costs associated with DNA manipulation.

### 4. 論文, 著書など

Y. Okegawa, K. Motohashi: Expression of spinach ferredoxin-thioredoxin reductase using tandem T7 promoters and application of the purified protein for *in vitro* light-dependent thioredoxin-reduction system. *Protein Expr. Purif.* **121**, 46-51(2016)

Y. Okegawa<sup>1</sup>, M. Koshino<sup>1</sup>, T. Okushima, K. Motohashi: Application of preparative disk gel electrophoresis for antigen purification from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* **118**, 77-82 (2016) <sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

Y. Okegawa, K. Motohashi: Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis *in vivo*. *Plant J.* **84**, 900-913 (2015)

Y. Okegawa, K. Motohashi: A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochem. Biophys. Rep.* **4**, 148-151 (2015)

Y. Okegawa, K. Motohashi: Evaluation of seamless ligation cloning extract (SLiCE) preparation methods from an *Escherichia coli* laboratory strain. *Anal. Biochem.* **486**, 51-53 (2015)

K. Motohashi: A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol.* **15**, 47 (2015)

## 5. 学会発表など

桶川友季、本橋健: Chloroplastic m-type thioredoxins as major regulators of Calvin cycle during photosynthesis. 第57回日本植物生理学会年会, 盛岡市, 2016.3.18-20

本橋健、桶川友季: A simple and efficient seamless DNA cloning method using cell lysates from laboratory *Escherichia coli* strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. 第57回日本植物生理学会年会, 盛岡市, 2016.3.18-20

桶川友季、本橋健: シロイヌナズナm型チオレドキシンはカルビンサイクル酵素の主たるレドックス制御因子として機能する. 第38回日本分子生物学会年会および第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸市, 2015.12.1-4

本橋健、桶川友季: 大腸菌粗抽出液を用いた簡便かつ高効率な Seamless DNA cloning法. 第38回日本分子生物学会年会および第88回日本生化学会大会 合同大会, 神戸市, 2015.12.1-4

桶川友季、本橋健: シロイヌナズナのm型チオレドキシンの欠損はカルビンサイクルの酵素の活性化に影響を与える. 第6回日本光合成学会年会, 岡山市, 2015.5.22-23

本橋健: 大腸菌抽出液を用いた簡便かつ高効率な Seamless DNA cloning法. 第6回日本光合成学会年会, 岡山市, 2015.5.22-23

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, 世田谷区, 2015.3.16-18

## 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)

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: H26-27年度 (2年)

2) その他 なし

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

本研究支援制度により、生命資源環境学科の学部教育で少人数教育が実施できることに加え、研究室活動においても大きな教育効果が得られた。特に、大学院生および学部生の研究室での教育・研究活動を活性化させることに大いに貢献している。教育・研究指導を行う場合に複数の指導者が指導することで、様々な視点から教育指導を行うことができた。また、それぞれの専門性を生かし、幅広い観点から教育・研究に関して助言できるようになったのも大きな成果である。その結果として、学部4年生の応用特別研究での研究成果を研究論文として発表することができた。



# 植物育種学研究室

Laboratory of Plant Breeding

教授 山岸 博

Prof. Hiroshi Yamagishi, Dr. Agr



## 1. 研究概要

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

このため、細胞質雄性不稔性を植物のF<sub>1</sub>育種に実際適用するためには、ミトコンドリアゲノムおよび核ゲノムの遺伝子の機能を正しく把握する必要がある。それと同時に、この雄性不稔-稔性回復の系は、植物における核とミトコンドリアのクロストークの進化を科学的に解明するための優れた舞台となる。

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

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ている。

### 2) シロイヌナズナを用いた細胞融合による新しい細胞質雄性不稔の開発

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

### 3) 細胞質置換によるダイコンとナスの雄性不稔の開発

宇都宮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、雄性不稔化のメカニズムを解明した。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た。さらに細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子の作用機作を明らかにすることを目的に研究を開始した。

## 2. 本年度の研究成果

### 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布

現在我国において、ダイコンの実際栽培に用いられているF<sub>1</sub>品種について、オグラ型雄性不稔遺伝子の有無とそのタイプならびに稔性回復遺伝子の分布を調査した。オグラ型雄性不稔遺伝子(*orf138*)については、*orf138*を持つ品種が多数見出され、とりわけAタイプの*orf138*を持つものが大部分を占めた。このことは、今日の我が国のダイコン育種においては、特定の雄性不稔細胞質に依拠したF<sub>1</sub>育種が主流となっていることを示す。その一方で、一部の品種に我国の栽培・野生ダイコンでは見出されていなかったHタイプの*orf138*が存在することが明らかになった。

オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子としては、*orf138*の翻訳を抑制する*orf687*と、転写産物を修飾する*Rtt*が知られている。この2つの遺伝子は、それぞれ品種の細胞質の分化に関係なく、ダイコンに分布することが明らかになった。このうち、*Rtt*が*orf687*より多くの品種に存在することは注目される。現在、各品種の実際の花粉稔性を調査している。

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

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種に由来する後代が BC<sub>6</sub> 世代に達した。この世代における各個体の花粉稔性、ミトコンドリアゲノムの構造ならびにミトコンドリア遺伝子の発現を詳しく調べた。

BC<sub>6</sub> 世代では系統内で可稔個体と不稔個体の分離が観察された。その一方で、これらの個体はいずれも同一のミトコンドリアゲノムの構造を有しており、体細胞雑種に生じたミトコンドリアゲノムの組換えは安定して後代に伝達されていた。このため BC<sub>6</sub> 世代における花粉稔性の分離は未知の稔性回復遺伝子が関与した結果であると推定された。

3) 細胞質置換によるダイコンとナスの雄性不稔の開発

細胞質置換によってダイコンに雄性不稔を起こすことが知られている、*Brassica oxyrrhina* のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した。このミトコンドリアゲノムは全長が 247,936bp で、56 種類の遺伝子を保有していた。同種のミトコンドリアゲノムのうち、ダイコン、カラシナなどに雄性不稔を誘起する原因遺伝子と推定されている *orf108* について、塩基配列を決定して、他種の *orf108* 遺伝子の塩基配列と比較した。その結果から *B. oxyrrhina* における稔性回復のメカニズムを推定しようとした。

一方、ナスの雄性不稔に対する稔性回復遺伝子を単離することを最終目的として、形質転換の基礎となる組織培養条件を検討した。その結果、従来の方法より遥かに高率に再分化シュートが得られる培養系が開発された。

4) その他

*Brassica* 属の作物のうち、*B. rapa* (A ゲノム種) においては、種内に種皮型の分化が存在することが知られている。この種皮型の種内分化のメカニズムを解明するためにミズナ (A 型種皮) とノザワナ (B 型種皮) の交雑後代を用いて、種皮型の DNA マーカーを開発した。それとともに、種皮型に関する遺伝子が座乗する染色体を決定しようとしている。

また、*Brassica* 属作物には3種の2倍体種と、3種の複2倍体種が含まれるが、このうち、*B. juncea* (AB ゲノム種; タカナ、カラシナ等) は *B. rapa* を細胞質親として成立した。そこで、両種におけるミトコンドリアゲノムの塩基配列変異を解析した。その結果、これらの2種には同一の塩基配列が共通して分布していた。このことから、*B. rapa* と *B. juncea* の栽培化は、共に2回以上起こったことが推定された。

### 3. Research projects and annual reports

In the field of plant breeding, F<sub>1</sub> hybrids have many genetic advantages and contribute to the increase of worldwide crop

production. For the efficient and stable F<sub>1</sub> 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.

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 has a fertility restoring gene different from both of *orf687* and *Rft*. We examined the distribution of *orf138* and its type in F<sub>1</sub> varieties cultivated in Japan. We also studied the differentiation of fertility restoring genes in radish.

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*). Progenies of the somatic hybrids were produced by successive back-crosses with *B. oleracea*. So far, the pollen fertility was investigated in the BC<sub>6</sub> progenies. The BC<sub>6</sub> progenies were segregated into completely male sterile plants and partially fertile plants. However, all the BC<sub>6</sub> progeny plants had the identical structure of mitochondrial genome. Further back-crosses and observation of pollen fertility are now undertaken.

3) CMS of radish and eggplant by cytoplasm substitutions.

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

#### 4. 論文、著書など

なし

#### 5. 学会発表など

前田 貴文、山岸 博：*Brassica rapa*における種皮型の分化と mucilageとの関係。日本育種学会第128回講演会、新潟市、2015. 9. 11-12

金山 純子、辻村 真衣、山岸 博：キャベツとシロイヌナズナの体細胞雑種後代における花粉稔性と花器形態の変異。日本育種学会第128回講演会、新潟市、2015. 9. 11-12

茨木 亮多、山岸 博：ナスにおける胚軸と葉の培養条件の検討。日本育種学会第128回講演会、新潟市、2015. 9. 11-12

軸屋 恵、寺地 徹、山岸 博：栽培ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔遺伝子 (*orf138*) と稔性回復遺伝子の変異。日本育種学会第128回講演会、新潟市、2015. 9. 11-12

向井 章人、辻村 真衣、寺地 徹、山岸 博：*Brassica oxyrrhina* のミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定。日本育種学会第128回講演会、新潟市、2015. 9. 11-12

#### 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)

科学研究費補助金・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

研究代表者：山岸 博，取得年度：H26-28年(3年)

##### 2) 学外活動：

大学基準協会 大学評価分科会 評価委員

日本学術振興会 科学研究費委員会 専門委員

長野県伊那北高等学校 クロスベンアカデミー事業「ようこそ教授」講師

#### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

本制度によって雇用された高橋 亮博士と科学英語 I を分担した。科学英語 I は、2学年の春学期に担当され、本学科における専門英語教育の基盤となるものである。この科目においては履修学生を2つのグループに分けて、山岸と高橋がそれぞれを担当した。それによって1グループあたりの学生数が15人前後となり、個々の学生に対応したきめ細かい指導が可能となった。科学英語 I では、特に生

物学における基本的な用語と英語表現の習得を目的としており、2人の担当者がそれぞれのグループの進捗状況を報告しあうこと等を通じて、学科の学生の英語学習の基礎固めに貢献した。

また、高橋博士は生命資源環境学実験・演習Ⅱのうち、山岸担当分においてアシスタントを務めた。それによって、実験のねらい等を学生に分りやすく伝達するとともに、学生の疑問に対していねいに答える授業体制が築かれた。この実験・演習Ⅱは3学年の春学期に担当されており、学生が基礎特別研究を履修するための基礎となる科目である。

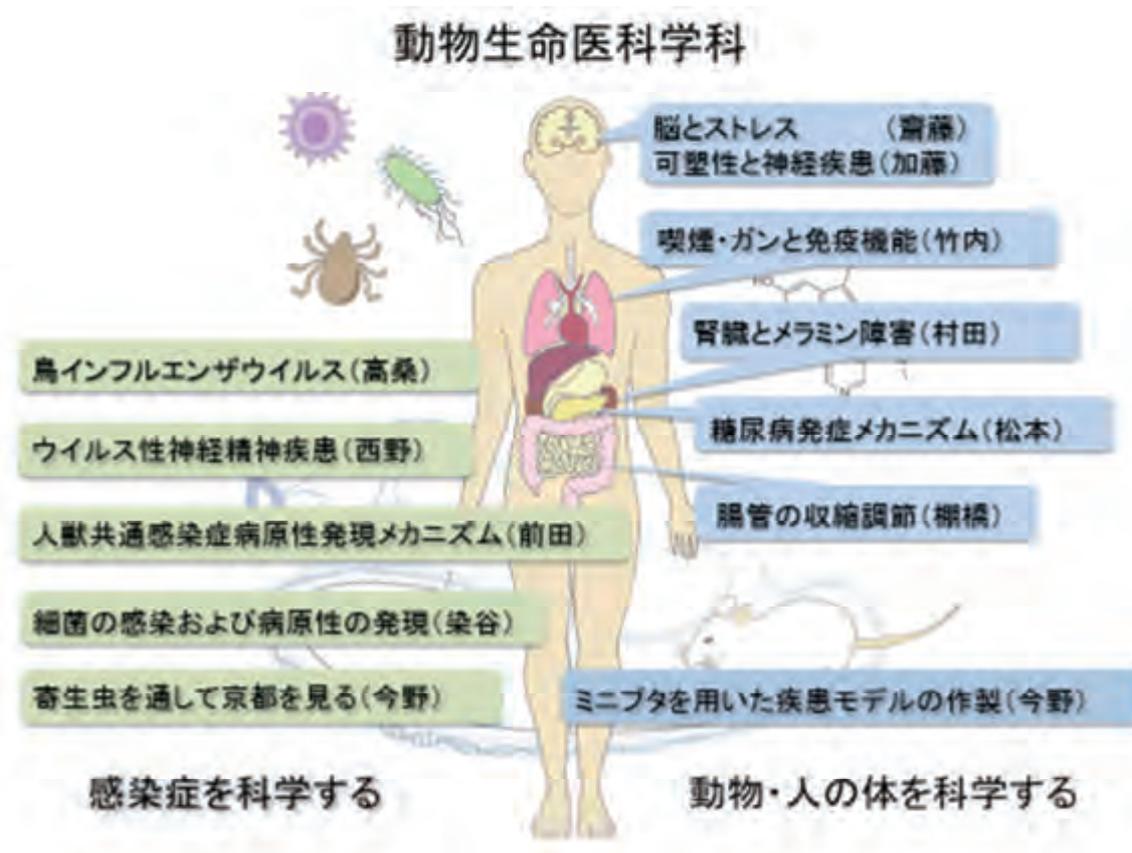


# 動物生命医科学科

## 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、大阪府立大学との学術交流協定を結び、特に感染症に関する研究を積極的に進め、グローバルからグローバルまでの研究を展開している。



## 【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 10 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、薬理・免疫毒性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 27 年度は 16 名もの合格者を輩出した。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・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    | 村田                            |
| 生化学実習                    | 1    | 染谷・西野                         |
| 動物遺伝学 / 実験動物遺伝学          | 1    | 松本                            |
| 動物遺伝学実習 / 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                            |
| 解剖学実習 / 生理学実習 / 解剖生理学実習  | 2    | 加藤・齋藤                         |
| 科学英語 I                   | 2    | 染谷                            |
| 薬理学・毒性学                  | 2    | 棚橋                            |
| 基礎病理学 / 免疫病理学            | 2    | 竹内                            |
| 公衆衛生学                    | 2    | 前田                            |
| 微生物学 I                   | 2    | 染谷                            |
| 動物繁殖学実習                  | 2    | 松本                            |
| 科学英語 II                  | 2    | 高桑                            |
| 動物繁殖学 / 実験動物医学           | 2    | 今野                            |
| 微生物学 II                  | 2    | 西野                            |
| 実験動物学・毒性学実習 / 薬理・免疫毒性学実習 | 2    | 竹内・海野                         |
| 栄養衛生学                    | 3    | 村田                            |
| 動物感染症予防学実習               | 3    | 高桑                            |
| 動物病態学                    | 2    | 小森                            |
| 動物発生工学                   | 3    | 松本                            |
| 動物と法・経営概論                | 3    | 竹内ほか                          |
| 動物発生工学実習                 | 3    | 松本                            |
| 科学英語 III                 | 3    | 高桑                            |
| 動物倫理学                    | 3    | 村田                            |
| 動物感染病学 I                 | 3    | 高桑・前田・西野・染谷                   |
| 動物感染病学 II / 動物感染症学       | 3/2  | 高桑                            |
| 基礎特別研究                   | 3    | 加藤・齋藤・竹内・高桑・西野・染谷・前田・村田       |
| 人獣共通感染病学                 | 3    | 前田                            |
| 応用特別研究 1・2               | 4    | 加藤・齋藤・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                            |

下線は非常勤講師

# 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

研究助教 藤田明子

Assist. Prof. Akiko Fujita, Ph.D



## 1. 研究概要

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

本研究分野では具体的に次の諸点について研究を展開している。

### 1) てんかん～うつ・不安障害に至る分子発症メカニズムの解明

#### 1-1) 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、下垂体で発現した後全身に運ばれ、成長促進作用を示す『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り、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。

さらに『シアル酸転移酵素 ST3Gal14』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、ST3Gal14 を欠失したマウス (T3Gal14-K0) 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。てんかん発作を獲得したマウスの神経細胞が著しい成長ホルモンの発現亢進を示すのに対して、ST3Gal14-K0 マウスは、血漿中だけでなく脳においても、その発現を低下させた。これは、てんかん発症に

は、ST3Gal14-成長ホルモン-Arc をつなぐシグナル系の制御が関与することを示唆する。

#### 1-2) てんかん共存症の発症機構の解明

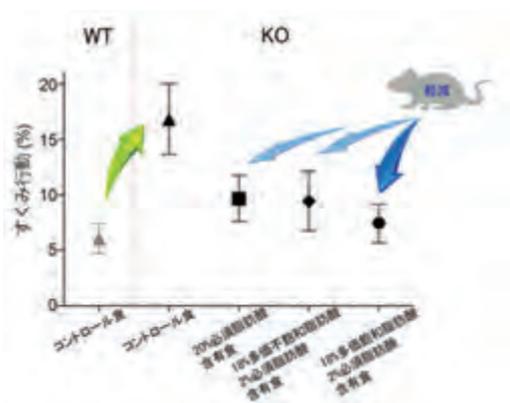
てんかん患者の 30%が、睡眠障害、うつ、不安障害を含む神経精神障害を示し、薬剤の副作用がその原因のひとつと考えられているが、そのメカニズムは不明である。一方で、シアル酸転移酵素 (ST3Gal14) を欠損したマウスは、てんかん発症を消失した副作用として、うつ、不安障害、睡眠障害を発症するマウスであった。さらに、“GWAS Catalog (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/docs/about>)”を用いてヒト一塩基多型を調べたところ、ST3Gal14-K0 マウスの症状と一致した。以上の知見は、ST3Gal14 を欠失したマウスがてんかん発症と、うつ、不安障害といった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。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、その共存症や副作用(情動系障害)に関わるのかについて研究を進めている。

#### 2) 代謝負荷に起因する精神神経疾患の発症とシアル酸修飾

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 ST3Gal14 欠損マウス脳では、その発現量が低い。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ところ、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 ST3Gal14 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 1. 異なる油脂餌が与える音恐怖記憶への影響

(図 1 解説, ST3Gal4-KO マウスは, 音恐怖に対する



記憶が著しく高い。離乳後すぐから, 6 週間餌中の油脂量を増やした結果, KO マウスの音恐怖が抑えられ, 野生型と同じレベルにまで回復した。)

## 2. 本年度の研究成果

扁桃体キンドリングマウスを作成し, 代謝産物を回収した。同時に, 扁桃体キンドリングマウスの作成方法を記録したビデオ作成を依頼され, 完成に近づいている。

シアル酸転移酵素 (ST3Gal4) を欠損したマウスの統合失調症様行動を示す知見, 雄の性行動異常やメスの性周期不全の詳細な観察結果を得た。次年度の論文作成につなげる。

うつ・不安障害を示す ST3Gal4 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。一例として, 餌に含まれる油脂が多い場合, 欠損マウス (KO) は音への恐怖記憶を弱め, 野生型のレベルまで回復した (図 1)。一連の研究成果を平成 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 and the comorbidity.

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. Furthermore, 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.

Second, we previously demonstrated that the sialyltransferase ST3Gal4 was upregulated within the neural circuits during epileptogenesis, in contrast, recently that kindling stimulation failed to evoke epileptic seizures in ST3Gal4-deficient mice. On the other hand, the deficient mice showed anxiety, depression, REM sleep disorders. Present our approach is to find the acceptor substrate that receives sialylation by ST3Gal4 and investigate molecular mechanisms in development of emotional side effect of epilepsy via ST3Gal4 and the acceptor substrate.

### 2: Neuropsychiatric disorders induced by metabolic loading and sialylation.

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.

### 3: Clarification of inhibitory mechanism of epileptic seizures with botulinum neurotoxin.

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. Kato K (2015) Differential effects of dietary oils on emotional and cognitive behaviors. *PLOS ONE* 10: e0120753.
2. Wands AM, Fujita A, 他 17 名 (2015) Fucosylation and protein glycosylation create functional receptors for cholera toxin. *Elife*. 4:e09545.
3. Fujita A and Kohler JJ (2015) Photocrosslinking Sugars for Capturing Glycan-dependent Interactions. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 27: E1-7 (総説).

#### 5. 学会発表など

1. 加藤啓子 (2015) リエゾンオフィス主催 シンポジウム「脳は不思議だー世界は脳でつくられるー」環境と脳ー音とチョコレートー 京都産業大学 壬生校地 むすびわざ館 2階ホール 10月31日 (口頭)
2. Hirota H, Kato K. (2015) Possibility that ST3Gal IV deficient mouse is a schizophrenia model, Glyco23 NEUROGLYCOSCIENCE, Croatia, Split. 9月19日(ポスター)
3. Kato K, Srimontri P, 他6名. (2015) Sialyltransferase ST3Gal IV deletion protects against epilepsy, but induces anxiety, Glyco23 NEUROGLYCOSCIENCE, Croatia, Split. 9月18日 (口頭)
4. 加藤啓子 (2015) 食餌中の油に反応するうつ, 不安障害モデルマウス (Dietary oils and anxiety- and depression-related model mice), イノベーション・ジャパン2015 - 大学見本市, 東京ビッグサイト, 8月27日 (口頭とポスター)

#### 6. その他特記事項

- 1) 外部資金
  - 平成27-29年 基盤研究(C)一般 15K07774 てんかん〜うつ・不安障害に至る分子発症メカニズムの解明 (研究代表者:加藤啓子)
- 2) 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協会理事
- 3) 新聞掲載
  - 食用油脂の種類で不安や恐怖に対する記憶変わるー京都産業大、チョコに不安軽減効果 (2015) 4月22日 日刊工業新聞.

- 恐怖の記憶、チョコが緩和 京産大教授確認、魚では強まる (2015) 4月17日 京都新聞.

#### 4) ホームページ

[http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kato/Home\\_J.html/Welcome.html](http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kato/Home_J.html/Welcome.html)

#### 7. 総合生命科学部教育研究活性化支援制度の教育効果

藤田氏 (9月) の赴任後半年が経過した。研究に関しては、神経症状と関連性が高いと示唆される代謝産物の同定に成功した。酵素のクローニングを含め、研究は発展的に進んでおり、すでに論文作成に着手している。教育に関しては、この半年は研究室内の学部生・大学院生の実験指導、発表指導に集中していた。研究員配置以前と比べ、学生の活発な実験への取り組みに加え、大学院への進学意欲も高まっている。また、藤田氏の前任校が、テキサス大学であったことから、英語習得意欲も飛躍的に高まった。さらに、藤田氏は二人の子供を育てながら、日々研究・教育に励んでおり、その若い女性教員の取り組み姿勢が、男女問わず学生の将来のメルクマールとして写っている。



# 動物生理学研究室

Laboratory of Animal Physiology and Neurobiology

教授 齋藤 敏之

Prof. Toshiyuki Saito, DVM, Ph.D.



## 1. 研究概要

動物生体機能学分野・動物生理学研究室では、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、長期にわたって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、脳の扁桃体が大きくなる一方で、前頭前野や海馬が小さくなることや神経細胞が変性する等の変化が生じる。研究では、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。

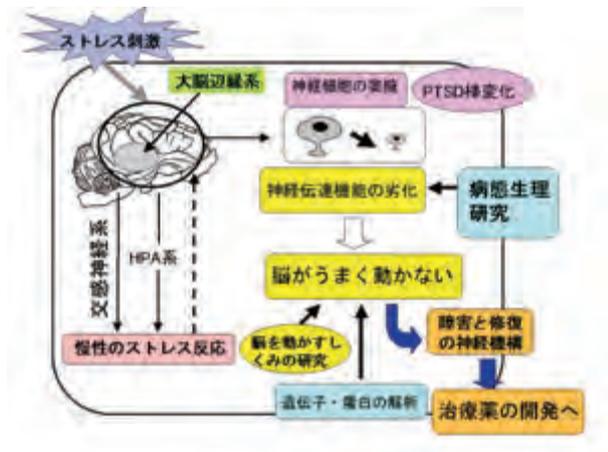


図1. 本研究の概略

## 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

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、麻酔ラットの分界状床核に興奮性アミノ酸を注入する、あるいはエンドトキシン投与によるグルココルチコイド分泌変化や心臓自律神経活動変化の測定・解析を進めている。また、脳の神経細胞やアストロサイト、ミクログリアの形態学的変化を合わせて解析している。

### 2) 大脳皮質由来の初代培養細胞に対する副腎皮質ホルモンの影響の解析

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、コルチコステロンやその誘導体をマウス大脳皮質由来の初代培養細胞に投与し、神経膠細胞の一つであるアストロサイトの数が減少することを確認した。アストロサイト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において、アストロサイトの機能障害が関与していることが考えられる。

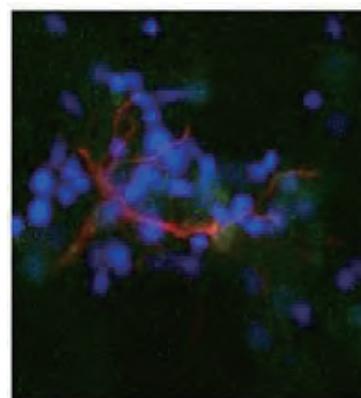


図1. マウス大脳皮質由来の初代培養細胞の蛍光顕微鏡像。神経膠細胞の一つであるアストロサイト(赤)の一部にグルココルチコイド受容体(緑)が共染している。

### 3) ミニブタの脳定位図譜の作成に向けた取組み

ブタはストレス感受性の高い動物として知られている。ブタの脳のサイズは比較的大きく、画像診断装置を利用してストレスの脳に対する影響を調べることが可能である。

正常な脳組織のデータを得るために、麻酔したミニブタを用いて、脳の CT・MRI 画像を撮影するとともに、ホルマリン灌流固定した脳から凍結切片を作製し、ニッスル染色および髄鞘染色を試みている。また、脳の基準面を設定し、画像と組織学における座標を統合した脳定位図譜の作成を進めている（自治医科大学、茨城県立医療大学との共同研究）。

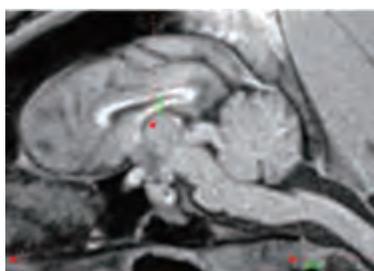


図 2. ミニブタ脳の MRI 像（矢状断断面像）



図 3. ミニブタ脳の髄鞘染色切片像（部分）

## 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 whether and how excitatory amino acids in the BNST may stimulate glucocorticoid secretion and may increase the heart rate. Influence of systemic administration of endotoxins has also been studied mechanisms to stimulate the HPA axis and to cause neuroinflammation.

#### **2) Investigation of influence of glucocorticoids on the primary cultured astrocytes**

We have used the primary culture of glial cells (astrocytes) 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 astrocytes have an important role for supporting activity of neuronal cells. Administration of corticosterone or its derivatives decreased number of the astrocytes in the primary culture.

#### **3) Stereotaxic atlas of miniature pig brain**

Pig is known to be sensitive to stressful stimuli. From the viewpoint of translational research on stress, this animal is valuable to examine influence of stress to the brain

morphology and function. Stereotaxic atlas is essential to the examination of the brain. Using miniature pig, we are making the stereotaxic map based on MRI data and anatomical data (Joint research with Jichi Medical University and Ibaraki Prefectural University of Health Sciences).

#### 4. 発表論文、著書など

なし

#### 5. 学会発表など

(学会発表)

Minami Ichikawa, Toshiyuki Saito. Influence of implantation of slow release corticosterone pellets on the hippocampal neuronal cells in C57BL/6 mice. The Joint Meeting of 120<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Kobe, 2015 March 21-23

Naoki Kawakita, Shinji Owa, Erika Fujita, Ryusuke Ono, Yusaku Miyawaki, Toshiyuki Saito, Tomoyuki Honda, Yoshii Nishino. Effect of corticosterone in the primary cultured neuron infected with Borna disease virus, The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, 2015 November 22-24

#### 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)-27年(延長)

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ドゥケーター

齋藤敏之：科学研究費委員会専門委員

##### 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



研究室メンバーとの集合写真

# 細菌学研究室

Laboratory of Bacteriology

准教授 染谷 梓

Assoc. 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、動物と人との間に入って病原体の受け渡し役を担っているマダニの疫学調査を実施し、これらのマダニが媒介する感染症が自然界でどのように維持されているのかを解明することをめざしている。また、食肉の流通現場における大腸菌の抗菌薬耐性について調査し、食肉を介し、動物と人との間でどのように耐性遺伝子が拡散していくのかを研究している。

## 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、調査地における優先種であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) とキチマダニ (*H. flava*) の季節消長を明らかにした。フタトゲチマダニは、5~6月に多数捕集された若虫が7月に成虫となり産卵し、孵化した幼虫が9月頃に捕集されたと考えられた。一方、キチマダニは、夏に孵化した幼虫が発育し、秋に若虫や成虫となって捕集されたと推測された。



図1 マダニの季節消長。色の濃い部分は、マダニが多数捕集されたことを示す。

これらのマダニから、日本紅斑熱の原因菌である *Rickettsia japonica* の PCR による検出を試みたところ、70%以上のマダニからリケッチアが検出された。検出された遺伝子断片の塩基配列解析の結果から、これらのマダニが保有するリケッチアの一部は、*R. japonica* と近縁である可能性が示された。今後は、これらのリケッチアの

病原性について詳細に解明するとともに、調査地には多数の野生動物が生息しているため、これらの野生動物が、マダニの生活環にどのように関与しているか検討していく。

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、公衆衛生上の問題となる。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。当研究室の調査により、食肉の流通現場から分離された大腸菌がアンピシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンなどの複数の薬剤に耐性を示し、耐性を示す薬剤のパターンには、検体の採取された場所により特徴があることが示された。また、アンピシリン耐性株において、耐性遺伝子であるβ-ラクタマーゼ遺伝子を検出し、この遺伝子が、由来の異なる検体に共通して存在することを明らかにした。今後はこの遺伝子の他の菌への伝達の可能性について検討するとともに、その他の薬剤における耐性メカニズムについて解明していく。

## 3. Research projects and annual reports

The microorganism exists in any places, and might threaten human and animal health. Zoonotic and food poisoning microorganism which can infect both animals and humans cause concern for public health.

Arthropods can transmit zoonotic pathogens such as spotted fever group rickettsiae. *Rickettsia japonica*, the etiological agent of Japanese spotted fever is also associated with arthropod vector, mainly ticks. Therefore, the prevalence of ticks in Kyoto was investigated. Ticks were collected weekly by flagging method and rickettsial DNA was detected by PCR. The rate of rickettsial infection depended on tick species.

The drug resistant bacterium in food processing can spread the drug resistance to commensal microflora in human. Therefore, susceptibility to antimicrobials in *Escherichia coli* isolated from slaughterhouse was investigated. *E. coli* isolated from the swab samples obtained from the barn which pigs and cattle were tied for slaughter were resistant to ampicillin, gentamicin, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline and showed multidrug resistance.

#### 4. 論文, 著書など

Someya, A., Ito, R., Maeda, A., Ikenaga, M. (2015). Detection of rickettsial DNA in ticks and wild boars in Kyoto City, Japan. *J Vet Med Sci.* 77:37-43.

Yoshii K, Okamoto N, Nakao R, Klaus Hofstetter R, Yabu T, Masumoto H, Someya A., Kariwa H, Maeda A. (2015). Isolation of the Thogoto virus from a *Haemaphysalis longicornis* in Kyoto City, Japan. *J. Gen. Virol.* 96(8):2099-103.

#### 5. 学会発表など

鈴木周、小園紗希、伊藤亜希、岡本奈津実、池永充宏、染谷梓、前田秋彦。京都市におけるマダニの季節消長およびリケッチアの検出。第67回日本動物衛生学会大会，金沢市，2015.3.28

佐々木創平、好井健太郎、岡本奈津実、中尾亮、染谷梓、前田秋彦。マダニからのThogoto virusの分離と解析。第50回日本脳炎ウイルス生態学研究会，京都市，2015.5.16

染谷梓、小園紗希、鈴木周、池永充宏、前田秋彦。京都市北部におけるマダニの季節消長およびリケッチアの検出。第158回日本獣医学会総会，十和田市，2015.9.8

脊戸優、佐々木創平、岡本奈津実、好井健太郎、中尾亮、染谷梓、前田秋彦。トゴトウイルスのゲノムRNAの解析とウイルス蛋白質発現の解析。第22回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会，福岡市，2015.11.21

#### 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

SAKURA Science Program

京都市立紫野高校高大連携授業「生物」



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、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。国内では、昨年 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、アヒルやマウスに対する病原性がこれまでに流行していた H5N1 亜型のウイルスに比べ比較的 low、カモ類に対する病原性の低く、拡散されたと考えられる。

## 3. Research projects and annual reports

Currently, outbreaks of highly pathogenic avian influenza and other emerging and re-emerging diseases have caused serious economical and social disturbances worldwide. To control these infections is the most important. Our research is focused on:

1: *The evolution and spread mechanism of pathogens such as avian influenza virus in nature.*

2: *Studies on the host range determinant in pathogens, mechanisms of pathogenesis and immune response of the hosts through in vivo and in vitro analyses of the host-parasite interactions.*

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

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. Fujimoto Y, Ozaki K, Iwamori N, Takakuwa H, Ono E.

Accumulation of a soluble form of human nectin-2 is required for exerting the resistance against herpes simplex virus type 2 infection in transfected cells. *Acta Virol.* in press

## 5. 学会発表など

1. Hiroki Takakuwa, Toshiyo Yabuta, yoshiki Kinoshita, takafumi amemori, Kosuke Soda, Tatsufumi Usui, Kozue Hotta, Le Mai, Tetsu Yamashiro, Hiroichi Ozaki, Hiroshi Ito, Tsuyoshi Yamaguchi, Toshiyuki Murase, Toshihiro Ito, Etsuro

- Ono, Koichi Otsuki. The characterization of avian influenza viruses isolated from wild birds in Vietnam from 2010 to 2014. 9th annual meeting of EPIZONE, Montpellier – France, 2015.8.31-9.3
2. Yoshikazu Fujimoto, Kinuyo Ozaki, Gen-Ichiro Uechi, Hiroki Takakuwa, Yukiko Tomioka, Toshiyo Yabuta, Haruka Suyama, Sayo Yamamoto, Masami Morimatsu, Toshihiro Ito, Koichi Otsuki, Mai Q. Le, Tetsu Yamashiro, Etsuro Ono. Anti-nucleocapsid protein antibody is sufficient to confer resistance to lethal infection with influenza A viruses of several subtypes in transgenic mice. 9th annual meeting of EPIZONE, Montpellier – France, 2015.8.31-9.3
3. 藤本佳万、尾崎絹代、上地玄一郎、高桑弘樹、富岡幸子、藪田淑予、陶山晴香、山本沙代、森松正美、伊藤壽啓、大槻公一、Le Thi Quynh Mai、山城哲、小野悦郎:抗ヌクレオカプシド蛋白質抗体のインフルエンザウイルス致死的感染回避における重要性. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 2015.11.22-24

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

感染症研究国際展開戦略プログラム

課題名:ベトナムにおける感染症制御研究・開発プロジェクト

研究代表者:森田公一, 取得年度:H27-31年(5年)

- 2) 知財権等 なし
- 3) 学外活動 なし
- 4) 受賞等 なし
- 5) その他 なし

# 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。

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.Sci.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。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している。また、日本全国の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。ピエダーテ地方の原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。

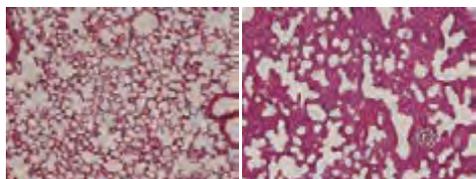
## 2. 本年度の研究成果

タバコ主流煙暴露による肺胞マクロファージの抗腫瘍活

性について検討した。喫煙により肺胞マクロファージの抗腫瘍活性の抑制が認められ、その抑制には喫煙による肺胞マクロファージのデスレセプター発現の抑制と TNF- $\alpha$  の産生抑制が関与していることが認められた。その結果、腫瘍細胞のレセプター経路によるカスパーゼの発現と活性が低下し、アポトーシスが抑制され、腫瘍細胞が生存し、喫煙により腫瘍増殖を促進することが解明された。また、喫煙により肺胞マクロファージの食食機能の抑制は、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、好中球の食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、食食作用を高め、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- $\beta$  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、好中球の走化因子である CXCL1 が産生されることが確認され、肺胞腔内に肺毛細血管からの好中球が誘導され、その結果肺炎を引き起こすことが示唆された。

### 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 $\beta$  and IL-6 mRNA expressions. Japanese honey enhanced IL-1 $\beta$  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

野瀬雅仁、竹内実 喫煙のアレルゲン吸入による肺胞マクロファージへの影響とアレルギー アレルギーの臨床、35(14) 49-53,2015

Xueting Lia, Min Xue, Otto G Raabe, Holly L Aaron, Ellen A Eisen, James E Evans, Fred A Hayes, Sumire Inaga, Abderrahmane Tagmout, Minoru Takeuchi, Chris Vulpe, Jeffrey I Zink, Subhash H Risbud, Kent E Pinkerton. Aerosol droplet delivery of mesoporous silica nanoparticles : A strategy for respiratory-based therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11: 1377-1385, 2015.

小池博嗣、山本理沙、富岡閏子、中野美穂、西川由美、林清音、松本真弓、駒由佳、中村嘉宏、脇本栄子、竹内実、藤野裕司 顕微授精法において精子濃度が胚発育成績に及ぼす影響一顕微授精法に関する検討一 日本受精着床学会雑誌、32(1):20-23,2015

田中美子、高崎摩依子、三輪奈緒子、高橋純一、竹内実 日本国産蜂蜜による好中球の走化活性に及ぼす影響 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第14巻、1-12, 2015

#### 5. 学会発表など

Naoko Miwa, Maiko Takasaki, Yoshiko Tanaka, Ayaka Kawazoe, Kazuma Sasaki and Minoru Takeuchi. Anti-tumor Activity of Neutrophil induced by Lipopolysaccharide (LPS). The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association , 8-10, October, 2015

Maiko Takasaki, Yuriko Hirono, Yoshiko Tanaka, Naoko Miwa, Masaaki Sakura and Minoru Takeuchi Effect of Cigarette Smoke Exposure on Anti-Tumor Activity in Alveolar Macrophage. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 8-10, October, 2015

Minoru Takeuchi, Yuriko Hirono, Maiko Takasaki, Yoshiko Tanaka Immunological pathogenesis of pulmonary inflammation by lipopolysaccharide (LPS) and anti-inflammation effect of honey in animals. 32nd World Veterinary Congress (WVC), Istanbul, 13-17 September, 2015.

M. Takeuchi, Y. Hirono, M. Takasaki, Y. Tanaka, Y. Tanahashi, M. Sakura. Cigarette smoke induces inhibition of immune functions and alteration of internal cell structure through the DNA damage in alveolar macrophage. 23rd European Conference on General Thoracic Surgery, Lisbon, 31 May - 3 June, 2015

Minoru Takeuchi, Yoshiko Tanaka, Eri Shigeyoshi, Maiko Takasaki, Masaaki Sakura and Kent E Pinkerton Anti-aging effect of honey mediated with activation of immune functions. 13th AMWC 2015, 25-28 March 2015, Monaco

Minoru Takeuchi, Yoshiko Tanaka, Eri Shigeyoshi, Maiko Takasaki, Masaaki Sakura. Effect of Honey on Antibody Production and Its Mechanism in Mice APCCN 2015, 26-29 January 2015, Kuala Lumpur

#### 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:喫煙による肺胞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

Pulmonology 雑誌編集委員, WJR 雑誌編集委員など

##### 3) その他

NHK名古屋「ほっとイブニング」に出演, 2015.3.3

読売テレビ「情報 net10」に出演, 2015.5.15

TBS「健康カプセル ゲンキの時間」に出演, 2015.7.12

テレビ東京「主治医が見つかる診療所」に出演, 2015.12.14

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(2015年9月5日)



## 薬理学研究室

Laboratory of Pharmacology

### 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M<sub>1</sub>からM<sub>5</sub>までの5つのサブタイプが同定されており、このうち、腸管平滑筋細胞にはM<sub>2</sub>とM<sub>3</sub>サブタイプが存在している。コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンがこれらの受容体を刺激すると、平滑筋細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)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[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は、細胞内ストアからのCa<sup>2+</sup>放出と電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルを介した細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入に由来する。このCa<sup>2+</sup>チャネルを介したCa<sup>2+</sup>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き、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、M<sub>2</sub>およびM<sub>3</sub>サブタイプやカハール細胞がそれぞれどのような役割を果たしているのか等、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、M<sub>2</sub>またはM<sub>3</sub>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。

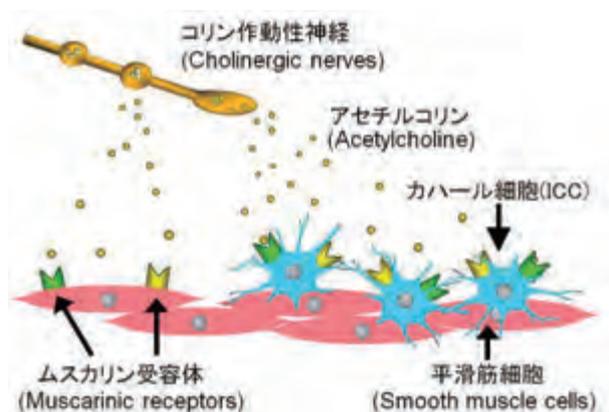


Figure 1. Regulation of gut motility by cholinergic nerves

#### (2) Ca<sup>2+</sup>透過性イオンチャネルの生理学的・病態生理学的役割

准教授 棚橋靖行

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



細胞内のCa<sup>2+</sup>は平常時、100 nM以下という非常に低い濃度に保たれている。細胞に様々な刺激が加わると、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が増加し、その結果、細胞の収縮、増殖、遊走、細胞死、神経伝達物質の放出など様々な細胞応答が惹起される。このように細胞内のCa<sup>2+</sup>は生理機能および病態に深く関与していることが知られている。この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加は、Ca<sup>2+</sup>ストアから細胞内へのCa<sup>2+</sup>放出と各種Ca<sup>2+</sup>透過性イオンチャネルを介した細胞外からのCa<sup>2+</sup>動員によってもたらされる。本研究課題は、TRPチャネル、Piezoチャネル、Oraiチャネルなどの各種Ca<sup>2+</sup>透過性イオンチャネルの薬理的性質、生理学的・病態生理学的役割を明らかにするものである。本研究はLeeds大学のProf. David J Beech研究室との共同研究として進めている。

### 2. 本年度の研究成果

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<sup>+</sup>(K<sub>ATP</sub>)チャネルの活性が抑制されることを明らかにしている。同抑制機構は陽イオンチャネルの開きとともに膜の脱分極に寄与していると考えられる。本年度は、同抑制機構における受容体以降の細胞内情報伝達機構を明らかにする目的で実験を行った。その結果、関与するG蛋白質のタイプ、Ca<sup>2+</sup>およびPLCに対する依存性の有無について明らかにした。

### 3. Research projects and annual reports

#### (1) Mechanisms of gastrointestinal motility.

It is well known that the motility of gastrointestinal tract is regulated by acetylcholine (ACh) released from cholinergic nerves, which act on the muscarinic receptors. The receptors have been classified into five subtypes including M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> and M<sub>5</sub>. In gastrointestinal smooth muscles, two subtypes of muscarinic receptor, M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub>, are found with no measurable quantities of other subtypes. As shown in Figure 1, stimulation of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> receptors by ACh increases in the intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, resulting in the smooth muscle contractions. The increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> results from Ca<sup>2+</sup> release from internal stores and Ca<sup>2+</sup> entry into the cell through L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> 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 M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> receptors and ICC in regulating the gut motility by ACh remain to be elucidated in detail. Therefore, we are addressing the above issue using the M<sub>2</sub> or M<sub>3</sub> muscarinic receptor knockout (KO) mice and ICC deficient mice.

Our previous studies indicated that muscarinic receptors can inhibit the activity of ATP sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels in small intestinal smooth muscle cells, which can contribute to the membrane depolarization in the myocytes. We identified the type of G proteins involved in the muscarinic suppression of K<sub>ATP</sub> channels in this year. We also investigated the Ca<sup>2+</sup> dependency and PLC dependency of the muscarinic suppression.

(2) Physiological and pathophysiological roles of Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channels.

Under normal conditions, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is kept very low (less than 100 nM). When cells are stimulated, the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is increased, resulting in various cellular responses such as contraction, proliferation, migration, cell death and release of neurotransmitters etc. The increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is induced by the Ca<sup>2+</sup> release from internal Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> entry into the cell through Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channels including TRP channels, piezo channels and Orai channels etc.. The aim of this study is to characterize the channels and to elucidate physiological and pathophysiological roles of them. In this study, we collaborate with Prof. David J Beech's Laboratory in University of Leeds.

#### 4. 論文, 著書など

該当なし

#### 5. 学会発表など

B. Wang, Y. Murakami, T. Unno, H. Matsuyama, S. Komori, Y. Tanahashi: The mechanism of M<sub>3</sub> muscarinic suppression of ATP sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels in mouse ileal smooth muscle cells. 第88回日本薬理学会年会, 名古屋市, 2015.3.18-20

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、Wess Jurgen、小森成一、海野年弘: M<sub>2</sub>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42回日本神経内分泌学会第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会, 仙台市, 2015.9.18-19

#### 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:

i. 担当講義: 動物医科学概論、化学通論 A、薬理学・毒性学

ii. 附属高校2年生接続授業 KSU サイエンス講座 生物 動物生命医科学科「腸管の機能の謎にせまる！」(2015.7.24)

iii. 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(2015.8.2)

iv. 在外研究員(2015.9.1~): 棚橋は本学学外研究員制度を利用して、Leeds 大学の Prof. David J Beech 研究室に在籍し、研究を行っている。

# ウイルス学研究室

Laboratory of Virology

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino,

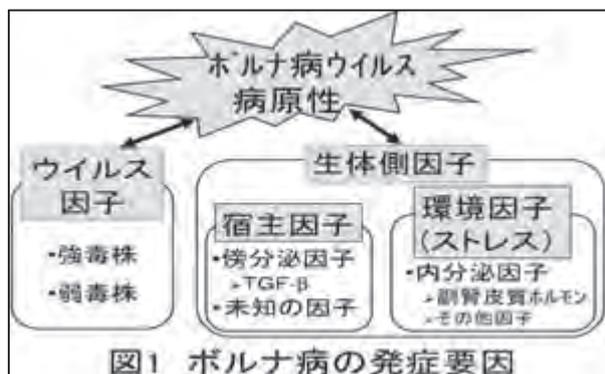
DVM, Ph.D



## 1. 研究概要

私達は多くの微生物に囲まれて生きている。ウイルスは微生物の一員であるが、自己複製のために必要な最小限度の遺伝子しか持たないため、動物や植物に寄生し、宿主細胞内の小器官を拝借して増殖する。その結果、寄生した細胞の破壊、細胞機能の障害といった直接的な障害、あるいはウイルス抗原を発現した感染細胞が宿主免疫応答から「異物」と認識されて排除されたり、サイトカイン等の液性因子の産生が誘導されるなどの間接的な障害を引き起こされる。このような感染個体における様々な影響を発症(病)と呼ぶ。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効果的な化学療法剤に限られるために治療法が困難な場合が多い、いわゆる「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って研究を行っている。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。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の解析(運動障害と行動学的異常)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

「BDV感染グリア細胞におけるTGF-βファミリー関連遺伝子の発現とその影響」

ボルナ病ウイルス(BDV)は感染動物に運動障害、行動学的異常あるいは感覚異常といった多様な神経疾患を引き起こすが、その発症メカニズムは明らかにされていない。グリア細胞で BDV-P タンパク質を強制発現するマウスは行動学的異常を示すことが報告されていることから、ウイルス感染したグリア細胞には発症に関わるような異常が起こっている可能性がある。また、私達は BDV 感染したラットの脳で TGF-β ファミリー関連遺伝子の発現レベルが変化することを報告している。本研究では、BDV が持続感染したグリオーマ株化細胞(C6BV 細胞)における TGF-β ファミリー関連遺伝子の発現レベルとシグナル伝達経路の阻害効果について解析した。

その結果、C6BV 細胞では inhibin/activin βA と BMP7 の遺伝子発現が著しく上昇し、inhibin/activin βE は著しく減少していた。内因性 TGF-β ファミリー活性を反映していると考えられる Smad7 の遺伝子発現量は、BDV 感染によって上昇し、TGF-β/activin および BMP 経路のそれぞれの阻害剤により抑制されることが明らかになった。BDV 感染によって上昇した TGF-β ファミリー活性が何をしているのかを探るために、BDV 感染によって発現上昇することが知られている IGFBP-3 の発現を調べたところ、BMP 経路の阻害剤によって抑制された。

以上から、C6 グリア細胞では BDV 感染によって確かに TGF-β ファミリー活性は変動すること、内因性の activin/TGF-β 活性を引き起こす因子として activin A が、BMP 活性として BMP7 が考えられた。さらに、BDV 感染によってグリア細胞に誘導された BMP7 発現は自身に作用して IGFBP-3 発現を誘導する可能性が示された。TGF-β ファミリーが多様な生理学的・病理学的反応に関与していることは、よく知られている一方、病原微生物感染時の TGF-β ファミリーの動態ならびに関与については、多くが不明である。今後は、BDV 感染の何が TGF-β ファミリーの活性変化をどのように引き起こすのか、BDV 感染によって惹起された BMP 活性が IGFBP-3 遺伝子発現をどのように亢進するのか、検討が必要である。

## 3. Research projects and annual reports

A previous study revealed that the expression of the Borna disease virus (BDV)-encoding phosphoprotein in glial cells was sufficient to induce neurobehavioral abnormalities resembling Borna disease. To evaluate the involvement of the TGF- $\beta$  family in BDV-induced changes in cell responses by C6 glial cells, we examined the expression levels of the TGF- $\beta$  family and effects of inhibiting the TGF- $\beta$  family pathway in BDV-infected C6 (C6BV) cells. The expression of activin  $\beta$ A and BMP7 was markedly increased in BDV-infected cells. Expression of Smad7, a TGF- $\beta$  family-inducible gene, was increased by BDV infection, and the expression was decreased by treatment with A-83-01 or LDN-193189, inhibitors of the TGF- $\beta$ /activin or BMP pathway, respectively. These results suggest autocrine effects of activin A and BMP7 in C6BV cells. IGFBP-3 expression was also induced by BDV infection; it was below the detection limit in C6 cells. The expression level of IGFBP-3 was decreased by LDN-193189 in C6BV cells, suggesting that endogenous BMP activity is responsible for IGFBP-3 gene induction. Our results reveal the regulatory expression of genes related to the TGF- $\beta$  family, and the role of the enhanced BMP pathway in modulating cell responses in BDV-infected glial cells.

#### 4. 論文, 著書など

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. Mol. Integr. Physiol.** 185:142-149, 2015.

#### 5. 学会発表など

西野佳以: ウイルスの基礎と診断法、持続感染する神経ウイルスの紹介。第7回 ELBION技術研究会、2015.11.13 (京都市) (招待講演)

河北尚輝、大和慎治、小野隆祐、宮脇勇作、本田知之、齋藤敏之、西野佳以: ボルナ病ウイルス感染神経細胞初代培養における副腎皮質ホルモンの影響。第8回日本ボルナウイルス研究会、2015.3.24(京都市)

西野佳以、河北尚輝、大和慎治、小野隆祐、宮脇勇作、本田知之、齋藤敏之: ボルナ病ウイルス感染初代神経培養細胞における副腎皮質ホルモンの影響。第158回日本獣医学会、2015.9.7-9 (十和田市)

Yoshii Nishino, Masaru Murakami, Masayuki Funaba: Expression and role of the TGF- $\beta$  family in glial cells infected with

Borna disease virus. 第63回日本ウイルス学会、2015.11.22-24 (福岡市)

河北尚輝、大和慎治、藤田英里香、小野隆祐、宮脇勇作、齋藤敏之、本田知之、西野佳以: ボルナ病ウイルス感染初代神経培養細胞におけるコルチコステロンの影響。第63回日本ウイルス学会、2015.11.22-24 (福岡市)

#### 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

該当なし

##### 3) 学外活動

- ・日本ボルナウイルス研究会、副会長
- ・日本獣医学会、評議委員

##### 4) 受賞等

該当なし

##### 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1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」、2015.6.22)のコーディネーター

第8回日本ボルナウイルス研究会主催 (鳥インフルエンザ研究センター共催)、2015.3.24 (京都産業大学)



研究室旅行

# 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

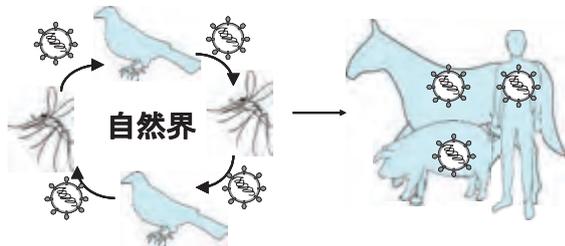


図 1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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および立命館大学の中谷友樹准教授と同大博士研究員の米島万有子さん、麻生大学の二瓶直子客員研究員、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ら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かんせんしょう病原体を動物から人に媒介する。媒介する病原体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。本年度は、京都市内で蚊やマダニを採取し、古典的な形態学的鑑別法に従って同定した。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 年にわたしたちのけんきゅうしつで京都市北区で分離したトゴトウイルス（THOV Kamigamo HL-25 株）の新規抗体検出法を作製した。

(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 細胞への感染様式を分子生物学的、細胞生物学的に詳細に解析した。ウイルス感染の初期では、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、ウイルスの粒子形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

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 zoonotic micro-organisms. Especially, we focus on viruses, which cause 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. Although some diseases are not in Japan, it is also urgent to develop detection and prevention system for the diseases.

Our main research themes are: (1) Epidemiological study on mosquito- and tick-borne diseases in Kyoto city, and development of new diagnostic and vaccine protocols for vector-borne diseases, and, (2) Molecular biological studies on mosquito- and tick-borne pathogens.

#### Annual reports

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

We continued to capture 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 mosquitoes. As the results, no evidence of 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 captured many ticks, and tried to detect pathogens within ticks. We detected several viruses by reverse transcription polymerase chain reaction. We also developed new serological detecting protocols for Kamigamo HI-25 strain of Thogoto virus (THOV), which we isolated in Kyoto City, 2013, using protein A/G.

- (2) Molecular biological studies on mosquito- and tick-borne pathogens

In this year, we completed the sequence of the virus. And we characterized the mechanism of THOV infection to Vero E6 cells. In early stage of infection of THOV, the viral polymerase proteins and replication-related proteins, NP, were produced and located within the cell nucleus. In the late stage of THOV infection, viral structural proteins were produced and located within the cell cytoplasm. These results clearly showed the process of THOV replication in cultured cells.

#### 4. 論文, 著書など

K. Yoshii, N. Okamoto, R. Klaus Hofstetter, T. Yabu, H. Matumoto, A. Someya, H. Kariea, A. Maeda: Isolation of the Thogoto virus from a *Haemaphysalis longicornis* in Kyoto City, Japan. *J. Gen. Virol.* 96, 2099-2103

前田秋彦: ダニ媒介性感染症. *健康教室*. 東山書房 pp18-21 (総説)

#### 5. 学会発表など

脊戸優, 佐々木創平, 岡本奈津実, 好井健太郎, 中尾亮, 染谷梓, 前田秋彦: トゴトウイルスのゲノム RNA とウイルス蛋白質発現の解析. 第 22 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 博多, 2015.10.21

前田秋彦: 日本における、蚊およびマダニ媒介性感染症. 平成 27 年度 動物感謝デー in Kyoto, 京都, 2015.10.18 (シンポジウム)

前田秋彦: デング熱ならびに蚊媒介感染症. 京都府「感染症に関する保健所、市町村等への研修会」, 京都, 2015.7.23 (招待講演)

前田秋彦: デング熱など蚊媒介感染症. 京都府「感染症に関する医療関係者研修会」, 京都, 2015.6.18 (招待講演)

佐々木創平, 好井健太郎, 岡本奈津実, 中尾亮, 染谷梓, 前田秋彦: マダニからの Thogoto virus の分離と解析. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 京都, 2015.5.15-16

前田秋彦: 身近に潜むマダニ由来感染症. 平成 26 年度 京都産業大学総合生命科学部シンポジウム, 京都, 2015.3.5 (シンポジウム)

#### 6. その他特記事項

- 1) 学外活動

前田秋彦: 日本バイオセーフティー学会会誌編集委員

前田秋彦: 日本脳炎ウイルス生態学研究会評議員



# 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利用による、肥満に伴う2型糖尿病原因遺伝子同定

今年度はNidd2, Nidd4, Nidd6の各糖尿病原因遺伝子座導入コンジュニック系統と肥満コンジュニック系統とのF1を作成に引き続き、F1同志を交配してF2を作成を行った。生まれてくる子供はすべて糖尿病遺伝子領域の遺伝子マーカー、ならびに肥満遺伝子マーカーを利用して、遺伝子型を決定し、その遺伝子座領域内での組換えの生じていないことを確認した。実際に作成、利用するダブルコンジュニック系統は予定の糖尿病遺伝子座全領域が入っており、かつ肥満遺伝子が劣性ホモになっている個体が選別された。

それらダブルコンジュニック系統の血糖値の検査をOGTTにて行った。肥満コントロールラットは、F344ラットと比較して50mg/dL程度高い血糖値を示し、肥満による影響を確認した。一方、その肥満ラットにNidd2, Nidd4, Nidd6の各糖尿病遺伝子を導入したダブルコンジュニックラットのOGTT結果は、OGTT60分値で、Nidd2-leprラットは肥満コントロールラットよりさらに100mg/dLも高い高血糖値を示し、さらにOGTT120分での血糖値は200mg/dLを超えており、明らかな糖尿病状態を示した。

このことから、Nidd2遺伝子座領域には肥満に伴い血糖値を異常に上昇させる遺伝子が存在することが確認された。一方、Nidd4-leprラットは肥満F344ラットとほぼ同じ血糖値であり、Nidd4遺伝子座は高血糖に関与していないことが判明した。また、Nidd6-leprラットでのOGTT結果は、Nidd2-leprと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同定を行った。Real Time PCRにてNidd2コンジュニック系統の導入遺伝子座領域に含まれる遺伝子をデータベースで抽出し、それら遺伝子、約130遺伝子についてのプライマー設計について検討し、その一部を作成し、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同様の方法で比較検討したところ、二つの原因遺伝子が同定された。

### 糖尿病に及ぼすハチミツの影響

ハチミツが健康食品の一つとして広く利用されていることから、糖尿病患者さんにもハチミツが良い効果をもたらすと、一部では信じられている。しかし、糖尿病の専門医の先生はそのことに関しては懐疑的である。なぜなら、ハチミツは主としてブドウ糖と果糖から構成されており、体内に入れば砂糖などと同じことになると考えるからである。ただ、両者とも実験データの無い議論となっている。

従って今年度はまずハチミツの糖尿病への効能について、遺伝的に均質な肥満性糖尿病マウスを使用し、ハチミツの長期投与による影響を調べ、ハチミツの長期使用で肥満や血糖値にどのような影響が出るかを検討した。その結果、単花蜜であるアカシアハチミツ、クリハチミツに関しては糖尿病マウスに対しても血糖値を初期値とほぼ同じで、砂糖のように高血糖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。しかしながらインスリン感受性やインスリン抵抗性には、RJ は全く影響を与えていなかった。ではなぜ、肥満抑制や血糖値降下を示したのか、その分子メカニズムを調べた。インスリン抵抗性が改善されていないことから、肥満や糖新生系の遺伝子、タンパク発現を比較したところ Adiponectin、AdipoR1、AMPK の有意な増加、G6Pase の有意な減少が見られた。このことから RJ は糖新生系に作用し、グルコース放出を抑制することにより、血糖値降下につながったと考えられる結果を得た。

### 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.

The double congenic strain, F344-*fa-nidd2* (*Lepr*<sup>-/-</sup> and *Nidd2/of*) showed significantly higher glucose levels, and significantly lower hypoglycemic response to insulin than those of the obese control strain, F344-*fa* (*Lepr*<sup>-/-</sup>). These phenotypes were observed specifically in the obese strains, but not in the lean strains. These results indicate that the *Nidd2/of* locus harbours a diabetogenic gene associated with obesity. We measured the expression of 60 genes in the *Nidd2/of* QTL region between the strains and found that the levels of the mRNA expression of five genes were significantly different between the strains under condition of obesity. However, three genes among the five genes were differentially expressed both in obese and lean rats, indicating that these genes were not specific for the condition of obesity. While the other two genes, *Coq2* and *Plac8* were differentially expressed specifically only in the obese rats, suggesting that these two genes are candidates for the onset of type 2 diabetes associated with obesity in rats.

#### 4. 発表論文(2015 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. Jvol.* 2015, Article ID 758564, 8 pages, 2015.
2. Modifications of azoxymethane-induced carcinogenesis and 90-day oral toxicities 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), 99-107, 2015 .
3. New animal models reveal that coenzyme Q2 (*Coq2*) and placenta-specific 8 (*Plac8*) are candidate genes for the onset of type 2 diabetes associated with obesity in rats. Sasaki, D., Kotoh, J., Watadani, R., and Matsumoto, K. *Mammalian genome* 26, 619-629, 2015

DOI 10.1007/s00335-015-9597-4

#### 5. 著書および総説(2015 年度分)

無し

#### 6. 招待講演、シンポジウム等(2015 年度分)

無し

#### 7. 学会発表(2015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 回生へ特別講義を数回行う。また、実技練習を毎週 2 ~ 3 回、ほぼ 2 月にわたって実施、指導する。17 名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、マウス由来の培養株化系球体濾過細胞(ポドサイト:a mouse kidney podocyte cell line: CLS Cell Line 社)を用いて、メラミン、シアヌル酸、およびメラミンシアヌレート(メラミンとシアヌル酸の化合物)の暴露による細胞への様々な影響を *in vitro* 実験で検証した。今回用いた指標は細胞活性(MTT 色素還元法)、細胞形態(クリスタルバイオレット染色標

本の光学顕微鏡観察)およびアポトーシス/ネクローシスの有無(TUNEL 法および蛍光色素取り込み像の観察)である。

メラミンおよびシアヌル酸は 1000  $\mu\text{g/ml}$  で最長 96 時間の暴露でもポドサイトの細胞には目立った影響を及ぼさなかった。一方、メラミンシアヌレートは、ある濃度(今実験では 250  $\mu\text{g/ml}$  以上)で極短時間暴露するだけでポドサイトに細胞活性の減少やアポトーシスの出現などの障害を与えることが確認された(図1)。また、さらに低濃度(125  $\mu\text{g/ml}$  以下)でも、長時間の暴露により、メラミンシアヌレートは高濃度暴露時と同様の細胞障害作用を示した(図2、3)。

これらの *in vitro* 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広範囲の濃度で細胞の機能を障害する可能性が示唆された。*In vivo* での障害機序については、今後の検討課題であるが、その解明には今回の *in vitro* 知見が寄与できると考えている。

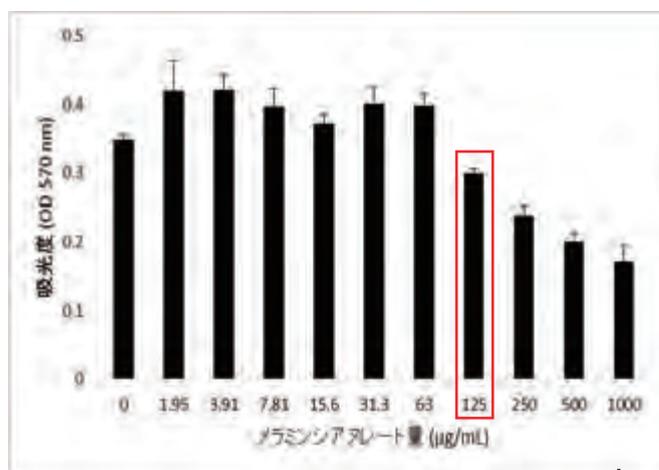


図1 メラミンシアヌレートによるポドサイト活性への影響  
メラミンシアヌレートの極短時間暴露がポドサイト活性に与える影響を MTT 色素還元法で判定した。ある濃度以上では暴露刺激を与えただけで細胞活性が濃度依存的に抑制された。暴露濃度が 125 $\mu\text{g/mL}$ (赤枠)及びそれ以下では細胞活性に影響がみられなかった。しかし、その濃度でも、長時間暴露により、メラミンシアヌレートの細胞障害性が確認された(図2、3を参照)。(加島原図)

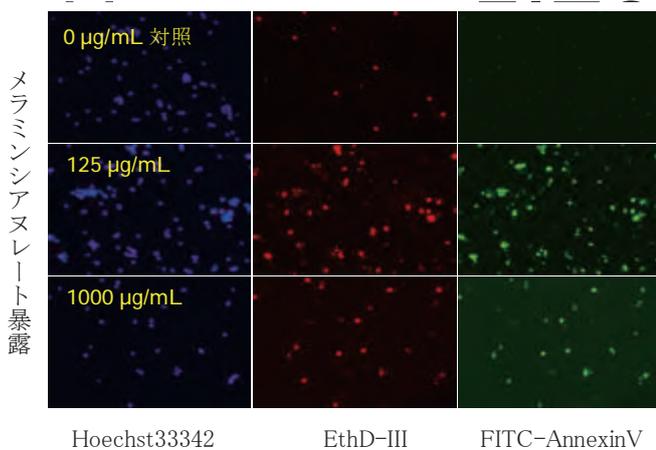


図2 メラミンシアヌレート暴露ポドサイトの蛍光色素染色像  
メラミンシアヌレートに48時間暴露した群(中および下段)には後期アポトーシス細胞が多いと判定された(同一の細胞が全色素に染まっているため)。蛍光色素:青はHoechst33342、赤はEthD-III、緑はFITC-AnnexinV(加島原図)

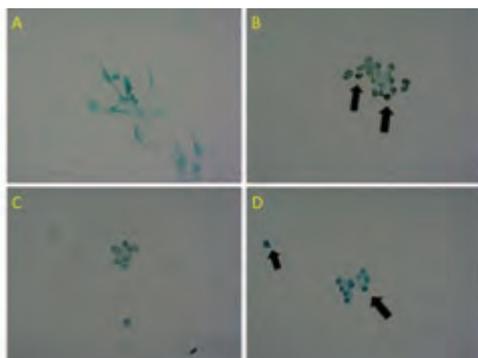


図3 メラミンシアヌレート暴露により誘導されたポドサイトのアポトーシス像(TUNEL法、Dの矢印)。A:対照 B:陽性対照 C:陰性対照 D:メラミンシアヌレート125 $\mu\text{g/ml}$ に48時間暴露されたポドサイト(加島原図)

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 mouse podocytes:

Treatments with melamine or cyanuric acid alone did not induce any significant difference on podocyte parameters. In contrast, melamine-cyanurate supplementation significantly affected the cell activity.

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

加島圭悟:メラミン及びメラミン関連物質がポドサイトに与える影響の *in vitro* 解析。京都産業大学大学院生命科学研究科 平成27年度修士論文

### 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運営委員

3) その他

- ・学会賞受賞:The 2015 Award for Excellence in Reviewing for Animal Science Journal in 2014 (日本畜産学会)
- ・栄養衛生学研究室の構成員(2016年3月現在)



大学院(修士)生 1名 学部4年生 5名 学部3年生 6名

## 2015 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、定期的に春、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。定期的以外にも臨時に適宜、教育訓練が開催されています。2015年度は、定期開催としては、春学期は4月8日に開催され、8名、秋学期は今年度は日程の都合上、夏休み前の7月18日（1日2回開催）に開催され、119名の参加者がありました。それ以外に臨時開催として、3回開催され、7月2日は20名、9月10日は8名、10月30日は3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。2015年度は、2月8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120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。供養の後、ご住職よりご説法がありました。

### 動物慰霊祭風景



**2016年**  
**総合生命科学部**  
**研究トピック**

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)  |
|------------|--------|--|--|
| 2015.01.16 | 生命資源環境 |  | 第35回植物バイテクシンポジウム(京都植物バイテク談話会、京都産業大学植物ゲノム科学研究センター共催)開催  |
| 2015.02.04 | 動物生命医科 | 種子野 章氏(ワクチノーバ株式会社代表取締役社長 獣医学博士)  | バイオフォーラム「動物ワクチン世界の将来」(世話人:高桑 弘樹)   |
| 2015.02.23 | 動物生命医科 | 田中 正嗣氏(東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長)  | バイオフォーラム「百寿者ゲノム多型研究と自分ひとりの代謝研究」(世話人:加藤 啓子)   |
| 2015.03.05 | 学部全体   | 講演<br>高崎 智彦氏(国立感染症研究所 ウイルス第一部室長)<br>「地球環境の変化とデング熱流行」<br>徳井 忠史氏(元農林水産省家畜衛生試験場 海外伝染病研究部部長)「口蹄疫について」<br>前田 秋彦教授(動物生命医科学科)「身近に潜むマダニ由来感染症」<br>安田 二郎氏(長崎大学 熱帯医学研究所 新興感染症学分野教授)「エボラウイルスとエボラウイルス病」                       | 学部シンポジウム「しのび寄る感染症の今を識る」(動物生命医科企画運営)  |
| 2015.04.16 | 生命システム | Dr. Laurent Désaubry, CNRS Research Director CNRS-Strasbourg University, France  | バイオフォーラム「Development of novel anticancer agents that target prohibitins and the translation in initiation factor eIF4 a」(世話人:中田博)                            |
| 2015.04.22 | 生命システム | 第1部<br>Dr. Shoshana Bar-Nun Tel Aviv University(Israel)<br>Proteostasis and Aging<br>第2部<br>Dr. Richard I. Morimoto Northwestern University(USA)<br>The Biology of Proteostasis: Challenges of Aging and Disease | バイオフォーラム<br>「第1部The Biology of Proteostasis: Challenges of Aging and Disease<br>第2部Proteostasis and Aging」(世話人:永田 和宏)  |
| 2015.06.02 | 生命資源環境 |  | 分子生態学セミナー「Impact of excess pyrophosphate on plant metabolism and development: New functions of an old player」(世話人:高橋純一)                                      |
| 2015.06.03 | 生命資源環境 | 朽津 和幸教授(東京理科大学 理工学部 応用生物科学科)   | バイオフォーラム「活性酸素・Ca <sup>2+</sup> シグナルネットワーク、オートファジーによる植物の免疫・発生・生殖の制御」(世話人:木村 介介)   |
| 2015.07.08 | 生命資源環境 | 武藤 望生氏(総合地球環境学研究所プロジェクト研究推進支援員)  | 第2回分子生態学セミナー&ワークショップ/バイオフォーラム「クニマスの保全生態学」(世話人:高橋純一)  |
| 2015.10.18 | 動物生命医科 |  | 平成27年度 動物感謝デー in KYOTO 開催  |
| 2015.11.13 | 動物生命医科 | 堀口 安彦教授(大阪大学微生物病研究所)   | バイオフォーラム「なぜ百日咳はヒトだけに感染して激しい咳を起こすのか? -百日咳とブタ萎縮性鼻炎の類縁原因菌と病原因子-」(世話人:加藤 啓子)   |
| 2015.11.26 | 生命システム | Prof. Tom A. Rapoport (米ハーバード大学)   | バイオフォーラム「Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms」(世話人:遠藤斗志也)  |
| 2015.11.30 | 生命システム | 古川 潤一特任助教(北海道大学大学院先端生命科学研究院)   | 生命科学セミナー「『総合グライコミクス』による細胞のキャラクタリゼーションと細胞マーカーの探索」(世話人:永田 和宏)  |
| 2015.12.4  | 生命資源環境 | 藤本龍准教授(神戸大学大学院農学研究科)   | バイオフォーラム「アブラナ科植物の雑種強勢の遺伝学的(ジェネティック)・後成遺伝学的(エピジェネティック)解析」(世話人:河邊昭)  |
| 2015.12.05 | 生命システム | 第1部<br>Prof. Chris Meisinger (Freiburg University, Germany)<br>第2部<br>瀬崎博美博士(米ジョンズホプキンス大学)   | バイオフォーラム<br>「第1部 Mitochondrial machineries for import and assembly of proteins」<br>第2部 ミトコンドリア分裂の分子機構 (Mechanisms of Mitochondrial Division)」<br>(世話人:遠藤斗志也) |
| 2015.12.11 | 生命資源環境 | 成宮 周特任教授(京都大学医学研究科)  | バイオフォーラム「私のRho GTPase研究: C3酵素の発見から現在まで」(世話人:津下英明)  |

研究トピックス(2): その他の大学ホームページ(HP)に掲載されたトピックス

| HP掲載月 | 関係学科   | 関係者   | トピック内容  |
|-------|--------|---|---|
| 1     | 生命システム |   | リエゾンオフィス主催シンポジウムにて、総合生命科学部 永田 教授らが講演  |
| 1     | 動物生命医科 |   | 難関！実験動物一級技術者の資格認定試験に 動物生命医科学科3年生の18名が合格!!   |
| 3     | 生命資源環境 |   | 第2回 生命資源環境学科 卒業研究発表会開催  |
| 3     | 生命資源環境 | 小林秀丈*(広島国際大学薬学部)、吉田徹*(京都産業大学総合生命科学部)、宮川拓也*(東京大学大学院農学生命科学研究科)、田代充(明星大学工学部)、岡本敬の介(岡山大学薬学部)、山中浩泰(広島国際大学薬学部)、田之倉優(東京大学総合生命科学部)、津下英明***(京都産業大学総合生命科学部)<br>(*同等貢献 **責任著者) | 津下英明教授と吉田徹研究員と広島国際大学、東京大学等の共同研究グループの研究が『Journal of Biological Chemistry』に掲載されました<br>掲載論文名<br>“Structural basis for action of the external chaperone for a propeptide-deficient serine protease from <i>Aeromonas sobria</i> ”<br>Journal of Biological Chemistry (JBC) doi:10.1074/jbc.M114.622852  |
| 3     | 学部全体   |   | 第2回 ミツバチ産業科学研究センター 研究会開催報告  |
| 3     | 生命システム | 千葉(下川)直美(京産大)、熊崎薫(東大)、塚崎智也(奈良先端大)、瀧木理(東大)、伊藤維昭(京産大)、千葉志信(京産大)   | 千葉志信准教授、千葉直美研究員らが東京大学、奈良先端大学との共同研究によりタンパク質膜組込装置YidCがもつ重要な性質を明らかにしました<br>本研究成果は、2015年4月8日付で、米国雑誌The Proceedings of the National Academy of Sciences USA(米国科学アカデミー紀要)のオンライン版に掲載されました。<br>掲載論文名<br>“Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein”(YidCの作る局所的親水性環境がチャンネル非依存的な膜組込機能に重要な役割を果たす)<br>doi: 10.1073/pnas.1423817112 |
| 3     | 動物生命医科 |   | 加藤 啓子 教授 マウス実験において「食事に含まれる油脂の種類が変わると、不安行動や恐怖記憶も変わる」ことを発見<br>本研究成果は、2015年3月23日付けで、学術誌PLOS ONEに掲載されました。<br>・掲載論文<br>Differential effects of dietary oils on emotional and cognitive behaviors<br>PLOS ONE (2015) DOI: 10.1371/journal.pone.0120753  |
| 4     | 生命システム | Daniel Sohmen(ミュンヘン大学)、千葉志信(京産大)、千葉(下川)直美(京産大)、C. Axel Innis(ボルドー大学)、Otto Berninghausen(ミュンヘン大学)、Roland Beckmann(ミュンヘン大学)、伊藤維昭(京産大)、Daniel N. Wilson(ミュンヘン大学)       | 千葉志信准教授らが、国際共同研究によりタンパク質合成分装リボソームと新生タンパク質との相互作用の詳細を解明<br>本研究成果は、2015年4月23日付で、英国雑誌「Nature Communications」にオンライン掲載されました。<br>掲載論文名<br>“Structure of the <i>Bacillus subtilis</i> 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling”(枯草菌70Sリボソームの構造から見えてきた種特異的翻訳停止の分子基盤)   |
| 4     | 生命システム |   | 総合生命科学部 永田和宏教授が「第13回日本歌人クラブ評論賞」を受賞  |
| 4     | 生命システム |   | 永田教授、遠藤教授、千葉准教授らの論文が「ネイチャー」年間論文掲載ランキング国内私立大学で1位に！   |
| 5     | 学部全体   |   | 平成27年度 総合生命科学部奨励金授与式を挙行了しました  |
| 6     | 生命資源環境 | Akiyuki Toda, Toshiharu Tsurumura, Toru Yoshida, Yayoi Tsumori and Hideaki Tsuge  | 津下英明教授のグループがRhoA特異的ADPリボソール化酵素C3とRhoA複合体の結晶構造解析に成功<br>“Rho GTPase Recognition by C3 Exoenzyme Based on C3-RhoA Complex Structure.”<br>Journal of Biological Chemistry 2015 Jun 11. pii: jbc.M115.653220.  |
| 6     | 生命資源環境 |   | 対馬に侵入した侵略的外来種ツマアカスズメバチの侵入経路を大学院生の高橋稜一(修士課程1年)さんが特定に成功しました   |

|    |        |   |   |
|----|--------|---|---|
| 7  | 生命システム |   | 板野研究室のオントン・パーワレドさんが、日本がん転移学会で優秀ポスター賞を受賞   |
| 8  | 生命システム | Sean Porazinski (バース大学)、Huija Wang (バース大学)、浅岡 洋一 (東京医科歯科大学)、Martin Behrndt (Institute of Science and Technology Austria)、宮本達雄 (広島大学)、Hitoshi Morita (IST Austria)、梶山治 (東京医科歯科大学)、佐々木貴史 (慶応大学)、S. F. Gabriel Krens (IST Austria)、長田優美 (ERATO近藤プロジェクト)、浅香聡 (東京医科歯科大学)、桃井章裕 (ERATO近藤プロジェクト)、Sarah Linton (バース大学)、Joel B. Miesfeld (ウイスコンシン大)、Brian A. Link (ウイスコンシン大)、千賀威 (名古屋大学)、Atahualpa Castillo-Morales (バース大学)、Araxi O. Urrutia (バース大学)、清水信義 (慶応大学)、Hideaki Nagase (オックスフォード大)、松浦伸也 (広島大学)、Stefan Bagby (バース大学)、近藤寿人 (京産大、ERATO近藤プロジェクト)、仁科博史 (東京医科歯科大学)、Carl-Philipp Heisenberg (IST Austria)、古谷-清木 誠 (バース大学、ERATO近藤プロジェクト) | 近藤寿人教授らが、ERATOプロジェクトを発展させた国際共同研究により、組織の形態形成の新たな制御機構を解明<br>本研究成果は、2015年5月14日刊行の英国雑誌「Nature」に掲載されました。<br>掲載論文名<br>「YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape」(YAPの作用は、組織に張力を発生させて、脊椎動物の体の3次元構造を保つのに必要である)  |
| 8  | 生命システム | 渡邊 康紀(京都産業大学)、田村 康(山形大学)、河野 慎(京都産業大学)、遠藤 斗志也(京都産業大学)  | 遠藤斗志也教授らがミトコンドリア外膜から内膜へリン脂質分子を輸送するタンパク質 Ups1-Mdm35複合体の立体構造及び脂質輸送メカニズムを初めて解明<br>本研究成果は、2015年8月3日に英国科学誌「Nature Communications」に掲載されました。「Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria」(Ups1-Mdm35によるリン脂質輸送に関する構造と機構の理解)  |
| 8  | 生命システム | ジェニン・カーステン*#、森戸大介#、垣花太一#、杉原宗親、アナタ・ミネン、マーク・ヒップ、カーメン・ナスバム・クレマー、ウーリッヒ・ハートル*、永田和宏*、リチャード・モリモト*(#責任著者、#筆頭著者)   | 永田和宏教授、森戸大介主任研究員らが老化・神経変性疾患に関する新たな共通メカニズムを発見<br>掲載論文名<br>Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments(老化・神経変性疾患の新たな共通メカニズム-老化・疾患では小胞体レドックスバランスが損なわれる-)   |
| 8  | 生命システム | 【筆頭著者、2責任著者】:塩田拓也1、神谷恵、遠藤斗志也2(名古屋大学、京都産業大学)塩田拓也1、Victoria L. Hewitt、Kshersing Tan、Hsin-Hui Shen、Trevor Lithgow2(オーストラリア・モナシュ大学)今井賢一郎、崎山則征、深沢嘉紀、富井健太郎、Paul Horton(産業技術総合研究所)Jian Qiu、Nils Wiedemann、Nikolaus Pfanner(ドイツ・フライブルグ大学)Sikander Hayat、Arne Elofsson(スウェーデン・ストックホルム大学)   | 【Science 掲載】遠藤斗志也教授らがミトコンドリアの膜透過装置TOM複合体の相互作用地図の作成により、タンパク質搬入口として働く仕組みを解明<br>本研究成果は、2015年8月3日に英国科学誌「Nature Communications」に掲載されました。<br>掲載論文名<br>「Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria」(Ups1-Mdm35によるリン脂質輸送に関する構造と機構の理解)   |
| 9  | 生命システム |   | 総合生命科学部 永田 和宏教授のリレーエッセイ「『家族の歌』が舞台となります  |
| 9  | 生命資源環境 |   | 河邊昭准教授が 第87回日本遺伝学会年会で奨励賞を受賞<br>論文タイトル<br>「野生植物集団の遺伝的多様度と変異の維持機構」<br>「Genetic diversity and its maintenance mechanism in wild plant populations」   |
| 10 | 生命システム | 森勇伍1)#、秋田薫1)、八代正和2)、澤田鉄二2)、平川弘聖2)、村田健臣3)、中田博1)*<br>(1)京都産業大学・総合生命科学部、2)大阪市立大・医学部3)静岡大・農学部、#筆頭著者、*責任著者)  | 森勇伍大学院生(総合生命、中田博教授研究室)らが新たな腫瘍悪性化機構を解明<br>掲載論文名<br>Binding of galectin-3, $\beta$ -galactoside-binding lectin, to MUC1 protein enhances phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and Akt, promoting tumor cell malignancy.<br>J. Biol. Chem. 2015 Sep 4. pii: jbc.M115.651489.<br>( $\beta$ -ガラクトシド結合レクチンであるガレクチン-3のMUC1への結合はERK1/2やAktのリン酸化を亢進し、腫瘍の悪性化をもたらす) |
| 10 | 生命資源環境 | 桶川友季(京都産業大学)、本橋 健(京都産業大学、責任著者)  | 本橋健教授と桶川友季研究助教の植物光合成に関する研究が英国科学誌「The Plant Journal」に掲載<br>掲載論文名「Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis in vivo.DOI: 10.1111/tpj.13049 葉緑体m型チオレドキシンは、光合成においてカルビンサイクル酵素の主要制御因子として機能する。  |
| 11 | 生命資源環境 | †天野瑠美(京都産業大学)、†中山北斗(日本学術振興会、京都産業大学、University of California, Davis)、諸星友里加(東京学芸大学)、川勝弥一(京都産業大学)、Ali Fejani(東京学芸大学)、木村成介(京都産業大学)<br>†共同第一著者   | 木村成介准教授、大学院生 天野瑠美さん、中山北斗研究員らの共同研究グループが、植物が生育環境に応じて葉の細胞の数や大きさを調節していることを発見<br>掲載論文<br>A Decrease in Ambient Temperature Induces Post-Mitotic Enlargement of Palisade Cell in North American Lake Cress<br>PLOS ONE (2015) 10 (11): e0141247   doi:10.1371/journal.pone.0141247  |
| 12 | 生命資源環境 |   | 高橋 稜一さん(生命科学研究所・修士課程1年)が対馬学フォーラム2015で研究奨励賞を受賞   |

## 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）<br>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6号 2015（平成27年）

発行日 2016（平成28）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/>