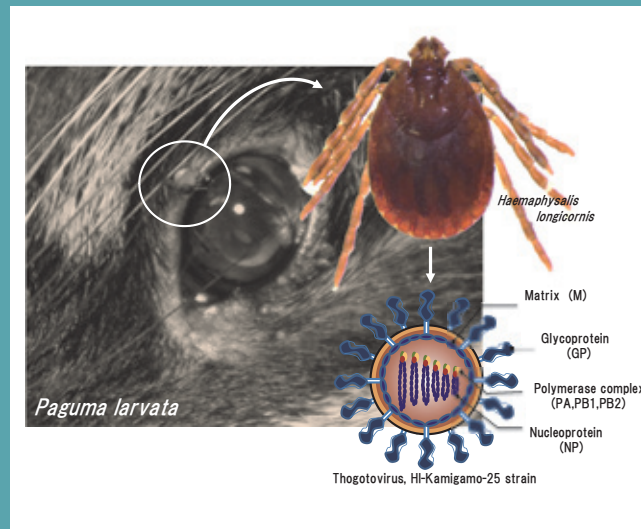


# 京都産業大学総合生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences  
Kyoto Sangyo University



《第7号》

2016  
平成28年

近年、マダニ由来感染症の発生が日本を含む世界各地で問題となっている。私たちの周囲に生息するマダニは未知の病原微生物を保有している可能性があり、それを調査・研究しておくことは防疫の観点からも重要である。京都産業大学近辺に生息するマダニが保有するウイルスについて調査したところ、フタゲチマダニ(*Haemaphysalis longicornis*)から、これまでに日本での存在が確認されていなかったトゴトウイルス(Thogotovirus)を分離し、HI-Kamigamo-25 株(Thogotovirus, HI-Kamigamo-25 strain)と名付けた。現在、本ウイルスの疫学的・病原学的・分子生物学的解析を行っている(Okamoto, N., Someya, A., Maeda, A. *et al.* J.Gen.Virol. 2015 Aug;96(8):2099-103. doi: 10.1099/vir.0.000177.)。

## 目 次

巻頭言	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
研究室メンバー・事務室スタッフ一覧・全学委員会委員一覧	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
2016年活動記録		
生命システム学科	生命システム学科の教育研究活動	5
	板野直樹教授	9
	遠藤斗志也教授	13
	川根公樹准教授	18
	黒坂光教授(学部長)	20
	近藤寿人客員教授	23
	佐藤賢一教授	27
	瀬尾美鈴教授	30
	千葉志信准教授	33
	中田博教授	37
	永田和宏客員教授	41
	中村暢宏教授	48
	浜千尋教授(副学科主任)	51
	横山謙教授(学科主任)	54
生命資源環境学科	生命資源環境学科の教育研究活動	57
	金子貴一教授(学科主任)	61
	河邊昭准教授	63
	木村成介教授	66
	高橋純一准教授	71
	津下英明教授	75
	寺地徹教授	78
	野村哲郎教授(副学部長)	81
	本橋健教授	84
	山岸博教授(副学科主任)	88
動物生命医科学科	動物生命医科学科の教育研究活動	91
	加藤啓子教授	95
	齋藤敏之教授(学科主任)	98
	白鳥秀卓教授	101
	染谷梓准教授	103
	高桑弘樹教授	105
	竹内実教授	107
	棚橋靖行准教授	110
	西野佳以准教授	112
	前田秋彦教授(副学科主任)	114
	村田英雄教授	116
	2016年度 動物実験教育訓練および動物慰霊祭	118
2016年 総合生命科学部 研究トピックス	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	119

## 巻 頭 言

総合生命科学部長  
寺地 徹

諸般の事情で例年より発刊が少し遅くなりましたが、ここに平成28年度の総合生命科学部年報をお届けいたします。思いがけずこの4月に、私が学部長を拝命してから数ヶ月がたちました。最近になってようやく大学や学部全体の有り様がおぼろげながら見えてきたところです。この年報は、私が学部長をひきついでからの最初の年報となりますが、初代学部長の永田和宏教授、二代目学部長の黒坂光教授により培われた、「総合生命科学部の研究内容は常にオープン」という、学部の伝統を絶やすことなく継続できたことを、まずは喜びたいと思います。周知のように生命科学の分野は、その進歩発展が著しく、実験で得られたデータの多くはすぐに古ぼけてしまいます。その意味でアップツォーデートとはいえない「年報」にどれだけの価値があるのかという議論はあると思いますが、この年報にはそれぞれの研究室の教員や研究員、大学院生や学部生などが、春夏秋冬の一年間、研究にかけた情熱とそこから得られた成果が詰まっています。また、年報を過去から順に辿ってみると、そこには研究の着実な進展（あるいは頓挫した痕跡）が、生き生きと描き出されています。

2010（平成22）年に開設されて以来総合生命科学部では、多くの方々の協力を得て、ライフサイエンスの醍醐味を伝える斬新な教育を行ってきました。特に本学部においては、研究実績のある教員が、研究に裏付けされた教育を行うことで、学生の知的好奇心を高めようと努力を続けています。このことは、本学大学院（生命科学研究科）への高い進学率に反映されていると思われます。その研究科は、前学部長の奮励努力の甲斐あって、2014（平成26）年4月に生命科学研究科博士前期課程、2016（平成28）年4月に同研究科博士後期課程の開設に至り、これにより生命科学系の教育・研究機関として、他大学に引けを取ることのない体制を築くことができたこと、教員一同自負しています。

研究面においては、毎年多くの国際専門誌に論文が掲載され、また活発な学会等での活動もあり、今日では総合生命科学部の研究は、それぞれの分野で高い評価を得ています。特にタンパク質科学に関しては、学部開設以来、国際的な水準の研究を継続してきました。2016（平成28）年4月には、初代学部長である永田先生を所長とするタンパク質動態研究所が開設され、タンパク質の細胞内外の動態に着目した特色ある研究をさらに発展させる体制ができました。

このように本学のライフサイエンスは、教育・研究の両面において大きく発展してきましたが、その起源は1989（平成元）年に開設された工学部生物工学科にまで遡ります。生物工学科はバイオテクノロジーに特化した学科としては、全国の私立大学に先駆けて開設されたものであり、当時としては非常に特色のある学科でした。総合生命科学部では、生物工学科の21年間にわたる活動をもとに、ライフサイエンスへの取り組みを学部レベルにまで展開しました。我々はさらに時代の変化の要請に対応して、これまでの取り組みをさらに発展させ、新たな学部を設置することを目指して、真剣な議論を進めています。

その土台となる総合生命科学部は、今まで以上に全構成員が力を合わせ、改革に果敢にチャレンジし、学部と研究科をさらに発展させて参ります。新しい学部に期待していただくとともに、総合生命科学部への、より一層のご理解とご支援をお願い申し上げます。

総合生命科学部教員研究室一覧

学科	役職	職名	氏名	スタッフ等名簿					
				講師	研究助教	研究員・研究補助員	客員研究員	嘱託・契約職員	大学院生
生命システム		教授	板野直樹		泉川友美(4月から)		Theerawut Chanmee (3月まで)		ジョー・チャイ・クワン、チャウ・チン・クワン(D1) 東出実歩(M1)
		教授	遠藤斗志也		河野慎	袖木芳一、丹羽純子、鈴木千香、角上春弘、飯田上田(4月から)、竹上法(4月から)	元須佐、島賀史、須賀比奈子、佐久夫(11月から)	中嶋晶子	杉原宗親(D1)
		准教授	川根公樹			平山真也、山井信秀、坪田中(4月から)、人(4月から)、憲(11月まで)、学(3月まで)			中井彩香(M1)
	学部長	教授	黒坂光		中村直介		中肥喜明、山塚靖彦(3月まで)		辻本優季(M1)
		客員教授	近藤寿人		石井泰雄(3月まで)、寺元万智子(10月から)	小西博郷(2月まで)			飯田英明(D3)、中村香絵(M1)、吉永康矢(M1)
		教授	佐藤賢一		トクモ・ア・アレクサンダー		井尻貴之(4月から)		
		教授	瀬尾美鈴				上野信洋、清水昭男、田亜佑美(5月から)、浅野弘嗣(4月から)		松島章子(M2)
		准教授	千葉志信		藤原圭吾	千葉直美(3月まで)	由良隆		
		教授	中田博	森勇吾	山下智子		河野正孝、村上憲(3月まで)、永原秀剛(4月から)		田中涼太(D2)
		客員教授	永田和宏		潮田亮	伊山藤進、山本戸大、森戸玉直、石田直泰、千福美子(4月から)	Denisse Sepulveda Alvarado (3月まで)	川崎邦人(3月まで)	瀧野友愛(M1)、堤智香(M1)、上垣日育(M2)、坂田健志朗(M2)、藤井唱平(M2)
		教授	中村暢宏						大迫志帆(M2)
	副学科主任	教授	浜千尋						高橋和田、悠太郎(M1)
学科主任	教授	横山謙		岸川淳一	中西温子(4月から)		中西温子(3月まで)	遠藤愛子(M1)、竹内奈央(M2)、馬場みほ里(M2)	
生命資源環境	学科主任	教授	金子貴一			板倉学			西田裕貴(M1)
		准教授	河邊昭		川邊隆大	吉田初佳(4月から)			
		教授	木村成介		坂本智昭	岡本郁(4月から)	Cesar Ivan Ojeda Linares (4月から5月まで)、中益朗子(3月まで)		天野瑠美(D1)、川勝弥一(D3)、桃井理沙(M1)、山口修二(M1)、三好彩央里(M2)
		准教授	高橋純一						西本愛(M1)、若宮健(M1)、中濱奏絵(M2)、高橋稜一(M2)
		教授	津下英明		吉田徹、鶴村俊治(3月まで)		鈴木俊治、山本秀喜(4月から)、中嶋伸雄(4月から)、入倉大祐(4月から)		Waraphan Tonity (D3)、竹内理子(M2)、村田晴香(M2)
		教授	寺地徹			塚谷真衣	山本真紀	植村香織、永島伊都子	岩橋直人(M1)、阿部こころ(M2)、出雲谷遥(M2)、中村由衣(M2)
	副学部長	教授	野村哲郎					小原真美	
		教授	本橋健		桶川友季		泉井桂	佐藤望(4月から)	村井亮太(M1)、越野将典(M2)、奥島輝也(M2)
副学科主任	教授	山岸博			高橋亮、橋本純子			鳩野紗希(M1)、輪屋恵(M2)、前田貴文(M2)	
動物生命医科		教授	加藤啓子		藤田明子		北村元隆(5月から)、島田佳奈(6月から)	渡邊裕子	タン・スザイ、シリ・ーン(D2)、大田知沙(M1)、織田弥伽(M2)、薄美有(M2)
	学科主任	教授	齋藤敏之				岩崎方子		井森貴世(M1)、上西美緒(M2)、オウハン(M2)、木下香菜子(M2)
		教授	白鳥秀卓						
		准教授	染谷梓				西野真理(6月から)、中野侑香(6月から)、山口麻衣子(8月から)、川崎成毅(8月から)、川谷祐毅(8月から)		
		教授	高桑弘樹				今江清朝(8月から)		雨森貴都(M2)
		教授	竹内実				石田裕裕、池澤久(4月から)、小池茂加(3月まで)、瓜田千朝(3月まで)、今江正明(3月まで)、佐佐土祐輔(3月まで)、西野康子(3月まで)	田中美子	金森千香(M1)、宇野真由奈(M2)、三輪奈緒子(M2)
		准教授	棚橋靖行						
		准教授	西野佳以				萩原克郎		河北尚輝(M2)
	副学科主任	教授	前田秋彦				好井健太郎(5月から)、松本耕三(5月から)、村昌美(7月から)、谷昌巳(8月から)、長谷祐輔(8月から)、土佐		水谷裕樹(M1)、佐々木創平(M2)、戸野優(M2)
		教授	村田英雄						

総合生命科学部事務室スタッフ名簿

役 職 名 等	氏 名
学長室 総合生命科学部長補佐	井上 朋 広
教学センター課長補佐 (総合生命科学部担当)	中上 ゆかり
教学センター課員 (総合生命科学部担当) (10月から)	木津 夏月美
教学センター課員 (総合生命科学部担当)	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)	石野 都
教学センター契約職員 (総合生命科学部担当)	有 麻 智 絵
教学センター契約職員 (総合生命科学部担当) (5月から)	石 井 典 子
教学センター嘱託職員 (化学物質等管理担当) (4月から)	川 原 瑞 穂
教学センター特定職員 (総合生命科学部担当) (11月から)	古 家 美 貴 子
教学センター特定職員 (R1業務担当)	碓 山 菜 々 子
教学センター嘱託職員 (日本化学未来館・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)	栗 本 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)	上ノ山 華 織
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 那
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	渡 邊 晴 代
教学センター嘱託職員 (実験補助員)	古 賀 由 希 恵
教学センター嘱託職員 (実験補助員) (10月から)	荒 井 華 葉 香
教学センター嘱託職員 (実験補助員) (10月から)	森 見 友 貴
教学センター嘱託職員 (実験補助員) (3月まで)	猪 子 朋 子
教学センター嘱託職員 (実験補助員) (9月まで)	山 岡 沙 織

その他

Song Ji Yao (学振PD)  
 荒 磯 裕 平 (学振PD)  
 松 本 俊 介 (学振PD)  
 渡 邊 康 紀 (学振PD)  
 RAPAPORT Doron (学振外国人招聘研究者)

永 原 秀 剛 (大学院委託生) (3月まで)  
 荻 田 祐 司 (大学院委託生) (3月まで)  
 井 上 拓 也 (大学院委託生) (4月から)  
 中 林 周 (大学院委託生) (4月から)

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)	中 村 暢 宏
自己点検・評価運営委員会 (生命科学・工学研究科)	中 田 博
ダイバーシティ推進委員会	瀬 尾 英 節 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 F/D/S/D推進ワーキンググループ	野 村 哲 郎
大学院 F/D/S/D推進ワーキンググループ	野 村 哲 郎
ラーニングコミュニティ運営委員会	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	木 村 成 介
留学アドバイザー	寺 地 徹
学生部委員会 (業・異学生選考委員会)	村 田 英 雄
学生祭教育スタッフ	染 谷 梓
障がい学生支援委員	千 葉 志 偉
入学試験委員会	板 野 直 樹
入試制度検討委員会	板 野 直 樹
進路・就職支援センター運営委員会	加 藤 啓 子 河 邊 昭
情報基盤運営委員会	板 野 直 樹
ネットワークセキュリティ委員会	板 野 直 樹
大学院委員会	遠 藤 斗 志 也
図書館委員会	竹 内 実
学術リポジトリ運営委員会	竹 内 実
全学共通カリキュラム推進委員会	野 村 哲 郎
人間科学教育カリキュラム部会	野 村 哲 郎
教職課程教育センター運営委員会	本 橋 健 博 中 田 博
国際交流推進委員会	山 岸 博
論集編集系列委員会	浜 千 尋
リエゾンオフィス運営委員会	瀬 尾 英 節
人権センター運営委員会	西 野 佳 以
人権委員会	津 下 英 明
人権センター窓口相談員	西 野 佳 以

吉 田 貴 徳 (学振PD)

中 山 北 斗 (学振PD)  
 岡 本 郁 (学振PD・3月まで)



# 生命システム学科



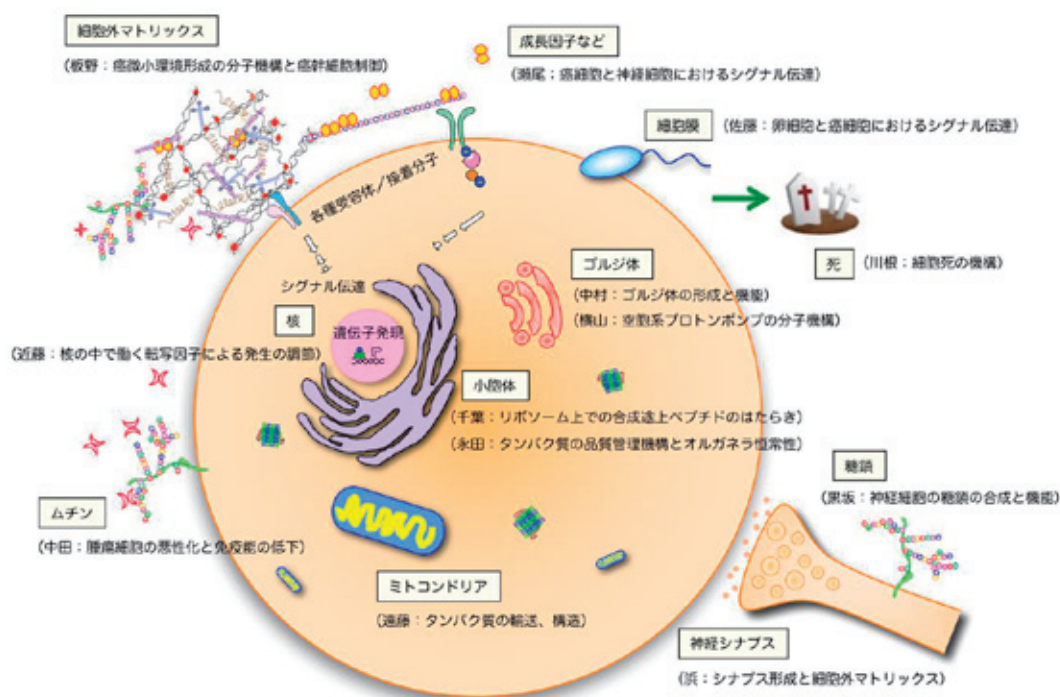


## 生命システム学科

### 【研究】

本学科は専任教員(教授11, 准教授2)13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2～4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分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所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4期生(平成25・西暦2013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、瀬尾、千葉、中田、中村、永田、浜、横山
生物学通論A、B	1	川根
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	千葉
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
バイオ解析科学	3	板野
タンパク質科学	3	永田、横山
免疫学	3	中田
神経生物学	3	浜、黒坂
腫瘍細胞生物学	3	佐藤、瀬尾
再生医科学	3	川根、近藤
薬理学	3	板野、(非常勤講師)
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、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、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、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がん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、「がん幹細胞」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。がん幹細胞は、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

教授 板野 直樹

Prof. Naoki Itano, Ph.D.



研究助教 泉川 友美

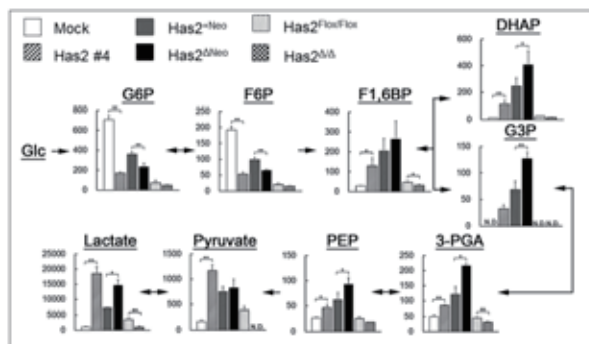
Assist. Prof. Tomomi Izumikawa, Ph.D.

最大の要因と考えられ、根治的治療の標的として重要視されている。

がん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、がん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、がん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。

## 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。質量分析の結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞において、ヘキソサミン合成経路(HBP)の代謝流束が著しく加速しているという新事実を明らかにした。HBPは、解糖系の代表的な側副路として糖代謝中心ネットワークを構築し、糖供与体のUDP-N-アセチルグルコサミンの供給を通じて糖鎖合成を制御している。メタボローム解析の結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞では、ヘキソサミン合成経路の加速と連動して、解糖系を中心とする糖代謝プログラムが正に制御されていることが明らかとなった(図1)。また、ヘキソサミン合成経路の律速酵素であるGFAT1を強発現すると、低酸素誘導因子であるHIF-1 $\alpha$ が蓄積し、解糖系が亢進した。一方、GFAT1の発現をノックダウン法により抑制すると、ヒアルロン酸高産生乳癌細胞においてHIF-1 $\alpha$ 量と解糖系が低下し、それに連動してがん幹細胞性が減弱した。以上の結果は、ヒアルロン酸合成と共役したヘキソサミン合成経路が、細胞内糖代謝の中心ネットワークを通じてがん幹細胞性の制御に働くことを示唆している(図2)。



**Figure 1. Metabolomic analysis of glycolytic intermediates in Has2-overexpressing and -deficient breast cancer cells.** Control mock (open bars) and Has2<sup>Neo</sup> (gray bars); Has2-overexpressing Has2 #4 (striped bars) and Has2<sup>ΔNeo</sup> (black bars) cells; Control Has2<sup>Flx/Flx</sup> (dotted bars) and Has2-deficient Has2<sup>ΔΔ</sup> (checkered bars) cells.

### 3. Research projects and annual reports

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

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

#### 1-2. Studies on Cancer Microenvironment Formation and the Establishment of Therapies Targeting Cancer Stem Cell Niches

Cancer has become the leading cause of death in our country due to increased longevity, and as such the eradication of cancer has become a social mission. Although it is well known that uncontrolled cell proliferation leads to the development of cancers, the precise mechanisms underlying metastatic tumor progression and recurrence have not been fully resolved. Cancer stem cells (CSCs) have recently been reported to exist in many malignancies and have attracted remarkable attention because they are believed to be the only cells capable of initiating cancer growth. Because CSCs are relatively resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy, and because they are closely associated with cancer metastasis and recurrence, targeting them is now a primary goal in cancer therapy. CSCs, like normal stem cells, reside and maintain their stemness within a specialized microenvironment called a stem cell niche. Thus, strategies to limit their stemness and malignant transformation must focus on the importance of targeting this CSC niche. The main purpose of our research in this domain is to identify the cellular and molecular cues that govern the formation of the specialized CSC niche microenvironment and establish novel therapies to induce a state of cancer dormancy by controlling the niche.

2. Our previous studies using a 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 adopted stable isotope-assisted tracing and mass spectrometry profiling to elucidate the metabolic features of HA-overproducing breast cancer cells. These integrated approaches disclosed an acceleration of metabolic flux in the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). A metabolic shift toward glycolysis was also evident by quantitative targeted metabolomics, which

was validated by the expression profiles of key glycolytic enzymes (Fig. 1). Forced expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 (GFAT1), an HBP ratelimiting enzyme, resembled the results of HA overproduction with regard to HIF-1 $\alpha$  accumulation and glycolytic program, whereas GFAT1 inhibition significantly decreased HIF-1 $\alpha$  protein level in HA-overproducing cancer cells. Moreover, inhibition of the HBP-HIF-1 axis abrogated HA-driven glycolytic enhancement and reduced the CSC-like subpopulation (Fig. 1). Taken together, our results provide compelling evidence that HA production regulates the metabolic and CSC-like properties of breast cancer cells via HBP-coupled HIF-1 signaling (Fig. 2).

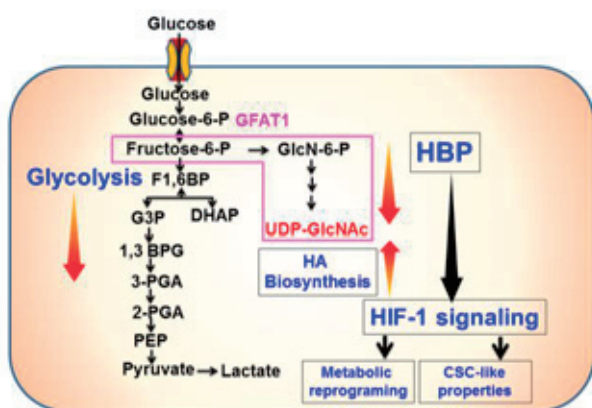


Figure 2. A proposed model for metabolic reprogramming driven by HA overproduction.

#### 4. 論文, 著書など

Chanmee T, Ontong P, Izumikawa T, Higashide M, Mochizuki N, Chokchaitaweek C, Khansai M, Nakajima K, Kakizaki I, Kongtawelert P, Taniguchi N, Itano N. Hyaluronan production regulates metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling. *J Biol Chem*. 291:24105-24120.

Izumikawa T, Dejima K, Watamoto Y, Nomura KH, Kanaki N, Rikitake M, Tou M, Murata D, Yanagita E, Kano A, Mitani S, Nomura K, Kitagawa H. Chondroitin 4-O-Sulfotransferase Is Indispensable for Sulfation of Chondroitin and Plays an Important Role in Maintaining Normal Life Span and Oxidative Stress Responses in Nematodes. *J Biol Chem*. 291: 23294-23304.

Saigoh K, Yoshimura S, Izumikawa T, Miyata S, Tabara Y, Matsushita T, Miki T, Miyamoto K, Hirano M, Kitagawa H, Kira J, Kusunoki S. Chondroitin sulfate  $\beta$ -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGn-1)

polymorphism: Association with progression of multiple sclerosis. *Neurosci Res*. 108: 55-59.

Chanmee T, Ontong P, Itano N. Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 375: 20-30.

#### 5. 学会発表など

東出実歩, 望月信利, チャンミー シーラウト, 板野直樹 ヘキソサミン合成経路による上皮-間葉転換制御機構 第63回日本生化学会近畿支部例会 神戸, 2016.5.21.

Tomomi Izumikawa, Mariana Capurro, Wen Shi, Jorge Filmus 常染色体劣性骨格異形成症の原因遺伝子であるGlypican-6の hedgehogシグナル伝達における制御機構の解析 第63回日本生化学会近畿支部例会 神戸, 2016.5.21.

板野直樹 ヒアルロン酸の科学から健康長寿を考える〜糖鎖と健康〜 東京都医学総合研究所 第3回都民講座 東京, 2016.7.29. (学術講演)

板野直樹 ヒアルロン酸生合成機構から健康長寿を考える ヒアルロン酸機能性研究会 第2回学術大会 東京, 2016.9.29. (学術講演)

Tomomi Izumikawa, Theerawut Chanmee, Pawared Ontong, Miho Higashide, Nobutoshi Mochizuki, Chatchadawalai Chokchaitaweek, Manatsanan Khansai, Kazuki Nakajima, Ikuko Kakizaki, Prachya Kongtawelert, Naoyuki Taniguchi, Naoki Itano Hyaluronan production regulates metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling 第89回日本生化学会大会 仙台, 2016. 9. 27.

#### 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: H26-27年 (3年)

東京生化学研究会国際共同研究助成金

課題名: ヘキソサミン生合成経路によるがん幹細胞性の制御機構の解明

研究代表者: 板野直樹, 取得年度: H27-28年 (2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員

日本がん転移学会評議員

プロテオグリカンフォーラム世話人

4) 受賞等 なし

5) その他

ホームページ:

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

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

今年度より研究助教に着任した泉川は、生命システム実習Ⅱや資源環境学実験・演習Ⅰの補助担当教員として教育活動に従事した。また、基礎特別研究や応用特別研究、さらには大学院生命科学研究科の特別研究では、研究室の学生に実験の指導・助言を行うなど、学部および大学院教育の一翼を担った。教育活動と並行して研究活動を開始し、Chanmee 氏（東京生化学研究会招聘研究者）と共同してがん幹細胞性の制御に関して新たな機構を見出した。

以上の教育・研究活動の成果は、学部における教育の充実、大学院生による学会発表や国際誌への投稿に反映された。



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。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、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、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 *de novo* には作られず、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カルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生合成や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。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（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様々な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) ノンストップ膜タンパク質の品質管理

真核生物の細胞内で合成されるタンパク質の 2/3 は分泌経路またはオルガネラに向かう。終止コドンの欠失により新生鎖として翻訳が停止したノンストップ (NS) タンパク質の品質管理については、これまでは専らサイトゾルの NS タンパク質が対象であった。われわれは最近、オルガネラ行きの NS タンパク質の品質管理について解析を行い、NS オルガネラ

教授 遠藤斗志也

Prof. Toshiya Endo, Ph. D.

助教 河野 慎

Assist. Prof. Shin Kawano, Ph. D.



タンパク質はリボソームだけでなく、オルガネラ上の膜透過チャンネルを占有するため、細胞にとって有害であること、細胞にはこれを回避するために、Dom34: Hbs1 により NS タンパク質をオルガネラ内にリリースする仕組みをもっていることを見出した。そこでオルガネラ行き NS タンパク質の品質管理の研究を NS オルガネラ膜タンパク質の品質管理の研究へと発展させ、ER 膜上の様々な膜トポロジーの一回膜貫通型膜タンパク質について、NS 化により膜透過チャンネルの占有状態がどう変わるのか、サイトゾルにおける NS タンパク質分解の仕組みが関与するかについて検討を行った。

C 末端側に膜貫通 (TM) 配列を持つ C アンカー型膜タンパク質は GET システムにより ER 膜に標的化されるため、Sec61 トランスロコン (膜透過チャンネル) を占有することなく、サイトゾルで Ltn1 によるユビキチン化→プロテアソームによる分解という品質管理を受ける。N 端付近に TM 配列をもつ N アンカー型膜タンパク質は、Sec61 トランスロコンから TM 配列がラテラルに ER 膜にリリースされるため、やはり Sec61 トランスロコンを占有することなく、サイトゾルで Ltn1 によるユビキチン化とプロテアソーム分解による品質管理を受ける。N 端にシグナル配列、C 端 TM 配列をもつ膜タンパク質は Sec61 トランスロコンからのラテラルリリースが十分でないため、一部トランスロコンのチャンネルを占有する。N 端側にシグナルアンカー (SA) 配列を持つ膜タンパク質は SA 配列に続く大きなドメインが ER 内腔側に膜透過し、C 端側はリボソームがサイトゾル側に残るため、Sec61 トランスロコンを占有する。これらの二つのケースでは、Dom34 による NS タンパク質の内腔側へのリリースが必須の品質管理機構となることが分かった。

### 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ホスファチジルエタノールアミン (PE) の原材料のリン脂質ホスファチジルセリン (PS) 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 Psd1 により PE に変換される。27 年度にホスファチジン酸のミトコンドリア外膜から内膜



への輸送に関わる Ups1-Mdm35 の X 線構造を決定し、輸送の分子機構を解明した。今回は PS の輸送に関与する因子の候補として Ups1 のホモログ Ups2 と Mdm35 を考え、ミトコンドリア内膜における Psd1 依存型 PE 合成以外の PE 合成経路を欠失した酵母変異体を用いて、Ups2 欠損の影響を解析した。Ups2 が欠失すると PE が減少すること、この減少は酵母の増殖過程が発酵からミトコンドリアの好気呼吸にスイッチする（ダイオキシシフト）ことで顕著になること、が明らかになった。さらに *in vitro* で精製 Ups2-Mdm35 を用いたリポソーム間脂質輸送アッセイを行い、Ups2-Mdm35 が PS を効率よく輸送することを示した。以上の結果から、Ups2-Mdm35 はミトコンドリアの外膜-内膜間で PS を輸送するタンパク質であることが明らかになった。

### 3. Research projects and annual reports

Eukaryotic cells are highly compartmentalized into membrane-bounded organelles with distinct functions. Mitochondria are essential organelles that fulfill central functions in cellular energetics, metabolism and signaling. We are studying the molecular mechanisms of biogenesis and quality control of mitochondria and other organelles from the viewpoint of protein and lipid trafficking.

Proteins are under the elaborate surveillance to maintain cellular protein homeostasis. mRNA lacking an in-frame stop codon called “nonstop mRNA” would generate aberrant “nonstop (NS) proteins” as well as accumulation of stalled ribosome-nascent chain (RNC) complexes. Although degradation of nonstop cytosolic proteins has been extensively studied, fate of NS proteins targeted to organelles such as the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria was characterized only in a few studies. Among them, we found that, when degradation of NS mRNAs does not work efficiently, NS proteins targeted to the ER or mitochondria occupy not only translating ribosomes but also translocons (translocators) in the organellar membranes. The Dom34-Hbs1 complex therefore acts on the stalled ribosomes to release stuck nonstop proteins into the organelle lumen, otherwise the protein flux into the organelle is blocked, resulting in defective cell growth.

Here we asked which of the pathways, the cytosolic Ltn1 and proteasome-dependent degradation and the Dom34-Hbs1 dependent release into the ER lumen, NS-ER membrane proteins can be targeted to. We thus followed the fate of NS-membrane proteins at the ER membrane with different membrane topologies, and found that Ltn1-dependent degradation differed for membrane proteins with different topologies and its failure did not affect ER protein import or cell growth. On the other hand, failure in the Dom34-dependent release of the nascent polypeptide from the ribosome led to the block of the Sec61 channel and resultant inhibition of other protein import into the ER caused cell growth defects. Therefore, the nascent membrane protein release from the translation apparatus is more instrumental in clearance of the clogged ER translocon channel and thus maintenance of normal cellular functions.

Organelle functions strictly rely on the organelle-specific lipid compositions. How hydrophobic phospholipid molecules can traverse aqueous compartments to shuttle between different membranes is a critical question concerning the mechanism of membrane biogenesis. We previously determined the X-ray structure of Ups1-Mdm35 and revealed the molecular mechanism of Ups1-Mdm35 mediated phosphatidic acid (PA) transfer between the mitochondrial outer membrane (OM) and inner membrane (IM). Here we asked if Ups2, an Ups1 homolog, can transfer phosphatidylserine (PS) between the OM and IM in cooperation with Mdm35 for phosphatidylethanolamine (PE) synthesis at the IM by Psd1. In the genetic background, where only the mitochondrial PE synthetic pathway is in operation, deletion of the *UPS2* gene significantly reduced the level of PE, especially upon diauxic shift. In addition, by using recombinant Ups2 and Mdm35, we could show that Ups2-Mdm35 efficiently transfers PS between liposomes *in vitro* in a similar manner that Ups1-Mdm35 transfer PA between liposomes. Therefore we concluded that Ups2 transfer PS between the OM and IM for PE synthesis at the IM.

#### 4. 論文, 著書など

- T. Suzuki, N. Iida, J. Suzuki, Y. Watanabe, T. Endo, T. Hisabori, M. Yoshida: Expression of mammalian mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase in Escherichia coli depends on two chaperone factors, AF1 and AF2. *FEBS Open Bio.* **6**, 1267-1272 (2016).
- R. Kojima, S. Kajiura, H. Sesaki, T. Endo, and Y. Tamura: Identification of multi-copy suppressors for endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* **590**, 3061-3070.
- Arakawa, K. Yunoki, T. Izawa, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo: Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol. *Sci. Rep.* **6**, Article number: 30795 (2016).
- R. Kojima, T. Endo, and Y. Tamura : A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro. *Sci. Rep.* **6**, Article number 20777 (2016).
- T. Jores, A. Klinger, L. E. Groß, S. Kawano, N. Flinner, E. Duchardt-Ferner, J. Wo hner, H. Kalbacher, T. Endo, E. Schleiff, and D. Rapaport: Characterization of the targeting signal in mitochondrial  $\beta$ -barrel proteins. *Nature Commun.* **7**, Article number 12036 (2016).
- N. Miyata, Y. Watanabe, Y. Tamura, T. Endo, and O. Kuge: Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria. *J. Cell Biol.* **214**, 77-88 (2016) (featured by Bruno Mesmin, "Mitochondrial lipid transport and biosynthesis: A complex balance" Spotlight, *J. Cell Biol.* **214**, 9-11 (2016)).

#### 5. 学会発表など

- Toshiya Endo: Transport of Proteins and Lipids to Mitochondria Gordon Research Conference: Mitochondria and Chloroplasts (招待講演), Mount Snow, West Dover, VT, USA, 2016.6.19-24
- Toshiya Endo: Machineries for mitochondrial protein and lipid transport (招待講演) FASEB Science Research Conference: Molecular Biophysics of Membranes, Snowmass, Colorado, USA, 2016.7.10-15
- Toshiya Endo: Quality control of nonstop proteins at the organelle membranes Nascent Chain Biology Meeting (招待講演), 富士レークホテル (山梨県富士河口湖町), 2016. 9.1-3
- Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis through protein and lipid transport (基調招待講演), ICES 2016 Kyoto (The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis), 京都府立大学 (京都府京都市), 2016. 9. 10-14

- 塩田 拓也, 今井 賢一郎, 深沢 嘉紀, 富井 健太郎, Paul Horton, 遠藤 斗志也: ミトコンドリアタンパク質搬入口、TOM 複合体の分子形態、および機能, 第16回日本蛋白質科学会年会 若手奨励賞シンポジウム, 福岡国際会議場 (福岡県博多市), 2016. 6. 7-9
- 遠藤斗志也: タンパク質と脂質を運んでミトコンドリアをつくる仕組み (招待講演), 第54回生物物理学会年会シンポジウム「ミトコンドリアの分子マシナリーと機能管理, 合成, 構造, 機能, 適応, そして淘汰」, つくば国際会議場 (茨城県つくば市), 2016. 11. 25-27
- 田村 康, 小島 理恵子, 遠藤 斗志也: リン脂質輸送におけるERMES複合体の役割 (招待講演), 第39回日本分子生物学会年会シンポジウム「ミトコンドリアとオルガネラのコミュニケーション」, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016. 11. 30-12. 2
- 塩田拓也, 今井賢一郎, Paul Horton, 遠藤斗志也, Trevor Lithgow: ミトコンドリアタンパク質搬入口の形と機能 (招待講演), 第39回分子生物学会年会シンポジウム「多才なミトコンドリアを支える分子基盤」, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016. 11. 30-12. 2
- 遠藤斗志也: 新たな視点で考えるミトコンドリア生合成の仕組み (招待講演), 大阪大学蛋白質研究所セミナー「真核細胞のオルガネラ研究最前線」, 大阪大学蛋白質研究所 (大阪府吹田市), 2017. 3. 21-22
- Jiyao Song, Yasushi Tamura, Tohru Yoshihisa and Toshiya Endo: Analysis of the outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial proteins, Keystone Symposium on Molecular and Cell Biology: Mitochondrial Dynamics 2016, Sheratone Steamboat Resort, Steamboat Springs, Colorado, USA, 2016. 4. 3-7
- 松本俊介, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットしたタンパク質の分解機構の解析, 第16回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場 (福岡県博多市), 2016. 6. 7-9
- 荒磯裕平, 柚木芳, 河野慎, 鈴木純子, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也: 立体構造解析に向けたミトコンドリア外膜トランスロケーター TOM40 複合体の大量調製, 第16回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場 (福岡県博多市), 2016. 6. 7-9
- 柚木芳, 荒川俊輔, 井澤俊明, 西川周一, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアにおけるノンストップタンパク質の品質管理機構の解析, 第68回細胞生物学会大会, 京都テルサ (京都府京都市), 2016. 6. 15-17
- 松本 俊介, 田村 康, 江崎 雅俊, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットしたタンパク質の 分解機構の解

析, 第68回細胞生物学会大会, 京都テルサ(京都府京都市), 2016. 6. 15-17

Yasunori Watanabe, Yasushi Tamura, Shin Kawano, Toshiya Endo: Structural basis of phospholipid transfer between the mitochondrial outer and inner membranes by Ups1-Mdm35, FASEB Science Research Conference: Molecular Biophysics of Membranes, Snowmass, Colorado, USA, 2016.7.10-15

Kaori Yunoki, Shunsuke Arakawa, Toshiaki Izawa, Shuh-ichi Nishikawa, Yasushi Tamura, and Toshiya Endo: The analysis of quality control systems for nonstop proteins in the ER and mitochondria, Nascent Chain Biology Meeting, 富士レークホテル(山梨県富士河口湖町), 2016. 9.1-3

Yuhei Arais, Kaori Yunoki, Shin Kawano, Junko Suzuki, Akihisa Tsutsumi, Masahide Kikkawa, and Toshiya Endo: Large-scale purification of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane, Nascent Chain Biology Meeting, 富士レークホテル(山梨県富士河口湖町), 2016. 9.1-3

古田詩唯奈, 小島理恵子, 田村康, 遠藤斗志也: 小胞体膜タンパク質 Ilm1 はミトコンドリア小胞体間リン脂質輸送を負に制御する, 第89回日本生化学会, 仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市), 2016.9.25-27

小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: 新規のin vitro PS輸送実験を用いたERMES複合体のリン脂質輸送機能の解明, 第89回日本生化学会, 仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市), 2016.9.25-27

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, 第89回日本生化学会, 仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市), 2016.9.25-27

渡邊康紀, 田村康, 遠藤斗志也: 小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質CAT-1の構造機能解析, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016. 11. 30-12. 2

松本俊介, 江崎雅俊, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットした膜タンパク質の分解機構の解析 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016. 11. 30-12. 2

Jiyao Song, Tohru Yoshihisa, Yasushi Tamura and Toshiya Endo: Analysis of the outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial proteins, American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016, San Francisco, USA, 2016.12.3-7

## 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・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析

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・若手研究(B)

課題名:小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質VAT-1の構造機能解析

研究代表者:渡邊康紀, 取得年度:H28-29年度(2年)

科学研究費補助金・若手研究(B)

課題名:ミトコンドリア外膜のAAA-ATPase Msp1によるタンパク質品質管理機構

研究代表者:松本俊介, 取得年度:H28-29年度(2年)

### 2) 知財権等

### 3) 学外活動

遠藤斗志也:九州大学客員教授

遠藤斗志也:名古屋大学招聘教員

遠藤斗志也:日本細胞生物学会評議員

遠藤斗志也:日本細胞生物学会常任編集委員

### 4) 受賞等

遠藤斗志也:平成28年度文部科学大臣表彰科学技術賞(研究部門)

### 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生物試料から精製・調製し、それらを用いて *in vitro* の適切な機能評価系を確立し、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（酵母などのモデル生物を用いて）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、マンツーマンの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。



28年9月 研究室(+CREST チーム)のリトリート(山形)

# 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の特徴である。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）。

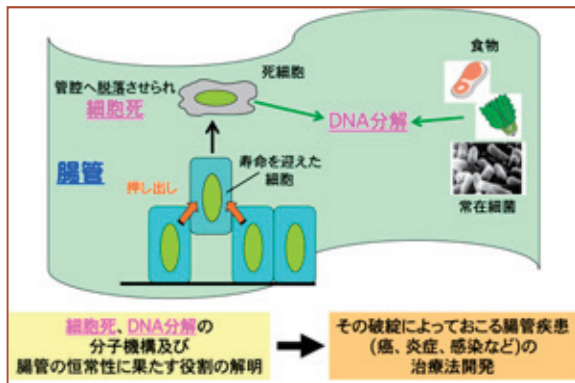


図1. 腸管での細胞死とDNA分解

現在は、腸上皮のターンオーバーでの脱落を対象に、以下のアプローチを用いて脱落の分子機構の解明を中心に研究を行っている。(A) 時間経過が細胞にもたらす変容をオミクス解析により明らかにし、寿命を迎えた細胞に何がおこり脱落のタイミングが決定されるかを明らかにする。(B) 脱落運命の決定された細胞はどのように隣接細胞に感知され、隣接細胞はどのように細胞を押し出すためのアクチンリングの形成を開始するかを明らかにする。ここではショウジョウバエにおいて新規 RNAi スクリーニング系を用いる。(C) アクチンリングのどのような動態変化が力を発生して細胞を押し出すのか、その際細胞間接着がどのように喪失、再形成されるかをマウス腸培養組織（オルガノイド）や哺乳類上皮培養細胞を用いたライブイメージングによって解明する。

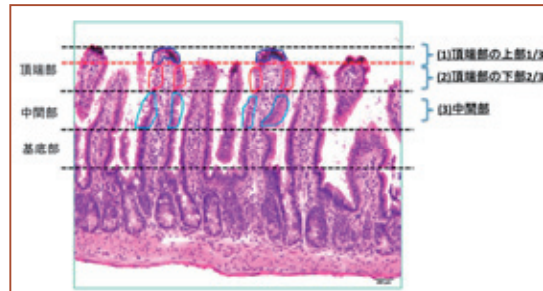
准教授 川根公樹

Associate Prof. Kohki KAWANE, Ph. D.



## 2. 本年度の研究成果

(A) 前年度までに、マウス腸上皮を用いて行ったマイクロダイセクション及びマイクロアレイ解析によって、脱落に関与する可能性のある候補遺伝子の抽出を行った（図2）。続いて本年度は各遺伝子の腸上皮での発現パター

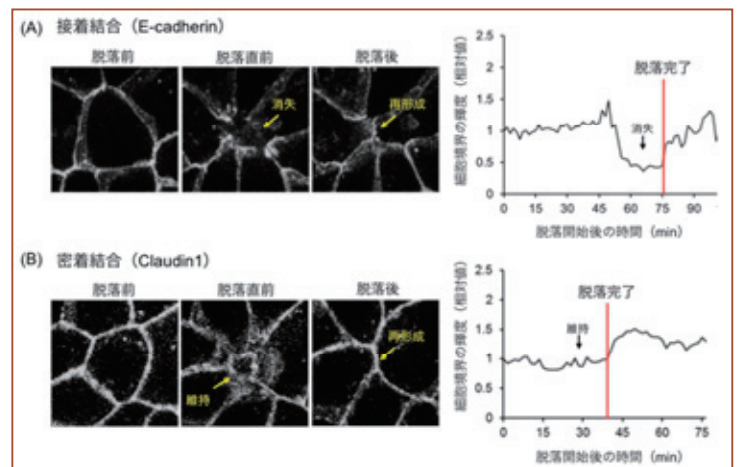


ーンを *in situ* hybridization で解析し、脱落のおこる絨毛先端部で発現が上昇する遺伝子を複数同定した。

図2. マウス腸上皮でのマイクロダイセクション解析

(B) 前年度までに、当初案の代替計画として、腸上皮細胞で誘導した各 RNAi の効果を細胞数や細胞の形態などの複数パラメーターで評価する一次スクリーニング系を構築した。本年度は、これを用い、500 系統（遺伝子）のスクリーニングを行い、約 40 系統の陽性結果（脱落に関与する可能性を示唆する）を得た。

(C) 前年度までに、哺乳類培養細胞を用いた細胞脱落の解析を構築した。本年度は、細胞接着分子と蛍光タンパク質の融合タンパク質を用いて細胞脱落時のこれら



の動態解析を行った。その結果、細胞脱落の際、タイト

図 3. 細胞脱落時の細胞接着の動態

ジャンクションとアドヘレンスジャンクションは異なる挙動を取ることを明らかにした (図 3)。

### 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 the diseases in gut and develop novel treatments against them.

This year, (A) we identified several genes which increase their expression level at the tip of mouse intestinal villi by *in situ* hybridization. These genes are considered to be candidate genes involved in cell extrusion. (B) We started the first screening step of RNAi screening by using *Drosophila* midgut to indentify the responsible genes for cell extrusion. (3) We revealed that adherens junction and tight junction behave differently during cell extrusion of epithelial cultured cells by quantitative imaging analysis. This mechanism seems to enable the epithelial tissue to both execute cell extrusion effectively and maintain its barrier function.

### 4. 論文, 著書など

1. Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K, Oike Y: ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. EMBO J. 36: 409-424, Feb. 2017

### 5. 学会発表など

該当なし

### 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)



# 神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

## 1. 研究概要

タンパク質の成熟過程には様々な翻訳後修飾反応が関与している。糖鎖の付加反応は重要な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)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)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、この酵素をコードし、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、本年度は、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて、*galnt17*, *galnt18* 欠失変異体の作製を試みた。*galnt17* と同様に酵素活性の検出されていない *galnt18* に関しては、ゼブラフィッシュでは 2 つのパラログ遺伝子 (*galnt18a*, *18b*)があるため、両パラログ遺伝子の欠失変異体の作製を試みた。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) *galnt17* 欠失ゼブラフィッシュモザイク胚の作製

これまでに我々は、*galnt17*の発現をモルホリノアンチセンスオリゴを用いて抑制すると、発生において脳、特に後脳形態に異常が生じることを報告した。今年度は、ゲノム編集技術である CRISPR システムを用いて、*galnt17* 変異体作製を試みた。実験には、*galnt17* の触媒領域を標的とした CRISPR single guide RNA (sgRNA) と核移行シグナルを付加した Cas9 をコードする mRNA をゼブラフィッシュ初期胚にマイクロインジェクションした。最近、コドンゼブラフィッシュに最適化した Cas9 mRNA を用いることで非常に高い効率でゲノム編集が起こり、F0 世代で遺伝子欠失体と同様の表現系の変化が得られると報告さ

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.

助教 中村直介

Assist. Prof. Naosuke Nakamura Ph. D.



れた。我々はその知見に基づいて、ゲノム編集を行ったところ、F0 で *galnt17* 遺伝子の標的部位において 80% 以上の効率でゲノム編集されることを見出した。この F0 モザイク胚の表現型を観察したところ、後脳領域の形態異常が見られた (Fig. 1)。この表現型異常はモルホリノオリゴで発現抑制と類似した形態異常であることから、*galnt17* は後脳の正常な発生に重要な役割を果たしていることが考えられた。

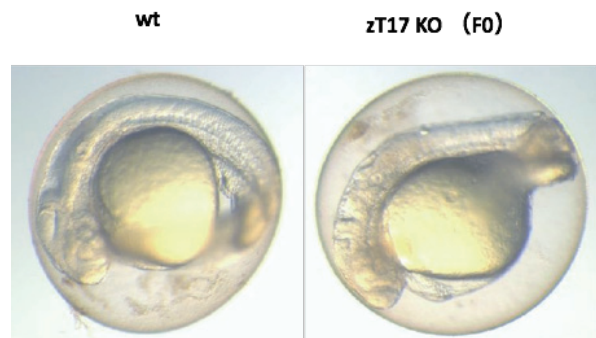


Fig. 1. Altered hindbrain observed for *galnt17* F0 mosaic embryos.

### 2) *galnt18* 欠失ゼブラフィッシュ変異体の作製

ゼブラフィッシュゲノムには *galnt18a*, *galnt18b* の 2 種類のパラログが存在する。パラログ間で高度に保存されている 5' 側 (N 末端側) の塩基配列を標的として sgRNA を作製し、2 つのパラログを同時にゲノム編集できるようにした。初期胚に sgRNA と cas9 mRNA を導入し、さらにゲノム編集された個体同士を掛け合わせることで、*galnt18a* 欠失体、*galnt18b* 欠失体、*galnt18a/b* 二重欠失体を得た。*galnt18a*, *galnt18b* 単独の変異体は正常に発生したのに対し、二重変異体では、初期胚は正常に生まれ稚魚まで生育するが、成魚まで育つものはなかった。

## 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* consist of 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) Production of *galnt* F0 mosaic zebrafish embryos

We thus far demonstrated that suppression of *galnt17* with morpholino antisense oligos generates embryos with altered hindbrain structure. We then tried to generate *galnt17* mutant zebrafish to elucidate its roles in the brain. CRISPR/Cas9 was employed to introduce mutations in the *galnt17* genome; sgRNA was designed to edit the DNA sequence coding for a *galnt17* catalytic domain. For the expression of cas9, mRNA, codons of which were optimized to zebrafish, was used to enhance the genome editing activity. With injection of sgRNA and cas9 mRNA, F0 mosaic embryos were obtained. Genome analysis showed that approximately 80 % of the *galnt17* target sequence was edited, and the F0 mosaic demonstrated disorganized hindbrain (Fig. 1). The phenotype was highly similar to that of the *galnt17* morphants. This indicates important roles of *galnt17* in hindbrain development.

#### 2) Production of *galnt* 18 deficient zebrafish

Zebrafish have two paralogue genes for *galnt18* (*galnt18a* and *-18b*). The highly homologous DNA sequence coding for the N-terminus of GalNAc-T18 was chosen as the target sequence so that the single complementary sgRNA can modify both *galnt18a* and *-18b* simultaneously. The genome edition with this sgRNA, and mating of mutated zebrafish generated *galnt18a* KO, *galnt18b* KO, and *galnt18a/b* double KO zebrafish. While single mutants with either *galnt18a* or *galnt18b* were apparently normal, the double KO mutants, although born with Mendelian ratio, failed to grow adults. Thus, concurrent expression of *galnt18a* and *galnt18b* may be necessary for the normal growth of zebrafish.

#### 4. 論文, 著書など

Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in *Drosophila* mushroom bodies. Y. Hirano, K. Ihara, T. Masuda, T. Yamamoto, I. Iwata, A. Takahashi, H. Awata, N. Nakamura, M. Takakura, Y. Suzuki, J. Horiuchi, H. Okuno, M. Saitoe, *Nature Communications* (2016) **14**(7) 13471.

#### 5. 学会発表など

中村 直介, 辻本 優季, 高橋 由衣, 川合 多美子, 中山 喜明, 小西 守周, 黒坂 光: 脊椎生物特異的なポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素を欠失したゼブラフィッシュ変異体の作製. 第35回日本糖質学会年会, 高知市, 2016.9.2

中村 直介, 辻本 優季, 高橋 由衣, 川合 多美子, 中山 喜明, 小西 守周, 黒坂 光: ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物特異的ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能解析. 第89回日本生化学会大会, 仙台市, 2016.9.26

Kurosaka, A. Developmental roles of polypeptide  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyltransferases. Texas A&M University, Dep. Biochem. Biophys. Specia Seminar Series (invited seminar). College Station, USA, 2016.11.17

Nakamura, N., Tsujiomoto, Y., Takahashi, Y., Nakayama, Y., Konishi, M., Kurosaka, A.: Generation of mutant zebrafish that lack multiple vertebrate-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. 2016 Society for Glycobiology Meeting, New Orleans, USA, 2016.11.20

Kurosaka, A., Nakamura, N., Tsujiomoto, Y., Takahashi, Y., Nakayama, Y., Konishi, M.: Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyltransferase genes during embryonic development. 2016 Society for Glycobiology Meeting, New Orleans, USA, 2016.11.20

中村 直介, 中山喜明, 黒坂 光: 脊椎動物特有なGalNAc-Tサブファミリーの機能欠失体作製. 平成28年度 新学術「神経糖鎖生物学」最終班会議, 名古屋市, 2017.3.3

#### 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)

##### 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： 洛西高校（2016.4.23），坂出高校（2016.11.11）

マイナビ進学 FESTA（金沢）で講演（2016.7.14）

京都府生物教育会研修会を開催（2016.5.20）

京都府理科連絡協議会研修会を主催（2016.12.7）

京都大学大学院薬学研究科特論担当（春学期）

### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

研究助教は、所属研究室における基礎特別研究、応用特別研究などにおいて極めて重要な研究指導を行っている。学生は生化学、分子生物学、発生生物学に関わる実践的な知識を身につけるとともに、小型魚類の胚操作、発生実験などの高度な実験技術を修得した。また、フレッシューズセミナー、生命システム実習、生命資源環境実習などの授業科目においても、学部学生を指導しており、教育への貢献は大きい。

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、さらにはセミナーなどを通じて研究指導を行っており、学部全体の教育および研究レベルを向上させている。



ラボ集合写真、菖蒲池、茶室前にて。

# 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)マウス胚を作製して解析すること、(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て、エピブラスト内に生み出されるサブ領域や特定の細胞集団を解析すること、(3)エピブラスト幹細胞から、特定の細胞系列の幹細胞を作り出して、その制御を解析すること、(4)哺乳類と同じ羊膜類であるニワトリ胚/ウズラ胚を用いて、エピブラスト領域の異所移植の効果を解析すること。をこれらを研究方法の中心に据えつつ、柔軟な作戦で研究を展開している。

また、体細胞の分化に至る細胞系譜の理解、また特定の細胞種を生み出す細胞系譜が限定されていることの意味などを明らかにするには、例外的な現象であると見なされてきた「分化転換」の機構を研究することが有効である。この観点から、異なった胚組織が水晶体を生みだしようという現象を中心として、分化転換の機構も研究している。

## 2. 本年度の研究成果

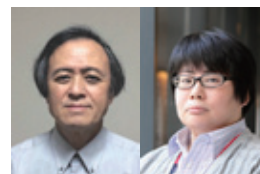
- (1) エピブラストの中に様々な領域が成立する過程が、さまざまな体細胞系列を発生させるための第一段階である。エピブラストの中にできる際立った構造は Node と原条である。マウスのエピブラスト幹細胞から、培養条件下で Node 様の組織状態を作り、それから内胚葉前駆体を効率よく作り出すための条件を検討した。これらの組織状態を生み出す、必要かつ最小限の条件として、3次元培養、Nodal 系シグナルの供給、Wnt シグナルの阻害が少なくとも必要であることがわかった。
- (2) mCherry を発現するトランスジェニックウズラのステージ 4 の胚の Node を、同ステージのニワトリ胚に異所移植することによってできる二次的な胚構造について、

教授 近藤寿人

Prof. Hisato KONDOH, Ph.D

助教 寺元万智子

Assist. Prof. Machiko TERAMOTO, Ph.D.



宿主と移植組織がどのように関与して作られるのかを解析した。その結果、頭部構造を作るには、宿主エピブラストが転写因子 OTX2 を発現することが必須であり、体幹部構造を作るには、エピブラストが OTX2 を発現しない領域に限定されることが明らかになった。

- (3) Node からは、脊索と内胚葉が発生するが、内胚葉は転写因子 SOX2 を発現して食道から胃にかけての消化管へと発生する領域、CDX2 を発現して腸へと発生する領域、NKX2.1 を発現して気管ならびに肺に発生する領域に分かれる。この内胚葉で Sox2 遺伝子を失活させると内胚葉の発生がどのように変化するかを、マウス胚を用いて解析した。SOX2 の発現がなくなっても、内胚葉全体が腸に変わることはないが、発生する食道が気管の性質を持つようになることがわかった。
- (4) エピブラスト幹細胞から効率よく神経幹細胞株を樹立する方法を確立した。神経幹細胞株を樹立する過程での Wnt シグナルの強度を操作すると、胚の中樞神経系の前後の領域に対応したさまざまな領域特性を持った神経幹細胞株を樹立することができた。低 Wnt 条件は、頭部に対応した(Otx2 発現)細胞株を生み、Wnt が高いと体幹部に対応した(Hox 発現)細胞株を生み出した。ひとたび領域特性が確立されると、いずれの株も培養条件の Wnt シグナル強度を変化させてもその領域特性は安定に維持され、分化条件に移すと、領域特性を持ったまま、ニューロン、Astrocyte、Oligodendrocyte に分化した。
- (5) 低頻度で水晶体を生む平板培養された網膜細胞に Notch シグナルの阻害剤を加えると、網膜細胞の大半が水晶体に分化することを見出し、その過程を解析した。Notch シグナルの阻害に引き続いて、Prox1, Pitx1 など、水晶体発生の初期過程を司る転写因子が発現された。この研究の結果、網膜自体に水晶体への潜在的な分化能が潜在しており、それが正常網膜発生では Notch シグナルなどの細胞間相互作用によって抑制されていること、その抑制が解除されると水晶体への分化が起きることを示した。つまり、発生過程での特定の細胞系譜は、複数の異なった細胞種への分化能を生むことがあるが、その場合には抑制機構によって見かけ上一義的な分化がもたらされている。

### 3. Research projects and annual reports

All somatic cells of our body develop from the epiblast, a sheet of cell group that are formed in post-implantation embryos in mammals and in laid eggs in avians, both belonging to the amniotes. How a variety of somatic cell lineages develop from initially homogeneous epiblast cells is a fundamental problem in developmental biology.

We investigate the functions of major transcription factors (TFs), e.g., SOX2 and signaling factors, e.g. Wnts, in epiblast cells and in the derivations of somatic cell lineages from the epiblast. The strategies include: (1) Use of conditional knockout mouse embryos that allow inactivation of specific TFs in defined cell groups and/or developmental stages; (2) Use of epiblast stem cell lines derived directly from mouse embryo epiblasts to analyze the process of regionalization of the epiblast cell sheet in vitro; (3) Derivation of stem cell lines representing an intermediate step of somatic development from the epiblast stem cells, in order to investigate the somatic lineage regulations; and (4) Use of avian embryo epiblast to investigate the effect of ectopic grafting of specific epiblast regions such as node.

The infrequent occurrence of the developmental process that gives rise to cell types that are usually not associated with the cell lineage is collectively referred to as “transdifferentiation”. Investigation of transdifferentiation phenomena will provide new insights into the mechanisms underlying cell lineage-dependent cell differentiation. Therefore, developmental processes of “transdifferentiation” that give rise to the lens tissue are also investigated.

- (1) The first step in the specification of somatic cell lineage is the regionalization of the epiblast cell sheet. The most prominent regional structures are the Node and the primitive streak. Starting from the epiblast stem cells in culture, we investigated the conditions under which cell organization representing Node-streak structures are formed and endoderm tissues are derived. We found that the three-dimensional culture of epiblast stem cells, low Wnt signaling, and high Nodal signaling are the minimal requirement for the formation of such cell organization.
- (2) We investigated the developmental process of the secondary embryonic structures formed upon

grafting of the second (quail) node at ectopic sites of the chicken epiblast, marking the quail tissue by mCherry transgene expression. Expression of Otx2 in the node-engrafted area was required for the development of secondary head structures, whereas the absence of Otx2 expression was required for the trunk structure development.

- (3) The endoderm that is derived from the node is regionalized with expression of the transcription factors Sox2 (esophagus and stomach precursor), Cdx2 (gut precursor) and Nkx2.1 (trachea and lung precursor). Conditional knockout of Sox2 in the endoderm resulted in transformation of the esophagus into trachea-like tissue, whereas gut development was not affected.
- (4) We established NSC lines from EpiSCs via passages in a serum-free culture condition. The NSC lines thus established produced neurons, astrocytes, and oligodendrocytes under differentiation conditions. We also established NSC lines with addition of either Wnt antagonist or Wnt agonist to the culture medium. Microarray analyses focusing on transcription factor transcripts indicated that NSC lines established under low- and high-Wnt conditions had characteristics of anterior and posterior CNS, marked by the expression of Otx2 and Hox genes, respectively. Our results suggest that the manipulation of extracellular signals during the NSC derivation allows the establishment of NSC lines harboring various regional specificities.
- (5) Embryonic neural retinas of avians produce lenses in culture, which is a paradigm of transdifferentiation. Retina-to-lens transdifferentiation occurs in spreading cultures, suggesting it is triggered by altered cell-cell interactions. Addition of Notch signal inhibitors strongly promoted lens development from the neural retina. After Notch signal inhibition, transcription factor genes that regulate the early stage of eye development, *Prox1* and *Pitx3*, were sequentially activated. These observations indicate that the lens differentiation potential is intrinsic to the neural retina, and this potential is repressed by Notch signaling during normal embryogenesis.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation. *Dev Biol*. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.004. Epub 2016 Nov 11.

Iida H, Yang T, Yasugi S, Ishii Y. Temporal dissociation of developmental events in the chick eye under low temperature conditions. *Dev Growth Differ*. 58, 41-749 (2016).

Menuchin-Lasowski Y, Oren-Giladi P, Xie Q, Ezra-Elia R, Ofri R, Peled-Hajaj S, Farhy C, Higashi Y, Van de Putte T, Kondoh H, Huylebroeck D, Cvekl A, Ashery-Padan R. Sip1 regulates the generation of the inner nuclear layer retinal cell lineages in mammals. *Development* 143, 2829-2841 (2016).

Teramoto M, Kudome-Takamatsu T, Nishimura O, An Y, Kashima M, Shibata N, Agata K. Molecular markers for X-ray-insensitive differentiated cells in the Inner and outer regions of the mesenchymal space in planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ*. 58, 609-619 (2016).

Kondoh H, Takada S, Takemoto T. Axial level-dependent molecular and cellular mechanisms underlying the genesis of the embryonic neural plate. *Dev Growth Differ*. 58, 427-436 (2016). (総説)

Takemoto T, Abe T, Kiyonari H, Nakao K, Furuta Y, Suzuki H, Takada S, Fujimori T, Kondoh H. R26-WntVis reporter mice showing graded response to Wnt signal levels. *Genes Cells*. 21, 661-669 (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, 205-214 (2016).

##### 著書

Uchikawa M, Nishimura N, Iwafuchi-Doi M, Kondoh H. Enhancer analyses using chicken embryo electroporation. In “*Methods in Molecular Biology – Avian and Reptilian Developmental Biology*” (Sheng G, eds) Springer (in press).

#### 5. 学会発表など

Kondoh H et al. Functional genomics of peri- and post-implantation stage stem cells. *The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Molecular Biology Society Japan*. Yokohama, 12.2 (2016).

Iida T, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation. *The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Molecular Biology Society Japan*. Yokohama, 12.1 (2016).

近藤寿人 ヘンゼン結節周辺組織の発生能の再検討. 日本発  
生生物学会秋季シンポジウム. 三島市 10.20 (2016).

飯田英明 神経性網膜に内在する水晶体分化能を抑制する  
Notch シグナル: その破綻が水晶体への「分化転換」をもたら  
す. 日本発生生物学会秋季シンポジウム. 三島市 10.19  
(2016)

Kondoh H. Functional genomics of peri- and post-implantation  
stage stem cells. *IRM Distinguished Lecture*, University of  
Pennsylvania Institute for Regenerative Medicine. 6.29  
(2016). (招待講演)

Kondoh H, Matsuda K, Mikami T, Oki S, Shigenobu S.  
Genome-wide functional interactions of five major  
transcriptional factors in mouse epiblast stem cells. *Cell  
Symposia: Transcriptional Regulation in Development and  
Disease*. Chicago, 6.26-28, 2016

Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Simultaneous promotion of neuronal  
and lens development from chicken embryonic neural retina.  
第 49 回日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Yoshihi K, Ishii Y, Kondoh H. Reinvestigation of the  
developmental potential of grafted Hensen's node. 第 49 回  
日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Nakamura K, Boitet C, Satake S, Yoshihi K, Ishii Y, Kondoh H.  
Direct derivation of embryonic neural progenitor cell lines  
from epiblast stem cells. 第 49 回日本発生生物学会年会.  
東京都 6.2 (2016).

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)

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(A)

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

研究代表者: 近藤寿人、取得年度: H26-28 年(3年)

##### 2) 知財権等 なし

##### 3) 学外活動

近藤寿人

日本発生生物学会 Development Growth and Differentiation  
副編集長

日本分子生物学会 Genes to Cells Associate Editor

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

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター

運営委員長

大阪大学大学院生命機能研究科 招へい教授

4) 受賞等 なし

5) 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

平成 28 年 3 月まで教育研究活性化支援制度による研究助教を務めた石井泰雄が東京女子医科大学講師に転任したことに伴い、その後任として寺元万智子が 9 月に研究助教に着任した。寺元は、*in situ hybridization* をはじめとした、現代的な組織解析のエキスパートで、技術的にも近藤を補完して、研究を大きく進展させた。特に、マウス胚を使った研究を担当している。基礎特別研究ならびに応用特別研究の学生に対して、実験指導から英文文献の講読にいたるまで、幅広く学術指導をおこない、充実した特別研究を体験させている。また、実習科目の補助などさまざまなかたちで、総合生命科学部の教育研究活動に貢献している。これからの一層の活躍が期待される。

# 発生情報研究室

Laboratory of Cell Signaling and Development

## 1. 研究概要

脊椎動物モデルのアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の生殖細胞、受精卵、および初期胚の生物学的機能を第1のテーマとして研究をおこなっている。アフリカツメガエルの卵巣には、細胞周期が第1減数分裂前期で一時停止状態にある未成熟卵母細胞がメス成体1個体あたり数千個以上存在する。これら未成熟卵母細胞は、数ヶ月間をかけて細胞成長(卵形成)を実行する。十分に大きく成長した未成熟卵母細胞がホルモン刺激を受けると、8時間程度をかけて卵成熟反応を実行する。成熟した卵母細胞は卵巣から離脱(排卵)して輸卵管を通過し、やがて総排泄腔から体外へ放出(産卵)される。産卵された成熟卵母細胞(未受精卵)はオス成体から放出された精子と合体(受精)し、受精卵となって発生を開始する。私たちは、これら一連の現象において、卵内および卵表層に存在する生体分子群(複合体)がどのような働きを担っているのかについて、特にタンパク質チロシンリン酸化酵素である Src(サーク)や同セリン/スレオニンリン酸化酵素 MAP(マップ)キナーゼの働きに焦点をあてて解析している。

私たちはまた、Src や MAP キナーゼの働きに同じく焦点をあててヒ膀胱がん細胞 5637 株を用いた「がん細胞の悪性機能」に関する研究を、もう1つのテーマとして取り組んでいる。がん細胞には一般に正常細胞と比較していくつかの特徴があることが知られている。その中で私たちは特に「自律的な細胞増殖」と「細胞死の回避」という2つに注目している。5637 細胞は血清飢餓環境下で特定の成長因子を自己分泌し、抗アポトーシス機構の作動を伴う形で細胞増殖を持続させる。この抗アポトーシス性の細胞増殖能は Src を含むいくつかのタンパク質チロシンリン酸化酵素の活性に依存していることがわかっており、その詳細を明らかにすることを目指している。

## 2. 本年度の研究成果

アフリカツメガエルの未成熟卵母細胞がホルモン刺激を受けて卵成熟反応(評価基準:MAP キナーゼのリン酸化/活性化、細胞表層の形態変化、卵核胞 germinal vesicle の崩壊等)を起こすときには、細胞が卵巣(臚胞細胞がつくる袋構造)から離脱し、輸卵管通過を経て体外放出する一連の動きが同時進行で起こる。単離した卵巣組織から臚胞細胞付きの未成熟卵母細胞試料を調

教授 佐藤 賢一

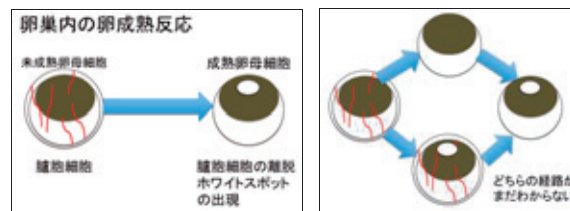
Prof. Ken-ichi SATO, Ph. D.



助教 トクマコフ アレクサンダー

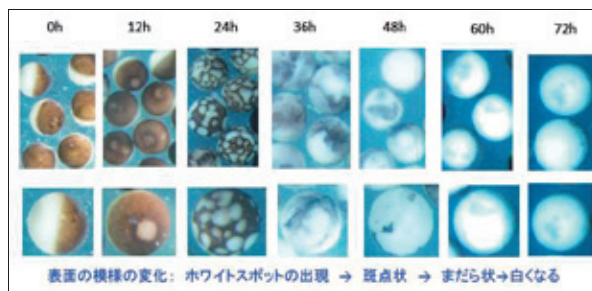
Assist. Prof. Alexander A. TOKMAKOV, Ph. D.

製し、前述したホルモン依存的現象の初期段階(卵成熟と卵巣からの離脱)の試験管内再構成(in vitro ovulation システム)を試みた。その結果、プロゲステロンによる卵巣内未成熟卵母細胞の卵成熟と卵巣からの離脱の再構成が可能であること、成熟卵母細胞は常に臚胞細胞から離脱していること、ただしその実行効率は10%以下であること、等が明らかとなった(下図、未発表)。



これらのことは、卵成熟反応が卵巣離脱に先立って起こる、MAP キナーゼ活性化に依存した現象であることを示唆している。現在、プロゲステロン以外の卵成熟/排卵誘導物質を検討し、また MAP キナーゼ活性化の生理的意義を阻害剤の併用により検討している。

産卵された成熟卵母細胞(未受精卵)は、受精しないまま一定時間以上経過するとアポトーシスを起こすことがわかっている(下図)。



このとき同時にあるいはアポトーシス反応の上流・下流で働く細胞内外の機構を明らかにすることを目的としていくつかの実験も行った。1卵細胞に対するマイクロキャピラリーを使った経時的な卵細胞質サンプリング法により、細胞内 mRNA のアポトーシス卵における非選択的な(あるいはグローバルな)崩壊が起こっていることが明らかとなった(論文発表済)。また蛍光プローブを使った生細胞イメージング解析により活性酸素種の産生がアポトーシス実行卵で上昇していることも明らかにした(学会発表済)。現在これらの現象の生理的意義を検証している。

### 3. Research projects and annual reports

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

In the *Egg Project*, we attempted to reconstitute hormone-dependent ovulation and maturation of immature oocytes in the ovary (in vitro ovulation system). Results so far obtained demonstrate that progesterone-induced maturation of ovarian, follicle cell-layered oocytes, is always accompanied by their release from the follicle cells. The results suggest that oocyte maturation, as assessed by the appearance of white spot on the cell surface, is a prerequisite event for ovulation. We are now investigating the use of other compounds for in vitro ovulation and the effect of specific inhibitors on the in vitro maturation and ovulation processes. We also attempted to demonstrate cellular phenomenon that is associated with the occurrence of hormone-induced senescence and apoptosis of oocytes and eggs. We found that numerous cytoplasmic mRNAs, coding for proteins classified in different functional types, are robustly degraded in apoptotic *Xenopus* eggs, but not in aging oocytes. mRNA degradation becomes evident in the eggs after meiotic exit at the time of cytochrome c release. Our preliminary experiments also demonstrated that production of reactive oxygen species was up-regulated in apoptotic, but not in non-apoptotic, oocytes, as judged by the live-cell imaging analyses using a specific fluorescent probe DCFDA. Its physiological importance for maintenance of cell viability and the onset of apoptosis is under investigation.

### 4. 論文, 著書など

K. Sato. 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) pp.383-400.

AA. Tokmakov, Iwasaki, K. Sato, S. Kamada. Reprogramming of somatic cells and nuclei by *Xenopus* oocyte and egg extracts. *Int. J. Dev. Biol.* 2016, **60**, 289-296

AA. Tokmakov, S. Iguchi, Iwasaki, Y. Fukami, K. Sato. Global decay of mRNA is a hallmark of apoptosis in aging *Xenopus* eggs. *RNA Biol.* In press.

### 5. 学会発表など

佐藤 賢一、井尻 貴之、トクマコフ アレクサンダー

アフリカツメガエル卵の成熟・受精・アポトーシス。次世代両生類研究会第2回会合 ゲノム・エピゲノムからリプログラミング・器官形成まで 両生類研究の新展開。岡崎市。2016. 8.9-9

佐藤 賢一、西川 裕貴、荒井 華菜香

ヒト膀胱がん細胞におけるSrc依存性抗アポトーシス増殖機構：新たなSrc基質としてのFAKキナーゼの同定。第75回日本癌学会学術総会。横浜市。2016. 10.6- 8

佐藤 賢一、トクマコフ アレクサンダー、井尻 貴之

アフリカツメガエル卵の成熟・受精におけるUPIII-Srcシステムの機能獲得および発現。第39回日本分子生物学会年会。横浜市。2016. 11.30- 12.2

トクマコフ アレクサンダー、J. Surawich、佐藤 賢一

Quantitative assessment of cell senescence markers in aging *Xenopus* oocytes and eggs. 第39回日本分子生物学会年会。横浜市。2016. 11.30- 12.2

黒谷 篤之、トクマコフ アレクサンダー、山田 豊、篠崎 一雄、櫻井 哲也

被子植物および藻類におけるタンパク質の翻訳後修飾部位とディスオーダー領域の関係。第39回日本分子生物学会年会。横浜市。2016. 11.30- 12.2

トクマコフ アレクサンダー、井口 将、岩崎 哲史、佐藤 賢一

Analysis of ROS levels in aging *Xenopus* oocytes and eggs. 日本動物学会第87回大会。宜野湾市。2016. 11.17- 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(C)

課題名:卵細胞膜マイクロドメイン UPIII-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(3年)

#### 2) 知財権等 該当なし

#### 3) 学外活動

公益財団法人大学コンソーシアム京都:

2015年度FDフォーラム検討委員会・委員(〜3月)

2016年度FDフォーラム検討委員会・副委員長(6月〜)

2016年度 運営委員、国際事業部長(4月〜)

#### 4) 受賞等 該当なし

#### 5) その他

Short-term Student Exchanging Program(7月6日〜8月4日)

受け入れ学生:Surawich Jeensuk(マヒドン大学獣医科学部)

受け入れ研究室:発生情報研究室(佐藤 賢一)

京都産業大学教育プログラム支援制度(平成28年度)

課題名:ハテナソンで教室を変える、学びを変える

代表者:佐藤 賢一

大学コンソーシアム京都第21回 FDフォーラム第1分科会(3月5~6日開催)

報告者:大西 辰彦、小川 俊雄、山崎 智文、山口 洋典、高橋 あゆみ

タイトル:地域貢献アウトキャンパス活動がもたらす学生の成長:その現状と可能性について

コーディネータ:佐藤 賢一

総合生命科学部バイオフォーラム(7月6日開催)

講演者:Steven W. L'Hernault 教授(米国・エモリー大学)

タイトル:「Looks Aren't Everything: What Nematode Sperm Are Teaching Us About Fertilization」

世話人:佐藤 賢一

教学改革 ICT 戦略大会(9月6~8日開催)

発表者:佐藤 賢一、近藤 寿人、岸川 淳一

タイトル:生命科学の学びを豊かにするための英語のよい教育を模索する

科学技術振興機構 プログラム・マネージャーの育成・活動躍進プログラム 第2期研修生(10月14日~)

研修者:佐藤 賢一

学内ハテナソン\*・アイデアソン企画(授業を除く)

3月22日 教職学向けアイデアソン体験&学習会

7月21日 京産大キャリア教育アイデアソン

9月13日 教職員向けハテナソン体験&学習会

12月7日 京都府高等学校理科教育研究会連絡協議会

学外ハテナソン企画(授業を除く)

3月5日 大学コンソーシアム京都第21回 FDフォーラム第1分科会

10月4日 体験&勉強会(京都、地球環境学研究所)

11月27日 日本旧石器学会研究会(奈良市)

11月29日 質問するカフェ(東京都千代田区)

12月3日 質問するカフェ(札幌市中央区)

学外ハテナソン授業

6月24日 京都産業大学附属高等学校

7月12日 兵庫県立明石城西高等学校

(以上、コーディネータ/ファシリテータ:佐藤 賢一)

\*ハテナソン:質問や疑問を意味する“はてな(?)”とマラソンを組み合わせた用語で佐藤賢一が2016年に造語した。「一人ひとりの発想が尊重され、かつ民主的なルールのもとで質問をつくる取り組み、ワークショップなど」というコンセプトを意味する。課題解決の取り組みにハッカソン、課題に対する解決策づくりの取り組みにアイデアソンという用語がそれぞれ使われている。対して、そもそも何が課題・問題であるのかを言語化または可視化する取り

組みにハテナソンという用語を使うことができる。

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

トクマコフ研究助教は2016年度において、生物学実験および生命システム実習I(生命システム学科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。また、トクマコフ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7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、2016年度分属生が、学会や各種研究会への参加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できたことを含む、学部教育への「間接的な教育効果」をもたらした。



研究室の集合写真(11月:15号館と14号館のあいだで)



L'Hernault 教授の来訪時のスナップ写真(7月:研究室等で)



# 血管と神経生物学研究室

Laboratory of Vascular and Neuronal Biology

教授 瀬尾 美鈴

Prof. Misuzu Seo, Ph. D.



## 1. 研究概要

日本では、1980年以降がん(悪性新生物)が死因第一位を保ったままである。本研究室では、特に血管内皮増殖因子 VEGF-A と線維芽細胞増殖因子 FGF によるがん悪性化のシグナル伝達を標的とする分子標的薬とがん治療効果の診断薬の開発を目標として基礎研究を展開している。悪性がん細胞で発現が上昇する VEGF-A 受容体ニューロピリン 1(NRP1)の細胞内シグナル伝達経路で働く GIPC1 と Syx の相互作用を阻害する細胞透過性ペプチド(CCP)を作成した。CCP 投与により、ヒト神経膠芽腫を移植したマウスの遠位リンパ節への転移が抑制されることを示した。また、企業と共同研究によって食道がんの早期発見をめざした診断薬の開発を実施している。博士前期課程松島章子さんは、研究テーマである神経軸索ガイダンス分子 Anosmin-1 が血管内皮細胞に対する生理作用を VEGF 受容体である VEGFR2 を介して及ぼしていることを証明した。この研究成果は、中枢神経系における血管形成と神経系発生が密接に調節されていることを示し、先天性神経疾患カルマン症候群の病因の1つを解明する重要な発見である。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) 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

Anosmin-1 は中枢性性腺機能低下症 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。本研究において、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC と不死化したマウス大脳皮質微小血管内皮細胞 bEnd3 細胞を用いて、Anosmin-1 が血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を促進することを示した。さらに、ニワトリ胚(E10)の嗅球および肺動脈の組織培養で Anosmin-1 が血管新生を促進することを示した。さらに、本研究では、Anosmin-1 の血管内皮細胞における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して VEGFR2 のリン酸化を調べたところ、Anosmin-1 が VEGFR2 のチロシンリン酸化を促進し、細胞遊走を促進することを示した。また、VEGFR2 の活性化には Anosmin-1 の4個のフィブロネクチン様ドメイン III 型(FnIII)のうち、2番目と3番目が重要であることを

明らかにした。以上の結果から、Anosmin-1 の変異により、従来の定説である嗅上皮から嗅覚神経の脳内侵入の異常による嗅球形成不全がおこるだけでなく、嗅球における血管形成不全が嗅球形成不全の原因となりうることを示した。

### 2) 食道がんにおける FGFR3IIIc アイソフォーム検出の特異的抗体作成と食道がん組織染色の検討

ヤマサ醤油株式会社との共同研究で、食道がんの早期発見のための抗体開発を行った。日本における食道がんの90%は扁平上皮癌である。正常扁平上皮では、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 FGFR3IIIb が発現しているが、がん部位では 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以前示している。正常上皮間葉転移(EMT)の過程で、スプライシングの異常が FGFR3IIIc アイソフォームの発現を誘導している可能性が高い。FGFR3IIIc 発現の上昇が食道がんの初期診断、また抗がん剤治療による治療マーカーとして有用であるかを食道がん組織染色によって評価している。

### 3) カルマン症候群原因遺伝子産物 Anosmin-1 は Netrin-1 と相互作用し嗅神経の伸長を促進する

Netrin-1(NTN1)は嗅索ニューロンを誘引する神経軸索ガイダンス分子である。当研究室の浅野は、Anosmin-1(Anos1)と NTN1 が直接結合することを見いだした。本研究では、ニワトリ胚を用い、中枢神経系での Anos1 と NTN1 タンパク質の共局在と、Anos1 と NTN1 の相互作用により嗅神経の誘引作用に影響を及ぼすかを解析した。E8~E12 の嗅球で Anos1 および NTN1 タンパク質が共局在していることが認められた。ニワトリ胚から採取した嗅上皮(E3~E4)の近傍に Anos1 または NTN1 タンパク質を強制発現させた HEK293T 細胞塊(コントロール: HEK、Anos1: Anos1-HEK、NTN1: NTN1-HEK)を25%マトリゲルと60%コラーゲン中で共培養し、神経マーカーである Tuj-1 抗体を用いた免疫染色法により嗅神経の誘引作用を検証した。Anos1-HEK または NTN1-HEK 単独の神経突起誘引作用は HEK と比較して高かった。また、Anos1/NTN1-HEK の神経突起誘引作用は Anos1-HEK または NTN1-HEK 単独と比較して高く、Anos1 および NTN1 の相互作用により、発生期の脳にお

いて嗅上皮から嗅球への嗅神経の伸長を相乗的に促進・誘引していることが示唆された。

#### 4) VEGF-A/ニューロピリン-1(NRP1)を阻害する膜透過性ペプチドは腫瘍の成長と転移を抑制する

多くの悪性腫瘍において、血管内皮増殖因子(VEGF-A)とその受容体ニューロピリン-1(NRP1)の発現が上昇する。以前、我々はVEGF-AがNRP1を介してがん細胞(ヒト皮膚、前立腺がん、神経膠芽腫)の増殖・浸潤をオートクリンに促進することを報告した。VEGF-AはNRP1の細胞内領域と足場タンパク質GIPC1との結合を誘導し、GIPC1はRhoGEFのSyxと複合体を形成する。SyxはRhoAを活性化しCDK阻害因子p27の分解を促進し、その結果がん細胞の増殖を促進した(Yoshida et al. 2015)。今回、VEGF-AがNRP1に結合し誘導する細胞内シグナル伝達を阻害する膜透過性ペプチドを用いて、がん細胞の増殖と浸潤、転移の抑制効果を検討した。GIPC1とSyx間の結合を阻害する膜透過型ペプチドを添加すると、がん細胞の増殖と浸潤はそれぞれ20-40%、20-50%に減少した。神経膠芽腫細胞を移植したヌードマウスにペプチドを腹腔内投与(240  $\mu$ g/マウス)すると、コントロール群と比較して腫瘍体積が60%に減少した。転移については、近位のリンパ節へは25%、遠位のリンパ節へは41%抑制された。以上のことから、VEGF-A/NRP1シグナルはがん細胞の増殖と転移を抑制する新たな分子標的として有効であると考えられる。

### 3. Research projects and annual reports

#### 1) An axonal guidance molecule Anosmin-1 enhances angiogenesis via VEGFR2 signaling in endothelial cells.

Anosmin-1 is a 100 kDa-secreted glycoprotein, which is encoded by the Kallmann syndrome (KS) causative gene termed KAL-1. Anosmin-1 is an axon guidance molecule, which induces olfactory nerve from olfactory epithelium and forms the olfactory bulbs (OBs). KS is a congenital disease, which is characterized by hypogonadism due to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency, and a defective sense of smell related to the defective development of the olfactory bulbs (OB) and olfactory tracts. Many axon guidance molecules have physiological activities on endothelial cells (ECs). However, it is not yet known whether Anosmin-1 has physiological function with endothelial cells. We examined whether Anosmin-1 affect ECs function by using HUVEC, bEnd3 cells and chick embryo (E10) OBs. In this study, we showed that

Anosmin-1 induced tube formation in the ECs and activated VEGFR2 and PLC-PKC signaling pathway. The VEGFR2 inhibitor SU5614 or knockdown of PLC $\gamma$ 1 inhibited the Anosmin-1-induced tube formation of ECs. Furthermore, in the tissue culture, Anosmin-1 induced angiogenesis in the OBs and lung aortic vessels of chick embryos. In addition, using Porcine aortic endothelial cells (PAE) and PAE overexpressing VEGFR2 (PAE/KDR) we showed that Anosmin-1 induced migration of PAE/KDR but not PAE, and phosphorylated VEGFR2. Studies with Surface Plasmon Resonance analysis showed that Full size anosmin-1 interacts with soluble VEGFR2 (sVEGFR2) with Kd 32nM. The truncated form of Anosmin-1 which lacks the N-terminal second to forth FnIII domains had lower affinity to VEGFR2 and lost almost activity to enhance PAE/KDR migration, and induced less phosphorylation of VEGFR2 compared to Full size Anosmin-1. These results suggest that Anosmin-1 interacts with VEGFR2 through its second and third FnIII domains to activate its downstream signaling inducing endothelial migration. In conclusion, these results shed light on the understanding the mechanism of the hypoplasia of OB in KS that may be caused by an angiogenesis disorder due to the mutation of Anosmin-1.

#### 2) A cell-penetrating peptide that inhibits the interaction between GIPC-1 and Syx suppressed cancer cell proliferation and metastasis.

In many types of cancer patients, Neuropilin-1 expression was correlated with tumor aggressiveness, advanced disease stage and poor prognosis. Therefore, it is intriguing to develop the inhibitor of VEGF-A/NRP1 signaling for molecular target cancer drug therapies. We have previously shown that VEGF-A binding to NRP1 induces the binding of GIPC-1 and Syx to activate RhoA, thereby promoting degradation of p27<sup>kip1</sup>, CDK inhibitor. Thus, it promotes G1 to S-phase transition in cancer cells. The cell-penetrating peptide corresponding to the sequences of eight amino acids of Syx C-terminus competitively interfered with GIPC-1 interaction with Syx. The peptide inhibited RhoA activation, cell proliferation and invasion of cancer cells. Further modifications of the cell-penetrating peptide for higher affinity to GIPC-1 and longer half-life may contribute to increase effectiveness on inhibition of cancer progression. These findings provide strong evidence for

the importance of VEGF-A-binding to NRP1 in cancer cell proliferation, invasion, and metastases in vivo. Targeting to the VEGF-A/NRP1 signaling molecules will be powerful means for developing new cancer therapeutic drugs.

#### 4. 論文, 著書など

Ohtaka K, Fujisawa Y, Takada F, Hasegawa Y, Miyoshi T, Hasegawa T, Miyoshi H, Kameda H, Kurokawa-Seo M, Fukami M, Ogata T. FGFR1 analyses in four patients with hypogonadotropic hypogonadism with Split-Hand/foot malformation: Implications for the promoter region. *Hum Mutat.* **38(5):503-506.** (2017)

#### 5. 学会発表など

山根銀平、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/NRP-1シグナルの阻害はがんの増殖と転移を抑制する。第63回日本生化学会近畿支部例会、神戸市、2016.5.21(口頭発表、ポスター発表)

和田千菜津、清水昭男、浅野弘嗣、石井泰雄、木田朱音、安木実悠、徳村脩人、小野勝彦、村上志津子、佐藤直子、瀬尾美鈴: カルマン症候群原因遺伝子産物Anosmin-1はNetrin-1と相互作用し嗅神経の伸長を促進する。第63回日本生化学会近畿支部例会、神戸市、2016.5.21(口頭発表、ポスター発表)

松島章子、清水昭男、浅野弘嗣、近藤真菜美、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63回日本生化学会近畿支部例会、神戸市、2016.5.21(口頭発表、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は嗅球の血管新生を誘導した。第89回日本生化学会、仙台市、2016.9.24-27(ポスター発表)

Misuzu K. Seo, Ayumi Yoshida, Akio Shimizu: BIT's 7<sup>th</sup> Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2017, Xi'an, China, 2017.4.25-27 (国際学会招待講演)

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

共同研究・ヤマサ醤油株式会社

課題名: 線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)のアイソフォームであるFGFR3IIIcに対する抗体の開発、および当該抗体の性能評価と組織染色法での有用性の検討

研究代表者: 瀬尾美鈴, 取得年度: H28年7月1日-29年6月30日

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

平成28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

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

日本生化学会近畿支部幹事

日本生化学会近畿支部奨励賞審査委員

京都府発明等功労者表彰審査委員

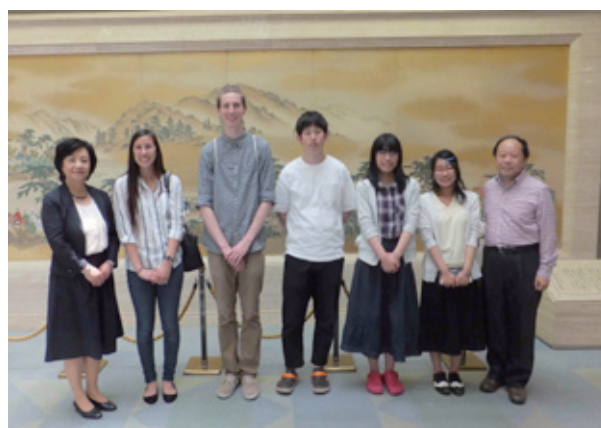
4) 受賞等 なし

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60回京都府発明等功労者の審査を行った。2016年3月

瀬尾美鈴: 平成28年度ダイバーシティ推進室 副室長

松島章子: 京都産業大学大学院生命科学研究科・博士前期課程、学位取得



立命館大学西澤先生と米国立イカロレッジからのインターンシップ学生との研究交流(2016年6月8日)

卒業式と大学院修了式後に(2017年3月19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.

助教 藤原 圭吾

Assist. Prof. Keigo Fujiwara, 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。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) 大腸菌翻訳途上鎖の網羅的プロファイリング

翻訳途上のタンパク質は C 末端に tRNA が共有結合したペプチジル tRNA の状態にある。そのため、tRNA の有無を調べることで、翻訳が完了したタンパク質と翻訳途上鎖とを区別することができる。以前、当研究グループは、C 末端 tRNA の有無を指標に翻訳途上鎖を合成完了鎖

と電気泳動上で区別する方法を開発し、以来、細胞内における翻訳途上鎖の集団 (nascentome と命名) を直接的に観察する試みを進めてきた。今回、東京工業大学 田口英樹研究室との共同研究で、大腸菌の個々の遺伝子産物から合成される翻訳途上鎖を *in vivo* および *in vitro* で網羅的に解析した。1つの遺伝子から生じる翻訳途上鎖はその伸長の途上では多様なサイズからなる集団である。翻訳伸長が一定速度で進行するならば、特定のサイズの翻訳途上鎖のみが蓄積することはない。一方、翻訳途上の特定の部位で伸長反応が一時停止する場合には、特定の長さの翻訳途上鎖が特異的に蓄積し、電気泳動で1つのバンドとして検出されることが期待される。今回、大腸菌遺伝子の中から 1,038 遺伝子についてパルスラベル実験を行ったところ、*in vivo*、*in vitro* ともに、8割以上のタンパク質で1回以上の翻訳伸長のポーズが起こることを示す結果が得られた。このことは、実際の翻訳が多くの場合速度変化の緩急を伴って進行するものであることを示している。また、ピューロマイシン感受性試験から、翻訳伸長のポーズが多様な機構で起こることを示唆する結果も得られた。

### (2) 枯草菌 MifM-リボソーム間相互作用の全容解明に向けて

枯草菌 MifM は、翻訳の途上で、自身を合成するリボソームと相互作用することで自らの翻訳伸長をアレストする。この MifM の持つユニークな性質は、MifM によるタンパク質膜挿入装置 YidC の活性のモニタリングとそれを介した YidC 経路によるタンパク質膜組込み活性の恒常性維持に必要である。この翻訳アレストは、MifM の C 末端付近に存在する特定のアミノ酸配列 (アレストモチーフ) がリボソームの大サブユニットにあるペプチド鎖排出トンネルの内壁やリボソーム活性中心付近の成分と相互作用することで引き起こされる。今回、さらに N 末端側に位置する領域への変異導入によっても MifM の翻訳アレストが不安定化されることが見出された。精製再構成翻訳系を用いた解析でもこの領域の変異効果が *in vivo* と同様に観察されたことから、翻訳装置そのものに関わる現象であり、例えばこの領域が直接リボソームと相互作用することで翻訳アレストを安定化させていることが考えられる。この領域は、アミノ酸配列上の翻訳停止位置からの位置関

係および構造解析の結果から、リボソームの外部に露出していると判断できる。MifM とリボソームとの相互作用は、トンネルの内部にとどまらず、リボソームの表面を含めた非常に広範囲にわたる領域で起こることが示唆された。

### 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 midst of the process of biosynthesis. A remarkable property of this class of nascent chains is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those of the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the cellular physiology that is executed by the target gene function, allowing each nascent chain to serve as a unique biological sensor to feedback-regulate the target gene expression. In the MifM regulatory system, its translation arrest is released when the nascent MifM chain, as a monitoring substrate of YidC (the regulatory target), engages in the YidC-mediated insertion into the membrane. The regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the cellular capacity of membrane protein biogenesis. 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. We envision that our research activities outlined above may ultimately lead to the development of 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) Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling.

Translation is a key biological process where genetic information is converted into functional

bio-molecules. Several recent studies have revealed that translation elongation sometimes undergoes transient pausing, which could possibly affect efficiency of cotranslational folding or localization of newly synthesized proteins. To understand whether and how generally the elongation pausing takes place during proteome biogenesis, we carried out systematic profiling of translation elongation of total 1,038 *E. coli* genes both in vivo and in vitro. Our results revealed that translation elongation of more than 80% of tested genes underwent transient pausing in vitro, in vivo, or both in vivo and in vitro. Our puromycin sensitivity tests suggest that there are several distinct mechanistic modes to induce elongation pause. Our data reveal that elongation pausing is a widespread event during proteome biogenesis.

##### 2) Interactions between MifM and the ribosome for the elongation arrest

MifM is a regulatory nascent chain that monitors cellular activity of membrane protein insertase, YidC, by a mechanism involving regulated translation elongation arrest. The elongation arrest requires cotranslational interactions between a specific amino acid motif (arrest motif) near the C-terminus of the MifM nascent polypeptide and the ribosomal components in the region from the peptidyl transferase center through the polypeptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. Our analysis currently under way revealed that mutations in the region N-terminal to the previously determined arrest motif of MifM caused destabilization of the elongation arrest. We reproduced the mutational effects in in vitro translation reactions reconstituted with purified translation components. These results suggest that the region N-terminal to the “arrest motif” also contributes to the stable elongation arrest most likely by directly interacting with the ribosome components. Structural data of the MifM-ribosome complex as well as the primary structure information suggests that such interactions occur probably on the surface of the ribosome rather than within the exit tunnel. Our analyses reveal that the elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the nascent chain and the ribosome.

#### 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) **113**, E829-838.

##### 5. 学会発表など

Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of a protein localization machinery. The 18th Tokyo RNA Club 2016. 1. 14 東京(招待講演)

Shinobu Chiba, Naomi Shimokawa-Chiba, Koreaki Ito: Use of *Bacillus subtilis* MifM to dissect the YidC functions to facilitate membrane protein insertion. Gordon Research Conference: Protein Transport Across Cell Membranes. 2016. 3. 6-11 Galveston, TX

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:ピブリオ属細菌における新生ポリペプチド鎖を介した発現制御機構 第13回21世紀大腸菌研究会 2016. 6. 2-3. 南阿蘇

Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of the membrane protein biogenesis factor. Nascent Biology and Ribosome Functions. 2016. 6. 27. 京都(招待講演)

Shinobu Chiba, Eiji Ishii, Yoshinori Akiyama, Koreaki Ito, Hiroyuki Mori: Nascent chain-mediated monitoring of protein localization machineries. EMBO Ribosome Structure and Function 2016. 2016. 7. 6-10 Strasbourg, France

Keigo Fujiwara, Shinobu Chiba: Role of the PTC-distal interactions between the MifM nascent polypeptide and the ribosome on the ribosome stalling. EMBO Ribosome Structure and Function 2016. 2016. 7. 6-10 Strasbourg, France

藤原圭吾、千葉志信:MifMの翻訳アレストを支える新規相互作用の解明 2016年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2016. 8. 29-30. 熱海

Naomi Shimokawa-Chiba, Shun Minobe, Koreaki Ito, Shinobu Chiba: A nascent chain-based reporter to study the mechanism of membrane protein insertion. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖

Keigo Fujiwara, Shinobu Chiba: Involvement of peptidyl transferase center-distal molecular interactions in MifM-instructed translation arrest. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖

Koreaki Ito: Dynamic translation entails nascent polypeptides as active players in gene regulation and protein biogenesis.

Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖(招待講演)

千葉志信:上流 ORF による翻訳アレストを介したタンパク質膜組込装置のモニタリングと発現調節 日本遺伝学会第 88 回大会 2016. 9. 7-9. 三島(招待講演)

千葉志信、Daniel Sohmen, Daniel Wilson, 藤原圭吾、下川(千葉)直美、伊藤維昭:自身の翻訳伸長を制御する枯草菌 MifM の分子機構と生理機能 第 4 回リボソームミーティング 2016. 9. 17-18 大阪医大

藤原圭吾、千葉志信:枯草菌 MifM の翻訳アレストに関わる新規相互作用の解明 第 4 回リボソームミーティング 2016. 9. 17-18 大阪医大

千葉志信、下川(千葉)直美、美濃部隼、伊藤維昭:チャネル非依存的タンパク質膜挿入装置 YidC の分子機構解明に向けて 第 89 回日本生化学会大会 2016. 9. 25-27 仙台(招待講演)

伊藤維昭:タンパク質誕生の真実 タンパク質動態研究所開設記念シンポジウム 2016. 10. 26 京都産業大学(招待講演)

伊藤維昭:遺伝情報の翻訳に携わる分子の自律性 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「RNA 研究から再考する遺伝情報のセントラルドグマ」2016. 11.30-12.2. 横浜(招待講演)

田口英樹、茶谷悠平、丹羽達也、千葉志信、伊藤維昭: Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「発現制御装置としてのリボソームの新機能」2016. 11.30-12.2. 横浜

##### 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:非チャネル型タンパク質膜挿入マシーナリーの分子機構の解明

研究代表者:千葉志信、取得年度:H28-31年(4年)

###### 2) 知財権等 なし

###### 3) 学外活動

千葉志信:第4回リボソームミーティング(大阪医大)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

## 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藤原圭吾助教は、その専門性を生かし、基礎特別研究、応用特別研究において、学生に対する実験指導に大いに貢献している。例えば、実験技術の習得を目指す学生にとって藤原助教による手厚い指導はなくてはならないものであり、また、藤原助教自らの研究活動の姿勢や研究室での作法が学生のよい手本ともなっている。研究活動を通じての学びでは、専門知識や技術の習得に加え、論理的思考力、表現力、コミュニケーション力の向上が期待されるが、藤原助教は、学生とのコミュニケーションを通じてそれらの能力を向上させるための教育にも積極的に関わっており、その貢献度は非常に高い。加えて、生命システム学科の化学実験、生命システム実習Ⅰ、生命資源環境学科の生命資源環境学実験・演習Ⅱなどの必修科目でも専任教員と協力して指導を行っており、それらを通じて学部教育にも貢献している。



第4回ラボソームミーティングを大阪医大の吉田秀司先生らと共同で主催した。研究室の分属学生らも会場設営の手伝いを担当した。上の写真は、懇親会におけるラボメンバーの様子。

# 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、多数のO-グリカンをもつ高分子の糖タンパク質である。正常な上皮細胞では、新たに合成されたムチンはアピカル側に輸送されるが、上皮細胞の悪性化による細胞極性の消失に伴い、ムチンは細胞表面全体に輸送されるようになる。がん組織微小環境は、癌細胞と免疫細胞などを含む間質細胞で構成される。結果として、癌組織微小環境では、あらたな細胞間相互作用や細胞とマトリックスの相互作用が生ずると考えられる。我々は上皮細胞に普遍的に発現している MUC1 ががん組織微小環境に存在する様々なレクチンと相互作用する可能性があると考えた。事実、ヒトがん組織標本において、MUC1 が ガレクチン-3 やシグレック-9 と共局在することを免疫化学的に示した。従って、我々はレクチンの結合を起点とした MUC1 仲介性のシグナル伝達と腫瘍の悪性化について研究してきた。これらの研究過程において、MUC1 の発現亢進に伴って発現が上昇するタンパク質を DNA マイクロアレイにより検索した。その中で、Trop 2 が著しく誘導されることがわかった。Trop 2 (TACSTD2) は細胞膜糖タンパク質で、様々な上皮性癌細胞に高発現している。Trop 2 は GA733 (Gastrointestinal tumor-associated antigen)ファミリーに属し、EpCAMとして知られる GA733-2 と GA733-1(Trop 2)からなる。Trop 2 は EpCAM と約 49% のホモロジーがあり、高い構造的類似性をもつ。Trop 2 の発現は膀胱癌、大腸癌や卵巣癌のような様々な癌の悪性度や予後不良と関連している。EpCAM の過剰発現も多くの悪性腫瘍でしばしば検出されている。

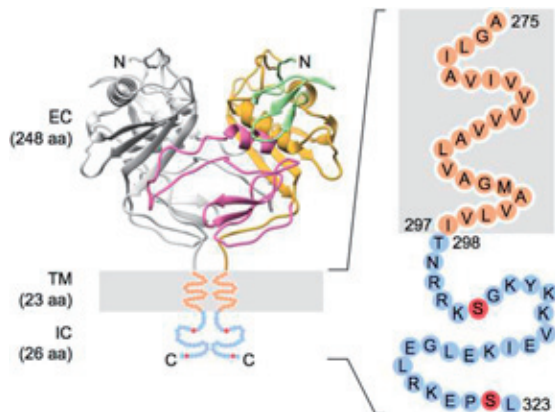


図 1 Trop 2 の模式図

教授 中田 博

Prof. Hiroshi Nakada, Ph. D.



研究助教 山下 智子

Assist. Prof. Tomoko Yamashita, Ph. D.

## 2. 本年度の研究成果

### 1) Trop 2 のリン酸化とその生物学的意義

Trop 2 の機能に関連して、GDLD ( Gelatinous drop - like dystrophy; 膠様滴状角膜ジストロフィー) において Trop 2 遺伝子の変異が直接的病因とされ、変異型 Trop 2 は角膜上皮組織のバリア機能を障害することが報告されている。しかしながら、癌において Trop 2 の変異は今まで報告されていない。従って、我々はリン酸化のような Trop 2 の修飾が生物学的機能に関連すると考えた。Trop 2 の細胞質側には 3 カ所のリン酸化される可能性のあるアミノ酸残基が存在する (303Ser,306Tyr,322Ser)。Frag タグ付き野生型 Trop 2cDNA をヒト大腸癌細胞株の HCT116 細胞に導入した。Trop 2 の発現はフローサイトメーターとウエスタンブロットで確認した。Trop 2 はおそらく糖鎖の不均一性のために、分子量 45kDa から 70kDa の幅広いバンドとして検出された。事実、細胞のライセートより免疫沈降した Trop 2 を N-グリカナナーゼ処理後に電気泳動すると約 40kDa の分子量の明確なバンドが検出された。リン酸化された Trop 2 とリン酸化されていない Trop 2 を見分けるために、Trop 2 を N-グリカナナーゼ処理した後、ホスタグを含むアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、ウエスタンブロットで解析した。2 つのバンドが明確に検出され、Ser あるいは Tyr のいずれかの 1 残基がリン酸化されることが示唆された。また、ウエスタンブロット後、抗リン酸化チロシン抗体を用いて、リン酸化チロシンを検出したところ、無視できるレベルであり、リン酸化部位は Tyr 残基ではなく、303, 322Ser 残基のいずれかであることが示唆された。そこで、303 または 322Ser 残基を Ala 残基に変異した Trop 2 を強制発現した細胞 (HCT116/303S/A Trop 2, HCT116/322S/ATrop 2) を作成した。それぞれの Trop 2 変異株より細胞溶解液を作成し、Trop 2 を調製した。同様に N-グリカナナーゼ処理後に電気泳動、ウエスタンブロットで解析したところ、303 Ser を Ala に変換した Trop 2 では、野生型 Trop 2 と同様に 2 つのバンドが検出されたのに対し、322 Ser を Ala に変換した Trop 2 では 2 本のバンドの内、低分子のバンドのみが検出された。従って、303 Ser はリン酸化されず、322 Ser がリン酸化されることがわかった。



## 2) 野生型及び変異型 Trop 2 発現 HCT116 細胞のコロニー形成

先ず、これらの野生型及び変異型 Trop 2 発現細胞の表現形質の違いについて調べた。HCT116Mock 細胞では細胞密度の高いドーム型コロニーを形成するのに対し、野生型 Trop 2 を導入した細胞ではやや平らなコロニーを形成した。HCT116/303S/A Trop 2 細胞は野生型 Trop 2 発現細胞と同様のコロニーを形成したが、HCT116/322S/A 細胞は Mock 細胞と同様に細胞密度の高いドーム型コロニーを形成した。このように、322 Ser のリン酸化が下流の事象を通じて細胞接着に影響していると考えた。さらに、322 Ser のリン酸化に伴う負の電荷が重要であると予想してリン酸化 322 Ser をミミックする目的で、322 Ser を Glu に変異した HCT116/S322ETrop 2 細胞を作成した。同様のレベルの変異型 Trop 2 の発現を FACS で確認した。予想どおり、HCT116/S322ETrop 2 細胞は野生型 Trop 2 発現細胞と同様の緩く結合したコロニーを形成した。従って、Trop 2 の 322 番目の Ser のリン酸化が間接的に下流の事象に繋がり、細胞接着の減少をもたらすことを示唆している。

## 3) 野生型及び変異型 Trop 2 発現細胞の異なる細胞移動能

次に、これらの細胞の細胞移動能をトランスウェルを用いて測定した。異なる細胞接着性から予想した通り、移動能にも違いが見られた。すなわち、322 Ser を Ala に変換し、非リン酸化 Trop 2 を発現する HCT116 細胞において、他の 322 Ser に負の電荷をもつ細胞と比較して著しい細胞移動能の減少が見られた。なお、これらの細胞間で増殖能に違いは見られなかったことから、移動した細胞数の違いはこれらの細胞の増殖スピードの違いに依るものではないことを示している。

## 4) Trop 2 と claudin-7 の相互作用

Trop 2 タンパク質は claudin-1,7 タンパク質と直接的に相互作用し、それらのタンパク質の分解を防ぎ、安定性に必要であることが報告されている。そこで、野生型及び変異型 Trop 2 と claudin-7 の相互作用を調べた。野生型及び変異型 Trop 2 を発現する HCT116 細胞のライセートより Trop 2 を免疫沈降し、電気泳動後、ウエスタンブロットを行った。免疫沈降物中に claudin-7 が認められ、従来の報告と一致した。Trop 2 と共沈降した claudin-7 のレベルは HCT116/S322A 細胞で最も高く、HCT116/S322E で最も低いことがわかった。この結果は、Trop 2 の 322Ser のリン酸化が claudin-7 との相互作用に影響していることを示唆している。

## 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 various lectins present in the tumor microenvironment. In fact, we demonstrated the colocalization of MUC1 with galectin-3 or siglec-9 immunochemically in the various human cancer tissues. Thus, we have studied on MUC1-mediated signaling triggered by the binding of lectins and resultant tumor progression. In the process of these studies, we performed DNA microarray analysis to detect proteins which expression is elevated associated with MUC1 expression. It was revealed that among these proteins, Trop 2 was highly induced. Trop2 (TACSTD2) is a cell-surface glycoprotein that is highly expressed in a variety of epithelial cancer cells. Trop 2 is part of the GA733 (gastrointestinal tumor-associated antigen) family, which is composed of GA733-1 (Trop 2) and GA 733-2, which is also known as EpCAM. Trop 2 has about 49 % homology with EpCAM. Thus, Trop 2 and EpCAM have a high structural similarity. The expression of Trop 2 has been associated with biological aggressiveness and poor prognosis of various cancer cells such as pancreatic, colorectal and ovarian cancers. Overexpression of EpCAM is also frequently observed in many types of carcinomas.

### 1) Phosphorylation of Trop 2 and its biological significance

In relation to the function of Trop 2, it is reported that mutation of Trop 2 gene is directly linked to Gelatinous drop-like dystrophy (GDL) and the mutated Trop 2 impairs epithelial barrier function. However, there are no known Trop 2 mutations that have been implicated in cancers. Thus we speculate that modification of Trop 2 such as phosphorylation may be related to biological function.

There are three possible phosphorylation sites within the cytoplasmic tail of Trop 2 (303Ser, 306Tyr and 322Ser). Flag tagged wild type Trop 2 cDNA was introduced into colorectal cancer cell line, HCT116 cells (HCT116/wTrop 2). Expression of the wild type Trop 2 was confirmed by flow cytometer and Western blotting. Lysate of HCT116/wTrop 2 cells was subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting. A broad band with a molecular weight from 45 to 70 kDa was detected, probably due to heterogeneity of glycosylation. In fact, after treatment with N-glycanase, immunoprecipitated Trop 2 showed a clear band with a molecular weight of about 40kDa. To distinguish phosphorylated Trop 2 from unphosphorylated one, N-glycanase-treated Trop 2 was subjected to SDS-PAGE using phostag-containing acrylamide, followed by Western blotting. Two bands were clearly detected, suggesting that a Ser or Tyr residue is phosphorylated. After Western blotting, phosphotyrosine was also detected using anti-phosphotyrosine antibody. Level of phosphotyrosine was negligible, suggesting that 303 or 322 Ser but not Tyr may be phosphorylated. Therefore, two types of mutated Trop 2 with Ala instead of Ser at residue 303 or 322 were generated using a site-directed mutagenesis and HCT116 cells expressing these mutated Trop 2 (HCT116/303S/ATrop 2 cell, HCT116/322S/ATrop 2 cell) were produced and phosphorylation of mutated Trop 2 was analyzed using phostag-containing acrylamide as described above. Mutated Trop 2 with 303 Ala instead of Ser showed two bands like those of wild type Trop 2. On the other hand, single band with a lower molecular weight was detected in mutated Trop 2 with 322Ala instead of Ser, suggesting that 322 Ser but not 303 Ser was phosphorylated.

## 2) Colony formation of wild-and mutated Trop 2-expressing HCT116 cells

First, we examined the phenotypic difference between these wild and mutated Trop 2 expressing HCT116 cells. Mock HCT116 cells formed tight dome-shaped colonies, whereas introduction of wild type Trop 2 caused slight flattening of colonies. It is noted that while HCT116/S303A Trop 2 cells showed a similar colony to that of HCT116/wTrop 2 cells, HCT116/S322A Trop 2 cells formed tight shaped colonies like mock HCT116 cells. Thus, we speculated that negative charge of phosphorylated 322 Ser residue is related to cell adhesion through the down-stream event. So, we prepared

mutated Trop 2 with 322 Glu instead of Ser in order to mimic Trop 2 with phosphorylated 322 Ser residues. Similar level of expression of mutated Triop 2 in HCT116/S322E cells was confirmed by FACS analyses. Expectedly, HCT116/S322E cells formed a loosely adhered colony like that of HCT116/wTrop2 cells, suggesting that 322 amino acid of Trop 2 is involved indirectly in cell adhesion and its negative charge is related to the down-stream events leading to reduce the cell adhesion.

3) Different migration of mutated Trop 2 expressing cells. Next we performed migration assay using Transwell. After incubation for 24 h, migrated cells were counted. As expected from the different adhesiveness, they migrated differently, with the HCT116 cells expressing 322Ala Trop 2 being significantly less motile than the other Trop 2 expressing cells which more or less possess negative charges in 322 amino acid. In addition, no difference in rates of cell proliferation was observed among these cells, indicating that different number of migrated cells has no relation to the growth rate of these cells .

## 4) Interaction of claudin 7 with Trop 2.

It has been reported that Trop 2 protein directly binds to claudin 1 and 7 proteins and the interaction is required for claudin 1 and 7 to be stabilized or to prevent their degradation. Thus, we investigated the interaction of wild and mutated Trop 2 with claudin 7. Trop 2 was immunoprecipitated from the cell lysates of wild and mutated Trop 2 introduced HCT116 cells and subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting. Claudin 7 but not occluding and E-cadherin was co-immunoprecipitated with Trop 2, indicating the interaction of Trop 2 with claudin 7 as described previously. HA-tagged claudin 7 cDNA was further introduced to HCT116/S322A and HCT116/S322E cells and stable transfectants were obtained. From the both cell lysates, HA tagged claudin 7 was immunoprecipitated and subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting. It was Flag tagged Trop 2 from HCT116/S322A cells but not from HCT116/S322E cells that was coimmunoprecipitated with claudin 7. Levels of immunoprecipitated claudin 7 with various Flag tagged Trop 2 were highest in HCT116/S322A Trop 2 expressing cells and lowest in HCT116/S322E Trop 2 expressing cells . These results strongly suggest that phosphorylation of 322 Ser affect the interaction of Trop 2 with claudin 7.

#### 4. 論文, 著書など

K. Nogimori, T. Hori, K. Kawaguchi, T. Fukui, S. Mii, H. Nakada, Y. Matsumoto, Y. Yamauchi, M. Takahashi, K. Furukawa, O. Tetsuya, K. Yokoi, Y. Hasegawa, K. Furukawa.  
Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis. *Int J Oncol.* 2016.49(4),1369-1376

中田 博, 森 勇伍. 膜結合型ムチンを介したシグナル伝達による腫瘍悪性化. *生化学(みにれびゆう)* 2016. 88(4), 511-516

#### 5. 学会発表など

田中 涼太, 万木 肇, 森 勇伍, 秋田 薫, 中田 博: リンパ球表面におけるプロヒピチンの発現と生物学的機能. 第89回日本生化学会大会, 仙台市, 2016. 9. 25-27

中田 博: 結合型ムチンMUC1による腫瘍悪性化機構. 第7回グライコバイオロジクス研究会, 大阪市, 2016.10.25 (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: 関節リュウマチにおけるスフィンゴシン 1-リン酸レセプター3(SIP3)の働き

研究分担者: 中田 博, 取得年度: H26-28 年 (3 年)

##### 2) 知財権等 なし

##### 3) 学外活動

中田 博: 徳島大学非常権講師

NEDO ピアレビューアー

京都高度技術研究所、京都市助成事業の査読委員

##### 4) 受賞等 なし

##### 5) その他

山下 智子, 秋田 薫, 森 勇伍, 中田 博: 上皮性癌細胞の発現するTrop-2を介した細胞接着への影響. 平成28年度京都産業大学総合生命科学部シンポジウム, むすびわざ館, 2017.3.3(ポスター発表)

研究室メンバーの写真



# 分子細胞生物学研究室

Laboratory of Molecular and Cellular Biology

教授 永田 和宏

Prof. Kazuhiro Nagata, Ph.D

助教 潮田 亮

Assist. Prof. Ryo Ushioda, Ph.D



## 1. 研究概要

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

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

本研究室では、上記のコンセプトに従って、以下の4つの主要なプロジェクトについて研究を進めている。いずれも、この一年でこれまで想定していなかった、インパクトの高い興味深い知見が得られ、それぞれ投稿の準備にかかっている。

### 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おり、その候補化合物を見つけ、特許を取得している。また新たなスクリーニング系の開発も同時に進めており、このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展している。Hsp47 は我々が発見し、長年研究を続けてきたタンパク質であるが、近年の進展も含めこれまでの Hsp47 研究の知見をまとめ、総説として発表した。

### 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た。レドックス制御を介したタンパク質品質管理とカルシウム恒常性のクロストークに注目している。

### 3) 新規小胞体膜因子によるオートファゴソームの大きさの制御機構の解明

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 がオートファゴソームの大きさを調節すること、そのことによって大きな分解基質の包み込みに必須であ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、国際学会で口頭発表に選出された。

### 4) モヤモヤ病感受性遺伝子ミスチリンの機能解析

モヤモヤ病は日本人に多い脳血管疾患であり、一部に家族性の発症が認められるが、我々は初めての確実な遺伝因子として新規の巨大遺伝子ミスチリンをクローニングした (*PLoS ONE*, 2011)。これまで、ミスチリンが AAA+ ATPアーゼ活性およびユビキチン化活性を示すことや、ゼブラフィッシュの血管・筋肉・神経発生に重要であることなどを明らかにしてきたが (*Sci Rep* 2014, 2015)、今年度、ミスチリン結合タンパク質探索から見つかった USP15 とミスチリンの機能相関について明らかにした (*Sci Rep*, in press)。

## 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

近年、コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の変異がヒトやイスで骨形成不全症を引き起こすことが報告された。我々は OI の原因となる Hsp47 変異体の分子の特性を調べた結果、変異による 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)。

分泌タンパク質は小胞体で合成された後、ER exit site より COPII 輸送小胞に詰め込まれ、積み荷として運ばれていくが、プロコラーゲンの分泌は、その分子サイズが巨大であることから、通常の COPII 小胞には入りきらず、特殊な経路によって運ばれると考えられてきた。最近、ER exit site において TANGO1 というタンパク質が巨大な COPII 小胞形成を助け、コラーゲンの分泌に関与することが明らかになりつつある。我々は共同研究により、Hsp47 が TANGO1 に結合する事で、コラーゲンの輸送にも重要な働きをしている事を示唆するデータを報告した (Y. Ishikawa et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016)。

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。このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展し、特許取得、論文投稿準備中である。Hsp47 は我々が発見し、長年研究を続けてきたタンパク質であるが、これまでの Hsp47 研究の知見をまとめ、総説として発表した (S.Ito, K.Nagata *Semin Cell Dev Biol.* in press)。(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受し、SERCA2 との複合体形成を調節し

ていることを明らかにした (R. Ushioda *et al.*, *PNAS* 2016)。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ゴソームの大きさの制御機構の解明

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の大きさを制御することが見出された。すなわち初めてのオートファゴソームの大きさを制御する因子である。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) モヤモヤ病感受性遺伝子ミスチリンの機能解析

ミスチリンの酵素活性、ゼブラフィッシュ初期発生における重要性等は明らかになったが、一方でミスチリンが細胞内でどのような機能を持つタンパク質なのか明らかでなかった。このポイントを明らかにするため、ミスチリン結合タンパク質の探索を行ってきたが、その1つである脱ユビキチン化酵素 USP15 に着目して研究を行った。その結果、2種類ある USP15 アイソフォームのうち、インタークラスター領域が29アミノ酸長いアイソフォームが主にミスチリンを認識し、脱ユビキチン化することによって、ミスチリンを安定化し、発現レベルの維持に寄与していることが明らかとなり、誌上発表を行った (Kotani, Morito *et al.*, *Sci Rep.* in press)。

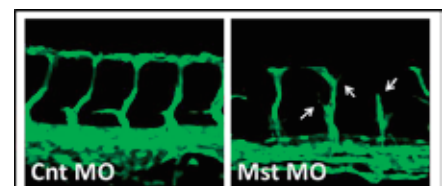


図 ミスチリンの発現を抑制すると、ゼブラフィッシュ体幹部血管の形成不全が引き起こされる。

## 3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the productive folding of nascent polypeptides by molecular chaperones and protein quality control mechanism for misfolded proteins within the cells. Particularly, we have been devoted our activity on the following four major research projects:

**1: Functional analysis of collagen-specific molecular chaperone Hsp47.** 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 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).

Secretory proteins are biosynthesized in the ER and transported via the Golgi apparatus. The coat protein complex II (COPII) transport vesicles are about 60 – 90 nm in diameter. However, collagen molecules are much larger, up to several hundreds of nm. Therefore, special COPII vesicles are required to coat and transport these molecules. The transmembrane protein TANGO1 facilitates loading of collagens into special vesicles. Our collaborators and we identify Hsp47 as a guide molecule directing collagens to special vesicles by interacting with TANGO1 (Y. Ishikawa et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016). And we reviewed the role of Hsp47 in collagen folding in cells, the importance of Hsp47 in mouse development, and the clinical relevance of Hsp47 in various collagen-related diseases such as fibrosis (S.Ito, K.Nagata *Semin Cell Dev Biol.* in press).

**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 (R. Ushioda et al., *PNAS* 2016). 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. ERdj8 regulates the size of autophagosomes to degrade large autophagic targets**

Non-selective and selective-autophagy promote the degradation of several size of autophagic targets, and are also closely linked to several human diseases. Isolation membrane, which is a source of autophagosome, promotes the engulfment of autophagic targets of different sizes, from small protein aggregates to large organelles, by regulating the extension of its own membrane. However, the underlying regulatory mechanisms remain unexplained. Here we show that an ER-localized membrane protein, ERdj8, controls the size of autophagosomes through the regulation of isolation membrane extension as to allow engulfment of large autophagic targets. We show in mammalian cells that downregulation of ERdj8 generates small autophagosomes that fail to engulf the large autophagic targets such as 3 μm latex beads (Lysophagy) and damaged mitochondria (Mitophagy), even though small autophagic targets such as 1 μm latex beads and p62 were not affected. Consistently, knockdown of *dnj-8* (*Caenorhabditis elegans* ERdj8 homologue) in worm causes the accumulation of mitochondria in muscle, despite the complete elimination of the small sperm-derived paternal mitochondria. To conclude, the regulation of the autophagosomal size via ERdj8 is essential for the degradation of large autophagic targets and control the intracellular homeostasis.

**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; Kotani, Morito et al, *Sci Rep*, 2015) and that mysterin forms a huge toroidal oligomer and changes its overall structure through ATP-binding and hydrolysis (Morito et al., *Sci Rep*, 2014). However, mysterin's physiological function in cells remains largely unclear. We explored mysterin binding proteins expecting their functional

correlation with mysterin, and found that a deubiquitylating enzyme USP15 deubiquitylates and stabilizes mysterin in an isoform specific manner (Kotani, Morito et al, *Sci Rep*, 2017).

#### 4. 論文、著書など

- R. Ushioda, A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. Maegawa, K. Uegaki, S. Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, K. Nagata: Redox-assisted regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(41):E6055–E6063 (2016)
- Y. Ishikawa, S. Ito, K. Nagata, L.Y. Sakai, H. Bachinger: Intracellular mechanisms of molecular recognition and sorting for transport of large extracellular matrix molecules *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(41): E6036–E6044 (2016)
- 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*. 469(3):437-442 (2016)
- 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* 2(12):1-222 (2016)
- S. Ito & K. Nagata: Biology of Hsp47 (Serp1 H1), a collagen-specific molecular chaperone *Seminars in Cell and Developmental Biology* in press
- K. Araki, R. Ushioda, H. Kusano, R. Tanaka, T. Hatta, K. Fukui, K. Nagata & T. Natsume: A crosslinker-based identification of redox relay targets *Anal Biochem* in press
- Y. Kotani, D. Morito, K. Sakata, S. Ainuki, M. Sugihara, T. Hatta, S. Iemura, S. Takashima, T. Natsume and K. Nagata: Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor. *Scientific Reports* in press
- D. Morito and K. Nagata: Physiological Role of Mysterin/RNF213 in Zebrafish. *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III* in press
- D. Morito and K. Nagata: Molecular Biology of Mysterin/RNF213 *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III* in press
- K. Maegawa, S. Watanabe, K. Noi, M. Okumura, Y. Amagai, M. Inoue, R. Ushioda, K. Nagata, T. Ogura & K. Inaba: The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation *Structure* in press

#### 5. 学会発表など

##### 招待講演、シンポジウム等

- Kazuhiro Nagata: ERdj5 and ERdj8 – Regulation of proteostasis and calcium homeostasis in the ER and negative regulation of autophagy. Cold Spring Harbor Meeting, Protein Homeostasis in Health and Disease, Cold Spring Harbor(USA),2016.4.19
- 永田和宏、山本洋平、潮田亮: Proteostasis と Autophagy を制御する2つの新規小胞体レドックスタンパク質  
第68回日本細胞生物学会大会シンポジウム、京都市、2016.6.17
- 森戸大介: モヤモヤ病の鍵因子ミステリンの同定と解析  
第63回日本生化学会近畿支部例会、神戸市、2016.5.21  
(平成28年度日本生化学会近畿支部奨励賞受賞記念講演)
- 潮田亮: 小胞体恒常性維持のためのレドックス制御 酸化ストレス学会シンポジウム、仙台市、2016.8.30-31
- Kazuhiro Nagata: Nascent polypeptide as a source of electrons for the reductive force of ERdj5. Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan),2016.9.2
- Ryo Ushioda: ERdj5-mediated ER homeostatic mechanism  
日本生化学会シンポジウム、仙台
- Denisse Sepulveda, Diego Rojas-Rivera, Andres Kholer, Shinya Ito, Hery Urra, Amado Carreras, Kazuhiro Nagata, Jimena Sierralta and Claudio Hetz: HSP47: a novel regulator of the Unfolded Protein Response 日本生化学会シンポジウム、仙台
- 永田和宏: タンパク質品質管理機能の破綻と病態  
脳心血管抗加齢研究会 2016、東京都、2016.12.18
- 潮田亮: 還元酵素ERdj5を介した小胞体恒常性維持機構  
京都大学第21回BNTセミナー、京都市、2017.12.20
- ##### 学会発表
- Yohei Yamamoto, Tomoe Takino, Munechika Sugihara, Kohei Hanafusa, Maho Hamasaki, Miyuki Sato, Ken Sato, Richard I. Morimoto, Tamotsu Yoshimori, Shoshana Bar-Nun, Kazuhiro Nagata: A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER-mitochondria contact site as a negative regulator for macro-autophagy 第2回4大学1研合同研究会、京都市、2016.1.11-12 (口頭発表)
- Shohei Fujii, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata: ER-resident redox proteins regulate calcium homeostasis  
第2回4大学1研合同研究会、京都市、2016.1.11-12 (口頭発表)
- Kaiku Uegaki, Chika Tsutsumi, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata: Novel ER-resident Thioredoxin, ERp18 scavenges Ero1-generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 第2回4大学1研合同研究会、2京都市、2016.1.11-12 (口頭発表)

Yohei Yamamoto, Tomoe Takino, Munechika Sugihara, Kohei Hanafusa, Maho Hamasaki, Miyuki Sato, Ken Sato, Richard I. Morimoto, Tamotsu Yoshimori, Shoshana Bar-Nun, Kazuhiro Nagata: A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER-mitochondria contact sites is a negative regulator for macro-autophagy Cold Spring Harbor Meeting, Protein Homeostasis in Health & Disease, Cold Spring Harbor(USA), 2016.4.18-22 (口頭発表)

Shohei Fujii, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata: Four cysteines in the ER-luminal loop of IP3R1 are essential both for the channel formation and for the channel activity Cold Spring Harbor Meeting, Protein Homeostasis in Health & Disease, Cold Spring Harbor (USA), 2016.4.18-22

堤智香, 上垣日育, 潮田亮, 永田和宏: 新規小胞体チオレドキシニンERp18による亜鉛結合依存的な活性制御機構の解明 新学術「新生鎖の生物学」第3回若手ワークショップ、淡路市、2016.5.23-25 (口頭発表)

伊藤進也, 杉原宗親, 森戸大介, 永田和宏: 小胞体膜タンパク質TMX1のコラーゲン生合成における役割. 第48回日本結合組織学会大会、長崎市、2016.6.24-25(口頭発表)

堤智香, 上垣日育, 潮田亮, 永田和宏: 新規小胞体チオレドキシニンERp18による亜鉛結合依存的な活性制御機構の解明 第2回細胞生物若手の会、京都市、2016.6.14

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. 第2回細胞生物若手の会、京都市、2016.6.14

Ryo Ushioda, Kaiku Uegaki, Chika Tsutsumi, Kazuhiro Nagata: Electron donor for disulfide reductase ERdj5 in ER Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan), 2016.9.1-3

Daisuke Morito: Potential facilitating effect of N-terminal ribosome arrest on translation process of long polypeptide Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan), 2016.9.1-3 (口頭発表)

Yohei Yamamoto, Ayano Kasai, Tomoe Takino, Munechika Sugihara, Kohei Hanafusa, Tetsuo Umemoto, Maho Hamasaki, Miyuki Sato, Ken Sato, Richard I. Morimoto, Ritsuko Arai, Satoshi Waguri, Tamotsu Yoshimori, Shoshana Bar-Nun and Kazuhiro Nagata: Regulation of autophagosomal size on ER-mitochondria contact site Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan), 2016.9.1-3

伊藤進也, 杉原宗親, 森戸大介, 永田和宏: 小胞体膜タンパク質TMX1のコラーゲン生合成への関与. 第89回日本生化学会大会、仙台市、2016.9.25-9.27(ポスターと口頭発表)

潮田亮: Maintenance for ER homeostasis through disulfide reductase, ERdj5. 第11回小胞体ストレス研究会、岐阜市、2016.10.10-10.11 上垣日育, 堤智香, 潮田亮, 永田和宏: 新規小胞体酸化還元酵素

ERp18の亜鉛イオン依存的な活性制御メカニズムの解明 第11回小胞体ストレス研究会、岐阜市、2016.10.10-10.11

森戸大介, 永田和宏: モヤモヤ病AAA+ATPアーゼミステリンの構造と機能. 第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、横浜市、2016.11.30-12.02(口頭発表)

堤智香, 上垣日育, 山下龍志, 潮田亮, 永田和宏: 新規小胞体チオレドキシニン様タンパク質ERp18の亜鉛結合依存的な活性制御 第39回日本分子生物学会年会、横浜市、2016.11.30-12.02

堤智香, 上垣日育, 山下龍志, 潮田亮, 永田和宏: 新規チオレドキシニン様タンパク質ERp18の亜鉛結合依存的な活性制御. 第39回日本分子生物学会年会、横浜市、2016.11.30-12.02

(優秀ポスター賞)

大村圭一, 奥村正樹, 前川憲一, 金村進吾, 井上道雄, 潮田亮, 永田和宏, 稲葉謙次: ERdj5とBiPの共役による酸化的フォールディング触媒機構の解明. 第39回日本分子生物学会年会、横浜市、2016.11.30-12.02

柳澤孝俊, 井上道雄, 作田菜奈美, 潮田亮, 永田和宏, 稲葉謙次: 小胞体カルシウムポンプSERCA2bの活性制御機構の解析. 第39回日本分子生物学会年会、横浜市、2016.11.30-12.02(優秀ポスター賞)

山本洋平, 瀧野友愛, 葛西綾乃, 杉原宗親, 花房航平, 梅本哲雄, 濱崎万穂, 佐藤美由紀, 佐藤健, Richard I. Morimoto, 荒井律子, 和栗聡, Shoshana Bar-Nun, 吉森保, 永田和宏: A novel ER membrane DnaJ Protein, ERdj8 decides the Size of autophagosome CREST 平成28年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

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恒常性維持機構の解明. CREST 平成28年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

上垣日育, 潮田亮, 永田和宏: 小胞体レドックスによるカルシウム恒常性維持機構の解明. CREST 平成28年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

堤智香, 上垣日育, 山下龍志, 潮田亮, 永田和宏: 新規小胞体チオレドキシニン様タンパク質ERp18の亜鉛結合依存的な活性制御 CREST 平成28年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

## 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 ]

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、研究代表者：永田和宏、取得年度：H27-30

日本医療研究開発機構（AMED）産学連携医療イノベーション  
創出プログラム

課題名：線維化疾患治療薬創出のためのコラーゲン分泌阻害化  
合物スクリーニングシステムの構築

研究代表者：永田和宏、取得年度：H28-29

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：H28年（1年）

熊本大学発生医学研究所共同研究

研究課題名：モヤモヤ病タンパク質ミスレリンの機能・構造解  
析

研究代表者：森戸大介、取得年度：H28年（1年）

群馬大学生体調節研究所共同研究

研究課題名：線虫における新規小胞体膜タンパク質 ERdj8 の機  
能解析および生理的意義の解明

研究代表者：山本洋平、取得年度：H28年（1年）

2) 知財権等

該当なし

3) 学外活動

永田和宏：九州大学オルガネラホメオスタシス研究センター  
客員教授

永田和宏：盛岡大学 客員教授

永田和宏：日本学術会議（細胞生物学）連携会員

永田和宏：文部科学省 科学研究費助成事業委員会専門委員

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：京都創生百人委員会 委員

永田和宏：人間文化研究機構情報発信センター 運営委員会委員

4) 受賞等

森戸大介：平成28年度日本生化学会近畿支部奨励賞受賞

堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏：第39回日本分子  
生物学会年会、優秀ポスター賞受賞

## 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 (Nakamura, N et al., *Curr Opin Cell Biol*, 24, p.467, 2012)。

このように、ゴルジ体の構造と機能は細胞の極性形成や細胞運動の制御にも積極的な役割を果たしていると考えられるが、その制御機構は明らかでない。そこで私達は、ゴルジ体の構造と機能の調節機構を明らかにして、ゴルジ体による細胞分極・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。特に近年は、① GM130 の構造変化と機能、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、③YIPF 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。

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 (Nakamura, N et al., *J Cell Biol*, 131, p1715, 1995)。YIPF タンパク質群は中村らが 2003 年に同定したゴルジ体に局在する複数回膜貫通タンパク質群であり、GM130 や GRASP65 などと強調してゴルジ体へのタンパク質局在や構造維持に機能している可能性がある。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。GM130 や YIPF タンパク質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明らかにできることが期待される。

## 2. 本年度の研究成果

本年度は YIPF1, YIPF2, YIPF6 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の解析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。細胞を Brefeldin A で処理したところ、全ての条件で、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送によって、ほとんどのゴルジ体マーカータンパク質が小胞体に輸送され、ゴルジ体は解体し細胞質に分散し、ノックダウンの影響は観察されなかった。コントロール細胞では Brefeldin A を洗浄除去するとゴルジ体タンパク質が小胞体から搬出され、ゴルジ体が再構成されリボン状の構造を形成した。一方、YIPF1, YIPF2 のノックダウン細胞では、ゴルジ体マーカータンパク質の小胞体からの搬出が遅延すると同時に、リボン状構造への再構成も顕著に遅延することが観察された。しかしながら不思議なことに、YIPF6 のノックダウン細胞では、コントロール細胞と同様のゴルジ体の再構成が観察された。これまでの実験から、YIPF1, YIPF2 は YIPF6 と複合体を形成していること、YIPF6 をノックダウンすると、YIPF1 と YIPF2 がともに顕著に減少すること、さらに、YIPF1 あるいは YIPF2 をノックダウンしても YIPF6 はゴルジ体に留まっていることが明らかとなっている。これらの結果から、YIPF1 あるいは YIPF2 の欠損が Brefeldin A 除去後のゴルジ体再構成の遅延を引き起こしているのではなく、パートナーである YIPF1 や YIPF2 を失った YIPF6 がゴルジ体に残留することによって、ゴルジ体の再構成の遅延が引き起こされている可能性が示唆された。したがって、YIPF1, YIPF2, YIPF6 の複合体は、ゴルジ囊の融合を調節してゴルジ体のリボン状構造の維持に機能している可能性が示唆される (Soonthornsit, J et al, *Exp Cell Res*, 353, p100, 2017)。

(2) 昨年度までに、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完了している。今年度は、作成したトランスジェニックゼブラフィッシュでのトランスジーン の染色体への組み込み部位の同定を進めた。Inverse PCR 法によってトランスジーン の組み込み部位のゲノム断片をクローニングしたところ、10 番染色体と、23 番染色体の 2 種の断片が得られた。トランスジーン 付近の配列を解析したところ、10 番染色体の断片は、トランスジーン の発現誘導に用いた *hsc70* 遺伝子のプロモーターそのものであることが明らかとなり、トランスジーン の組み込み部位ではないことが判明した。したがって、トランスジーン は 23 番染色体に組み込まれていることが強く示唆された。現在、組み込み位置の同定を進めている。

### 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 (Nakamura, N 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 (Nakamura, N 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. YIPF are multi-span membrane proteins localizing in the Golgi apparatus first reported by Nakamura et al. on 2003. YIPF proteins are expected to function as anchors for Golgi proteins together with GM130 and GRASP65 to retain Golgi localized proteins.

Under these circumstances, we have been analyzing the function of GM130 and its binding proteins and also YIPF 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 relationship of the structural and function of GM130, (2) the developmental analysis of GM130 functions using zebrafish as a model organism and (3) analysis of the function of YIPF proteins. This year, we report following two topics.

**(1) Analysis of the functions of YIPFs:** Knockdown of YIPF1 or YIPF2 but not that of YIPF6 was found to delay the Golgi reassembly after the Brefeldin A wash out. Because YIPF1, YIPF2 and YIPF6 form complexes and YIPF6 knockdown caused striking reduction of YIPF1 and YIPF2, the remaining YIPF6 in the Golgi was suggested to cause the delay. These results suggested that YIPF1, YIPF2 and YIPF6 function in the reassembly of the Golgi apparatus, possibly promoting cisternal fusion (Soonthornsit, J et al, *Exp Cell Res*, 353, p100, 2017).

**(2) Production of transgenic zebrafish expressing *N*-acetylglucosaminyltransferase I - eGFP fusion protein (MAGT-eGFP) :** The integration site of the transgene was analyzed. Fragments of chromosome 10 and 23 were detected by inverse PCR method. The sequence analyses indicated that chromosome 23 is the true integration site while chromosome 10 was endogenous *hsc70* promoter that has the same sequence with the promoter used for transgene expression. The detailed analysis for the integration site is underway.

#### 4. 論文, 著書など (Publications)

**中村暢宏** (2016) 分泌経路におけるメンブレントラフィック, (化学同人) **メンブレントラフィック - 膜・小胞による細胞内輸送ネットワーク**, 福田光則, 吉森保 編, 2-20

西村典優, 石橋陽一, 足立薫, 水口充, **中村暢宏**. 理系向け短期留学プログラム「海外サイエンスキャンプ」の目的と成果 (2016) **高等教育フォーラム** 6, 65-70

#### 5. 学会発表など (Meeting Reports)

大迫志帆, スントンスイット・ジーラワット, **中村暢宏**. トランス・ゴルジに局在する YIPF 群の機能解析. **第 68 回日本細胞生物学会大会**, 京都市, 2016. 6. 15-17

#### 6. その他特記事項 (Others)

##### 1) 外部資金 (Research Grants)

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) 佐々木優里花



Yurika Sasaki (B4), 桑折悠 Yu Kori (B4), 渡邊亮太 Ryota Watanabe (B4), 村上涼一 Ryoichi Murakami (B4), 大迫志帆 Shiho Ohsako (M2), 森田健吾 Kengo Morita (B3), 猪尻修輔 Shusuke Ijiri (B3)

# 神経回路発生研究室

Laboratory of Neural Development

## 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とシナプス機能における役割については未だ僅かな知見しか得られていない。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世界で初めて同定された Hig タンパク質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 (Hoshino *et al.*, 1993 Neuron) 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(図1)。

### b) シナプス間隙を含めたシナプス構造の新しいモデル

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、その分子が局在する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。特に、Hig と Hasp が示す異なる分子コンパートメント (Nakayama *et al.*, 2016, J. Neurosci.) とシナプス構造

教授 浜 千尋

Prof. Chihiro HAMA, Ph. D.



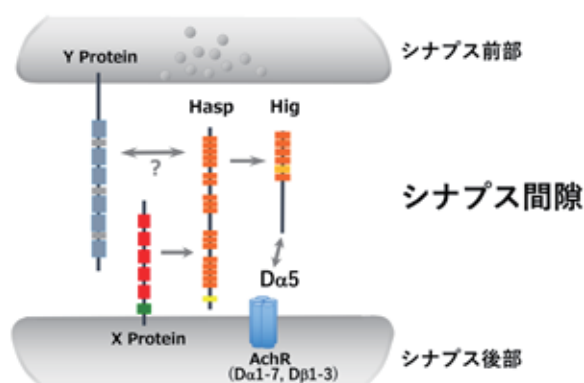
との関係を明確にする。その上で、シナプス間隙を含めたシナプス構造の新しいモデル像を提出する。

## 2. 本年度の研究成果

### a) Haspタンパク質をシナプス間隙に繋ぎ止めるタンパク質の同定

Hig タンパク質はコリン作動性シナプスのシナプス間隙に特異的に局在し、シナプス後膜上のアセチルコリン受容体(AchR)の集積量を制御している (Nakayama *et al.*, 2014, J. Neurosci.)。また、分泌性の Hig タンパク質がシナプス間隙に局在化するためには、AchR の他に Hasp タンパク質 (Hig-anchoring scaffold protein) の存在が必須である (Nakayama *et al.*, 2016, J. Neurosci.)。ここで、Hasp も Hig と同様に分泌性のタンパク質であるため、Hasp をシナプス間隙に繋ぎ止める新たな膜タンパク質の存在が予想される。そこで、Hasp を免疫沈降させた時に共沈降するタンパク質を質量分析したところ、2種の有力な膜タンパク質が同定された(名古屋大学医学研究科、貝淵研究室との共同研究)。その内の1種 X タンパク質(図1)について、遺伝子の欠失変異を作成したところ、Hasp タンパク質のシナプスにおける局在が有意に減少していることが確認された。ただし、その際に Hasp が完全に消失するわけではないことから、他にも Hasp の局在に必要なタンパク質が存在することが予想され、さらに新たな因子の同定を試みる必要がある。

### 当研究室で発見されたタンパク質



### b) Hig と相互作用するタンパク質の遺伝学的同定

活動性および寿命を指標に *hig* 変異のサブレッサー変異の分離を試みたところ、独立に2種の変異株が同定された。そのうち1種について全ゲノム配列決定を行ったと

ころ、アセチルコリン受容体(AchR)のサブユニットの一つである  $D\alpha 5$  にアミノ酸置換変異が生じていた(理化学研究所、工樂樹洋博士との共同研究)。残りの1種についても  $D\alpha 5$  遺伝子の塩基配列決定を行ったところ、同遺伝子内の別の配列にアミノ酸置換変異が生じていた(図2)。そこで、新たに  $D\alpha 5$  遺伝子の機能欠損変異を

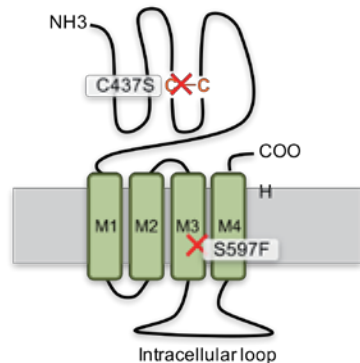


図2  $D\alpha 5$  タンパク質に生じた *hig* サプレッサー変異

CRISPR/Cas9 法により作成し、*hig* 変異株に導入したところ、

活動性および寿命が野生型に近い回復を示した。このことから、 $D\alpha 5$  タンパク質は Hig と相互作用することが示唆された。さらに、 $D\alpha 5$  を強制発現させるとシナプス間隙における Hig の量が増える一方、AchR の別のサブユニットである  $D\alpha 6$  を強制発現させると、 $D\alpha 5$  と Hig が共にシナプスで減少することが判明した。他のいくつかの実験から、 $D\alpha 5$  は細胞外ドメインで Hig と相互作用しながら AchR のシナプス後膜への局在において中心的な役割を果たすことが示唆された(東邦大学、中山実博士との共同研究)。このように、AchR を構成するサブユニットそれぞれが受容体の局在に関して異なる役割を持つという重要な知見が得られてきている。

### 3. Research projects and annual reports

**Research Project:** How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We are studying regulatory mechanisms underlying synapse differentiation at molecular levels, and also try to understand a genetic program that globally organizes the neural 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 genki*) 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. In addition, we are interested in building a new model of synaptic structure because the current model lacks the details of synaptic cleft that should be an essential component of synapses.

#### Annual reports:

##### Identification of membrane proteins that anchor Hasp in the synaptic clefts of cholinergic synapses.

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. Hasp is required for trapping of Hig, which is also secreted and diffused in the brain; 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. Therefore, both Hig and these nAChR subunits are not required to anchor Hasp at synaptic clefts. To find Hasp-anchoring proteins, we have conducted interactome analysis by preparing protein fractions co-immunoprecipitated with Hasp and using mass spectrometry to measure the characteristics of individual proteins in the fraction. As a consequence, we have identified two membrane proteins that are abundantly present in the brain. We have mutated one of the genes and found that Hasp was significantly reduced at synapses of the mutant brains. However, as Hasp does not completely disappear, another unidentified protein should function in anchoring Hasp.

##### Identification of suppressor mutations of *hig*

EMS mutagenesis of *hig* null mutants generated flies that showed locomotor activities and longevity recovered to the wild-type level. The whole genome sequencing revealed that an amino-acid substitution mutation occurred in the  $D\alpha 5$  gene. We further created a  $D\alpha 5$  mutation, using CRISPR/Cas9, and combined it to a *hig* mutation, confirming that the *hig* mutant phenotypes were suppressed. This and other data suggest that  $D\alpha 5$  has a specific function in the localization of nAChR on the postsynaptic membrane by interacting Hig. Among 10 subunits constituting AchR,  $D\alpha 5$  and some other subunits appear to play a differential role in nAChR accumulation.

#### 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. *The Journal of Neuroscience*. 2016. **36**, 590-606

#### 5. 学会発表など

中山実、西村理、工楽樹洋、曾根雅紀、浜千尋: アセチルコリン受容体集積を制御する分泌性シナプス間隙タンパク質 Hig. 第39回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016.12.2

太田麻友、Thomas Senard、Dennis Kruk、鈴木章弘、中山実、浜千尋、曾根雅紀: ショウジョウバエ Hikaru genki タンパク質のシナプス輸送における発生時期特異的な制御機構. 第39回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016.12.2

#### 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: 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能

研究代表者: 浜 千尋, 取得年度: H27-29 年 (3 年)

##### 2) 学外活動

日本学術振興会 特別研究員等審査会委員

##### 3) その他

研究内容が2016年2月2日の京都新聞朝刊に掲載された。





# 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

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) 低温電子顕微鏡 (クライオ EM) による単粒子解析は、タンパク質の構造を決定する有力な方法の1つである。しかし、それから得られる構造情報の分解能は、X線結晶構造解析で得られる構造情報と比べるとやや劣るケースがほとんどであった。しかし、最近開発された電子直接検出器の登場により、タンパク質分子の明瞭な像がクライオ EM で撮影できるようになった。この革命的な技術により、多くのタンパク質の構造が Nature、Science 等の一流科学雑誌に掲載されるようになった。そこで、結晶構造解析のかわりに、クライオ EM で撮影された  $V_0V_1$  の単粒子画像を解析することでその構造を明らかにすることを試みた。現在、界面活性剤を含む溶液条件を検討

することで  $V_0V_1$  の明瞭な分子像を撮影できるようになった。画像解析ソフトにより、 $V_0V_1$  の立体構造を再構成することに成功した。

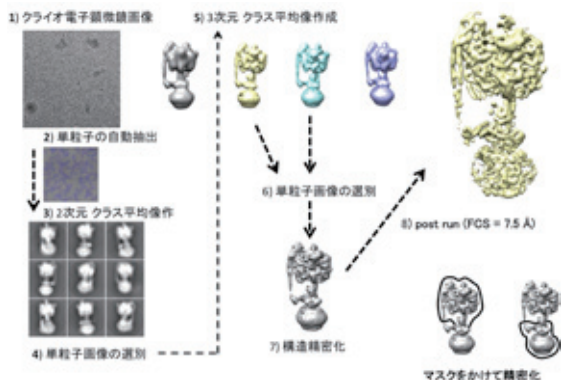


図 クライオEMを用いたSPAによる立体構造決定のフローチャート。約900枚のクライオEM画像から約 $1.2 \times 10^5$ の単粒子画像を抽出し、2次元および3次元クラス分けで選別された単粒子画像から精密化を行う。

2)  $V_1$  部分の軸を de novo 合成し、 $V_1$  部分と共発現刺させたところ、本来の軸との配列相同性がない棒状分子であるにもかかわらず回転した。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。軸部分の完全合成に成功したので、次の段階として、トルクを発生する固定子部分の設計を行う予定である。

### 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。今年度は、麻酔剤の種類を増やしたが、やはり ATP 合成を阻害することで細胞や個体での ATP レベルを低下させることが示された。麻酔作用と ATP レベル変化との密接な関連が示唆された。

## 3. Research projects and annual reports

1. Vacuolar type ATPases ( $V_0V_1$ ) are widely distributed in organisms and function as a proton pump responsible for acidification of intracellular compartments such as a lysosome, Golgi apparatus, endosome so on. In this study we have attempted to determine the structure of  $V_0V_1$  by single particle analysis using cryo electron microscope. For imaging of  $V_0V_1$ , LMNG was used for solubilization detergent to reduce detergent concentration. Over a couple of thousands imaged of cryo-grid containing  $V_0V_1$  were obtained by cryo-EM Titan

krios(FEI). Single particle images of  $V_0V_1$  were picked up by RELION ,single particle analysis software, then 2-D averaged class images were reconstructed from the collected images. Finally, we obtained 3D averaged class images from nearly 100k particles at resolution of 7.5 Å estimated by Fourier shell correlation.

## 4. 発表、著書など

\*Corresponding author

1. Baba M, Iwamoto K, Iino R, Ueno H, Hara M, Nakanishi A, Kishikawa J, Noji H, \*Yokoyama K. (2016) Rotation of artificial rotor axles in rotary molecular motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113(40), 11214-11219 (2016)
2. 中西温子、岸川淳一、横山謙 (2016) 液胞型 ATPase ( $V_0V_1$ ) の構造解析 京都産業大学 研究所報

## 5. 学会発表など

### 招待講演、シンポジウム等

1. 岸川淳一、馬場みほ里、中西温子、横山謙: *De novo* 設計人工軸の回転とそこから明らかになったトルク発生の仕組み. 第16回日本蛋白質科学会年会 於 福岡国際会議場 6.7-9
2. 光岡薫、中西温子、竹内奈央、難波伸丞、岸川淳一、横山謙: 低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析による *Thermus thermophilus* V-ATPase の構造解析. 第16回日本蛋白質科学会年会 於 福岡国際会議場 6.7-9
3. 岸川淳一、馬場みほ里、中西温子、横山謙: *De novo* 設計軸から明らかになったトルク発生機構. 第54回日本生物物理学会年会 於 つくば国際会議場 11.25-27
4. 横山謙: クライオEMによるV-ATPase の構造解析. 2016 第8回 膜輸送研究会 富良野, 12.27-29

### 学会発表

1. 竹内奈央、中西温子、岸川淳一、光岡薫、横山謙: 複数種からの  $V_1$ -ATPase の発現系構築と機能・構造解析. 第16回日本蛋白質科学会年会 於 福岡国際会議場 6.7-9
2. 馬場みほ里、岸川淳一、中西温子、横山謙: トルク発生に必要な回転軸の要素について. 第16回日本蛋白質科学会年会 於 福岡国際会議場 6.7-9
3. Jun-ichi Kishikawa, Yuki Inoue, Atsuko Nakanishi, Makoto Fujikawa, Hiromi Imamura, Ken Yokoyama: The relationship between general anesthetic effects and ATP level in cells. European Bioenergetics Conference 2016、於 イタリア・リーヴァ・デル・ガルダ 7.2-7
4. Mihori Baba, Atsuko Nakanishi, Jun-ichi Kishikawa, Ken Yokoyama: Rotation of xenogeneic subunits in rotary

- motor proteins. European Bioenergetics Conference 2016、  
於 イタリア・リーヴァ・デル・ガルダ 7.2-7
5. Mihori Baba, Atsuko Nakanishi, Jun-ichi Kishikawa, Ken Yokoyama:  $V_1$  回転分子モーターでの外来タンパク質の回転. 第 54 回日本生物物理学会年会 於 つくば国際会議場 11.25-27
  6. Atsuko Nakanishi, Jun-ichi Kishikawa, Kaoru Mitsuoka, Ken Yokoyama: クライオ電子顕微鏡による *Thermus thermophilus* V-ATPase の単粒子解析. 第 54 回日本生物物理学会年会 於 つくば国際会議場 11.25-27
  7. Nao Takeuchi, Atsuko Nakanishi, Jun-ichi Kishikawa, Kaoru Mitsuoka, Ken Yokoyama: Structural analysis for  $V_1$ -ATPase from a variety of prokaryotes. 第 54 回日本生物物理学会年会 於 つくば国際会議場 11.25-27
  8. Kei Adachi, Jun-ichi Kishikawa, Hiroyuki Terashima, Takayuki Uchihashi, Katsumi Imada, Ken Yokoyama, Toshio Ando: Observation of conformational dynamics of FliI by HS-AFM. 第 54 回日本生物物理学会年会 於 つくば国際会議場 11.25-27
  9. Aiko Endo, Jun-ichi Kishikawa, Ken Yokoyama: Does home hexamer function as a stator of rotary motor? 第 54 回日本生物物理学会年会 於 つくば国際会議場 11.25-27
  10. 岸川淳一、井上勇奎、藤川誠、中西温子、今村博臣、横山謙: 全身麻酔薬は細胞内 ATP レベルを減少させる. 第 39 回日本分子生物学会年会 於 パシフィコ横浜 11.30-12.2
  11. 岸川淳一、馬場みほ里、中西温子、光岡薫、横山謙: 人工回転軸の設計とその回転. 第 42 回日本生体エネルギー研究会 於 名古屋工業大学 12.19-21
  12. 中西温子、岸川淳一、光岡薫、横山謙: 好熱菌 *Thermus thermophilus*  $V_0V_1$  の単粒子解析. 第 42 回日本生体エネルギー研究会 於 名古屋工業大学 12.19-21
  13. 馬場みほ里、岸川淳一、中西温子、横山謙: 回転分子モーター  $V_1$ -ATPase での外来サブユニットの回転. 第 42 回日本生体エネルギー研究会 於 名古屋工業大学 12.19-21
  14. 竹内奈央、中西温子、岸川淳一、光岡薫、横山謙: *Ruminiclostridium thermocellum* 由来の  $V_1$ -ATPase を用いた構造、機能解析. 第 42 回日本生体エネルギー研究会 於 名古屋工業大学 12.19-21

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

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: 馬場みほ里 日本生物物理学会 学生発表賞 受賞

### 5) その他: 京都新聞への研究内容掲載 2016 9.20 朝刊



# 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。当学科で行われる研究の多くは、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を置いている。図に示したように研究対象は、実験用のモデル生物から作物までを含む高等植物、ミツバチなどの昆虫、牛や馬などの家畜と多岐にわたり、適宜、集団、個体、細胞及び分子レベルの研究が、実験的あるいは理論的方法で実施されている。つまり、ミクロからマクロな視点を備えた生物学を教育・研究の根本に据えている。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いる。その領域では、植物・動物の品種改良、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研究が進められている。これらの研究では、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す。



## 【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。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、その後に専門性のより高い科目を履修できるようになっている。学科定員35名に対して、9名の専任教員が教育にあっており、総合生命科学部の他の学科と同様、徹底した少人数教育が実施されている。学生は3年の秋 semester の基礎特別研究から研究室へ分属し、最終年度には、応用特別研究で本格的な卒業研究に取り組む。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。卒業研究の総括として、卒業研究発表会を生命資源環境学科独自の取り組みとして実施している。卒業後は、大学院進学あるいは食品、製薬、バイオ関連企業、公務員などへ就職をしている。

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、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
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、森
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、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
科学英語 I	2	山岸、坂本
科学英語 II	2	河邊、吉田
化学実験	2	津下、 <u>老田</u> 、 <u>安井</u> 、吉田
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、川邊、吉田、中村、泉川
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、本橋、山岸、桶川、川邊、坂本、藤原
基礎特別研究	3	木村、高橋、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
生体分子機能学	3	津下
応用特別研究 1・2	4	木村、高橋、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

## 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。そのような微生物の多くは、宿主植物に害をもたらすようなダメージを与えることはなく、これまでに多様な植物から分離されてきた。そのいくつかは、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いる。定着微生物がこのような特性を植物へ付与することは、農業生産にも資材として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バクテリアのゲノム研究に取り組み、そ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。植物に定着するバクテリア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い。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) メチロバクテリウムは葉の表面に生息するバクテリアで、ダイズの茎に生息するバクテリアでも、優占属である。ダイズの茎に生息するメチロバクテリウムは 16S rRNA 遺伝子配列に基づいて3つのグループ I, II, III に分類され、なかでもグループ I が優占種であった。グループ I のすべてのメチロバクテリウムのゲノムには、メチルアミンを利用可能にする N-メチルグルタミン酸経路の遺伝子群が揃っている。そのためグループ I のメチロバクテリウムは、メチルアミンを唯一の炭素源とする培地で生育させることができることがわかった。また、グループ I のメチロバクテリウムには、尿素の分解系の遺伝子があり、尿素やアラントインを唯一の窒素源とする培地で生育させることがわかった。

## 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

教授 金子 貴一

Prof. Takakazu Kaneko, ph.D



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) *Methylobacterium* inhabits the phyllosphere of plants. *Methylobacterium* is the most dominant genus among bacteria inhabiting soybean stems. They are classified into Groups I, II, and III, based on 16S rRNA gene sequences. Group I members were clarified to be dominant in the soybean-associated *Methylobacterium*. All members of them possess a complete set of genes for the N-methylglutamate pathway for methylamine utilization. Therefore, they are able to grow in the medium with methylamine as a sole carbon source. Group I members also possess genes for urea degradation. They are possible to be utilized urea or allantoin as a sole nitrogen source.

## 4. 論文、著書など

T.Minami, M.Anda, H.Mitsui, M.Sugawara, T.Kaneko, S.Sato, S.Ikeda, T.Okubo, H.Tsurumaru, K.Minamisawa: Metagenomic Analysis Revealed Methylamine and Ureide Utilization of Soybean-Associated *Methylobacterium*. *Microbes Environ.*, 2016. **31**, 268-278

## 5. 学会発表など

三屋公佑、金原一真、菅原雅之、南澤究、金子貴一、板倉学：根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* の種内比較ゲノム解析。第10回日本ゲノム微生物学会年会、目黒区、2016.3.4-5

南智之、按田瑞恵、池田成志、菅原雅之、金子貴一、佐藤修正、  
田畑哲之、三井久幸、南澤究: 植物共生細菌

Methylobacterium属内のメタゲノム解析. 第10回日本ゲノム微生物学会年会、目黒区、2016.3.4-5

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: ミヤコグサにエフェクター誘導免疫反応を誘導する

*Bradyrhizobium elkanii* USDA61株のIII型分泌エフェクターの解析. 第57回植物生理学会年会、盛岡市、2016.3.18-20

板倉学、三屋公佑、金原一真、菅原雅之、金子貴一、南澤究:

有用ダイズ根粒菌*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110型菌株におけるゲノム構造の多様性. 日本土壌微生物学会2016年度大会、岐阜市、2016.6.11-12

板倉学、木村成介、上ノ山華織、金子貴一: 微生物群集がアブラ

ナ科水生植物ニューベキア (*Rorippa aquatica*) における葉の形態形成に及ぼす影響. 植物微生物研究会 第26回研究交流会、仙台市、2016.9.7-9

西田裕貴、板倉学、佐藤修正、金子貴一: *Bradyrhizobium*

*elkanii*系統共生アイランドの塩基配列比較. 植物微生物研究会 第26回研究交流会、仙台市、2016.9.7-9

渡辺剛、板倉学、三屋公佑、原新太郎、金原一真、菅原雅之、

按田瑞恵、篠田亮、金子貴一、南澤究: ダイズ根粒菌

*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110型菌株における吸収型ヒドロゲナーゼの多様性. 植物微生物研究会 第26回研究交流会、仙台市、2016.9.7-9

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:

ミヤコグサとの相互作用に関与する*Bradyrhizobium elkanii* USDA 61株の3型分泌エフェクターの解析. 植物微生物研究会 第26回研究交流会、仙台市、2016.9.7-9

三輪大樹、安田美智子、増田幸子、金子貴一、佐藤修正、岡崎伸:

根粒菌のエフェクターによるミヤコグサ根粒形成の制御.

植物微生物研究会 第26回研究交流会、仙台市、2016.9.7-9

## 6. その他特記事項

なし

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

なし

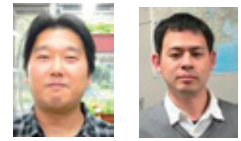


# 集団遺伝学研究室

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ると思われる。様々なエピジェネティック制御機構のうち特にゲノムインプリンティングに注目して研究を進めている。インプリンティング制御パターンの変化やインプリンティングを受けることによる進化への影響などを調査している。

## 2. 本年度の研究成果

本年度は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熱によって活性化される O N S E N ファミリーの進化解析をおこなった。

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ィ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。

また、染色体構造が近縁種と比べて変化していることが知られているハタザオのゲノム配列の決定をおこない、構造変化部位を特定することが出来た。今後、ハタザオのゲノム構造の変化と進化パターンの関係を詳細に解析していくことでゲノム進化に及ぼす染色体構造の変化の知見が得られることが期待される。



図1 研究室で栽培中のハタザオ (*Turritis glabra*)

### 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 evolutionary pattern of centromeric sequences. We found novel repeat from *Turritis glabra* with no homology to previously known centromeric repeat from any species.

#### 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. We also analysed heat activated ONSON family transposon in Brassicaceae species for their evolutionary histories and heat activation mechanisms.

#### 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) Whole genome sequencing of *Turritis glabra*

We determined whole genome sequences of *T. glabra* whose chromosome number decreased from 8 to 6 by chromosome fusions. By whole genome sequencing, the break points were determined. We are analyzing the patterns of chromosome structure changes and its relation to genome evolution.

### 4. 論文, 著書など

A. Kosugi, C. Nishizawa, A. Kawabe, E. Harada: Zinc accumulation and vegetation ecology in the allotetraploid, *Arabidopsis kamchatica* ssp. *kawasakiana*. *Plant Biotechnology* 33, 33-37 (2016)

HY. Furihata, K. Suenaga, T. Kawanabe, T. Yoshida, A. Kawabe: Gene duplication, silencing and expression

alteration govern the molecular evolution of PRC2 genes in plants. *Genes Genet. Syst.* 91, 85-95 (2016)

S. Masuda, K. Nozawa, W. Matsunaga, Y. Masuda, A. Kawabe, A. Kato, H. Ito: Characterization of a heat-activated retrotransposon in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.*, in printing

T. Yoshida, A. Kawabe: Analysis of nuclear mitochondrial DNAs and the factors affecting patterns of integration in plant species. *Genes Genet. Syst.*, in printing

## 5. 学会発表など

吉田貴徳、河邊昭、アブラナ科植物ハタザオのゲノム解析、日本遺伝学会第 88 回大会、日本大学国際関係学部三島駅北口校舎、2016 年 9 月 7 日～10 日

吉田貴徳、薄伊納、河邊昭、アブラナ科植物 *Brassica rapa* におけるゲノムインプリンティング、日本進化学会第 18 回大会、東京工業大学大岡山キャンパス、2016 年 8 月 25 日～28 日

小杉亜希、西澤千晶、河邊 昭、原田英美子、琵琶湖湖岸における絶滅危惧種タチスズシロソウの金属集積性および耐性、第7回日本水環境学会関西支部研究発表会、大阪工業大学うめきたナレッジセンター、2016 年 12 月 2 日

原田英美子、小杉亜希、西澤千晶、高倉耕一、野間直彦、河邊昭、絶滅危惧種タチスズシロソウ (*Arabidopsis kamchatica* ssp. *kawasakiana*) の重金属集積性と植生調査、日本植物学会第 80 回大会、琉球大学、沖縄コンベンションセンター、2016.9.16-19

## 6. その他特記事項

### 1) 学外活動

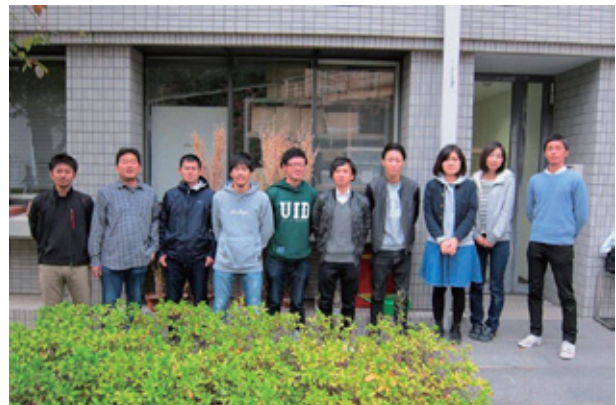
Genetica: 編集委員

### 2) 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的確な指示・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 (2016 年 11 月)



# 植物分子発生生物学研究室

Laboratory of Plant Developmental Biology

## 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。本研究室では、植物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の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丸い葉からギザギザの葉まで様々な形の葉を発生する。このような変化は、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* の表現型可塑性の研究を進めている。

### (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。本研究室では、このような葉の形態の多様性が進化の過程でどのように生み出されているのかを、発生メカニズムの違いに着目することで明らかにしようとしている。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。

教授 木村 成介

Prof. Seisuke Kimura, Ph. D.

助教 坂本 智昭

Assist. Prof. Tomoaki Sakamoto, Ph. D.

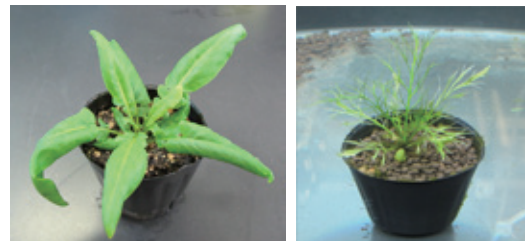


図1 *Rorippa aquatica*

左：陸上の形態 右：水中の形態

## 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* のゲノム配列解読を試みた。*R. aquatica* のゲノムDNAをIlluminaのNextSeq500およびMiSeqでシーケンスし、100Gbp程度の配列情報を得た。また長鎖リードを得るために、PacBioでもシーケンスをおこない、12Gbp程度の配列情報を得た。得られたリードを用いてMaSuRCA ver3.2.1によるハイブリッドアセンブリを行った。その結果、1,797本の配列からなるゲノムサイズ440Mbpのドラフトゲノムが得られた。ドラフトゲノムのN<sub>50</sub>は1.3Mbp、最長配列は8.9Mbpであった。k-mer頻度分析から推定されるゲノムサイズは450Mb前後であり、BUSCO解析の結果からも、今後の解析に十分なゲノム配列情報が得られたと判断できた。イヌガラシ属の基本染色体数は8 (2n=16) である。*R. aquatica* の染色体数を数えたところ、30本であったため染色体が倍加している可能性が示唆された。実際、ゲノム配列情報からも多くの遺伝子が重複していることが示された。また、細胞遺伝学的な解析から、染色体が倍加したあと、一部の染色体が融合することで30本になっていることを確かめた (2n = 4x-2 = 30)。*R. aquatica* のゲノム情報が得られたことで、今後ChIP-seq法によるヒストン修飾の解析や、パイサルファイトシーケンス法によるDNAメチル化解析などが可能になった。

### (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。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。江戸時代の文献を中心とした文献調査を行った結果、ミブナという呼称が誕生したのは1700年代の後半頃で、当時のミブナは切

れ込みのある葉を有していたと考えられた。また、1850 年ごろから葉形がやや単純化したものが ミブナと呼ばれ始め、丸葉のミブナが誕生したのは 1870 年頃であることがわかった。QTL解析によりミズナとミブナの葉の形の違いには少なくとも4つの遺伝子座が関わっていることが明らかとなっており、おそく丸い葉を持つカブ類の交配により葉の形が変化したのではないかと考えている。

### (3) 植物の栄養繁殖機構の研究

葉断面からの再生過程についても経時的なトランスクリプトーム解析を行なった。*R. aquatica*は、葉の断片の基部側の断面からのみ再生し、先端部側からは再生しない。基部側と先端部側で比較トランスクリプトーム解析をおこなったところ、基部側でのみ再生に関わる遺伝子群の発現が誘導されていた。これには、葉の先端から基部側へのオーキシン極性輸送が関与していると考え、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、葉の切断後、極性輸送によりオーキシンが断片の基部側に蓄積することが再生に重要であることが明らかとなった。

### (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には5箇所存在のリン酸化部位(SQ配列)が存在しているが、これらのリン酸化部位の変異体を作成し、トランスクリプトーム解析により遺伝子発現の応答を解析したところ、リン酸化部位が増えるにつれ、DNA修復遺伝子や細胞周期関連遺伝子の転写が徐々に変動す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 sequenced the

genome of *R. aquatica* using illumina and PacBio platforms. To obtain draft genome sequence, hybrid assembly was performed using the reads. Total number of contigs of the draft genome is 1,797 and N50 is 1.3Mbp. Total length of the draft genome is 440 Mbp, which is close to the estimated genome size by K-mer counting. Gene prediction analysis using RNA-seq data identified 49,599 gene loci on the draft genome.

### (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. Mizuna and Mibuna (*Brassica rapa* var. *nipposinica*) are traditional leafy vegetables in Kyoto. Though they are closely related varieties, their leaf shape are completely different. We surveyed historical literature, including agricultural text and picture books, which were written in the 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> centuries, to reveal the evolutionary history of the differences in leaf shape found between Mizuna and Mibuna. We determined that the spatulate leaf of Mibuna emerged around 1870, and we suggest that the leaf shape evolved from an outcross of Mizuna with turnips.

### (3) Molecular 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. To reveal the molecular basis of *R. aquatica* vegetative propagation, we performed time-series gene expression analyses by RNA-seq. These analyses identified the genes that might play important roles in vegetative propagation.

### (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 previously reported that phosphorylation of five serine-glutamine (SQ) motifs in the C-terminal of SOG1 are required to activate downstream pathways. We introduced mutations in these five SQ motifs and examined the effects on DNA damage responses. We found that the expression level of the most of the genes involved in DNA repair and cell-cycle progression gradually changed dependent on the number of SOG1 phosphorylation sites.

#### 4. 論文, 著書など

Yaichi Kawakatsu, Hokuto Nakayama, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Atsushi J. Nagano, Kentaro Yano, Nakao Kubo, Seisuke Kimura, A *GLABRA1* ortholog on LG A9 controls trichome number in the Japanese leafy vegetables Mizuna and Mibuna (*Brassica rapa* subsp. *Nipposinica* L. H. Bailey): evidence from QTL analysis, *Journal of Plant Research*, in press

坂本智昭, 木村成介, *Rorippa aquatica* 遺伝子情報データベースの構築, *京都産業大学総合学術研究所報* **11**: 105-113

天野瑠美, 中山北斗, 木村成介, アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* にみられる葉断面からの栄養繁殖条件の検討, *京都産業大学総合学術研究所報* **11**: 115-121

中西佳世子, 中沢正江, 木村成介, 山本尚広, 荻野晃大, 下田幸男, 平春菜, 主体性と異文化受容力を育成する正課外プロジェクト型教育の実践と評価 - WACE世界大会の学生企画活動の事例より -, *高等教育フォーラム* **6**: 49-63

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* **49**: 161-181

Mutsutomo Tokizawa, Kazutaka Kusunoki, Hiroyuki Koyama, Atsushi Kurotani, Tetsuya Sakurai, Yutaka Suzuki, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata and Yoshiharu Y Yamamoto: Identification of *Arabidopsis* Genic and Non-genic Promoters by Paired-end Sequencing of TSS Tags. *Plant J* in press

Qingqing Cai, Hiroko Fukushima, Mai Yamamoto, Nami Ishii, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Hiroyasu Motose and Taku Takahashi: The SAC51 Family Plays a Central Role in Thermospermine Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **57**: 1583-1592

Shota Yamauchi, Atsushi Takemiya, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Toshifumi Tsutsumi, Toshinori Kinoshita and KenIchiro Shimazaki: The Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA1 Plays a Major Role in Stomatal Opening in Response to Blue Light. *Plant Physiol* **171**: 2731-2743

Asuka Higo, Masaki Niwa, Katsuyuki T 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.

#### 5. 学会発表など

Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Risa Momoi, Shizuka Gunji, Ali Ferjani, Seisuke Kimura, Developmental and molecular

studies on the mechanism of vegetative propagation in *Rorippa aquatica*, Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference, Awaji, Japan, 2016.11.29-12.2

Hokuto Nakayama, Tomoaki Sakamoto, Yasunori Ichihashi, Manabu Fujie, Tetsuya Kurata, Seisuke Kimura, Impact of Environment on Leaf Development: Studies on Heterophylly in *Rorippa aquatica*, Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference, Awaji, Japan, 2016.11.29-12.2

Rumi Amano, Risa Momoi, Seisuke Kimura, Vegetative propagation in *Rorippa aquatica*: Understanding plant regeneration using non-model species, The 45<sup>th</sup> Plant Biotechnology Symposium "International Plant Meeting in Kyoto 2016- Plant Development and Environment-", Kyoto Sangyo University, Kyoto, 2016.11.25 (招待講演)

木村成介, 水中への適応形質としての異形葉性と栄養繁殖の進化, 植物科学若手研究会2016, 木江ふれあい郷土資料館, 2016.9.29-10.1

辻村真衣, 出雲谷遥, 執行正義, 上ノ山華織, 坂本智昭, 木村成介, 寺地徹, 雄性不稔タマネギのミトコンドリア転写産物の解析, 日本育種学会第130回講演会, 鳥取大学, 2016.9.24-26

木村成介, 水中への適応戦略としての異形葉性と栄養繁殖, 日本植物学会第80回大会シンポジウム「Induced Development: 環境要因に誘発される発生の多様性と共通性」, 沖縄コンベンションセンター, 2016.9.16 (招待講演)

川勝弥一, 中山北斗, 上ノ山華織, 五十嵐香理, 八杉公基, 工藤洋, 永野惇, 矢野健太郎, 久保中央, 木村成介, 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, 日本植物学会第80回大会, 琉球大学, 沖縄コンベンションセンター, 2016.9.16-19

山口修二, 中山北斗, 坂本智昭, 市橋泰範, 倉田哲也, 木村成介, *Rorippa aquatica* の異形葉性における *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* の機能解析, 日本植物学会第80回大会, 琉球大学, 沖縄コンベンションセンター, 2016.9.16-19

桃井理沙, 天野瑠美, 中山北斗, 木村成介, *Rorippa aquatica* の栄養繁殖とオーキシンの関係の解析, 日本植物学会第80回大会, 琉球大学, 沖縄コンベンションセンター, 2016.9.16-19

天野瑠美, 中山北斗, 郡司玄, Ali Ferjani, 木村成介, アブラナ科 *Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析, 日本植物学会第80回大会, 琉球大学, 沖縄コンベンションセンター, 2016.9.16-19

三好彩央里, 中益朗子, 木村成介, 水生シダ *Microsorum pteropus* とその変種の葉の形態に関わる分岐構造の多様性について, 日本植物学会第80回大会, 琉球大学, 沖縄コンベンションセンター, 2016.9.16-19

小塚俊明、中野道治、坂本智昭、木村成介、有賀悠貴、谷口研至、草場信、キクタンギク自家不和合性系統を用いたキク属モデル植物の開発、日本植物学会第80回大会、琉球大学、沖縄コンベンションセンター、2016.9.16-19

天野瑠美、中山北斗、郡司玄、Ali Ferjani、木村成介、アブラナ科 *Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析、日本植物形態学会第28回大会、琉球大学、2016.9.15

三好彩央里、中益朗子、木村成介、水生シダ *Microsorium pteropus* とその変種の葉の形態に関わる分岐構造の多様性について、日本植物形態学会第28回大会、琉球大学、2016.9.15

川勝弥一、中山北斗、上ノ山華織、五十嵐香理、八杉公基、工藤洋、永野惇、矢野健太郎、久保中央、木村成介、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、日本植物形態学会第28回大会、琉球大学、2016.9.15

愿山(岡本)郁、上ノ山華織、坂本智昭、木村成介、植物における多様なDNA損傷応答の選択機構、日本遺伝学会第88回大会、日本大学(三島)、2016.9.15

板倉学、木村成介、上ノ山華織、金子貴一、微生物群集がアブラナ科水生植物ニューベキア (*Rorippa aquatica*) における葉の形態形成に及ぼす影響、植物微生物研究会第26回研究交流会、東北大学、2016.9.7-9

Kaoru (Okamoto) Yoashiyama, Kaori Kaminoyama, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, The regulatory mechanism of DNA damage responses through SOG1 phosphorylation, Plant Genome Stability and Change 2016, Shonan Village Center, Hayama, Japan, 2016.7-7-10

Seisuke Kimura, Impact of Environment on Leaf Development: Studies on Heterophylly in *Rorippa aquatica*, Seminar at Institute of Molecular Plant Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, UK, 2016.4.7(招待講演)

Seisuke Kimura, Impact of Environment on Leaf Development: Studies on Heterophylly in *Rorippa aquatica*, Sainsbury Laboratory Symposium "Induced Plant Development", The Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK, 2016.4.4-6(招待講演)

川勝弥一、中山北斗、上ノ山華織、五十嵐香理、八杉公基、工藤洋、永野惇、矢野健太郎、久保中央、木村成介、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、第57回日本植物生理学会年会、岩手大学、2016.3.18-20

中山北斗、坂本智昭、市橋泰範、藤江学、倉田哲也、Neelima Sinha、木村成介、異形葉性を示す *Rorippa aquatica* の二つの地域系統を用いたトランスクリプトーム解析、第57回日本植物生理学会年会、岩手大学、2016.3.18-20

岡本郁、木村成介、シロイヌナズナにおけるDNA損傷応答とSOG1のリン酸化の関係、第57回日本植物生理学会年会、岩手大学、2016.3.18-20

三好彩央里、中益朗子、木村成介、水生シダ *Microsorium pteropus* とその変種の葉の形態に関わる分岐構造の多様性について、第57回日本植物生理学会年会、岩手大学、2016.3.18-20

木村成介、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、東京理科大学応用生物科学科セミナー、東京理科大学、2016.3.7(招待講演)

木村成介、葉っぱの形の遺伝と進化 -メンデル遺伝学で解き明かす多様な葉の形ができるしくみ-、京都産業大学リエゾンオフィス主催シンポジウム「遺伝と進化の不思議〜ダーウィンとメンデルから学んだこと〜」、京都産業大学むすびわざ館、2016.3.5(招待講演)

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

科学研究費助成事業・新学術領域研究(研究領域提案型)

課題名:環境刺激による葉の形態形成の制御機構の解明  
研究代表者:木村成介、取得年度:H28-29年(2年)

科学研究費助成事業・基盤研究(C)一般

課題名:葉断面からの再生をモデルとした種子植物の栄養繁殖の分子メカニズムの研究

研究代表者:木村成介、取得年度:H28-30年(3年)

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)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動 なし

4) 受賞等 なし

5) その他

木村成介 第45回植物バイオテクノロジーシンポジウム「International Plant Meeting in Kyoto 2016 -Plant Development and Environment」オーガナイザー

## 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、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ズ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。また、本年度は、1年生対象の生物学実験、2年生対象の生命資源環境学実験・演習 I、2年生対象の科学英語 II、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。



H28 年度卒業式謝恩会



# 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.



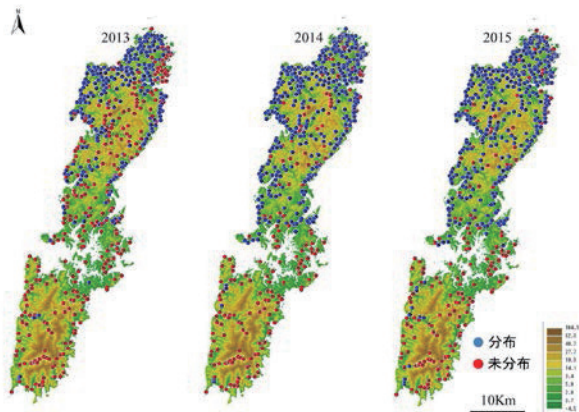
## 1. 研究概要

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

### 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

対馬に侵入したツマアカスズメバチの帰化状況について本種を発見した 2012 年から現在に至るまで継続して分布拡大の調査を行い、北部を中心に全域に分布を広げ、スズメバチ属の中で優占種になっていることを明らかにした。またミトコンドリア DNA およびマイクロサテライト DNA マーカーの遺伝子解析から本種の侵入経路について中国原産の系統が韓国を経由して対馬および北九州に侵入したことを解明した。さらに生態調査により、対馬で定着している系統は、巨大な巣を形成し、薬剤抵抗性が高いため通常の防除方法では刺傷被害や多量の薬剤散布が必要となる。そこで本種の生態を調査し、巣の下部を特定の波長で振動させることで働き蜂が上部に集まり、攻撃性が低下する特異な性質を発見し、そこに薬剤を散布すると通常よりも少量で安全に巣を防除することができる方法を見つけることができた。これにより安全で効果的に巣の防除を行うことができるようになった。



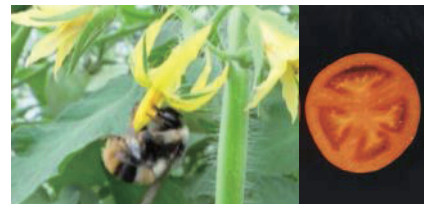
対馬でのツマアカスズメバチの帰化状況

### 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

エゾオマルハナバチの累代飼育を現在までに F4 世代まで進め、これにより飼育環境条件を明らかにすることができた。さらに交尾に用いるケージの色や交尾前処理などの新女王バチの交尾率を高める条件を明らかにした。また、長期保存を可能とする有用な産卵基質を開発した。休眠覚醒(打破)方法については、低温処理についてはほぼ確立し、二酸化炭素処理については技術として確立できる可能性が示唆された。営巣成功率の向上条件を確立することができた。エゾオマルハナバチに寄生・感染する既知の 13 種類の病原微生物の LAMP 法による検出方法を確立した。野外で採集したエゾオマルハナバチの女王蜂の営巣試験によって、初期選抜の指標として女王の体サイズ、第 1 ブルードのサイズ(最初の卵塊から羽化したワーカーの数)が有効であることを示した。

昨年度にマルハナバチの繁殖特性を考慮した BLUP 法の開発、今年度に近親交配を回避するための交配様式の開発を終えており、すでに大半の理論が構築できた。コロニーサイズの大小を大まかに識別することのできる可能性のある母系遺伝マーカーを1つ設計することに成功した。また開発したマイクロサテライト DNA マーカーを利用して交配パターンを明らかにして交尾試験で利用できるようにした。また、ワーカー産卵や性比の偏りと血縁構造には関連性がないことを明らかにして育種モデルに利用できるようにした。

累代飼育中のコロニーを使用して、低温期間での活動性を調査するために冬型のトマトハウスでの訪花試験を行ったところ、セイヨオマルハナバチと同等の温度での訪花活動性を確認できた。



開発中のエゾオマルハナバチにより授粉して生産されたトマト

### 3. Research projects and annual reports

#### ***Complete mitochondrial DNA sequence of the invasive hornet *Vespa velutina* (Insecta, Hymenoptera) found in Japan***

We analyzed the complete mitochondrial genome of the invasive Asian hornet *Vespa velutina* from Japan. The mitochondrial genome of *V. velutina* was identified as a circular molecule of 16,765 bp, similar to that in other hornet species. It was predicted to contain 13 protein-coding, 20 tRNA, and two rRNA genes, along with one A $\beta$ T-rich control region. The initiation codons ATC was found in one, ATG in four, ATT in five, and ATA in three genes, while TAA was the termination codon in all these genes. The average AT content of 13 protein-coding was 82%.

#### ***The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis koschevnikovi* (Insecta: Hymenoptera: Apidae)***

We analyzed the complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *A. koschevnikovi*. The mitochondrial genome of *A. koschevnikovi* was observed to be a circular molecule of 15,278 bp and was similar to that of the other cavity-nesting honeybee species. The average AT content in the *A. koschevnikovi* mitochondrial genome was 84%. It was predicted to contain 13 protein-coding, 24 tRNA and two rRNA genes, along with one A $\beta$ T-rich control region, besides three tRNA-Met repeats.

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

We describe the complete mitochondrial genome of the common bumblebee, *Bombus hypocrita hypocrita*, from the Otome Plateau, in Yamanashi Prefecture, Japan. The mitochondrial genome of *B. h. hypocrita* is a circular molecule of 15,795 bp. It contains 13 protein-coding, 22 tRNA and two rDNA genes. The protein-coding genes had ATA, ATG or ATT as the initiation codon and were terminated by the typical stop codon TAA, except for ND4 and Cytb. All the tRNA genes typically formed a cloverleaf secondary structure, except for trnE and trnS1.

#### ***The complete mitochondrial genome of *Mnais costalis Selys* (Odonata: Calopterygidae) assembled from next generation sequencing data***

We describe the complete mitochondrial genome of the damselfly *Mnais costalis* (Odonata: Calopterygidae) from Shiga Prefecture, which is sympatric region where closely related species show loss of their wing-color polymorphism. The mitochondrial genome of *M. costalis* was determined to be a circular molecule of 15,484 bp. It was predicted to contain 13 protein-coding, 22 tRNA and two rRNA genes, and a non-coding control region. The organization of the genome is similar to that in the other Odonata species, including *M. costalis* (KU871065). The frequencies for occurrence of A, T, C and G nucleotides were 40.02, 26.25, 19.53 and 14.17%, respectively, with an average AT content of 66.27%. Four start codons (ATG, ATC, ATT, and TTG) and four stop codons (TAA, TAG and an incomplete TA and T) were observed in the 13 protein-coding genes. Twenty-two tRNAs were predicted to form the cloverleaf secondary structures.

#### ***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)***

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.

#### 4. 論文, 著書など

1. [Takahashi J.](#), Rai J, [Wakamiya T\(M1\)](#), Okuyama H. Characterization of the complete mitochondrial genome of the giant black Himalayan honeybee (*Apis laboriosa*) from Nepal. *Conservation Genetic Resources*. inpress.
  2. Okuyama H, [Wakamiya T\(M1\)](#), Fujiwara A, Washitani I, [Takahashi J.](#) Complete mitochondrial genome of the honeybee *Apis cerana* native to two remote islands in Japan. *Conservation Genetic Resources*. DOI 10.1007/s12686-017-0721-5
  3. Takeuchi T, [Takahashi R\(M2\)](#), Kiyoshi T, Nakamura M, Minoshima YN, [Takahashi J.](#) The origin and genetic diversity of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina* introduced in Japan. *Insectes Sociaux* DOI 10.1007/s00040-017-0545-z
  4. Okuyama H, [Takahashi J.](#) The complete mitochondrial genome of *Mnais costalis* Selys (Odonata: Calopterygidae) assembled from next generation sequencing data. *TOMBO* 2017. inpress
  5. 高橋純一 ポリネーターの役割と環境変化について. GREEN AGE. 2017 印刷中.
  6. [Takahashi R\(M2\)](#), Okuyama H, Kiyoshi T, [Takahashi J.](#) Complete mitochondrial DNA sequence of the invasive hornet *Vespa velutina* (Insecta, Hymenoptera) found in Japan. *Mitochondrial DNA Part B* 2017. inpress.
  7. [Nishimoto M\(M1\)](#), Okuyama H, Kiyoshi T, Nomura T, [Takahashi J.](#) Complete mitochondrial genome of the Japanese bumblebee, *Bombus hypocrita hypocrita* (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part B*. 2017 inpress.
  8. [Wakamiya T\(M1\)](#), Tingek S, Okuyama H, Kiyoshi T, [Takahashi J.](#) The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis koschevnikovi* (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part B* 2017. inpress.
  9. [Takahashi J.](#), [Nishimoto M\(M1\)](#), [Wakamiya T\(M1\)](#), Takahashi M, Kiyoshi T, Tsuchida K, Nomura T. Complete mitochondrial genome of the Japanese bumblebee, *Bombus hypocrita sapporensis* (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part B*. 2016 1:224-225.
  10. [Takahashi J.](#), [Wakamiya T\(M1\)](#), 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 Part B* 2016 1:156-157.
  11. [高橋稜一\(M2\)](#), [高橋純一](#) ツマアカスズメバチの生態と農業被害. *植物防疫*. 2016. 70:457-460.
  12. [若宮健\(M1\)](#), [吉岡優奈\(B4\)](#), 清拓哉, [高橋純一](#) 対馬に生息するニホンミツバチ(*Apis cerana japonica* Radoszkowski)のミトコンドリアゲノムに見られる遺伝的変異. *長崎県生物学会誌*. 78:7-14.
  13. [高橋稜一\(M2\)](#), 清拓哉, [高橋純一](#) DNAバーコーディング法を利用したツマアカスズメバチの食性解析の試み. *長崎県生物学会誌*. 78:43-48.
  14. 野村哲郎, [高橋純一](#) X染色体上の遺伝子および半数倍性生物における連鎖不平衡の集団の有効な大きさ. *京都産業大学先端科学技術研究所所報*. 2016. 15:33-41.
  15. 野村哲郎, [高橋純一](#) 北海道産マルハナバチの授粉用系統の造成:選抜計画の再検討. *京都産業大学先端科学技術研究所所報*. 2016. 15:141-146.
- #### 5. 学会発表など
1. [西本愛\(M1\)](#), 高橋萌, 竹内剛, 清拓哉, 土田浩治, 野村哲郎, [高橋純一](#) ミトコンドリアDNAとマイクロサテライトDNAによるエゾオオマルハナバチの集団遺伝構造解析. 日本昆虫学会近畿支部2016年度大会. 大阪市. 2016.12.17.
  2. [若宮健\(M1\)](#), 奥山永, [高橋純一](#) 東アジアに分布するトウヨウミツバチの系統地理学的解析. 日本昆虫学会近畿支部第53回大会. 大阪市. 2016.12.17.
  3. [若宮健\(M1\)](#), 奥山永, [高橋純一](#) 世界レベルでみた対馬島のニホンミツバチの固有性と個体群の移入について. 対馬学フォーラム2016. 対馬市. 2016.12.14.
  4. [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.
  5. [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.
  6. 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.
  7. [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.



## 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 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  
研究代表者:高橋純一、平成 27-29 年度(3 年)
2. 科学研究費補助金 基盤研究 C 侵略的外来種ソ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)
3. 科学研究費補助金 基盤研究 C シグナル形質の進化要因としての種内競争と種間関係 研究代表者:椿宜高、平成 28-30 年度(3 年)
4. 日本中央競馬会畜産振興事業 ノゼマ病予防混合飼料実証事業  
研究代表者:高橋純一、平成 28 年度(1 年)

### 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 京都府養蜂組合:顧問  
高橋純一 和歌山県養蜂協会: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.

# 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、特に感染症因子とホスト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、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な反応状態での結晶構造解析を進めている。

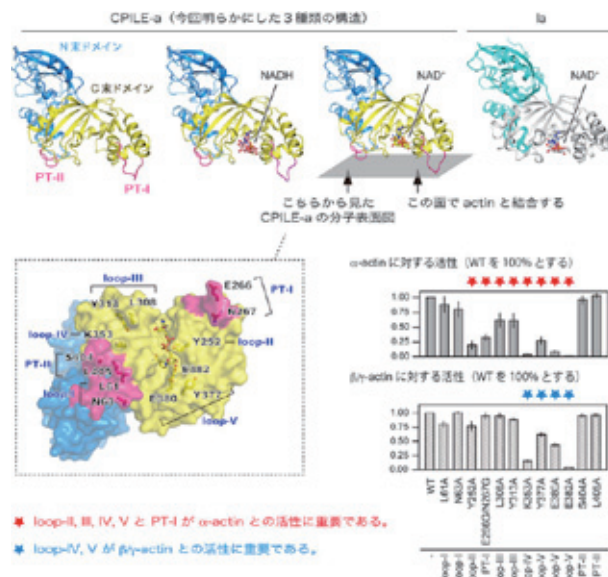
## 2. 本年度の研究成果

(1) 近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン (CPE)欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素は Clostridium perfringens iota-like toxin (CPiLE)と命名された。CPiLE は CPiLE-a, CPiLE-b の 2 つのコンポーネントからなる binary 毒素である。ウェルシュ菌の Iota 毒素(Ia,Ib)との相同性は 50%程度であるが、その毒性に違いがあることが報告された。Iota 毒素では Ia はアクチン特異的な ADP リボシル化毒素、一方 Ib は細胞膜上でオリゴマーを作り、Ia を透過するトランスポーターと考えられている。CPiLE の食中毒原因毒素としてのアッセイすなわち腸管を用いた Fluid accumulating 活性は、CPiLE-b のみでもあり、CPiLE-a で増強することが示されている。我々は、食中毒毒素の作用機構解明のため CPiLE-a の構造機能解析を行った (PLoS ONE 2017)。

CPiLE-a の結晶は PEG を沈殿剤として得られ、初期位相は水銀を用いたMAD法で得られた。その後、構造精密化し、最終構造を得た。今回得られた構造は 3 種類であり、基質なし、NAD<sup>+</sup>複合体 (本来の基質である NAD<sup>+</sup>が結合したもの)、NADH 複合体である。Ia と構造を比較すると、Ia にはない2つの Extra Protruding Loop (PT-I と PT-II) が存在することがわかった(図 1)。すでに我々のグループで研究が進んでいる、Ia と基質タンパクのアクチンとの複合体との結晶構造から、

CPiLE-a-actin 複合体のモデルを構築し、アクチン結合部位と思われるアミノ酸の変異体を作成して、その役割を検討した。Ia は2つのドメインからなり、C 末端ドメインに NAD<sup>+</sup>が結合し、この周りの5つのループ (N 末端ドメインの loop-I、C 末端ドメインの loop-II<sup>~</sup>V:loop-V には基質アミノ酸 Arg177 の認識に関わる ARTT-loop の2つの Gluも存在する)がアクチンとの結合に関与していることがわかってきたが、CPiLE-a では、loop-II<sup>~</sup>IV と領域外の PT-I の変異体も  $\alpha$  アクチンとの結合すなわち活性に影響することがわかった(図 1)。

その一方で  $\beta/\gamma$  アクチンに対する活性を見ると、loop-IVとVの変異体では活性が落ちたが、その他の部位の変異体では大きく変化が見られなかった。また、 $\beta/\gamma$  アクチンに対する ADP-リボシル化活性は、 $\alpha$  アクチンに対する活性のわずか36%であった。この結果は、CPiLE-a類似のボツリヌス菌の酵素C2-IIが  $\beta/\gamma$  アクチンしかADPリボシル化しないこととは対照的である。現在、構造が未知の膜結合のタンパク質透過装置CPiLE-bの構造と機能の研究を進めている。



(2)アクチンを ADP リボシル化する毒素は多く知られているが、我々の研究室では、このタイプの毒素とヒト基質タンパク質複合体の構造および其の反応を明らかにしてきた(PNAS 2008, PNAS 2013)。また 2015 年、全く異なる基質 RhoA を ADP リボ

シル化する C3 exoenzyme とその基質(RhoA)複合体の結晶構造解析に成功した(JBC 2015)。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。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。C3 exoenzyme とその基質 RhoA 複合体の結晶構造解析の結果、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 の認識に関わりと予測されていた。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 の認識に関わり、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。

更に、RhoA シグナルに関わる ADP リボシル化の影響を検討するため、ADP リボシル化した RhoA と GDI との複合体研究を進めている。また、ある種の細菌毒素は RhoA, Rac1, Cdc42 のシグナルを脱アミド化修飾することでそのシグナル攪乱を行う。この脱アミド化に関わる毒素とその基質複合体の構造解明を目的に、その解析を進めている。

### 3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complex and we would like to reveal the interaction between the infectious factor protein and human protein.

(1) Unusual outbreaks of food poisoning in Japan were reported in which *Clostridium perfringens* was strongly suspected to be the cause

based on epidemiological information and fingerprinting of isolates. The isolated strains lack the typical *C. perfringens* enterotoxin (CPE) but secrete a new enterotoxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPILE-a), which acts as an enzymatic ADP-ribosyltransferase, and CPILE-b, a membrane binding component. Here we present the crystal structures of apo-CPILE-a, NAD<sup>+</sup>-CPILE-a and NADH-CPILE-a. Though CPILE-a structure has high similarity with known iota toxin-a (Ia) with NAD<sup>+</sup>, it possesses two extra-long protruding loops from G262-S269 and E402-K408 that are distinct from Ia. Based on the Ia-actin complex structure, we focused on actin-binding interface regions (I-V) including two protruding loops (PT) and examined how mutations in these regions affect the ADP-ribosylation activity of CPILE-a. Though some site-directed mutagenesis studies have already been conducted on the actin binding site of Ia, in the present study, mutagenesis studies were conducted against both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin in CPILE-a and Ia. Interestingly, CPILE-a ADP-ribosylates both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin, but its sensitivity towards  $\beta/\gamma$ -actin is 36% compared with  $\alpha$ -actin. Our results contrast to that only C2-I ADP-ribosylates  $\beta/\gamma$ -actin. We also showed that PT-I and two convex-concave interactions in CPILE-a are important for actin binding. The current study is the first detailed analysis of site-directed mutagenesis in the actin binding region of Ia and CPILE-a against both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin.

(2) We have been analyzed Ia (actin specific ADP-ribosyltransferase) with actin. Recently we also revealed C3 exoenzyme (RhoA specific ADP-ribosyltransferase) with Rho GTPases (JBC 2015). 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. Now we are trying to reveal the complex structure of ADP-ribosylated RhoA with GDI to understand the effect of ADP-ribosylation on Rho signalling. Furthermore we are trying to reveal the complex structure of Rho family deamidase with Rho GTPase.

#### 4. 論文著書など

Yoshida T, Ogola HJ, Amano Y, Hisabori T, Ashida H, Sawa Y, Tsuge H, Sugano Y. Anabaena sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers. *Proteins*. 84(1):31-42. doi: 10.1002/prot.24952. (2016)

Toda A, Tsurumura T, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H. Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme. *Photon Factory Highlight 2015*. 58-59 (2016)

#### 5. 学会発表など

津下英明:ワークショップ「細菌病原性の分子機序研究の最前線」

ADPリボシル化毒素 C3 がシグナル伝達阻害を引き起こすしくみ、日本細菌学会、大阪国際交流センター(大阪)、2016.3.25

津下英明:細菌由来 ADP リボシル化毒素の作用機構と基質特異性、大阪府立大学(大阪)、獣医学専攻オープンセミナー、2016. 7.22

Waraphan Toniti, Toru Yoshida, Toshiharu Tsurumura, Daisuke Irikura, Chie Monma, Yoichi Kamata, and Hideaki Tsuge: Characterization of Actin ADP-ribosyltransferase from *Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin. ICC05-AEM2016 Unazuki(Toyama), 2016.9.8

Toru Yoshida, and Hideaki Tsuge: ADP-ribosylation of RhoA by C3 exoenzyme. ICC05-AEM2016 Unazuki(Toyama), 2016.9.8

村田晴香,ウエルシュ菌産生イオタ毒素Ib成分の構造解析, 生化学会、仙台国際センター(仙台)、2016, 9.25

津下英明、戸田暁之、鶴村俊治、吉田徹: シンポジウム「モノ・ポリ ADPリボシル化によるシグナル伝達系の意義」 C3 exoenzymeと RhoA複合体の結晶構造解析に基づく基質特異性、日本分子生物学会、パシフィコ横浜(横浜)、2017.12.2

#### 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)

##### (2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

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

日本生化学会 評議員

##### (3) 受賞等 なし

(4) 京都産業大学、タンパク質動態研究所のメンバーとしての活動が始まった。バイナリー毒素はアクチン特異的な ADP リボシル化毒素とそれを細胞内に透過する膜透過装置: トランスロケータからなる。我々の研究室では細菌のアクチン特異的 ADP リボシル化毒素とヒトアクチン複合体研究など、この分野の構造生物学の最先端研究を推し進めてきたが、特に、膜透過装置: トランスロケータの構造を明らかにしたいと考えている。この研究から、「どのようにしてアクチン特異的 ADP リボシル化毒素がこのトランスロケータ介して細胞内へ通過するのか」という重要な問いに答えていきたいと考えている。

(5) 高エネルギー加速器研究機構、放射光科学研究施設の『Photon Factory (PF) Highlight』は放射光科学研究施設を用いた研究成果のうち、国内外に向けて非常にインパクトがあった成果、さらには新たな測定・解析手法を提唱する非常に重要な成果等が掲載される。2015 年度の生命科学分野における成果として 11 の研究成果が紹介され、其のうちの一つとして以下の我々の研究が紹介された。

Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme A. Toda, T. Tsurumura, T. Yoshida, Y. Tsumori and H. Tsuge (Kyoto Sangyo Univ)

<http://www2.kek.jp/imss/pf/science/publ/pfhl/2015/>

#### 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、CPILE の結晶構造解析と機能解析は学振 DC2 学生の Waraphan Toniti を中心に行われたが、総合生命科学部教育研究活性化支援制度、研究助教の吉田の強力なサポートで行われた。



# 植物分子遺伝学研究室

Laboratory of Plant Molecular Genetics

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr.



## 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、研究の主な柱となっている。より具体的には、以下の5つのプロジェクトを進めている。

- 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、上記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、1)の研究から新たに派生したもので、平成27年4月に科研費の挑戦的萌芽研究に採択された。

1)のプロジェクトは、植物オルガネラゲノムの改変によって人類に有用な植物を育成することを長期的な目標としており、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に関する技術開発は重点的に行ってきたが、栽培タバコの葉緑体ゲノムへ遺伝子を導入する方法が確立されたことを受けて、近年はパンコムギ、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

グルタチオン合成に関与する酵素の遺伝子(*GS*, *gsh1*)を葉緑体ゲノムに持つタバコも作出され、後代の植物を用いて組換え体の特徴付けが、ある程度なされている。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、葉緑体の遺伝子組換え技術が有効である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、ダイズのフェリチン遺伝子を葉緑体で強発現させ、葉に含まれる鉄分を上昇させることにも成功している。

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研究されている。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、ダイコンに細胞質雄性不稔をもたらす *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プス属植物やライムギ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、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ミトコンドリア遺伝子の特定、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、前述のように、5)のプロジェクトは1)の研究における新発見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、小さいサークルのコピー数が異常に増加していることが示されている。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。また、この小さいサークルを利用した、新しい葉緑体形質転換ベクターの開発にも着手したところである。

## 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。またその翌年、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、2年前からレタスの葉緑体ゲノムに 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ゲノムへフェリチン遺伝子を導入する際に用いた方法によった。昨年度の実験では、1つのカルスに由来する5個体の組換え体を得られ、それらの詳細な特徴付けを行った。しかし、この実験では、導入した *gsh1* 遺伝子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、結果的に GSH1 タンパク質が作られず、グルタチオンの大幅な増加も達成できなかった。そこで今年度は、*gsh1* 遺伝子のフレームシフト変異を修正したコンストラクトを新たに作成し、これをレタス葉緑体ゲノムへパーティクルボンバードメント法により導入した。レタスの葉へ 75 ショット DNA を撃ち込んだ結果、1系統 2 個体の組換え体を得た。分子的解析の結果では、組換え体の葉緑体ゲノムに *gsh1* 遺伝子が導入され、それが強転写されていることが確認できた。また、Western 解析では GSH1 タンパク質の蓄積も認められた。現在、この組換え体の後代を育成しており、グルタチオンの増加が認められるか調査する予定である。

植物の栽培・管理を最適化させるため、昨年度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および 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。またトマトについても、以前、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、今年度は、諸般の事情で上記の共同利用研究拠点との共同研究は実施できなかった。

上記4)のプロジェクトについては、以前からの実験を継続し、*Triticum monococcum*, *Aegilops searsii*, *Secale*

*cereale* など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完了し、オオムギについては論文化することができた。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)の調査で発見された、雄性不稔を示すオグラ型と、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に注目している。これまで数多くのハマダイコンを調査してきたが、オグラ型と正常型のヘテロプラスミックな個体は例がなかったことから、現在、この個体について次世代シーケンサーを用いたミトコンドリアゲノムの解読を実施中である。

## 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 using NGS.
- 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 plants (containing genes like *apx*, ferritin, etc...) have been produced using tobacco as a model plant, and experiments to produce transplastomic crops including 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. Since this plant is expected to serve as a unique resource to study chloroplast DNA replication and to develop a new chloroplast transformation vector, we are now conducting several experiments related to the subjects.

#### 4. 論文, 著書など

H. Hisano, M. Tsujimura, H. Yoshida, T. Terachi, K. Sato:  
Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). 2016. *BMC Genomics*. 17, 824

#### 5. 学会発表など

寺地 徹, 岸本 岳之, 木下 滉平, 児島 和志, 中山 侑加, 軸屋 恵, 山岸 博: 大腸菌を用いたダイコンのミトコンドリアCMS遺伝子の進化実験. 日本育種学会 第129回講演会, 横浜市, 2016.3.21-22

出雲谷 遥, 辻村 真衣, 執行 正義, 寺地 徹: タマネギ (*Allium cepa*) のミトコンドリアゲノムの解析-N型ゲノム-. 日本育種学会第129回講演会, 横浜市, 2016.3.21-22

辻村 真衣, 森 直樹, 寺地 徹: スペルタコムギが持つVIIb型ミトコンドリアゲノムの解析. 日本育種学会 第129回講演会, 横浜市, 2016.3.21-22

植村 香織, 辻村 真衣, 永島 伊都子, 寺地 徹: *Brachypodium distachyon* のミトコンドリアゲノムの解説. 日本育種学会 第129回講演会, 横浜市, 2016.3.21-22

辻村 真衣, 出雲谷 遥, 執行 正義, 上ノ山 華織, 坂本 智昭, 木村 成介, 寺地 徹: 雄性不稔タマネギのミトコンドリア転写産物の解析. 日本育種学会 第130回講演会, 鳥取市, 2016.9.24-25

植村 香織, 林 未来, 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 IV. ミニサークルを

利用した新規葉緑体形質転換ベクターの構築. 日本育種学会 第130回講演会, 鳥取市, 2016.9.24-25

阿部 ころろ, 井上 理恵子, 植村 香織, 寺地 徹: ダイズの鉄貯蔵タンパクferritinを葉緑体ゲノムに導入した形質転換レタスの特徴づけ. 日本育種学会 第130回講演会, 鳥取市, 2016.9.24-25

軸屋 恵, 寺地 徹, 山岸 博: ダイコンの稔性回復遺伝子の変異がオグラ型雄性不稔の発現に与える影響. 日本育種学会 第130回講演会, 鳥取市, 2016.9.24-25

岩橋 直人, 辻村 真衣, 村田 稔, 寺地 徹: ライムギ細胞質を持つ細胞質置換コムギのミトコンドリアゲノムの塩基配列の決定. 日本育種学会 第130回講演会, 鳥取市, 2016.9.24-25

#### 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)

##### 2) その他

日本学術振興会 科研費審査委員

Gene & Genetic Systems editor

Breeding Science editor

他大学講師:

京都府立大学大学院「植物バイオテクノロジー特論」



# 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。

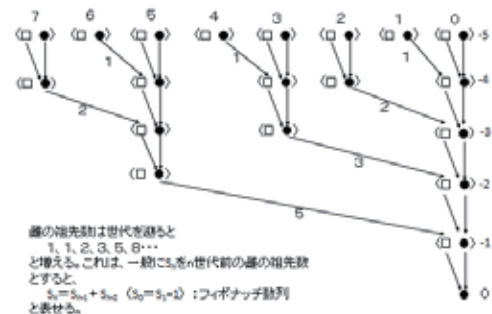
- 1) 動物集団の遺伝的多様性の評価方法の開発とその応用  
野生動物や家畜について血統記録や DNA 情報を用いて集団内の遺伝的多様性を評価するための方法について、理論的研究を行っている。また、開発した方法を和牛集団の遺伝的多様性維持のために応用している。
- 2) 絶滅が危惧される野生動物の維持集団および家畜希少系統における遺伝的多様性の維持方法の確立  
動物園や自然公園などで動物を維持するときに、どのような個体を親として残し、どのような交配を採用すれば遺伝的多様性が効率的に維持できるかについて研究を進めている。
- 3) 動物および昆虫集団における遺伝的多様性の調査  
日本で普通に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) 半倍数体生物における近交最大回避交配について

近交最大回避交配(maximum avoidance of inbreeding: MAI)は、可能な限り血縁関係が遠い個体間で組織的に交配を行う交配様式である。この交配様式は、小集団における近親交配の有害な影響を軽減する上で有効であり、希少種の繁殖において重要である。2 倍体生物における MAI は個体数が 2 のべき乗( $2^m$ )の集団について定義され、MAI の下では集団中のすべての個体は m 世代前に異なる  $2^m$  個体の祖先を持つ。

MAI の性質は 2 倍体生物について多くの研究がなされてきたが、半倍数体生物については、これまでに全く研究がなされてこなかった。そこで、半倍数体生物の MAI に関して理論的な研究を行った。その結果、半倍数体生物の MAI は雌の個体数がフィボナッチ数の集団について複数の交配様式を1セットとした巡回交配として定義できるが、このセットの繰り返しは MAI にはならないことを数学的に証明した。



雌数が8の半倍数性生物集団における  
近交最大回避交配

### 2) エゾオオマルハナバチの授粉用系統の作出に向けた予備選抜指標の探索

北海道では海外から導入されたセイヨウオオマルハナバチ (*Bombus terrestris*) がトマトの栽培施設で授粉用に用いられてきた。しかしながら、逸出した個体が野外で定着し、在来のマルハナバチさらには生態系のネットワーク維持の脅威となっている。そのためセイヨウオオマルハナバチの代替種として、北海道の在来マルハナバチを用いた授粉系統の作出が強く望まれている。報告者は、これまでに培ってきた動物育種における選抜育種に関する知識や技術を活用して、北海道の在来マルハナバチを用いた授粉系統の作出を意図して研究を進めている。今年度は、在来マルハナバチの 1 種であるエゾオオマルハナバチ (*B. hypocrita sapporoensis*) を用いた系統造成における予備選抜の指標を検討した。材料は、平成 28 年 5 月および 6 月に北海道で採集したエゾオオマルハナバチの休眠明け女王 112 個体である。これらの女王(創設女王)を実験室内で飼育し営巣させた。創設女王ごとに羽化したワーカーおよび生殖虫(新女王、雄)の数を調べるとともに、

飼育終了時に創設女王の体サイズの指標として頭幅および胸幅を計測した。その結果、創設女王の体サイズと第 1 ブルードから得られたワーカーの数が有望な予備選抜指標であることが示唆された。これらの予備選抜指標は、以下のように利用できると考えられた。

- 採集時において野外で生きた女王の頭幅や胸幅を計測することは困難であるが、肉眼で明らかに小型と判定した個体はリリースして大型の個体のみを持ち帰り飼育する。
- 第 1 ブルードの生産がなかった女王は、早期に淘汰し、可能なら新たな女王を採集し補充する。



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)

3) 盲導犬の繁殖集団の集団構造と遺伝的多様性の評価  
アジア盲導犬繁殖ネットワーク (Asia Guidedog Breeding Network) に参加する国内 8 協会および海外 3 協会の繁殖犬集団の繁殖構造と遺伝的多様性を血統分析によって調査した。その結果、他の家畜集団と比べて、集団の有効な大きさが大きく、選抜育種を行っていく上で十分な遺伝的多様性が維持されていることが明らかになった。



国内で盲導犬として最も多く使われている犬種、  
ラブラドルレトリバー

### 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: *Maximum avoidance of inbreeding in haplodiploid populations*

Extension of maximum avoidance of inbreeding (MAI) to haplodiploid populations is considered. For a haplodiploid population with a Fibonacci number of females, a set of mating systems to avoid inbreeding to the maximum after the practice of one cycle can be defined. But unlike MAI in diploid populations, repetition of the practice cannot be MAI in the global range of generations, with a trivial exception of a population with 3 females.

#### 2: *Investigation of preliminary selection criteria for development of strains of a native bumblebee species (*Bombus hypocrita sapporoensis*) available for pollination in Hokkaido*

In Hokkaido, a foreign species of bumblebee, *Bombus terrestris*, has been used for pollination of Tomato in glasshouses. However, the escaped bees from glasshouses have widely distributed in wild, and become a threat for native bumblebees and ecological network maintained by them. Using the technique of selective breeding, the authors intend to develop a strain of native bumblebees that could be an alternative pollinator to the foreign bumblebee. In this report, we investigated preliminary selection criteria for development of strains of a native bumblebee species (*Bombus hypocrita sapporoensis*) available for pollination in Hokkaido. It was suggested that body size of queen and the number of workers emerged from first brood are promising criteria for the preliminary selection.

#### 3: *Studies on population structure and genetic diversity in the breeding population of Asia Guidedog Breeding Network*

Population structure and genetic diversity of breeding population of Asia Guidedog Breeding Network (AGBN) were investigated by means of pedigree analysis. It is shown that the effective population size is larger than other domesticated animal populations, and genetic diversity sufficient for efficient genetic improvement by artificial selection is retained.

### 4. 論文・著書など

Nishimoto M., Okuyama H., Kiyoshi T., Nomura T., Takahashi J. (2017) Complete mitochondrial genome of the Japanese

bumblebee, *Bombus hypocrita hypocrita* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) Mitochondrial Data Part 8: Resouces 2:19-20.

祝前博明・国枝哲夫・野村哲郎・万年英之 [編著] (2017) 「動物遺伝育種学」 朝倉書店.

野村哲郎・高橋純一 (2017) X 染色体上の遺伝子および半倍数性生物における連鎖不平衡と集団の有効な大きさ. 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第 15 号: 33-41.

## 5. 学会発表など

竹内 剛・高橋 萌・西本 愛・清 拓哉・土田浩治・野村哲郎・高橋純一：エゾオオマルハナの遺伝構造：在来種を用いた商品作物の授粉の可能性. 第 64 回日本生態学会大会. 東京.  
西本 愛・高橋 萌・清 拓哉・竹内 剛・土田浩治・野村哲郎・高橋純一：ミトコンドリア DNA とマイクロサテライト DNA によるエゾオオマルハナバチの集団遺伝構造の解析. 日本昆虫学会近畿支部 2016 年度大会. 大阪.

## 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有識者会議 家畜改良センター部会委員

公益社団法人全国和牛登録協会 育種推進委員

公益社団法人全国和牛登録協会 中央審査委員会委員

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.



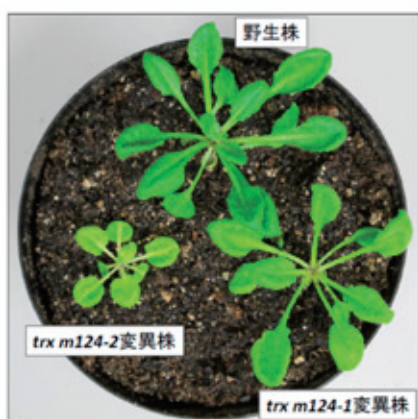
研究助教 桶川 友季

Assist. Prof. 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示し、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* での機能  
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 *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葉緑体における酵素活性のレドックス制御で中心的な役割を担うと信じられてきた。そのため、カルビンサイクルなどの主要代謝経路の制御機構に不具合が生じると予想される *f* 型チオレドキシシを欠失した変異体は、その成長に大きな影響があると考えられたが、実際の *f* 型チオレドキシシ欠失変異体の成長は野生型の植物と大きな違いはなかった。これに対して、私たちが作成した *m* 型チオレドキシシを欠失した植物体では、SBPase を含む重要なカルビンサイクル酵素の活性化が効率良く行われず、*in vivo* においては、カルビンサイクル酵素の活性化に、*m* 型チオレドキシシが重要な役割を果たしていると考えられることができる。これまで行ってきた *m* 型チオレドキシシの機能欠失体での解析に加えて、*m* 型チオレドキシシを過剰発現した植物体を作成し、その生理学的解析を開始した。



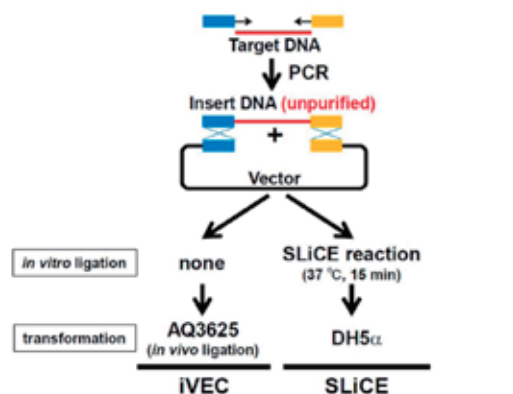
Arabidopsis thalianaのm型チオレドキシン欠損変異株

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 クローニング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 クローニングできる。



精製酵素を用いないクローニング法(IVEC法とSLICE法)

最近、SLICE 法以外にも精製酵素を用いない簡便、かつ低コストなクローニング法が開発されている。そのひとつである *in vivo E. coli* cloning (IVEC)法と SLICE 法で、その効率を比較した。得られた結果から、SLICE 法は利便性と効率において IVEC 法よりも有利であることがわかった。

### 3. Research projects and annual reports

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

Plants have photosynthetic ability to convert carbon dioxide into organic compounds, especially sugars, as a 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. Furthermore, we developed and analyzed overexpressor of *m*-type thioredoxins.

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 Seamless ligation cloning extract (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. The SLiCE method greatly reduces the costs associated with DNA manipulation. *In vivo Escherichia coli* cloning (iVEC) can directly transform a mixture of insert and vector DNA fragments into *E. coli*, which are ligated by endogenous homologous recombination activity in the cells. An evaluation of the efficiency and utility of these methods is important in deciding the adoption of a seamless cloning method as a useful tool. Both seamless cloning methods were compared with the efficiency. As a result, SLiCE cloning provides both higher efficiency and better utility than the iVEC method for seamless DNA cloning.

#### 4. 論文, 著書など

K. Motohashi\*: Evaluation of the efficiency and utility of recombinant enzyme-free seamless DNA cloning methods. *Biochem. Biophys. Rep.* **9**, 310-315 (2017)

Ken Motohashi\*: Seamless ligation cloning extract (SLiCE) method using cell lysates from laboratory *Escherichia coli* strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *Methods Mol. Biol.* **1498**, 349-357 (2017)

Yuki Okegawa and Ken 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)

Yuki Okegawa<sup>1</sup>, Masanori Koshino<sup>1</sup>, Teruya Okushima and Ken 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.

本橋 健: SLiCE法: 精製酵素をいっさい使わない"超低コスト"システムレスクローニング *実験医学* **34**, 2349-2354 (2016)

#### 5. 学会発表など

桶川友季, 本橋健: Analysis of overexpressor of chloroplastic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島市, 2017.3.16-18

本橋健: Evaluation of the efficiency and utility of recombinant enzyme-free seamless DNA cloning methods. 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島市, 2017.3.16-18

Ken Motohashi and Yuki Okegawa: Thioredoxin-dependent redox regulatory system in chloroplasts. The 17th International

Congress on Photosynthesis Research, Maastricht (Netherlands), 2016.8.7-12 (招待講演)

Yuki Okegawa and Ken Motohashi: *Arabidopsis m*-type thioredoxin regulates the Calvin cycle enzymes *in vivo*. The 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht (Netherlands), 2016.8.7-12

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

#### 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: 葉緑体活性酸素種消去システムにおけるペルオキシレドキシンの役割

研究代表者: 本橋 健, 取得年度: H28-30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: 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 -

研究分担者: 本橋 健, 取得年度: H27-31年 (5年)

科学研究費補助金・若手研究(B)

課題名: 葉緑体チラコイド内腔におけるレドックス制御機構の解明

研究代表者: 桶川友季, 取得年度: H28-30年 (3年)

2) 学外活動 本橋 健: 日本光合成学会幹事

3) 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、桶川研究助教は、生命資源環境学科の生物学実験、生命資源環境学実験 II、科学英語 II を担当した。これらの科目を教員 1 人で担当した場合、細かな指導が行き渡らず高い教育効果を生み出すことはむずかしい。研究助教を含めた複数の教員の指導により、実質的な少人数教育を行うことが可能となり、高い教育効果をあげている。

また、学部生の基礎特別研究、応用特別研究などの研究室活動においては、研究助教のサポートのおかげで各個人への教育・実験指導が細かな点まで行き届いている。また、一番大きな影響は、大学院生の教育において重要な役割を果たしていることにある。研究助教が研究を行う姿は、身近な存在として、各大学院生へ刺激



を与え、彼らの研究意欲を向上させるのに大いに貢献している。



# 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*Rit*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、*Rit*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、種皮型に関与する遺伝子が乗乗する染色体を決定し、遺伝子が存在する領域を約 480kb に絞り込んだ。

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。このため、これら2種における細胞質の種内分化および2種間の細胞質の対応関係を明らかにするために、*B. rapa* に属するハクサイとミズナのミトコンドリアの全塩基配列を決定した。両作物のミトコンドリアゲノムは共に 219,775bp であり、かつハクサイとミズナの間には1か所の塩基置換 (SNP) が存在した。これら2作物のミトコンドリアの塩基配列情報は DDBJ に登録された (AP017996, AP017997)。この結果、2011年に示された *B. rapa* のミトコンドリアゲノムの塩基配列 (JF920285) は誤りであることが明らかになった。発見された

SNP について、*B. rapa* と *B. juncea* の種内における分布を調査した結果から、*B. rapa* の栽培化は2回以上起こったこと、*B. rapa* を細胞質親とした *B. nigra* との種間交雑および *B. juncea* の栽培化も2回以上起こったことが判明した。

### 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

##### 論文

Hatono, S., Nishimura, K., Murakami, Y., Tsujimura, M. and Yamagishi, H. Complete mitochondrial genome sequences of *Brassica rapa* (Chinese cabbage and mizuna), and intraspecific differentiation of cytoplasm in *B. rapa* and *Brassica juncea*. *Breeding Science* 67 (In press). 2017

##### 著書

Yamagishi, H. In: Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) *The Radish Genome*. Springer (In press), *Speciation and diversification of radish*. 2017

Yamagishi, H. and Terachi, T. In: Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) *The Radish Genome*. Springer (In press), *Cytoplasmic male sterility and mitochondrial genome variations in radish*. 2017

#### 5. 学会発表など

軸屋 恵, 寺地 徹, 山岸 博: *Sinapis*属植物におけるミトコンドリアの *orf108* の分布. 日本育種学会第131回講演会, 名古屋市, 2017. 3. 29-30

山岸 博, 崎山 史歩, 金山 純子, 軸屋 恵: タカナとCMSキャベツの体細胞雑種作出. 日本育種学会第130回講演会, 鳥取市, 2016. 9. 24-25

鳩野 紗希, 辻村 真衣, 山岸 博: ハクサイとミズナのミトコンドリアゲノムの全塩基配列. 日本育種学会第130回講演会, 鳥取市, 2016. 9. 24-25

軸屋 恵, 寺地 徹, 山岸 博: ダイコンの稔性回復遺伝子の変異がオグラ型雄性不稔の発現に与える影響. 日本育種学会第130回講演会, 鳥取市, 2016. 9. 24-25

前田 貴文, 田中 花歩, 柴田 菜々恵, 山岸 博: *Brassica rapa* における種皮型関連遺伝子の同定に向けた連鎖解析. 日本育種学会第130回講演会, 鳥取市, 2016. 9. 24-25

寺地 徹, 岸本 岳之, 木下 滉平, 児島 和志, 中山 侑加, 軸屋 恵, 山岸 博: 大腸菌を用いたダイコンのミトコンドリアCMS遺伝子の進化実験. 日本育種学会第129回講演会, 横浜市, 2016. 3. 21-22

山岸 博, 鳩野 紗希, 西村 香里, 山下 陽子, 辻村 真衣:

*Brassica rapa* および *Brassica juncea* におけるミトコンドリアゲノムのSNP. 日本育種学会第129回講演会, 横浜市, 2016. 3. 21-22

Gyawali, Y., T. Sato, H. Fukuoka, H. Yamagishi: Detailed genetic analysis of fertility restorer genes in eggplant. 日本育種学会第129回講演会, 横浜市, 2016. 3. 21-22

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

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

課題名: ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の単離

研究代表者: 山岸 博, 取得年度: H25-29年(5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:

日本学術振興会 科学研究委員会 専門委員

農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業 評価委員

NHK テキスト 趣味の園芸 やさいの時間 12月号 ダイコン世界紀行, 2016.11.21:6-11(教えてくれた人)

朝日新聞 2016.10.15 「失われる野菜の多様性」にコメント

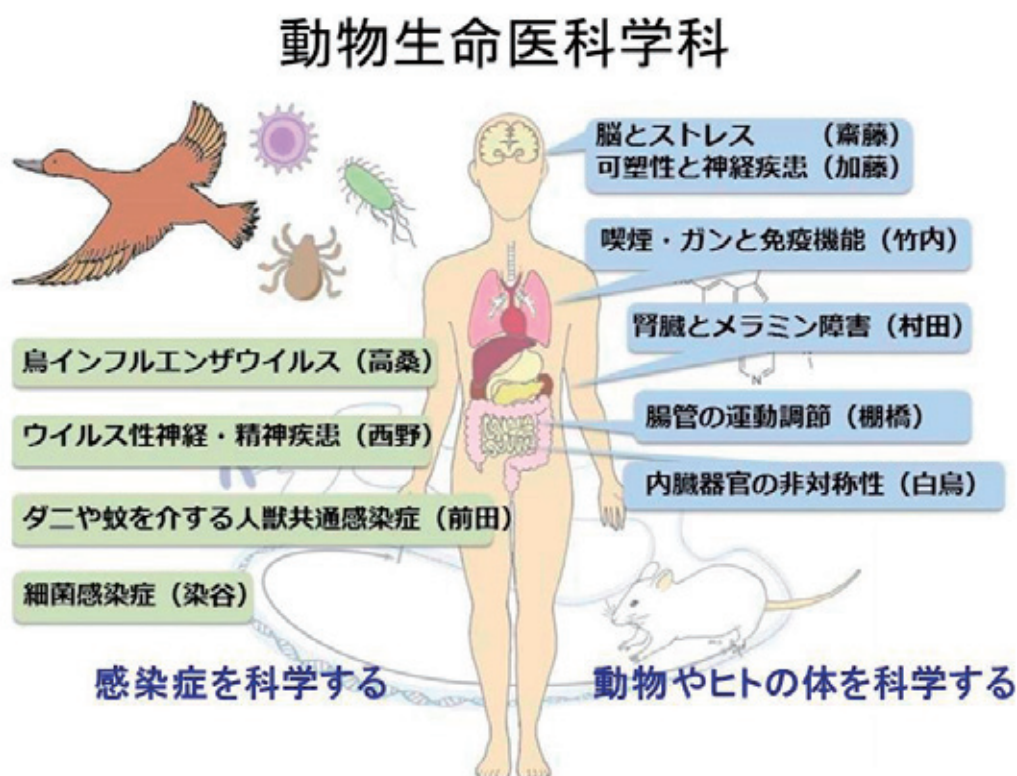


# 動物生命医科学科

## 動物生命医科学科

### 【研究】

動物生命医科学科では、動物の遺伝子から個体を対象として、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・製薬における安全性確保などに役立つ研究を行っている。研究は図に示すような内容で、種々のテーマについて幅広く展開している。具体的には、インフルエンザなどのウイルス、細菌と感染症について分子レベルでの解明、神経疾患やストレスの影響の解明、免疫系、消化管運動の分子機構の解明について、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、国内外の研究者と密接に連携しながら、国内有数の実験施設のもとで研究を進めている。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、特に感染症を中心と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た少数精鋭教育を実施している。特に、学科の特性上、実習に重点をおき、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っている。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行っている。また、特筆すべき教育として、鳥取大学、岐阜大学との連携教育を行っている。カリキュラム編成は、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、動物感染症学などを学ぶ。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する。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でき、平成 28 年度は 15 名の合格者を輩出した。大学院への進学も多く、社会の安全・安心に貢献する、動物に関連した高度研究技術者、研究者や食の安全に貢献する専門知識や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・村田・白鳥
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	加藤
動物実験遺伝学実習/生物学実習	1	加藤・齋藤・高桑・前田・村田・白鳥
微生物学Ⅰ	2	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
科学英語Ⅱ	2	高桑
実験動物学・毒性学実習/薬理・免疫毒性学実習	2	竹内・棚橋
食品栄養衛生学	3	村田
動物感染症予防学実習/微生物・公衆衛生学実習	3	高桑・前田・村田
実験動物学実習	3	白鳥
動物と法・経営概論	3	竹内ほか
科学英語Ⅲ	3	齋藤・染谷・村田・竹内・西野・前田
動物倫理学	3	村田
動物感染症学	3/2	高桑
基礎特別研究	3	加藤・齋藤・染谷・高桑・竹内・棚橋・西野・前田・村田・白鳥
応用特別研究1・2	4	加藤・齋藤・染谷・高桑・竹内・棚橋・西野・前田・村田・白鳥
生物災害防止論	4	前田
動物福祉学	4	村田

# 動物神経解剖学研究室

Laboratory of Animal Anatomy and Neurobiology

教授 加藤 啓子

Prof. Keiko Kato, D.V.M. Ph.D

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。

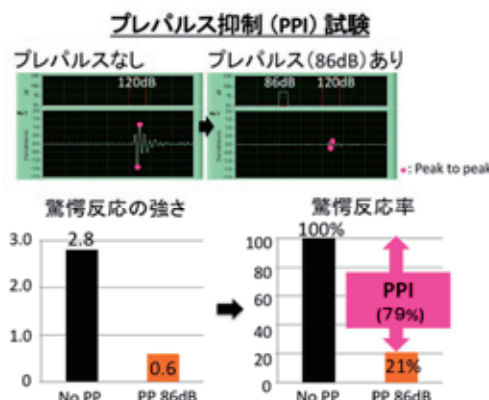
その一つ、下垂体で発現した後全身に運ばれ、成長促進作用を示す『成長ホルモン』が脳内で発現し、てんかん発症の閾値を決定することを発見した。また、てんかん誘導刺激を導入した扁桃体は、情動中枢の神経領域であり、脳成長ホルモンは、Arc(シナプス活性の強化に作用)の発現調節を介して過活動-低活動を制御することがわかった。

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 欠損マウスは、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。さらに平成 28 年度には、統合失調症・陰性症状を示すことを証明し、現在その原因の解明を目指している。

“GWAS Catalog (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/docs/about>)” を用いてヒト塩基多型 (SNPs) を調べたところ、ST3Gal14 欠損マウスの症状と一致した。具体的には、注意欠陥多動性障害 (ADHD) や知的障害を示すヒトに ST3GAL4 SNPs が見つかり、共に、ヒトのコレステロール血症やアテローム動脈硬化症にも ST3GAL4 SNPs が見つかった。以上の知見は、マウスとヒトにおいて、ST3Gal14 が神経精神疾患の発症に関与し、脂質代謝系への影響に起因する可能性を示唆している。そして ST3Gal14 欠損マウスがてんかん発症と、うつ、不安障害、統合失調症・陰性症状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。



図：大きい音(120dB)に驚愕したマウスの反応が足元の加速度センサーに伝わり、波形として検知される。通常、弱い音(86 dB、プレパルス)の80 m秒後に入る大きい音は聞こえなくなる。この反応をプレパルス抑制 (PPI) という。マウスが PPI を低下すると「プレパルスなし」の時と同様に、大きい音が聞こえてしまい驚愕する。統合失調症や ADHD を示すヒトでは、PPI の低下が現れる。



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 ST3Gal4 欠損マウス脳では、その発現量が低い。また、ヒト SNPs より、脂質代謝の変化と神経精神疾患との関わりが提案されている。平成 27 年度には、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、ST3Gal4 を介した脂質代謝の変化が情動記憶を変える現象を見つけた。ST3Gal4 欠損マウスの代謝に着目することで、代謝負荷に起因する情動行動システムの変化とその解明を目指して、研究を進めて行く。

## 2. 本年度の研究成果

平成 27 年度に引き続き、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が陰性症状であったことを示す知見、ST3Gal4 欠損マウスの脂質代謝系の異常を示す知見を得た。平成 27 年度の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含めて、次年度の論文作成につなげる。

ST3Gal4 遺伝子欠損マウスにおけるうつ・不安障害の発症メカニズムについて、微小管の形態及び輸送系の変化が原因である可能性を示唆する知見を得た。次年度には、その確認を行い論文作成につなげる。

## 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. In 2016, it was found that the deficient mice also showed negative symptom of schizophrenia, presently we aim to analyze the mechanism. Using GWAS Catalog (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/docs/about>), human ST3Gal4 SNPs were found in the attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and intellectual disability, on the other hand, in the hypercholesterolemia and atherosclerosis that are related to the lipid metabolism. The ST3gal4 deficient mice is a useful model animal for elucidating molecular bases of neuropsychiatric disorders, such as epilepsy, depression, anxiety, and schizophrenia. Present our approach is also 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 ST3Gal4 deficient mice. Results of human ST3GAL4 SNPs that written in the above “1” and of lipid metabolism in ST3gal4 deficient mice provide involvements of lipid metabolism in neuropsychiatric disorders via ST3gal4. Therefore, we continue 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

なし

### 5. 学会発表など

1. 加藤啓子, 「油脂飼料を摂食したシアル酸転移酵素ST3Gal IV遺伝子欠損マウスにおける認知行動について」第35回日本糖質学会 2016年9月2日 高知市文化プラザ かるぼーと, 高知 (ポスター)
2. 薄 美有, 廣田 暖奈, 藤田 明子, 加藤 啓子 「シアル酸転移酵素ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスの海馬歯状回・神経細胞の形態変化について」第35回日本糖質学会2016年9月2日 高知 (ポスター)
3. 太田 知沙, 廣田 暖奈, 藤田 明子, 加藤 啓子 「シアル酸転移酵素ST3Gal IV 欠損マウスの統合失調症様症状について」第35回日本糖質学会2016年9月2日 高知 (ポスター)
4. 藤田 明子, Wands AM, McCombs JE, Cervin J, Rodriguez AC et al. 「コレラ毒素の作用における糖タンパク質とフコシル化の役割」第35回日本糖質学会2016年9月1日 高知 (口頭)
5. Keiko Kato, Sialyltransferase ST3Gal IV deletion protects temporal lobe epilepsy but induces the side effects, such as anxiety, depression, and schizophrenia in mice. *in Mechanisms of Epilepsy & Neuronal Synchronization*, Gordon Research Conference (PGA Catalunya Business and Convention Centre, Girona, Spain) August 21-26, 2016.

### 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)
- 平成28年 水谷糖質科学振興財団 第23回研究助成 2 シアル酸転移酵素と代謝負荷に起因する精神神経疾患の発症(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

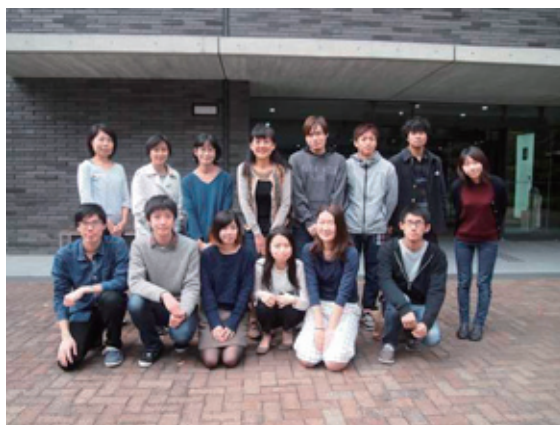
- 3) インターシップ受入れ (マヒドン大学獣医学部 5年生 1名)

### 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1年半が経過した。平成28年度内に実施した研究より, 2件の特許出願, 原著論文の作成に至る結果を得ている。教育に関しては, 「遺伝子工学」「Modern Life Sciences in Our Life」の講義に参加し, それぞれ5回ずつ担当している。また研究室内の学部生・大学院生の実験指導, 発表指導に精力的に取り組んでいる。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。



(2016年11月1日撮影)

# 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、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、あるいは重篤なストレス刺激を受けると、前頭前野や海馬では縮小や神経変性などが生じる。研究では、ストレスによる脳の神経変性機構を明らかにするため、脳の酸素供給変化、副腎皮質ホルモンの影響などの解析、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。

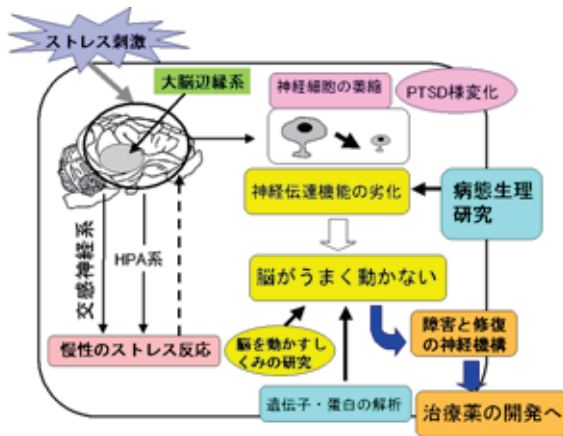


図1. 本研究の概略

## 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い。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分界状床核に着目し、グルココルチコイド分泌変化の解析を進めている。また、脳の神経細胞やミクログリアの形態学的変化の解析を合わせて行っている。

### 2) 海馬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

副腎皮質ホルモンが脳に与える影響を調べるため、合成副腎皮質ホルモンをラット海馬由来の初代培養神経細胞に投与し、神経細胞変性のしくみを解析している。低濃度デキサメタゾン (1 μM) 処置により、培養神経細胞のアポトーシスが生じた。しかし、高濃度のデキサメタゾンでは顕著な変化が見られなかった。この効果の差について、解析を進めている。

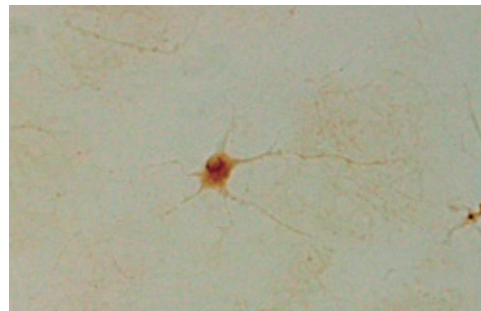


図1. ラット海馬由来の初代培養神経細胞の明視野顕微鏡写真。デキサメタゾンを培養液に加えると、神経細胞が褐色に染まり、アポトーシスを起こしていることがわかった (TUNEL 法による染色)。

### 3) 幼若子ブタにおける脳発達障害機構の解明

ブタはストレス感受性の高い動物として知られている。本年度から、生後の脳発達障害とそのしくみを調べるため、幼若子ブタの正常な脳の形態学データを収集している。はじめに、生後2週齢の子ブタを用いて、脳の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製作し、ニッスル染色および髄鞘染色を行った。今後、ヒトの乳幼児の脳発達障害の解明に資するため、正常な幼若子

ブタの脳の形態学的データを解析し、ストレスなどによる脳の生後発達障害とその機構を調べるための研究基盤を整備していく予定である。

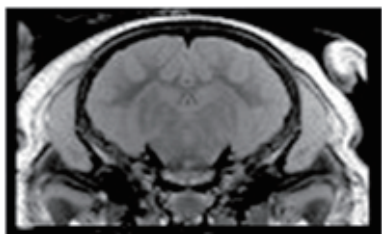


図 2. 幼若子ブタ脳の MRI 像 (前額断撮影画像)

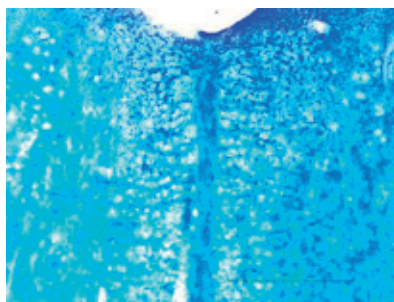


図 3. 幼若子ブタ脳の髄鞘染色切片像  
(Nissl 染色による二重染色)

### 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 how glutamate in the BNST may stimulate glucocorticoid secretion. Influence of systemic administration of Lypopolysaccharide has also been studied mechanisms to stimulate the HPA axis and to cause neurodegeneration with activation of microglia.

##### **2) Influence of glucocorticoids on the primary cultured neurons**

We have used the primary neuronal culture from the fetal brain of rats to investigate influence of stress hormones such as glucocorticoids and mechanisms of neuronal degeneration by the stress hormones at the cellular level. Dexamethasone (1  $\mu$ M) caused apoptosis in the cultured neurons. However, high dose of dexamethasone had no apparent effect on the cultured neurons.

##### **3) Piglets-new animal model for studying developmental brain disorders in human infants**

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 on the brain development. Using preweaning piglets, we are analyzing the MRI and histochemical data of the brain.

### 4. 発表論文、著書など

Saito T, Watanabe E, Sasaki S. Brain atlas of the miniature pig to establish new animal model for image-assisted stereotaxic surgery.

Database of Grants-in-Aids for Scientific Research, Japan

(<https://kaken.nii.ac.jp/ja/>), 2016.

## 5. 学会発表など

(学会発表)

齋藤敏之, 宇賀美奈子, 佐々木誠一, 渡辺英寿: ミニブタの脳地図作製の技術的検証. 第159回日本獣医学会学術集会, 日本大学, 藤沢市, 2016. 9. 6-8.

Wang B, Tanahashi Y, Ono R, Kawakita N, Nishino Y, Saito T. Dexamethasone modulate GABAergic response in primary cultured neurons of mouse cerebral cortex. Neuroscience 2016, Yokohama, 2016, July 20-22.

木下香菜子, 井森貴世, 大崎薫, 中島和佳子, 齋藤敏之: ラット分界条床核へのグルタミン酸投与による心拍数と血漿中副腎皮質ホルモン濃度変化の解析. 第109回近畿生理学談話会, 大阪市立大学, 大阪市, 2016. 11. 5.

Nishino Y, Fujita E, Kawakita N, Kubota Y, Ono R, Owa S, Saito T, Honda T. Effect of corticosterone and kainic acid in the primary cultured neuron infected with Borna disease virus. The 64th annual meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, 2016, October 23-25.

Kawakita N, Kitamura M, Kubota Y, Taguti H, Kimura A, Nishino Y, Saito T. Effect of corticosterone in the mice infected with Borna disease virus-1. The 64th annual meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, 2016, October 23-25.

## 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-(H26)-H27(延長)

### 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

齋藤敏之: 平成28年度京都のこだわり畜産物生産農場登録審査会委員

### 4) 受賞等 なし

### 5) その他

(1) 学内研究資金: 平成28年度特定課題研究採択

課題名: E1614 乳幼児の脳発達障害の病態を解明するための新規動物モデルの開発

(2) 学部内各種委員: 動物生命医科学科・学科主任

(3) 鳥取大学共同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



## 器官形成学研究室

Laboratory of Organogenesis

教授 白鳥 秀卓

Prof. Hidetaka Shiratori, D.V.M., Ph.D.



### 1. 研究概要

我々ヒトを始めとした脊椎動物は、外見上ほぼ左右対称であるが、心臓、胃、血管など内臓器官の多くは左右非対称に配置している。胎児期において、内臓器官も初めは左右対称にできるが、その後左右非対称に形が変化して完成する。私たちは、このような器官の左右非対称性の形成機構を解析する。「どのように左右非対称な遺伝子発現が確立するのか。」その結果として、「どのように内臓器官が左右非対称に変化するのか。」を明らかにしていきたい。

具体的には、我々ヒトと同じ哺乳類のマウスを用いて、KO マウス、トランスジェニックマウスを作製・繁殖・解析して、左右非対称に発現する遺伝子の発現制御機構や役割、細胞移動・細胞増殖・細胞形態・細胞死の左右非対称性とその意義を解明する。

また、老化に関与するアミノ酸代謝経路遺伝子の役割を解析する。アミノ酸代謝経路に関与する遺伝子を KO したところ、早老症様の症状を示した。今後は、KO マウス、トランスジェニックマウスを作製・繁殖・解析して、アミノ酸代謝異常による早老機構を解明する。

### 2. 本年度の研究成果

4月に本学に着任したので、まずは研究室のセットアップとマウス系統の繁殖を行った。

マウス系統が順調に繁殖した後に、左右非対称に発現する細胞外マトリックス因子 LR1 変異マウスの表現型の解析を行った。LR1 変異マウスの表現型が B6/129 系統よりも B6 純系に近い方が重度であったことから、B6 系統への戻し交配を進め、表現型の解析を行った。新生仔を解剖して内臓を観察したところ、腸ループ・血管系・肝臓の分葉構造等の左右非対称な器官形成の異常が見られた。

また、LR1 変異マウスが示す左右非対称な形態異常が LR1 の左右非対称な発現が無くなったためであることを証明する(左右非対称性の形成異常にも見えるが、実は左右非対称性の形成とは関係ない異常である可能性を否定する)ために作製したマウス:LR1 変異マウスに左側側板中胚葉特異的に LR1 を発現するトランスジェーンを導入したレスキュー実験用のマウスの解析も行った。レスキューマウスについても、解析を効果的に行うために B6 系統への戻し交配を進めた。

着任1年目であり、マウス系統の準備に時間がかかり、詳細な解析を行うことはできなかったが、本年の解析によって、LR1 を始めとする細胞外因子の左右非対称な器官形成における役割を明らかにするための基礎を固めることができた。

アミノ酸代謝経路遺伝子の KO マウス、トランスジェニックマウスについても繁殖を行い、KO マウスの個体レベルでの表現型の解析や各器官の組織異常、各器官・血液中の遊離アミノ酸濃度の測定を行った。

また、理研 CDB、ドイツ University Hospital Muenster との共同研究により、学術論文を発表した。

### 3. Research projects and annual reports

Several visceral organs are left-right (L-R) asymmetrically located in vertebrates. In embryonic development, the visceral organs are L-R symmetrically initiated, and then their shape is asymmetrically changed. We want to know the mechanism for the generation of L-R asymmetry.

①How is the asymmetric expression of the genes regulated?

②How is the shape of the visceral organs changed?

We analyze the role and transcriptional mechanism of the genes that are asymmetrically expressed focusing on the differences between left and right in cell migration, cell proliferation, cell shape and cell death, using several mutant and transgenic mice.

We also analyze the role of a factor in amino acid metabolic pathway. The KO mouse of this factor showed the premature aging-like phenotype. We want to know the mechanism for premature aging by abnormal amino acid metabolism.

I arrived in this university in April. I first set up our laboratory and bred the KO and transgenic mice.

LR1 is extracellular matrix factor and is L-R asymmetrically expressed in mouse embryo. We backcrossed the LR1 KO to B6 and analyzed the phenotype of this KO mouse. The KO mice showed abnormal gut-looping, blood vessels and lobation of liver. Moreover, we did the rescue experiment using the transgenic mouse expressing LR1 only on left side.

We also analyzed the KO mouse of a factor in amino acid metabolic pathway. We observed the morphology and behavior in KO mice and measured the free amino acid in several organs and blood.

I published the papers in the collaboration with RIKEN CDB or University Hospital Muenster.

#### 4. 論文, 著書など

1. J. Wallmeier, H. Shiratori, GW. Dougherty, C. Edelbusch, R. Hjeij, NT. Loges, T. Menchen, H. Olbrich, P. Pennekamp, J. Raidt, C. Werner, K. Minegishi, K. Shinohara, Y. Asai, K. Takaoka, C. Lee, M. Griese, Y. Memari, R. Durbin, A. Kolb-Kokocinski, S. Sauer, JB. Wallingford, H. Hamada, H. Omran: TTC25 Deficiency Results in Defects of the Outer Dynein Arm Docking Machinery and Primary Ciliary Dyskinesia with Left-Right Body Asymmetry Randomization. Am J Hum Genet. 99(2):460-469.
2. K. Minegishi, M. Hashimoto, R. Ajima, K. Takaoka, K. Shinohara, O. Y. Ikawa, H. Nishimura, AP. McMahon, K. Willert, Y. Okada, H. Sasaki, D. Shi, T. Fujimori, T. Ohtsuka, Y. Igarashi, TP. Yamaguchi, A. Shimono, H. Shiratori, H. Hamada: A Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking. Dev Cell. 40(5):439-452.

#### 5. 学会発表など

無し

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名: Pitx2 の下流の分子機構と左右非対称な形態変化の解析

研究代表者: 白鳥秀卓, 取得年度: H26-28年(3年)

##### 2) その他

実験動物1級技術者資格取得のための実技練習を担当。15名が認定試験に合格した。

# 細菌学研究室

Laboratory of Bacteriology

## 1. 研究概要

微生物はあらゆるところに存在しており、時に動物や人の健康を脅かすこともある。なかでも動物と人の双方に感染する微生物は、人と動物との関わり方が多様化する現代社会において、人獣共通感染症や食品衛生上の問題を引き起こす可能性があるため、大きな注目を集めている。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た。2015年には、11,140個体のマダニを捕獲した。前年に比べ捕獲数が減少しており、調査地点において設置された野生動物防除のための網の影響が考えられた。今年度の捕獲状況の解析は今後の検討事項である。さらに、これまで収集してきた捕獲時の気象要因と、捕獲数の関係について統計学的な解析を開始した。

また、採集されたマダニの70%以上からリケッチアが検出され、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ことから、これらのリケッチアの病原性について詳細に解明するため、リケッチアの表面抗原タンパクについての解析を開始した。また、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するため、野生動物の赤外線カメラによる生態調査に加え、シャーマントラップを利用した小型野生動物の捕獲調査を実施した。その結果、調査地点において、10数種の野生動物が観察され、調査地によって、その観測される割合が異なることが明らかとなった。また、少数であるが、シャーマントラップによりアカネズミが捕獲された。今後は、これらの野生動物の病原体感染状況等を検討していく必要がある。

准教授 染谷 梓

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

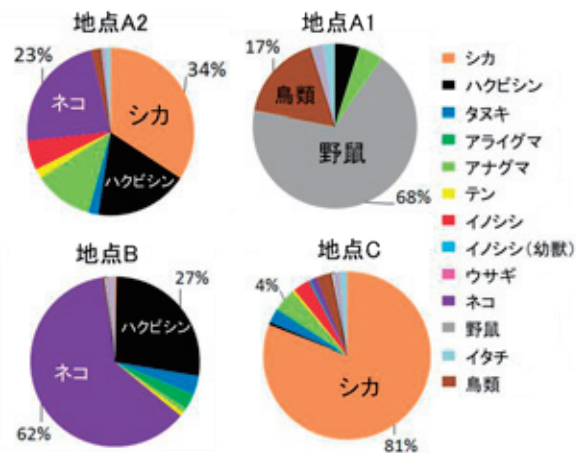


図1 2016年に各調査地点で撮影された野生動物の割合。

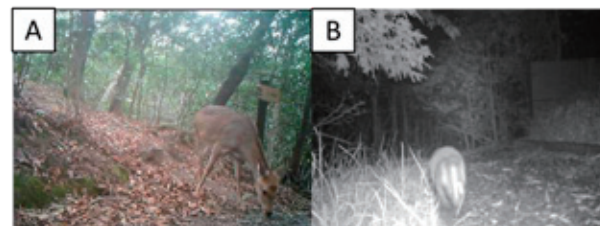


図2 調査地において撮影された野生動物。A. 地点Cにおいて撮影されたシカ。B. 地点Bにおいて撮影されたハクビシン。

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。さらに、複数の薬剤に対して同時に耐性を示す多剤耐性菌が検出された。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

なし

### 5. 学会発表など

水谷裕樹、青木里帆、染谷梓、川道美枝子、三宅慶一、前田秋彦. 京都市で捕獲されたハクビシンの日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況の調査. 第51回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 猪苗代市, 2016.5.14

佐々木創平、脊戸優、染谷梓、好井健太郎、前田秋彦. Vero E6細胞におけるトゴウイルスの増殖機構. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌市, 2016.10.23

### 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: 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

土庄町立土庄中学校連携講座「身近な微生物」

(2016.6.14 四国新聞掲載)



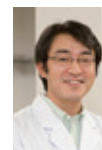
研究室メンバー

## 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

H5 亜型の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。また、日本国内においても、高病原性鳥インフルエンザ野外調査を行っており、鳥取県の飛来したオナガガモの糞便から H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) を分離した。その後、日本各地で H5N6 亜型の HPAIV の発生が起こり、ウイルスは 2.3.4.4c に分類され、最近韓国と中国で分離された H5N6 亜型 HPAIV と遺伝的に近縁であった。さらに、これらの HPAIV は、さらに抗原変異を起こしていた。

野鳥由来の鳥インフルエンザウイルスは、ヒト細胞でウイルス RNA ポリメラーゼ活性が低く、特に NP タンパク質が活性に関連し、鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染に、重要である可能性が示された。

### 3. Research projects and annual reports

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

- 1: *The evolution and spread mechanism of pathogens such as avian influenza virus in nature.*
- 2: *Studies on the host range determinant in pathogens, mechanisms of pathogenesis and immune response of the*

*hosts through in vivo and in vitro analyses of the host-parasite interactions.*

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

Due to concerns that wild birds could possibly spread subtype H5 viruses, surveillance was conducted to monitor the types of avian influenza viruses circulating among the wild birds migrating to or inhabiting in Vietnam and Japan. An H5N6 highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIVs) was isolated from a fecal sample of a northern pintail collected at an overwintering site of migratory birds in Tottori Prefecture. H5N6 HPAIV were concurrently introduced into several distant regions of Japan. These viruses were classified into the genetic clade 2.3.4.4c and were genetically closely related to H5N6 HPAIVs recently isolated in South Korea and China. In addition, these HPAIVs showed further antigenic drift.

The avian influenza viruses derived from wild birds has low viral RNA polymerase activity in human cells, and it is shown that NP protein is related to activity and may be important for human infection of avian influenza virus.

### 4. 論文、著書など

Fujimoto Y, Tomioka Y, Takakuwa H, Uechi GI, Yabuta T, Ozaki K, Suyama H, Yamamoto S, Morimatsu M, Mai LQ, Yamashiro T, Ito T, Otsuki K, Ono E. Cross-protective potential of anti-nucleoprotein human monoclonal antibodies against lethal influenza A virus infection. *J Gen Virol.* 2016;**97**(9):2104-2116.

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.* 2016;**60**(1):41-48.

### 5. 学会発表など

なし

### 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

高桑弘樹:日本ウイルス学会 雑誌ウイルス編集委員

4) 受賞等 なし

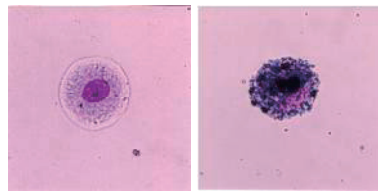
5) その他 なし

# 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”は炭粉粒子を取り込み、“肺胞真っ黒ファージ”へと変化し、その結果、貪食能、抗



原提示能などの免疫機能は抑制され、逆に活性酸素の産生能は増加する。そこで、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、肺癌などの肺疾患発症にこれらの要因が関係している可能性について研究している。また抑制された免疫機能を回復するために、天然成分(アガリクス茸、蜂蜜)の免疫増強作用について研究し、新薬の開発を目指し、「喫煙と免疫と癌と天然成分を科学」し、以下の研究テーマについて研究を進めている。

### 1) タバコ煙による肺胞マクロファージへの影響と遺伝子損傷について

タバコ喫煙により、タバコ煙は直接肺に吸入されるため、肺に存在する免疫細胞や肺組織への影響があると考えられる。特に肺の免疫系で中心的な役割を担っている肺胞マクロファージの機能に対するタバコ喫煙の影響を調べることは、肺の免疫系、ひいては生体防御を考える上で重要である。そこで、自動喫煙装置を用いて、マウスに一定量、一定期間、均一にタバコ煙を喫煙させた後、気管支肺胞洗浄により肺胞マクロファージを採取し、肺胞マクロファージの免疫機能と遺伝子への影響および喫煙の LPS 肺炎症への影響、スギ花粉による肺への影響についても研究している。

### 2) LPS およびスギ花粉の初期免疫応答について

グラム陰性菌由来の内毒素である Lipopolysaccharide (LPS)は、様々な免疫活性を有し、タバコ煙や環境中に含まれており、呼吸や喫煙により肺に吸入することにより肺胞領域に取り込まれる。そこで、LPS による肺免疫細胞への影響について研究している。また、肺に影響を与え、アレ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

教授 竹内 実

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



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をしている。また、日本全国から蜜源の違う日本国産ハチミツの免疫機能への影響と有効成分についても研究を開始している。



#### ② アガリクス茸

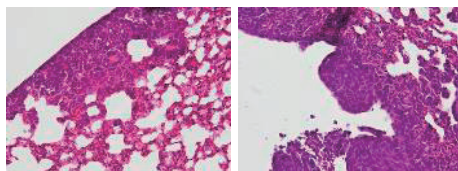
アガリクスは、学名「アガリクスブラゼイムリル (Agaricus blazei Murill)」、和名を「カワリハラタケ」という食用キノコで、ブラジルのピエダーテ地方と呼ばれる高地に唯一自生している。この地で暮らす人々が昔から食用にしてきたキノコである。ピエダーテ地方の住民には生活習慣病の患者が少なく長寿者が多いことから研究が進められ、アガリクスには免疫活性が知られている。しかし、免疫作用の機構については十分に解明されていないため、そのメカニズムと有効成分について研究している。



### 2. 本年度の研究成果

タバコ主流煙暴露により肺胞マクロファージの抗癌作用

の抑制が認められた。その抑制機構には、喫煙により肺泡マクロファージの TLR4 経路に関係する転写因子の JNK と AP1 の活性が抑制され、proTNF- $\alpha$  を切断する TACE の発現低下による TNF- $\alpha$  の産生低下が関与し、その結果癌細胞のカスパーゼの活性が抑制され、アポトーシスの抑制が引き起こされ、癌細胞に対する抗癌作用が抑制された可能性が示唆された。また、喫煙により影響を受けた肺泡マクロファージは、癌細胞の腫瘍形成と肺転移を促進し



た。喫煙により肺泡マクロファージの抗癌作用の低

下には、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も関連していると考えられる。

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泡マクロファージのサイトカイン mRNA 発現を増強する作用が認められた。また、好中球の貪食作用に対する増強効果も認められた。アガリクス茸熱水抽出液もマクロファージのサイトカイン mRNA 発現を増強する作用が認められた。これらの天然成分物質は、マクロファージの活性化を介して好中球の細菌への移動性を早め、貪食作用を高め、細菌感染を防御する可能性が示唆された。

LPS による肺の初期免疫応答に関しては、LPS の気管支内投与により、肺泡マクロファージが 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、肺泡マクロファージにオートクラインに作用し、その後、好中球の走化因子が産生されることが確認され、肺腔内に好中球が誘導され、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

Yi-Hsin Shen, Alexa K. P. Pham, Minoru Takeuchi, Kent E. Pinkerton. Sex and strain-based inflammatory response to repeated tobacco smoke exposure in Spontaneously Hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Inhalation Toxicology*, 28 : 677-685, 2016.

M. Takeuchi, M Takasaki, N Miwa, Y Tanaka, K.E. Pinkerton. Immunotoxic Effect of Cigarette Smoke as Environmental Factor on Immune Functions and DNA damage in Alveolar Macrophages. *Toxicology Letters*, 259:150, 2016.

木村沙也加、宇野真由奈、田中美子、竹内実 蜂蜜による好中球の抗腫瘍作用と食食機能への影響 京都産業大学先端科学技術研究所報 第15号、1-11, 2016.

竹内実 スギ花粉アレルゲン吸入による免疫応答に対する喫煙の影響 アレルギーの臨床 36:70-73,2016

野瀬雅仁、竹内実 スギ花粉の肺胞マクロファージと好中球への影響と喫煙 アレルギーの臨床 36:41-45,2016

#### 5. 招待講演、シンポジウム等

ハチミツの免疫機能について 京都府獣医師会産業動物部会研修会 2016.8.28.

#### 6. 学会発表など

M. Uno, T. Kanamaori, N. Miwa, Y. Tanaka, M. Takeuchi. Anti-inflammatory effect of honey on pulmonary inflammation induced by Lipopolysaccharide (LPS) in mice. 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 5-7 December, 2016.

C. Kanamori, M. Uno, N. Miwa, Y. Tanaka, M. Takeuchi. Effects of Cryptomeria Japonica pollen and cigarette smoke on immune cells. 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 5-7 December, 2016.

N. Miwa, M. Uno, C. Kanamori, Y. Tanaka, M. Takeuchi. Anti-tumor activity of neutrophil induced by Lipopolysaccharide (LPS). 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 5-7 December, 2016.

M. Takeuchi, M Takasaki, N Miwa, Y Tanaka, K.E. Pinkerton. Immunotoxic effect of cigarette smoke as environmental factor on immune functions and DNA damage in alveolar macrophages. XIV International Congress of Toxicology, Merida, 2-6

October,2016.

M. Takeuchi, A. Kawazoe, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Tanaka, K. E. Pinkerton. Immunological Mechanism of Lung Inflammation by Lipopolysaccharides (LPS). ATS 2016, San Francisco, 13-18 May, 2016

M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Tanaka. Effect of Cigarette Smoke Exposure on Anti-Cancer Activity of Alveolar Macrophage to Lewis Lung Carcinoma in Mice. European Lung Cancer Conference (ELCC2016), Geneva, 13-16 April 2016

#### 7. その他特記事項

##### 1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(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

鳥取大学, 岐阜大学非常勤講師

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

マキノ出版「壮快」2017年4月号 ハチミツ記事掲載

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(2016年9月3日)



# 薬理学研究室

Laboratory of Pharmacology

准教授 棚橋靖行

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

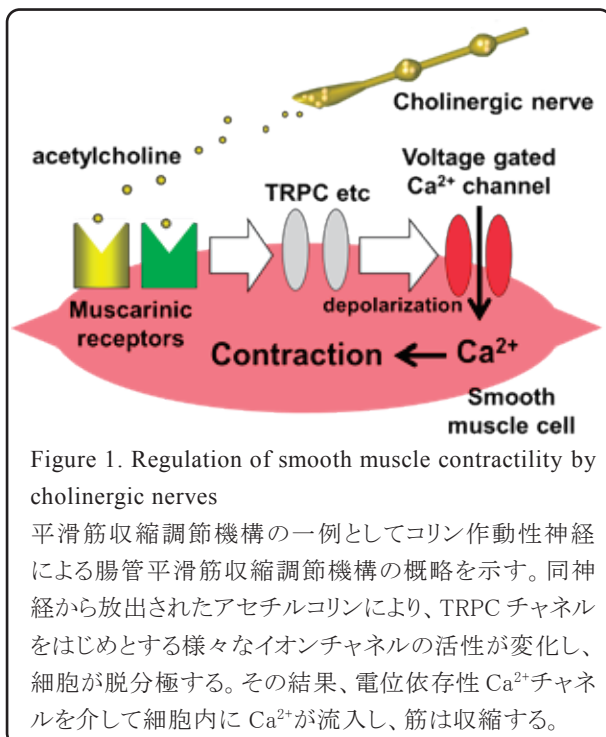


## 1. 研究概要

当研究室では、主に以下のテーマについて研究を行っている。

(1) 平滑筋収縮調節メカニズムおよび平滑筋機能疾患の病態解明

平滑筋組織は、末梢臓器および脈管系の管壁を構成しており、血圧の調節、胃腸管および泌尿・生殖器の運動、気道抵抗の調節といった様々な生理機能を担っている。平滑筋細胞の収縮は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が増加することにより起こる。また、平滑筋の収縮活性は、様々な神経伝達物質やホルモンによって緻密に制御されている。これら内因性情報伝達物質は、まず、平滑筋細胞に発現する受容体と呼ばれる蛋白質と結合して、それぞれの受容体に固有の情報伝達機構を作動させる。これにより、細胞に発現する  $Ca^{2+}$  透過性のイオンチャネルの活性が変化する結果、細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度が増加し、最終的に筋の収縮活性が変化する (Figure 1)。平滑筋組織の形態および機能的変化は、構成する臓器の機能異常につながり、高血圧、喘息、過敏性腸症候群などの疾患につながると考えられる。当研究室では、未解明な点が未だ多く残されている①平滑筋収縮調節メカニズムおよび②平滑筋組織の異常に伴う疾患の病態の二点について研究を行っている。



(2)  $Ca^{2+}$  透過性イオンチャネルの生理学的・病態生理学的役割

細胞内の  $Ca^{2+}$  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、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 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  $Ca^{2+}$  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  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は、 $Ca^{2+}$  ストアから細胞内への  $Ca^{2+}$  放出と各種  $Ca^{2+}$  透過性イオンチャネルを介した細胞外からの  $Ca^{2+}$  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  $Ca^{2+}$  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

近年、機械受容チャネルとして Piezo チャネルが新しく同定された。しかし、同チャネルの基本的な性質や生理学的な役割についてはほとんど明らかにされていない。本年度は、Piezo1 チャネルの薬理的性質を明らかにするために、ヒト Piezo1 チャネルを強制発現させたヒト胎児由来腎臓細胞において、Piezo1 チャネル活性化薬として知られる Yoda1 を投与した時の膜電流反応を記録し、Yoda1 の 50% 有効濃度 ( $EC_{50}$ )、電流-電圧関係、陽イオンチャネルの非選択的阻害薬である  $Gd^{3+}$  およびルテニウムレッドに対する感受性などを明らかにした。

## 3. Research projects and annual reports

(1) Mechanisms of gastrointestinal motility.

Smooth muscle, which is located in the walls of the visceral organs, plays an important role in several processes in the body including modulating blood vessel tone, controlling gastrointestinal and genitourinary tract motility, and regulating airway resistance. Smooth muscle contractility is regulated by intracellular  $Ca^{2+}$ , which is affected by various neurotransmitters and hormones that act on its receptors, leading to change in activities of ion channels (Figure 1). Structural and functional changes in the smooth muscle can lead to disorders such as hypertension, asthma, and irritable bowel syndrome. Our

laboratory focuses on understanding 1) the mechanisms that regulate smooth muscle contractility, and 2) pathophysiology of diseases associated with smooth muscle abnormality.

(2) Physiological and pathophysiological roles of  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ion channels.

Under normal conditions, intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) is kept very low (less than 100 nM). When cells are stimulated, the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is increased, resulting in various cellular responses such as contraction, proliferation, migration, cell death and release of neurotransmitters etc.. The increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is induced by the  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores and  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the cell through  $\text{Ca}^{2+}$ -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.

Piezo proteins have been recently identified as novel mechanosensitive ion channels. Its pharmacological properties and physiological roles are not fully understood. In this year, we analyzed the current evoked by Yoda1, which has been newly developed as a Piezo1 activator, in Piezo1-overexpressed human embryonic kidney cells to characterize its channel properties such as 50% effective concentration values ( $\text{EC}_{50}$ ) of Yoda1, the current-voltage relationship, and the sensitivity to non-selective cationic channel blockers  $\text{Gd}^{3+}$  and ruthenium red.

#### 4. 論文、著書など

Y. Tanahashi, B. Wang, Y. Murakami, T. Unno, H. Matsuyama, H. Nagano and S. Komori: Inhibitory effects of SKF96365 on the activities of  $\text{K}^+$  channels in mouse small intestinal smooth muscle cells. *J. Vet. Med. Sci.* **78(2)**, 203-211

#### 5. 学会発表など

Yasuyuki Tanahashi, Ban Wang, Yuri Murakami, Hayato Matsuyama, Seiichi Komori and Toshihiro Unno: Muscarinic suppression of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels mediated by the  $\text{M}_3$ /phospholipase C pathway contributes to smooth muscle contractions in mouse small intestine: XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. Marseille, Paris, 15-21 Oct 2017 Poster and Poster Highlights talk  
Toshihiro Unno, Kasumi Suzuki, Emi Sakuma, Hiroshi Nagano, Hayato Matsuyama, Yasuyuki Tanahashi, Seiichi Komori:

Cholinergic contraction mediated via the  $\text{M}_2$  muscarinic receptor is predominant in mouse colonic circular muscles. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. Marseille, Paris, 15-21 Oct 2017 Poster

松山 勇人、内藤清惟、和田善明、永野宏、齋藤正一郎、酒井洋樹、棚橋靖行、北澤多喜雄、小森成一、海野年弘: ムスカリン受容体を介した胃粘膜細胞の分化・増殖制御: 第159回日本獣医学会学術集会, 藤沢市, 2016.9.6~8 口頭発表  
Ban Wang, Yasuyuki Tanahashi, Ryusuke Ono, Naoki Kawakita, Yoshii Nishino, Toshiyuki Saito: Dexamethasone Modulates GABAergic Response in Primary Cultured Neurons of Mouse Cerebral Cortex. 第39回日本神経科学大会, 横浜市, 2016.7.20-22 Poster

#### 6. その他特記事項

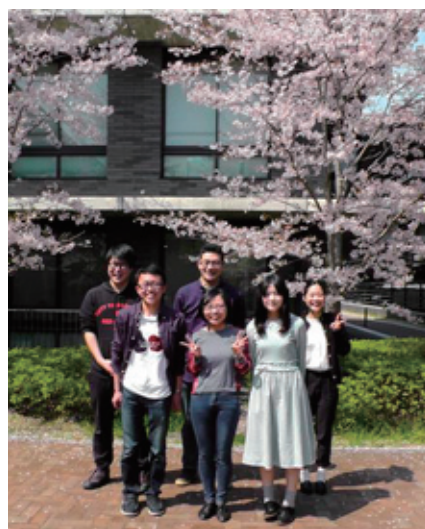
1) 外部資金

該当無し

2) その他

i. 担当講義: 化学通論 A, 薬理学・毒性学, 薬理・免疫毒性学実習, 基礎特別研究

ii. 在外研究員 (2015.9.1~2016.8.31): 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、研究を行った。



研究室メンバー



# ウイルス学研究室

Laboratory of Virology

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino,

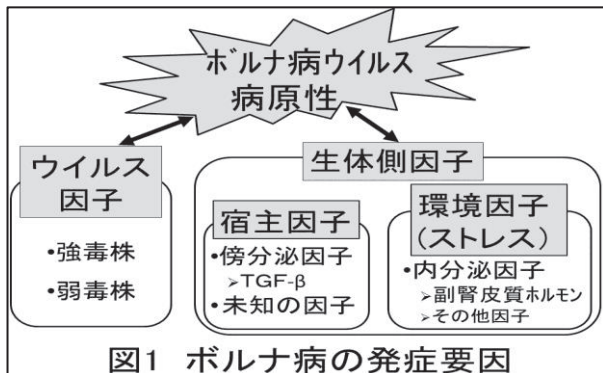
DVM, Ph.D



## 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が引き起こされる。このような感染個体における様々な影響を発症(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が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/BoDV)感染により引き起こされるボルナ病に焦点を絞り研究を行っている。ボルナ病はウマやヒツジに持続的に感染し、時に致死的な神経疾患を引き起こす病気として100年以上前から知られていたが、最近では、ネコ、イヌ、アライグマ、ニホンザル、ヒト、鳥類、爬虫類を含む幅広い脊椎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、いまだ発病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症学調査を中心に研究を行っている。



## 2. 本年度の研究成果

「ボルナ病ウイルス感染初代神経培養細胞はコルチコステロンおよびカイニン酸への反応性が変化する」

ボルナ病ウイルスはモノネガウイルス目ボルナウイルス科に属する、神経向性ウイルスである。多くの脊椎動物の中枢神経系に持続感染し、ボルナ病(行動学的異常、運動機能障害、感覚異常、あるいは致死的神経疾患)を引き起こす。ボルナ病に至る詳しいメカニズムはまだ明らかにされていないが、ボルナ病ウイルスは持続感染することにより、感染細胞の機能を変化させることが示されつつある。本研究では、ボルナ病ウイルス感染細胞の機能的変化を探ることを目的として、副腎皮質ホルモンのひとつであるコルチコステロン(CORT)、あるいはカイニン酸(KA)刺激に対するウイルス感染初代培養神経細胞の反応性について解析した。

妊娠14日齢のC57BL/6Nマウス(SLC)の胎仔から大脳皮質を取り出し、初代神経培養細胞を作製した。培養4日目にBoDV-CRNP5株を感染し、培養7あるいは8日目にCORT(10 $\mu$ M)あるいはKA(200 $\mu$ M)処理をした。それぞれ所定の培養後に細胞を固定し、蛍光抗体染色とFluoro-Jade C染色を行ない、初代神経培養細胞のボルナ病ウイルス感染率と障害率を測定した。また、Mifepristone(RU-486: Mif)を用いて、CORT刺激反応におけるグルココルチコイド受容体(GR)阻害試験を行った。

その結果、神経細胞はCORTおよびKA刺激のいずれにおいても障害をうけた。CORTとKAによる神経細胞障害性は、ボルナ病ウイルス感染によりさらに高まった。一方、神経細胞のBDV感染率は、CORT添加により高くなった。GR阻害剤であるMifの前処理により、CORTによるウイルス伝播促進効果が一過性に阻害された。

初代培養神経細胞は、ボルナ病ウイルス感染によりCORTあるいはKA刺激に対する反応性が亢進し、より機能障害を受けやすい性質に変化する可能性が示唆された。また、CORT添加による神経細胞におけるボルナ病ウイルスの伝播促進は、GRを介した刺激によって誘導されることが示唆された。

## 3. Research projects and annual reports

Borna disease virus-1 (BoDV-1) is a non-segmented negative-strand RNA virus belonging to the

family *Bornaviridae*. BoDV-1 infection induces severe signs of neurological disease, including behavioral abnormalities. Responses to virus infection vary according to differences in the species, animal strain, age of the host at the time of infection, or viral strain, indicating that host-dependent factors as well as virus-specific factors determine the onset of Borna disease. However, the precise mechanism underlying the BoDV-1-induced onset of behavioral disorders currently remains unclear. A previous study revealed that the cell function might be modulated by infection with BoDV-1.

To evaluate the functional modulation of BoDV-1-infected neurons, we examined effects of corticosterone (CORT) or kainic acid (KA) in mouse primary cultured cerebral cortex neurons infected with BoDV-1.

CORT degenerated the PCN infected with BoDV-1. KA degenerated the PCN infected with BoDV-1. CORT upregulated the infection rates of BoDV-1 in PCN. Mifepristone (Mif) inhibited the effect of CORT that upregulated the infection rates of BoDV-1 in PCN.

Our results show that responsiveness to CORT or KA changes to be more sensitive by BoDV-CRNP5 infection in PCN; it may be more susceptible to functional abnormality. The present study also suggests that stimulatory transmission of BoDV-1 by CORT is mediated by GR in neurons.

#### 4. 論文, 著書など

Yoshii Nishino\*, Masaru Murakami and Masayuki Funaba.\*Expression and role of the TGF- $\beta$  family in glial cells infected with Borna disease virus. *Microbes Infect.* 18:128-136. 2016

#### 5. 学会発表など

王班、棚橋靖行、小野隆介、河北尚輝、西野佳以、齋藤敏之: Dexamethasone Modulates GABAergic Response in Primary Cultured Neurons of Mouse Cerebral Cortex. (マウスの大脳皮質初代培養神経細胞における GABA 作動性反応に対するデキサメタゾンの制御。) 第 39 回日本神経科学大会、2016.7.20-22(横浜市)

河北尚輝、北村真穂、窪田裕樹、田口央基、木村享史、齋藤敏之、西野佳以: Effect of corticosterone in the mice infected with Borna disease virus-1 (ボルナ病ウイルス感染マウスにおけるコルチコステロンの影響). 第 64 回日本ウイルス学会、2016.10.23-25 (札幌市)

西野佳以、藤田英里香、河北尚輝、窪田裕樹、小野隆祐、大和慎治、齋藤敏之、本田知之: Effect of corticosterone and kainic acid in the primary cultured neuron infected with Borna disease virus. (ボルナ病ウイルス感染初代神経培養細胞はコルチコステロンおよびカイニン酸への反応性が変化する) 第 64 回日本ウイルス学会、2016.10.23-25 (札幌市)

#### 6. その他特記事項

##### 1) 学会活動

- ・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

##### 2) 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、ならびに合同会議参加
- ・鳥取大学・京都産業大学遠隔模擬講義(生理学)(鳥取大学、山野好章教授による「血糖調節と糖尿病」、2015.6.20)のコーディネーター
- ・平成 28 年度附属高校 2 年生接続授業 KSU サイエンス講座(生物)担当(2016.7.29)



卒業式 (2016 年 3 月 19 日)15 号館正面にて。

# 環境衛生学研究室

Laboratory of Environmental Hygiene

教授 前田 秋彦

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



## 1. 研究概要

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

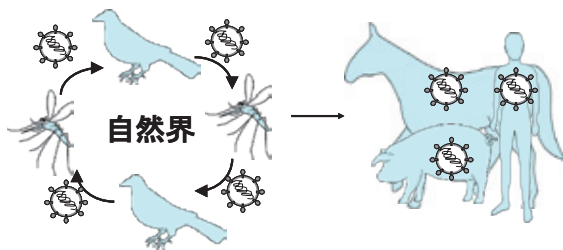


図 1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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。

## 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年に私たちの研究室において分離したトゴトウイルス（THOV） Kamigamo HL25 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 THOV 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を明らかにした。また、THOV の 5' および 3' 非翻訳領域の間にレポーター遺伝子をアンチセンスの方向性持つミニゲノム RNA 発現システムを確立した。

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

#### Annual reports

##### 1) Epidemiological study on mosquito- and tick-borne diseases in Kyoto city

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 H1-25 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. And also, we established the THOV Mini-genome RNA, which contains a reporter gene flanked by 5' and 3' non-coding region of THOV genome RNA.

#### 4. 論文, 著書など

- J. Kotoh, D. Sasaki, K. Matsumoto, A. Maeda: *Plekhs1* and *Prdx3* are candidate genes responsible for mild hyperglycemia associated with obesity in a new animal model of F344-*fa-nidd6* rat. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **78**, 1737-1740
- M. Yoshida, K. Hayashi, R. Watadani, Y. Okano, K. Tanimura, J. Kotoh, D. Sasaki, K. Matsumoto, A. Maeda: Royal jelly improves hyperglycemia in obese/diabetic KK-Ay mice. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **79**, 299-307

#### 5. 学会発表など

- 前田秋彦: 身近に潜む節足動物媒介性感染症. 第50回ペストコントロールフォーラム, 京都市, 2016.2.18
- 前田秋彦: 身近に潜む感染症－害獣・害虫駆除について. 土庄町・京都産業大学共同開催 公開講座, 香川県土庄町, 2016.6.12
- 前田秋彦: 蚊媒介性感染症の感染蚊の生態について. 蚊媒介感染症に係る市町村等実務者研修会(京都府), 京都市, 2016.7.12
- 佐々木創平, 脊戸優, 染谷梓, 好井健太郎, 前田秋彦: Vero E6細胞におけるトゴトウイルスの増殖機構. 第64回日本ウイルス学会, 札幌市, 2016.10.23-25

#### 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: トゴトウイルスの感染と病原性発現メカニズムに関する研究

研究代表者: 前田秋彦, 取得年度: H28-30年(3年)

##### 2) 学外活動

前田秋彦: 日本バイオセーフティー学会誌編集委員

前田秋彦: 日本脳炎ウイルス生態学研究会評議員



# 栄養衛生学研究室

Laboratory of nutrition-related hygiene

教授 村田 英雄

Prof. Hideo MURATA, PhD



## 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牛乳試料中の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) 牛乳試料を用いたメラミン簡易検出手法の開発

その手法の概要は以下のとおりである。

- ①検査牛乳1mlをマイクロチューブ(蓋付2ml用)に入れ、遠心(14,000rpm で 10 分間@22℃)後、乳清を採取する。
- ②その乳清に、等量のシアヌル酸飽和液を添加し、よく混和する。30分間室温で反応させる。時々攪拌する。
- ③混和液を遠心(2,800rpm で 10 分間@22℃)後、上清を除去、沈渣に 0.5%トリパンプルーを少量添加し、混和する。
- ④混和液を光学顕微鏡 x400 視野下で観察する。ノイバウエル血球計算板の 16(4x4)マス内で、特徴的なメラミンシアヌレート様顆粒(以下、顆粒)の存在とその数を計測する。

### 2) その成績の解釈

(i) この方法では 3ppm (mg/L) 程度のスクリーニング感度が期待できる(図1の黒丸枠内に顆粒が確認できる)。また、その顆粒数が 500 個未満なら、メラミン濃度/顆粒数の標準反応線(図2)を用いて、牛乳中のメラミンのおよその濃度が推定できる。

(ii) もし、1~数個以上の顆粒が存在する場合、市販最少量の牛乳パック(125~200ml)に含まれるメラミン量は体重 2~3kg の乳幼児の許容一日摂取量(TDI)以上に相当すると推定する。なお、メラミンの TDI は 0.2mg/kg 体重/日(WHO 2008)である。

(iii) もし、顆粒の存在が陰性の場合、その試料中のメラミン濃度を 3ppm 未満と推定する。その場合、成人(体重 60kg)がその牛乳を毎日 1L ずつ消費し続けても当分は影響ないものと推定できる。

### 3) 今回の開発手法の利点と留意点

(i) 本方法の実施の際には、専用機器や特別の施設は必要ない。しかし、目視に基づく顆粒状物質の真性/偽陽性の判別作業にはある程度の熟練が要る。また、3ppm 未満のメラミン混入は検出困難であった。

(ii) 本方法はあくまでも簡易法であり、検出感度も上げる必要がある。したがって、その確定と定量は公定法に委ねるべきである。

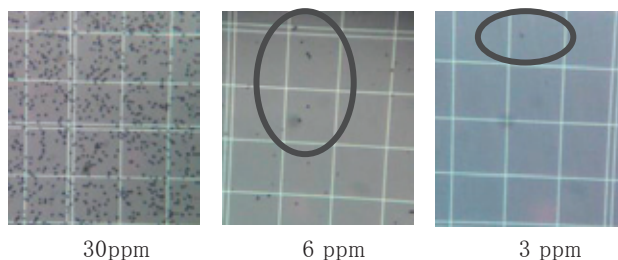
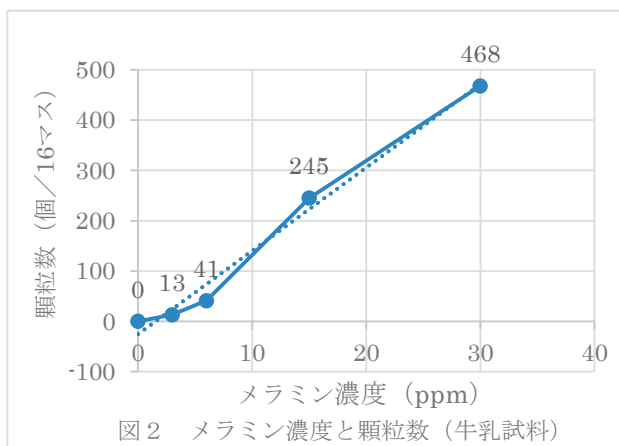


図 1 各メラミン濃度に調整した牛乳中の顆粒の分布状況

(荒美・山田 H28 卒業研究データを基に作成)



注:実線:平均実測値に基づく 点線:近似線  
(荒美・山田 H28 卒業研究データを基に作成)

### 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:*

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

2: *Development of a melamine screening method*

A tentative method to evaluate the presence of melamine in milk was proposed. The method seems to be able to detect the substance at concentrations as low as 3 ppm, by only using high-speed centrifuge and light microscopy. However, further improvement is required to make this test more stable, reliable and comparable to the authorized melamine detection methods.

### 4. 論文, 著書など

なし

### 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) 知財権等

なし

#### 3) 学外活動

農業資材審議会 臨時委員

獣医事審議会 専門委員

The Veterinary Journal 誌の Editorial Advisory 委員

京都動物愛護センター運営委員

#### 4) 受賞等

なし

#### 5) その他

特記することはなし

### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

該当せず



栄養衛生学研究室の構成員(2017年3月現在)

## 2016 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のもとで、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、飼育管理、取扱い、動物愛護・福祉、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。2016年度は、定期開催としては、春学期は4月6日に開催され、17名、秋学期は9月12日に開催され、133名の参加者がありました。なお、2016年度の臨時開催は、ありませんでした。

### 動物慰霊祭

本学では、毎年、本学動物実験委員会の主催のもと動物慰霊祭が執り行われています。2016年度は、2月8日に心光院村橋邦彦住職に来て頂き読経のもと、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**  
**研究トピックス**



研究トピックス(1): バイオフォーラムなどのセミナー開催状況

開催年月日	関係学科	講演者(所属先)	イベント名・講演タイトル(世話人、敬称略)
2016.01.22	動物生命医科	佐々木 宣哉 教授(北里大学獣医学部実験動物学研究室)	「腎臓病モデルマウスから学んだこと」(世話人: 前田 秋彦)
2016.01.22	生命資源環境		第41回植物バイオテクノロジーシンポジウム「これからの植物科学」 京都植物バイオテク談話会および本学京都産業大学生態進化発生学センターとの共催
2016.1.29	動物生命医科	野田 岳志 教授(京都大学ウイルス研究所)	バイオフォーラム「インフルエンザウイルスのゲノム転写機構」(世話人: 高桑 弘樹)
2016.3.1	生命システム	高橋 淑子 教授(京都大学大学院理学研究科)	バイオフォーラム「しっぽの発生生物学」(世話人: 永田 和宏)
2016.03.02	学部全体	講演 野村 哲郎教授(生命資源環境学科) 「生物資源としての和牛: 遺伝的多様性の意義と保全」 大澤 良氏(筑波大学 生命環境系 教授) 「作物の品種改良: 遺伝資源の多様性の恩恵を受ける」 井鷲 裕司氏(京都大学大学院 農学研究科 教授) 「全個体遺伝子型解析に基づく絶滅危惧植物の保全」 坂本 崇氏(東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 教授) 「養殖魚類における遺伝情報を活用した分子育種研究の現状と展望」	学部シンポジウム「最新遺伝学からせまる生物資源の利用と保全」 (生命資源環境企画運営)
2016.03.07	生命システム	後藤 聡 教授(立教大学 理学部 生命理学科)	バイオフォーラム「翻訳後修飾の新しいメカニズムと生理機能」(世話人: 浜 千尋)
2016.03.14	生命システム	岡島 徹也 教授 (名古屋大学大学院医学系研究科)	バイオフォーラム「Notch 受容体の上皮成長因子ドメインを修飾する特異的O-結合型糖鎖」(世話人: 黒坂 光)
2016.06.12	動物生命医科	前田 秋彦 教授	地方公開講座「身近に潜む感染症・害獣・害虫駆除について」開催(香川県土庄町)
2016.06.16	生命資源環境	源 利文 氏(神戸大学大学院人間発達環境学研究所 特命助教)	分子生態学セミナー/バイオフォーラム「環境中のDNAからさぐる水中の生物多様性」 (世話人: 高橋 純一)
2016.06.23	生命システム	Dr. Janine Kirstein (Leibniz-Institute of Molecular Pharmacology (FMP)(Germany))	生命科学セミナー「Identification of distinct chaperone complexes that can suppress Htt fibril formation and can disaggregate Htt fibrils in vivo and in vitro」 (世話人: 永田 和宏)
2016.06.29	生命システム	山田 吉彦 先生(NIDCR, NIH, Bethesda, MD, USA)	生命科学セミナー「歯原性上皮幹細胞の運命決定と分化誘導の制御因子の解明」
2016.07.06	生命システム	Steven W. L'Hernault, Professor and Chair (Department of Biology, Emory University)	バイオフォーラム「Looks Aren't Everything: What Nematode Sperm Are Teaching Us About Fertilization」(世話人: 佐藤 賢一)
2016.07.07	生命資源環境		国際シンポジウム「Frontiers in plant mitochondrial genome research」 (世話人: 寺地 徹)
2016.07.11	生命システム	竹市 雅俊 氏(理化学研究所 多細胞システム形成研究センター)	バイオフォーラム2016/第172回細胞生物学セミナー「細胞間接着分子の多機能性」 (世話人: 永田 和宏)
2016.07.13	動物生命医科	天谷 友彦 先生(大和高原動物診療所 所長)	バイオフォーラム「馬ってどんな動物なんだろう?」(世話人: 西野 佳以)
2016.08.31	生命システム	Prof. Agnieszka Chacinska (International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw)	生命科学セミナー「Oxidation of mitochondrial membrane proteins」 (世話人: 遠藤 斗志也)
2016.09.09	生命システム	第1部: Prof. Arnold J. M. Driessen (University of Groningen) 第2部: Prof. Ralf Erdmann (Ruhr-University Bochum)	バイオフォーラム 第1部「Single molecule imaging of the dynamics of the Sec translocase in living cells」 第2部「Protein Import into Peroxisomes」(世話人: 遠藤 斗志也)
2016.09.12	生命システム	Prof Dr. Jürgen Soll (Ludwig-Maximilians University Munich)	生命科学セミナー「Protein translocation in chloroplasts and mitochondria」
2016.09.28	生命システム	Dr. Claudio A. Hetz (University of Chile, Chile / Harvard School of Public Health, USA)	生命科学セミナー「HSP47: a novel regulator of the Unfolded Protein Response」 (世話人: 永田 和宏)
2016.10.07	生命システム	Dr. Filip Wymeersch (MRC Centre for Regenerative Medicine, The University of Edinburgh Scotland U.K.)	バイオフォーラム A transcriptionally Dynamic Population of Neuromesodermal and Lateral Mesoderm Progenitors coexists alongside a Stable Notochord Progenitor Pool
2016.10.23	動物生命医科		平成28年度 動物感謝デー in KYOTO 開催
2016.10.20	生命システム	Prof. Doron Rapaport (University of Tubingen)	生命科学セミナー 「Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins in evolutionary context」 (世話人: 遠藤 斗志也)
2016.11.28	生命システム	Prof. Thomas Langer (University of Cologne)	生命科学セミナー 「Mitochondrial phospholipid trafficking」(世話人: 遠藤 斗志也)

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
2	生命システム		脳神経で情報伝達物質が通過する隙間に構造物があることを総合生命科学部 浜 千尋教授や中山 実 助教らが突き止めた
2	生命システム	茶谷 悠平(京都産業大学 総合生命科学部 博士研究員) 現・東京工業大学 大学院生命理工学研究科 博士研究員) 丹羽 達也(東京工業大学 大学院生命理工学研究科 助教) 千葉 志信(京都産業大学 総合生命科学部 准教授) 田口 英樹(東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授) 伊藤 維昭(京都産業大学 シニアリサーチフェロー)	タンパク質合成過程における「緩急のリズム」を実証 -大腸菌遺伝子産物の中間状態を網羅的に解析- 本研究成果はProceedings of the National Academy of Sciences of USA(米国科学アカデミー紀要)のオンライン版にて2016年2月1日公表されました。 標題「Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing」(生細胞と無細胞反応系を統合した新生鎖観察により明らかとなった翻訳一時停止の一般性)
2	生命資源環境		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 野村 教授らが講演
3	学部全体		生命科学研究科修士課程 1期生21名の学位記交付が行われました！！
3	生命資源環境		高橋 稜一さん(生命科学研究科・修士課程1年)が日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会で学生ポスター賞を受賞
4	生命システム		国内私立大学1位タイ！2015年「ネイチャー・サイエンス」論文掲載数
5	生命システム		総合生命科学部 遠藤 斗志也 教授が文部科学大臣表彰「科学技術賞」を受賞
5	学部全体		平成28年度 総合生命科学部奨励金授与式を挙りました
6	動物生命医科		香川県土庄町で公開講座、中学校での実験体験を実施
6	生命システム		読売新聞掲載 総合生命科学部のフレッシュャーズセミナーで、佐藤 賢一 教授の担当する質問づくりのグループワーク「ハテナソ」の様子が掲載
8	生命資源環境		神原 育穂さん(総合生命科・4年次)が第43回京都府はちみつ品評会で第2位(京都府議会議長賞)を受賞
9	生命システム		総合生命科学部 横山 謙 教授と生命科学研究科 馬場 みほりさんらの研究グループがタンパク質の新たな仕組みを発見
10	生命システム		総合生命科学部 永田和宏教授と潮田亮研究助教らのグループが、ジスルフィド還元酵素ERdj5がSERCA2bのジスルフィド結合を還元することを解明
10	動物生命医科		浅井 皓平さん(総合生命科・3年次)が理化学研究所主催「大学生のための生命科学研究インターンシップ」に参加
10	生命システム 生命資源環境		高エネルギー加速器研究機構、放射光科学研究施設の発行する『Photon Factory Highlight 2015』に総合生命科学部の2つの研究成果が掲載 掲載論文 Crystal structures of the Upl1-Mdm35 complex Reveal the Mechanism of Phospholipid Transfer in Mitochondria Y. Watanabe and T. Endo (Kyoto Sangyo Univ) Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme A. Toda, T. Tsurumura, T. Yoshida, Y. Tsumori and H. Tsuge (Kyoto Sangyo Univ)
10	生命資源環境		総合生命科学部 寺地 徹 教授が平成28年度「科研費」審査委員表彰者に選出

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

10	大学全体		京都産業大学 タンパク質動態研究所 開設記念シンポジウム「タンパク質のゆりかごから墓場まで」開催
10	生命システム		鳥取県倉吉市で公開講座を開催 「ことばのカー歌で想いを伝えたい」永田 和宏客員教授
10	生命システム		「第5回～家族を歌う～河野裕子短歌賞」選者として総合生命科学部 永田 和宏 教授が参加
10	生命システム		京都産業大学「タンパク質動態研究所」開設記念シンポジウムに“七人の侍”が集結
10	生命資源環境		植物ゲノム科学研究センター 辻村(塚谷)真衣研究員が野生オオムギと栽培オオムギのミトコンドリアゲノムを初めて解読
11	生命資源環境		京都植物バイオテク談話会および京都産業大学生態進化発生学研究センターとの共催で第45回植物バイオテクシンポジウム「Plant Development and Environment」開催
11	生命システム		総合生命科学部 板野 直樹教授らの国際共同研究チームが、乳がん幹細胞抑制の鍵を握る糖代謝リプログラミングの機構を解明
12	生命システム		5紙掲載 ノーベル賞授賞式にタンパク質動態研究所長 永田 和宏教授と吉田 賢右シニアリサーチフェローが出席
12	生命システム		堤 智香さん(生命科学研究科 博士前期課程・1年次)が第39回日本分子生物学会年会で優秀ポスター賞を受賞

## 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） 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7号 2016（平成28年）

発行日 2017（平成29）年10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/>