

ISSN 2186-5507

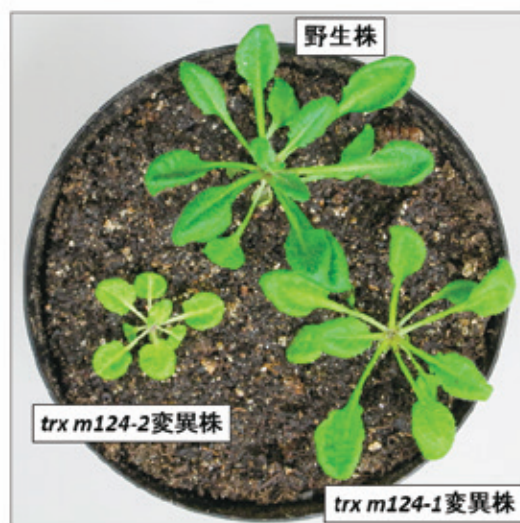
京都産業大学総合生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences
Kyoto Sangyo University



《第9号》

2018
平成30年



【 *Arabidopsis thaliana* の *m*型チオレドキシシン欠損変異株 】

植物の光合成による二酸化炭素固定は、カルビンサイクル酵素によって行われます。チオレドキシシンというタンパク質は、二酸化炭素固定を担うカルビンサイクル酵素を活性化する役割を持ちます。チオレドキシシンの生理機能を解析すると、遺伝学的に *m*型チオレドキシシンの蓄積量を減らすと、その蓄積量にしたがい植物の成長阻害が観察されました。 *m*型以外でのチオレドキシシン変異体ではこのような表現型は観察されません。このことから、植物の光合成に依存した生育に、 *m*型チオレドキシシンが重要な役割を担っていることがわかりました。

目次

巻頭言	1	
教員研究室一覧・事務室スタッフ名簿・全学委員会等名簿	2	
2018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(副学科主任)	13
川根公樹	准教授	19
黒坂光	教授	21
近藤寿人	客員教授	23
佐藤賢一	教授	27
瀬尾美鈴	教授	31
千葉志信	准教授	34
中田博	教授	38
永田和宏	教授	43
中村暢宏	教授(学科主任)	50
浜千尋	教授(副学部長)	53
三嶋雄一郎	准教授	56
横山謙	教授	58
生命資源環境学科	生命資源環境学科の教育研究活動	63
金子貴一	教授	67
河邊昭	准教授	69
木村成介	教授	72
高橋純一	准教授	78
津下英明	教授	83
寺地徹	教授(学部長)	86
野村哲郎	教授(副学科主任)	90
本橋健	教授(学科主任)	93
山岸博	教授	96
動物生命医科学科	動物生命医科学科の教育研究活動	99
加藤啓子	教授	103
齋藤敏之	教授(学科主任)	106
白鳥秀卓	教授	109
染谷梓	准教授	111
高桑弘樹	教授	113
竹内実	教授	115
棚橋靖行	准教授	118
西野佳以	准教授	121
前田秋彦	教授(副学科主任)	124
2018年 動物実験教育訓練および動物慰霊祭		126
2018年 総合生命科学部 研究トピックス		127

巻頭言

生命科学部長

寺地 徹

5月に年号が平成から令和にかわり、なんとなく新しい気分が漂っている日本ですが、我々京都産業大学の総合生命科学も改組を終え、この4月から生命科学部として新たな活動を開始したところです。遅くなりましたが、ここに平成30年度の総合生命科部年報(第9号)をお届けいたします。

総合生命科学部では、初代学部長を務められた永田和宏教授を筆頭に「よりよい教育はよりよい研究から」を目標として、教員は教育の基礎となる生命科学の研究に真摯に取り組んで参りました。その成果は歴代の年報で広くお示ししたとおりです。新しい生命科学部でもこの学部目標を継承し、生命科学の研究をさらに推し進めていくことに疑問の余地はありませんが、新学部では二代目学部長の黒坂光教授の高邁な志を反映し、質の高い生命科学教育を行うことを謳っています。現在、教育カリキュラムの改革に、教職員一同、鋭意取り組んでいるところです。

この年報は、総合生命科学部で行われた一年間の教育研究活動の総決算として、その内容を詳らかにし、意義を広く社会へ問うものです。読んでみると、他の研究室では今年はどうな発見があったのだろうか、かねて注目していた研究はいったいどのように進展したのだろうかなど、知的好奇心が刺激されます。一方、自身の研究室の成果をまとめるときには、この研究の公表を急がなくてはとか、あるときこんな実験をやっておけば良かったなど、一年間の研究活動を真摯に内省する良い機会ともなります。高浜虚子の俳句に「去年今年貫く棒の如きもの」というのがあります。今まさに、総合生命科学部から生命科学部へ移行するとき。それぞれの教員によって捉え方は違うでしょうが、この棒の如きものは何であろうか、私自身も、今一度考えてみたいと思います。

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
生命システム学科		教授	板野 直樹		泉川 友美	小林 孝		
	副学科主任	教授	遠藤 斗志也		河野 慎	阪上 春花 松本 俊介 荒磯 裕平 丹羽 一 齊藤 知加	元島 史尋 鈴木 俊治 須賀 比奈子 久夫 康紀 渡邊 依里 植田 柚木	足立 織生
		准教授	川根 公樹				村田 真智子	
		教授	黒坂 光		中村 直介			
		客員教授	近藤 寿人		寺元 万智子		飯田 英明	
		教授	佐藤 賢一		Tokmakov Alexander Alexandrovich			井尻 貴之 横山 朋子
		教授	瀬尾 美鈴				清水 昭男 上野 信洋 吉田 亜佑美 (5月から)	
		准教授	千葉 志信		藤原 圭吾		千葉 直美 天野 佐織	茶谷 悠平
		教授	中田 博	森 勇伍	山下 智子			河野 正孝
		客員教授	永田 和宏		潮田 亮		石田 玉美 森戸 大介 (6月より客員研究員) 伊藤 進也 福田 泰子	
	学科主任	教授	中村 暢宏				PANDEY Himani	
	副学部長	教授	浜 千尋					
		准教授	三嶋 雄一郎				若林 貴美	
		教授	横山 謙		岸川 淳一		中西 温子	
生命資源環境学科		教授	金子 貴一				板倉 学	
		准教授	河邊 昭		川邊 隆大 (3月まで) 吉田 貴徳 (4月から)		吉田 初佳	
		教授	木村 成介		坂本 智昭		池松 朱夏 川勝 弥一 (4月から9月まで) 上ノ山 華織 (4月から)	Gholamreza Gohari (7月から9月まで)
		准教授	高橋 純一				奥山 永	稲元 哲朗 藤本 卓矢 中野 江一郎
		教授	津下 英明		吉田 徹		藪田 淑予	嶋本 伸雄 入倉 大祐 中山 秀喜
	学部長	教授	寺地 徹				高橋 亮 (6月まで) 塚谷 真衣 植村 香織 永島 伊都子	
	副学科主任	教授	野村 哲郎					上西 美緒
	学科主任	教授	本橋 健		桶川 友季		佐藤 望	
	教授	山岸 博				橋本 絢子		
動物生命医科学科		教授	加藤 啓子		藤田 明子			北村 元隆 渡邊 裕子
	学科主任	教授	齋藤 敏之					矢田 桃子
		教授	白鳥 秀卓					
		准教授	染谷 梓					浜田 絢也 (8月から) 山崎 剛士 (8月から)
		教授	高桑 弘樹					仲井 まなみ (8月から)
		教授	竹内 実					石田 喬裕 Ozumba Benjamin Chukwuma
		准教授	棚橋 靖行					
		准教授	西野 佳以					
副学科主任	教授	前田 秋彦					松本 耕三 好井 健太郎 本谷 匠 後藤 慶子 奥村 昌美 (8月から) 川崎 成人 (8月から) 木澤 正人 (8月から)	

スタッフ等名簿	
大学院生	その他
西垣 大樹 (M1) CHOKCHAITAWEEESUK Chatchadawalai (D3)	
阪田 孝大 (M2)	竹田 弘法 (学振 PD)
服部 和泉 (M1) 吉良 彰人 (M2)	
山口 裕樹 (M1) 内倉 唯 (M2) 関 宗治 (M2)	
稲森 祥子 (M2)	
荒井 華葉香 (M2)	
	PALASHIKAR Gargi Mahesh (外国人特別生・M1) RAYMOND Abbott (交換留学生)
樫 祐太郎 (M1) 桑折 悠 (M1) 塩田 成未 (M1) 向川 結紀子 (M1)	
押谷 麻里 (M1) 矢寺 夕貴 (M1) ALZAAQI Shouq Mohammed A (M2) 岩本 駿吾 (M2) 尾島 和樹 (M2)	井上 拓也 (委託生)
阿部 真由子 (M1) 山下 龍志 (M2) 亀井 亮太 (M1) 堤 智香 (D1) 會退 詩央莉 (M2) 上垣 日育 (D2) 葛西 綾乃 (M2) 藤井 唱平 (D2)	
SHAIK Shaheena (D2)	THIRUMALASETTI Satish Kumar (外国人特別生)
古田 綾 (M1) 三谷 奈穂 (M1) 林田 優希 (M2)	
蒲生 雄大 (M1)	
馬瀬 樹志 (M1) 天野 瑠美 (D3)	
近野 真央 (M1) 新村 友理 (M2)	
半田 達也 (M1) 山田 等仁 (M1)	
山下 健太 (M1) 児島 和志 (M2)	
佐々木 琢馬 (M1)	
児玉 慧太 (M2)	
利川 泰博 (M1) 青木 仁星 (M1) 太田 真菜美 (M2) 奥野 貴哉 (M2) TANGSUDJAI Siriporn (D4)	
武内 莉夏 (M1) 橋本 唯 (M1)	
上口 恭平 (M1) 内村 尚哉 (M1) 山澤 彩奈 (M2)	
濱田 沙希 (M1) 平野 由貴 (M1) 宇野 真由奈 (M2)	
藤川 咲 (M1)	
立花 蓮 (M1) 窪田 裕樹 (M2)	
辻本 絢香 (M1) 中塚 聖菜 (M1) 村岡 綾 (M1)	

総合生命科学部事務室スタッフ名簿

役職名等	氏名
教学センター 総合生命科学部事務長	井上 朋広
教学センター 事務長補佐 (総合生命科学部事務室) (9月まで)	淵 三佐子
教学センター 事務長補佐 (総合生命科学部事務室) (10月から)	前田 好直
教学センター 課員 (総合生命科学部事務室) (5月まで)	岡田 賢
教学センター 課員 (総合生命科学部事務室) (6月から)	林 大介
教学センター 課員 (総合生命科学部事務室)	木津 夏月美
教学センター 契約職員 (総合生命科学部事務室)	角 理恵子
教学センター 契約職員 (総合生命科学部事務室)	石野 都
教学センター 契約職員 (総合生命科学部事務室) (4月から)	有麻 智絵
教学センター 契約職員 (総合生命科学部事務室) (11月まで)	石井 典子
教学センター 嘱託職員 (化学物質等管理業務担当)	川原 瑞穂
教学センター 嘱託職員 (日本科学未来館・実験室事務補助)	伊藤 君枝
教学センター 特定職員 (RI 管理業務担当)	碓山 菜々子
教学センター 特定職員 (総合生命科学部事務室) (12月から)	橋本 晶子
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員) (3月まで)	早瀬 麻耶
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員)	渡邊 晴代
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員)	古賀 由希恵
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員)	内海 陽子
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員) (4月から)	吉岡 倫世
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員)	森見 友貴
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員)	村木 直子
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員) (3月まで)	上ノ山 華織
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員)	福永 明日美
教学センター 嘱託職員 (実験補助委員) (4月から)	佐野 暁 遥香

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	中田 博
省エネルギー推進委員会	山岸 博
自己点検・評価運営委員会 (総合生命科学部)	金子 貴一
自己点検・評価運営委員会 (生命科学・工学研究科)	板野 直樹
ダイバーシティ推進委員会	瀬尾 美鈴
学部 FD/SD 推進ワーキンググループ (総合生命科学部)	浜 千尋
大学院 FD/SD 推進ワーキンググループ (生命科学・工学研究科)	浜 千尋
教務委員会	川根 公樹
障害学生支援委員会	川根 公樹
大学院委員会 (工学研究科・生命科学研究科)	遠藤 斗志也
学生部委員会 (兼・奨学生選考委員会)	竹内 実
学生寮教育スタッフ	高桑 弘樹
入学試験委員会	河邊 昭
入試制度検討委員会	河邊 昭
進路・就職支援センター運営委員会	加藤 啓子 千葉 志信
図書館委員会	染谷 梓
学術リポジトリ運営委員会	染谷 梓
国際交流推進委員会	棚橋 靖行
情報基盤運営委員会	三嶋 雄一郎
ネットワークセキュリティ所属管理責任者 (ネットワークセキュリティ委員会)	三嶋 雄一郎
人権センター運営委員会	西野 佳以
人権委員会	高橋 純一
窓口相談員	西野 佳以
論集編集系列委員会	前田 秋彦
社会連携推進委員会	横山 謙
初年次教育センター運営委員会	浜 千尋
人間科学教育カリキュラム部会	浜 千尋
教職課程教育センター運営委員会	白鳥 秀卓 木村 成介
教育支援研究開発センター運営委員会	浜 千尋
GSC ワーキンググループ	棚橋 靖行

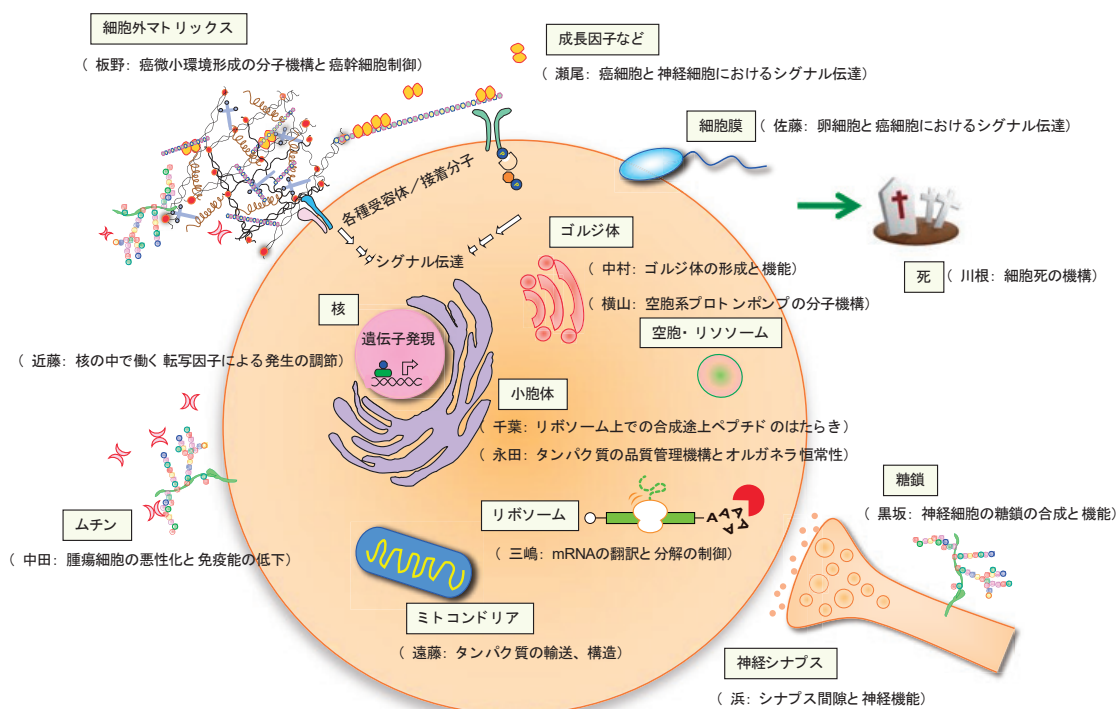
生命システム学科

生命システム学科

【研究】

2018年4月より、東京大学分子細胞生物学研究所から三嶋雄一郎准教授を迎え、母性 mRNA の安定性に関する新たな研究が進められた。一方、初期胚および幹細胞からの発生過程における転写調節の研究で日本の発生生物学を牽引してこられた近藤寿人教授が2019年3月をもって退官される。本年度の生命システム学科は、教授11名、准教授3名の計14名の専任教員を中心とした活動により運営された。

本学科の研究の特色は、細胞・組織・個体のそれぞれを生命システムとして捉え、そのシステムの中における特定の分子の振舞いを解析することによりシステムの理解を目指していることである。各教員の研究テーマは、下図に示すように多岐にわたる。プロトンポンプの構造解析、母性 mRNA の安定性制御、転写因子による発生調節、リボソームにおける翻訳アレスト、タンパク質の品質管理、ミトコンドリアにおける輸送制御、ゴルジ体形成調節、糖鎖合成酵素の発生における機能、表皮からの細胞脱落と細胞死、ヒアルロン酸合成と癌増殖、血管形成、卵形成、受精、癌増殖におけるシグナル伝達、膜タンパク質による腫瘍悪性化制御、シナプス間隙タンパク質と脳機能、などであり、細菌、培養細胞、動物(線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス)を用いて実験が進められた。これらの研究の成果は、J. Cell Biol., Nat. Commun., PNAS 誌を含む 36 報の国際誌に公表されている。



【教育】

専任教員が担当する授業科目を下表に示す。例年のように、本学部の特色である少人数教育を、1年次のフレッシュャーズセミナー、3年次の基礎特別研究、4年次の応用特別研究で実践した。また、数年前に、基礎科目の重視と科目間の連携に重点を置いてカリキュラムを再編したが、そのカリキュラムの中で年次進行的に基礎から専門科目への段階的内容を持った教育を行った。学部FDの一環として、公開授業を毎年行っているが、本年度は、本学科から2名の教員が授業を公開した。春学期には、佐藤賢一教授が「腫瘍細胞生物学」で学習の基礎となる質問作りを進める質問駆動型授業を行い、また秋学期には川根公樹准教授が「生命科学演習 I」で学習への意欲を引き出す対戦型グループ学習を行った。いずれもアクティブ型学習における新しい試みであった。

本年度も、大学院への進学を推奨する一方で、進路・就職支援センターと連携して就職支援を活発に行った。2017年度の本学科卒業生の内、本学生命科学研究科への入学者は13名であった。

科目名	配当学年	担当教員
フレッシュャーズセミナー	1	板野、遠藤、川根、黒坂、近藤、佐藤、瀬尾、千葉、中田、永田、中村、浜、三嶋、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、三嶋
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	黒坂、浜
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)
生命科学演習 I、II、III、IV、V	1, 2	板野、川根、黒坂、千葉、中村、三嶋、横山
生命システム英語講読 I、II、III	2, 3	遠藤、近藤、佐藤、瀬尾、千葉、中田、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、浜、三嶋、横山
Modern Life Sciences in Our Life	3	遠藤、近藤
基礎特別研究	3	板野、遠藤、川根、黒坂、佐藤、瀬尾、千葉、中田、中村、永田、浜、三嶋、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、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、 β -1,3と β -1,4結合で交互に連結した2糖ユニットの繰り返し構造からなる高分子多糖であり、特に結合組織の細胞外マトリックス成分として広く存在している。細胞はこのマトリックスにヒアルロン酸受容体を介して接着し、細胞内情報伝達系を活性化して細胞増殖や移動の調節に働く(図1)。私達は、世界に先駆けて、動物のヒアルロン酸合成酵素を見出し、ヒアルロン酸合成機構の解明に取り組んできた。そして、合成酵素遺伝子組換えタンパク質を用いた試験管内ヒアルロン酸合成システムの開発に成功し、酵素を活性化する化合物の探索を始めている。今後、ヒアルロン酸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、細胞内代謝が変化すると考えられる。本研究において我々は、メタボロミクス技術を駆使して、ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞における代謝の変化について研究した。定量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において、解糖系とペントースリン酸経路への代謝のシフトが観察された(図1)。ペントースリン酸経路の亢進に伴い、NADPH/NADP比や還元型グルタチオンレベルが上昇した。このことは、ヒアルロン酸過剰産生細胞が高い酸化ストレス耐性をもつことを示唆している。ヒアルロン酸産生と酸化ストレス耐性との関係を更に解明するため、過酸化水素処理後のアポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリ解析により測定した。ヒアルロン酸過剰産生細胞は、対照細胞に比べて高い酸化ストレス耐性を示した。我々はさらに、安定同位体と質量分析によりヒアルロン酸過剰産生細胞における代謝プログラミングについて検討し、ヘキサミン合成経路(HBP)の代謝流束が著しく加速していることを明らかにした(図2)。ヘキサミン合成経路の律速酵素であるGFAT1を強発現すると、ヒアルロン酸過剰産生と同様に代謝プログラミングと酸化ストレス耐性が認められた。一方、GFAT1の発現をノックダウン法により抑制すると、ヒアルロン酸誘導性の代謝シフトが阻止され、過酸化水素によるアポトーシス細胞の割合が増

加した。抗がん剤であるシスプラチンの作用は、酸化ストレスによるアポトーシスの誘導を伴う。そこで、シスプラチン処理後のアポトーシス細胞の割合を、ヒアルロン酸過剰産生および対照癌細胞において比較した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生細胞が高濃度のシスプラチンに対する耐性を獲得していることを見出した。以上の結果は、ヒアルロン酸産生が、酸化ストレスと抗がん剤に対する耐性の制御に働くことを示唆している。

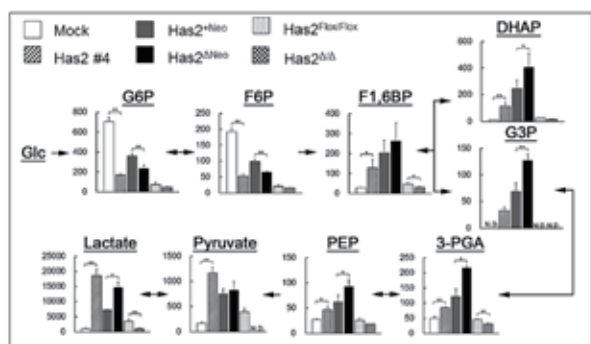


Figure 1. Metabolomic analysis of glycolytic intermediates in Has2-overexpressing and -deficient breast cancer cells. Control mock (open bars) and Has2^{+Neo} (gray bars); Has2-overexpressing Has2 #4 (striped bars) and Has2^{ΔNeo} (black bars); Control Has2^{Fllox/Fllox} (dotted bars) and Has2-deficient Has2^{Δ/Δ} (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 cellular metabolism. In this study, a metabolomics strategy was adopted to comprehensively investigate the metabolic features of

HA-overproducing CSC-like cells. A metabolic shift toward glycolysis and pentose phosphate pathway (PPP) was evident by quantitative targeted metabolomics (Fig. 1). In accordance with the enhancement of PPP, the ratio of NADPH to NADP, and reduced glutathione (GSH) levels were significantly increased in HA overproducing cells, suggesting higher oxidative stress resistance. To further elucidate the relationship between HA production and oxidative stress resistance, the ratios of apoptotic cells following exposure to hydrogen peroxide were measured by flow cytometry analysis. HA overproducing cells represented higher oxidative stress resistance than control cells. We further elucidated the metabolic reprogramming in HA-overproducing cells by stable isotope-assisted tracing and mass spectrometry profiling. These integrated approaches disclosed an acceleration of metabolic flux in the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) (Fig. 2). Forced expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 (GFAT1), an HBP rate-limiting enzyme, resembled the results of HA overproduction with regard to metabolic reprogramming and oxidative stress resistance, whereas GFAT1 inhibition abrogated HA-driven metabolic shift and increased hydrogen peroxide-induced apoptosis in HA-overproducing cells. The action of cisplatin, an anticancer drug, involves the induction of apoptosis by oxidative stress. Therefore, the rates of apoptotic cells after cisplatin treatment were compared in HA overproducing and control cancer cells. We found that HA overproducing cells acquire resistance to high concentrations of cisplatin. Taken together, our results suggest that HA production regulates resistance of CSCs to oxidative stress and anti-cancer drugs.

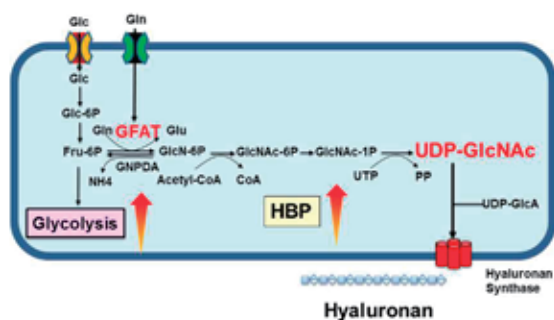


Figure 2. HA biosynthesis and HBP

4. 論文, 著書など

Itano, N. Implications of altered *O*-glycosylation in tumour immune evasion. *J. Biochem.* **165**(5): 387-390.

Izumikawa, T., Itano, N.

Metabolic Reprogramming and Hyaluronan Production in Cancer Stem Cells. *Trends in Glycosci. Glycotechnol.* **30** (176): E147-E154.

黒岩隆史, 泉川友美, 板野直樹 乳がん細胞における酸化ストレス耐性の分子機構 *京都産業大学総合学術研究所所報* **13**, 103-110.

5. 学会発表など

Naoki Itano Role of Hyaluronan in Metabolic Reprogramming of Cancer Stem Cells Gordon Research Conference (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:ヘキサミンシグナル伝達経路を標的とした薬剤耐性スペクトルの狭小化とがん創薬

研究代表者:板野直樹, 取得年度:H30-32年(3年)

科学研究費補助金・若手研究 B

課題名:ヘキサミン合成経路異常亢進による酸化ストレス耐性を介したがん幹細胞化機構の解明

研究代表者:泉川友美, 取得年度:H29-30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委員

日本がん転移学会評議委員

プロテオグリカンフォーラム世話人

ISHAS (International Society for Hyaluronan Sciences) Trustee

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

本制度により配置されている泉川研究助教は、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、担当教員と協力して学生の実験指導を行った。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において、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。泉川研究助教の適切な指導により、学生の専門知識や技術の向上が図られ、研究意欲がより一層高まるなど、良い効果が現れている。教育活動と並行して、研究活動にも精力的に取り組み、酸化ストレス耐性を介したがん幹細胞化の機構に新たな知見が得られており、研究内容に関連した総説も発表している。

このように泉川研究助教は、教育・研究活動を通じて学部や大学院における教育研究の充実に大きな貢献を果たしている。



研究室メンバー

生物化学研究室

Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤斗志也

Prof. Toshiya Endo, Ph. D.

助教 河野慎

Assist. Prof. Shin Kawano, Ph. D.



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) ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体の動的アセンブリーの意義の解明

ミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体は 1000 種におよぶミトコンドリアタンパク質のほとんどのミトコンドリア内への移行の搬入口として機能する。一方ミトコンドリア外膜のポリンは小分子の代謝物質やイオンのミトコンドリア内外の出入りを担う。われわれは、TOM 複合体は「孔」と

して機能する Tom40 3 分子が Tom22 によって糊付けされた 3 量体をつくるが、その一部は Tom22 がはずれて Tom40 が 2 分子の 2 量体に変換することを見出していた。今回、3 量体からはずれた Tom22 にミトコンドリアのポリンが結合すること、すなわちポリンは TOM 複合体 3 量体から一時的にはずれた Tom22 に結合することで、TOM 複合体 3 量体 (Tom22 を含む) から TOM 複合体 2 量体 (Tom22 を含まない) への変換を促進する働きがあることが分かった。それでは TOM 複合体の 3 量体と 2 量体の存在意義は何なのか？今回われわれは、ミトコンドリアタンパク質の多くは 3 量体の TOM 複合体を使ってミトコンドリア内に入るが、膜間部の可溶性タンパク質 (TIM40/MIA 経路により輸送される基質) は 2 量体の TOM 複合体を使ってミトコンドリア内に入ることを新たに見出した。すなわち、ミトコンドリアタンパク質の搬入口 TOM 複合体は、その組成を 3 量体と 2 量体で変えることで、1000 種類に及ぶさまざまなミトコンドリアタンパク質を、効率よく取り込めるようになっていていると考えられる。

ポリンとは逆に、TOM 複合体のサブユニットの 1 つである Tom6 は 2 量体から 3 量体への変換を促進するが、この変換が細胞周期に依存することも明らかになった。すなわち、Tom6 は細胞周期依存的にリン酸化されるが、このリン酸化が 2 量体と 3 量体の安定性を変えていることがわかった。細胞周期に依存して、ミトコンドリアが必要とするタンパク質の種類が異なり、そうしたタンパク質の種類の変化にうまく対応できるよう、2 量体と 3 量体の量比が微調整されているのかもしれない。

2) エントロピーが駆動する新たなミトコンドリアタンパク質輸送機構の発見

正常機能のミトコンドリアを維持するためには、ミトコンドリア内膜のクリステ構造の形成と維持が重要である。クリステ構造の特にジャンクションと呼ばれる部分を作るのに必要な MICOS 複合体の構成因子はサイトゾルで合成され、ミトコンドリア内に移行する。われわれは、酵母の MICOS 複合体を構成する 6 種の因子のうち、Mic19 に、しっかりした

立体構造をとらない長い領域があると、MIA 経路による膜間部への輸送が阻害され、その解除には Mic19 のミリストイル化が必要であることを見いだした。また Mic19 がミリストイル化されると、ミトコンドリアの外膜や、外膜の膜透過装置 TOM 複合体の受容体 Tom20 への結合が促進されることもわかった。立体構造をとらない長い領域があると、Mic19 はミトコンドリアの外でのエントロピーが特に高く、そのままでは、TOM 複合体の狭い孔には入りにくくなる（孔に入るとエントロピーが大きく減少する）。しかし、Mic19 をミトコンドリアの外膜や Tom20 に結合させると、ミトコンドリアの外で自由に動き回れる空間が小さくなる、つまりはエントロピーが下がることで、孔に入るときのエントロピー減少が少なくなり、TOM 複合体への輸送がスムーズに行われるようになる。こうしたエントロピーにより駆動される輸送はこれまで想定されていなかったが、N-ミリストイル化は哺乳動物のミトコンドリアタンパク質などで見いだされており、こうしたメカニズムが単に Mic19 のみに見られるのではなく、一般的な輸送の仕組みとして働くことが考えられる。

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.

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and are transported to mitochondria by dedicated import systems. The TOM complex in the outer membrane (OM) functions as a protein entry gate through which over 90% of the mitochondrial proteome is imported. The TOM complex consists of the channel-forming β -barrel protein Tom40, and six α -helical membrane proteins. Structural analyses of the TOM complex by site-specific photocrosslinking revealed that the TOM complex exists in two distinct forms, a three-channel form (the “trimer”) and two-channel form (the “dimer”).

Here we discovered that Por1 sequesters the Tom22 molecule that is dissociated from the

trimeric TOM complex upon its conversion to the dimeric complex. Por1 is a yeast voltage-dependent anion channel (VDAC) and mediates transport of small molecules and ions across the OM. Absence of Por1 shifts the equilibrium of the TOM complex towards the trimeric form and accelerates the assembly of newly imported Tom22 into the mature trimeric TOM complex. Tom6 is known to stabilize the trimeric TOM complex; the absence of Tom6 shifts the equilibrium of the TOM complex towards the dimeric form. What is the role of the minor population of the dimeric TOM complex lacking Tom22? We observed that minimizing the proportion of the dimeric TOM complex by Por1 depletion selectively slowed the import of soluble intermembrane-space proteins that use the TIM40/MIA pathway. This suggests that the dimeric TOM complex facilitates import of soluble proteins into the intermembrane space.

The MICOS complex mediates formation of the crista junctions in mitochondria, which is essential for mitochondrial respiration. Here we analyzed the mitochondrial import pathways for the six yeast MICOS subunits as a step toward understanding of the assembly mechanisms of the MICOS complex. Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, and Mic60 used the presequence pathway to reach the intermembrane space (IMS). In contrast, Mic19 took the TIM40/MIA pathway, through its CHCH domain, to reach the IMS. Unlike canonical TIM40/MIA substrates, presence of the N-terminal unfolded DUF domain impaired the import efficiency of Mic19, yet N-terminal myristoylation of Mic19 circumvented this effect. The myristoyl group of Mic19 binds to Tom20 of the TOM complex as well as the outer membrane, which may lead to “entropy pushing” of the DUF domain followed by the CHCH domain of Mic19 into the import channel, thereby achieving efficient import.

4. 論文、著書など(2018.1~2018.12)

H. Sakaue and T. Endo, Regulation of the protein entry gate assembly by mitochondrial porin. *Curr Genet.* in press.

- T.K. Sato, S. Kawano, and T. Endo, Role of the membrane potential in mitochondrial protein unfolding and import. *Sci Rep.* in press.
- Y. Tamura, R. Kojima, and T. Endo, Advanced *in vitro* assay system to measure phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine transport at ER/mitochondria interface. *Methods Mol Biol.* in press.
- H. Sakaue, T. Shiota, N. Ishizaka, S. Kawano, Y. Tamura, K.S. Tan, K. Imai, C. Moton, T. Hirokawa, K. Taki, N. Miyata, O. Kuge, T. Lithgow, and T. Endo, Porin associates with Tom22 to regulate the mitochondrial protein gate assembly. *Mol Cell.* in press.
- E. Ueda, Y. Tamura, H. Sakaue, S. Kawano, C. Kakuta, S. Matsumoto, and T. Endo, Myristoyl group-aided protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Sci Rep.* in press.
- R. Kojima, Y. Kakimoto, S. Furuta, K. Itoh, H. Sesaki, T. Endo, and Y. Tamura, Maintenance of cardiolipin and crista structure requires cooperative functions of mitochondrial dynamics and phospholipid transport. *Cell Rep.* in press.
- Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo, Organelle contact zones as sites for lipid transfer. *J. Biochem.* in press.
- K. Sawasato, R. Sato, H. Nishikawa, N. Iimura, Y. Kamemoto, K. Fujikawa, T. Yamaguchi, Y. Kuruma, Y. Tamura, T. Endo, T. Ueda, K. Shimamoto, and K.I. Nishiyama, CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase essential for membrane protein integration *in vivo*. *Sci Rep.* in press.
- T. Jores, J. Lawatscheck, V. Beke, M. Franz-Wachtel, K. Yunoki, J.C. Fitzgerald, B. Macek, T. Endo, H. Kalbacher, J. Buchner, D. Rapaport, Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. *J Cell Biol.* 217, 3091-3109 (2018).
- T. Endo, Y. Tamura, and S. Kawano, Phospholipid transfer by ERMES components (Editorial). *Aging*, 10, 528-529 (2018).
- Y. Kakimoto, S. Tashiro, R. Kojima, Y. Morozumi, T. Endo, and Y. Tamura, Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci. Rep.* 8, 6175 (2018).
- T. Endo, Y. Tamura, Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J.* 37, 98993 (2018).
- 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, ミトコンドリアと小胞体間のオルガネラコンタクト, 生体の科学 69, 577-580 (2018)
- 河野慎, 遠藤斗志也, (最新のトピックス) 膜間コンタクトサイトで働く脂質輸送タンパク質: SMPドメインと START(-like)ドメイン, 化学 73, 66-67 (2018)
- 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, ミトコンドリアと小胞体のクロストーク, 月刊細胞 50, No.8, 412-415 (2018)
- 八木達彦, 遠藤斗志也, 神田大輔, 「化学の要点シリーズ 25: 生化学の論理, 物理化学の視点」 共立出版 (2018)
5. 学会発表など(2018.1~2018.12)
- Toshiya Endo: Mitochondrial Protein and Lipid Transport (招待講演), Gordon Research Conference on Protein Transport across Cell Membranes, Galveston, TX, USA, 2018.3.11-16
- Toshiya Endo: Mitochondrial Protein and Lipid Trafficking (招待講演), Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26
- 遠藤斗志也: Cellular mechanisms to make mitochondria: pathways and machineries (招待講演), 第70回細胞生物学会大会・第51回発生生物学会合同大会シンポジウム「Current Frontiers in Cell and Developmental Biology」東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8
- 河野慎, 遠藤斗志也: ERMES 複合体再構成によるリン脂質輸送(招待講演) 第18回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「蛋白質の分子内情報伝達機構の新展開」, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- Toshiya Endo: Mitochondrial protein trafficking across the outer membrane: pathways and machineries (招待講演), International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis: machineries and pathways (基調講演) International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis, 倉敷, 倉敷国際ホテル, 倉敷市民会館, 2018.11.7-10

Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis and maintenance: pathways and machineries (招待講演), Protein Biogenesis and Mitochondrial Dynamics, Bayersbronn, Germany, 2019.11.19-21

松本俊介, 角田千香, 中務邦雄, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: 2つのAAA-ATPaseによるミトコンドリア外膜に誤局在したテイルアンカータンパク質の分解機構 (招待講演) 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ「AAA-ATPaseリングが織りなす多彩な細胞機能とそのしくみ」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizaka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: Mitochondrial porin modulates the assembly of Tom22 into the TOM complex, Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26

Shin Kawano, Toshiya Endo: Partial reconstitution analyses indicate the phospholipids transfer functions of the ERMES complex between membranes, Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26

Shunsuke Matsumoto, Kunio Nakatsukasa, Yasushi Tamura, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo: Degradation pathway mediated by the two AAA-ATPase Msp1 and Cdc48 for the mistargeted tail-anchored proteins on the mitochondrial outer membrane, 第70回細胞生物学会大会・第51回発生生物学会合同大会, 東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8

Yuriko Kakimoto, Shinya Tashiro, Rieko Kojima, Toshiya Endo, Yasushi Tamura: Visualizing multiple inter-organelle contact sites using split-GFP system, 第70回細胞生物学会大会・第51回発生生物学会合同大会, 東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8

鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地博行: 生体分子モーターはどのようにして力を発生させているのか? 静的・動的 X線結晶構造解析による哺乳類 F1-ATPase の回転力発生機構の分析, 第46回生体分子科学討論会, 大阪, 大阪市立大学, 2018.6.22-23

木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化, 第18回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28

荒磯裕平, 包明久, 松本俊介, 柚木芳, 吉川雅英, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体の構造・機能研究, 第18回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28

阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアポリンタンパク質 Por1 は外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリー制御因子として機能する, 第18回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28

Yuhei Arais, Akihisa Tsutsumi, Shunsuke Matsumoto, Kaori Yunoki, Masahide Kikkawa, Toshiya Endo: Structural and functional study of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29

Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizaka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: The regulation of the assembly of the mitochondrial translocator TOM complex by mitochondrial porin, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29

Shunsuke Matsumoto, Chika Kakuta, Kunio Nakatsukasa, Yasushi Tamura, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo: Two AAA-ATPase-mediated degradation pathways of mislocalized tail-anchored proteins on the outer mitochondrial membrane, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29

鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地博行: 静的・動的 X線結晶構造解析による生体分子モーターF1-ATPase の反応素過程構造の決定と力発生の分子機構, 第12回分子科学討論会, 福岡, 福岡国際会議場, 2018.9.10-13

西川周一, 宇治周平, 坂本智昭, 山本雅也, 杉山智之, 木村成介, 遠藤斗志也: シロイヌナズナ小胞体品質管理変異株が高温ストレス下で示す花粉成熟異常の解析, 日本植物学会第82回大会, 広島国際会議場, 広島, 2018.9.14-16

鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地博行: X線結晶構造解析により明らかになった回転分子モーターF1-ATPase の力発生の仕組み, 第56回日本生物物理学会年会, 岡山, 岡山大学, 2018.9.15-17

丹羽一, 遠藤斗志也: ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 複合体の構造機能解析, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

田代晋也, 遠藤斗志也, 田村康: 遺伝学的スクリーニングに向けた哺乳類動物細胞内ミトコンドリア-ER 膜間コンタクト検出系の構築, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

柿元百合子, 田代晋也, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFP を用いた新規オルガネラ間近接評価実験系の確立, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアポリンタンパク質 Por1 による外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリー制御, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

工藤真之祐, 古田詩唯奈, 遠藤斗志也, 田村康: リン脂質代謝における Pah1 の機能解析, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

新名真夏, 柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFP を用いた NVJ 連携ゾーンの機能の解析, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

藤木幸夫, 丹羽一, 宮内 (南里) 康弘, 奥本寛治, 向井悟, 野井健太郎, 小椋光, 遠藤斗志也: 新しく単離した Pex7 結合 PTS2 タンパク質 P7BP2 は新規ダイニンタイプ AAA+ である, 第 41 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「AAA-ATPase リングが織りなす多彩な細胞機能とそのしくみ」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

Takuya Shiota, Haruka Sakaue, Toshiya Endo, Kher Shing Tan, Trevor Lithgow: Cell cycle-dependent dynamic association of the mitochondrial protein entry gate, TOM complex, 第 41 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「Mitochondria-governed evolution and higher-order functions in life」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也: クライオ電子顕微鏡によるミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体の構造解析, 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・特別推進研究

課題名: ミトコンドリア生合成を司る細胞内統合的ネットワークの解明

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: H27-31 年度 (5 年)

科学研究費補助金・若手研究 (B)

課題名: 再構成系により明らかにする膜間リン脂質輸送分子メカニズム

研究代表者: 河野慎, 取得年度: H29-30 年度 (2 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名: ミトコンドリアトランスロケータ SAM 複合体の構造・機能研究

研究代表者: 竹田弘法, 取得年度: H30-32 年度 (3 年)

2) 知財権等

なし

3) 学外活動

遠藤斗志也: 日本学術会議連携会員

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: 日本蛋白質科学会役員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会代議員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会常任編集委員

4) 受賞等

阪上春花: 第 91 回日本生化学会大会 若手優秀発表賞 (日本生化学会)

5) その他

なし

7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

「タンパク質と脂質の交通を基軸とするミトコンドリア生合成の分子機構の統合的解明」では, タンパク質の配送に関わるトランスロケータやその補助因子の精密構造の決定, 精密構造に基づく各因子の機能メカニズムの解明をめざすとともに, これまでほとんど手が付いていなかった脂質の配送と組成維持に関わる因子, オルガネラ間コンタクトに関わる因子の同定とその機能の解明をめざしている。そのため構造生物学的手法と生化学的手法に習熟し, 実績のある研究員として, 河野慎研究助教を配置し,

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 14 名と大学院生（委託学生を含む）3 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。



30年9月 研究室(+関連研究者)のリトリート「オルガネラ研究会」(鶴岡)

細胞死研究室

Laboratory of Cell Death

准教授 川根公樹

Associate Prof. Kohki KAWANE, Ph. D.



1. 研究概要

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

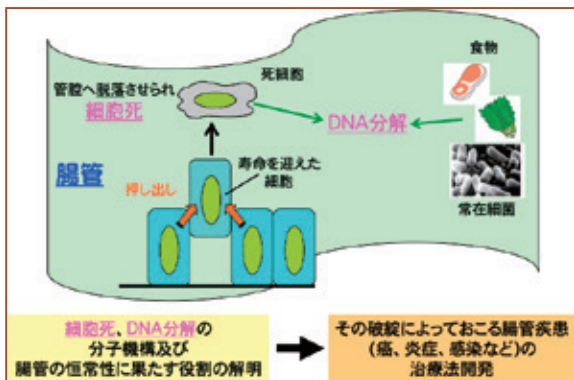


図1. 腸管での細胞死とDNA分解

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、オルガノイドを用いたライブイメージングによって解明する。

2. 本年度の研究成果

ショウジョウバエ腸組織において、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方法で、期間内に 1000 遺伝子のスクリーニングを実施した。その結果、複数の細胞脱落に関与しうる遺伝子を同定したが、中でも細胞の貪食に関与する遺伝子が細胞脱落に重要であることがわかった。そこで細胞が脱落する際の膜動態に着目し、細胞膜を可視化したショウジョウバエ蛹上皮及び複数の哺乳類上皮培養細胞を用いてライブイメージング解析を行ったところ、隣接細胞において、小胞構造によって細胞膜が取り込まれることを見出した(図2)。細胞をそれぞれ異なる蛍光タンパク質で標識するモザイク実験により、この取

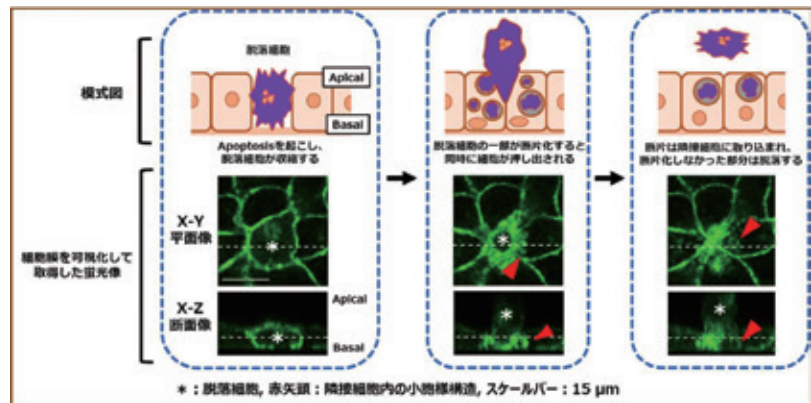


図2. 細胞脱落における脱落細胞の断片化と隣接細胞による断片の貪食

り込みは単なるエンドサイトーシスではなく、隣接細胞の膜成分を小胞内に取り込んでいることが示された。よって、脱落細胞は脱落実行過程において、細胞の一部で断片化をおこし、その断片は隣接細胞に貪食されることがわかった。例えば、哺乳類小腸において絨毛先端から脱落する細胞は、管腔へ剥離して貪食されることはないと考えられていたが、細胞脱落においても貪食のステップが存在することが分かった。さらにこの断片化と貪食は、脱落細胞が組織から突出するタイミングと同時に起こることから、脱落の実行に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。この知見は、報告されている、アクチンなどの細胞骨格の再編成だけでなく、脱落細胞の断片化と貪食が、脱落の実行を駆動している可能性を提示するものである。

3. Research projects and annual reports

The homeostasis in gut is maintained by the balance of proliferation and death of epithelial cells with the rigid barrier function of epithelia. The impairment of either of them causes various disease such as cancer, inflammatory disease, and infection in gut. I focus on two related phenomena, cell death and DNA degradation, to decipher their molecular mechanism and role for gut homeostasis. The insight obtained from the project will contribute to understand disease in gut and develop novel treatments against them.

This year I planned to perform the research aimed to decipher the precise mechanism and physiological role of cell extrusion. Through the analysis we identified the phenomenon that the extruding cell carries out fragmentation and the fragments are engulfed by neighboring epithelial cell. The fragmentation occurs in a part of a cell body and remaining part of extruding cell undergoes delamination from the epithelial cell layer. These processes are unexpected cellular dynamics and are temporally well correlated with the timing of cell movement for extruding out from cell layer. Accordingly it is hypothesized that the processes are crucial steps of cell extrusion as an essential interaction between extruding cell and the neighboring cells.

4. 論文, 著書など

1. 川根公樹 「上皮細胞の終焉様式である細胞脱落」 臨床免疫・アレルギー科 2019; 第71巻第2号: P127-133

5. 学会発表など

1. 服部和泉, 中井彩香, 山田信人, 梶田春奈, 村田真智子, 川根公樹: 「上皮細胞の細胞脱落における細胞接着分子の動態解析」(口頭), 2018 年度日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月, 横浜
2. 吉良彰人, 勝山大暉, 村田真智子, 川根公樹: 「細胞脱落における貪食」(ポスター), 2018 年度日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月, 横浜

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・若手研究(A)

課題名: 未解明の細胞死様式である細胞脱落の分子機構の解明

研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H26-31 年 (4 年 + 1 年延長)

科学研究費補助金・挑戦的研究(萌芽)

課題名: ヒト培養細胞を用いた網羅的スクリーニングによる細胞脱落を司る遺伝子の同定

研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H29-31 年 (3 年)

武田科学振興財団 医学系研究奨励

課題名: 新規スクリーニング系を用いた、上皮組織における細胞脱落現象の分子機構の解明

研究代表者: 川根公樹, 取得年度: H25- (使用期限 H31 年まで)

2) 知財権等 該当なし

3) 学外活動

夢ナビライブ 2018 大阪 (6 月), 夢ナビライブ名古屋 2018 (7 月)での講義 「細胞の死の物語-私達の生を支える細胞死-」

4) 受賞等 該当なし



5) その他 なし

神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

1. 研究概要

タンパク質への糖鎖付加反応は、重要な翻訳後修飾反応の一つであり、糖鎖の構造は、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 α 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 UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (以降 GalNAc-T) により触媒される。この糖転移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。この酵素ファミリーには、酵素活性に関わるモチーフ内に変異を持ち、*in vitro* の酵素活性が未だ検出されず、基質が未同定の4種類のオーファンアイソザイム (GalNAc-T8, -T9, -T17, -T18) がある。これらは互いに相同性を有し、脊椎生物にのみ保存されるアイソザイムである。我々はその中の2つのアイソザイム(GalNAc-T9, -T17)を単離し、それらが脳特異的に発現していること、これら4つのオーファン酵素がゼブラフィッシュでも発現しており、GalNAc-T9, -T17 が神経特異的であること、GalNAc-T8, -T18 も脳において高発現していることを見いだした。

GalNAc-T17 遺伝子座(*galnt7*)は、精神遅滞、極度の社交性を特徴とする Williams-Beuren 症候群の原因候補遺伝子の1つであると見なされており、Wbscr17 (Williams-Beuren syndrome critical region 17) とも呼ばれている。またある種のアルツハイマー病、およびオオカミ/イエヌ間で Wbscr17 の一塩基多型が認められる。これらの情報より、神経系に発現するオーファンアイソザイムの解析を通じて、これまで全く情報のない脳神経系におけるムチン型糖鎖の生理機能を解明することが可能と考えられる。

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、4つのオーファンアイソザイム遺伝子 *galnt17*, *galnt18* 欠失変異体の作製を試みた。

2. 本年度の研究成果

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

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中村直介

Assist. Prof. Naosuke Nakamura Ph. D.

形態に異常が生じることを報告した。この異常が変異体においても観察できるかどうかを確認するために、ゲノム編集技術である CRISPR システムを用いた。ゲノム編集の効率を上げるために、CRISPR single guide RNA (sgRNA) と核移行シグナルを付加し、コドンゼブラフィッシュに最適化した Cas9 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。その結果、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。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。つぎに、この F0 個体から *galnt17* 変異をヘテロで持つ F1 個体を確立し、F1 個体同士を掛け合わせて *galnt17* ホモ変異体 (F2 個体) の解析を行った。予想に反して、*galnt17* ホモ変異体では、モルホリノアンチセンスオリゴによる機能阻害や、前述の F0 個体にて見られた後脳形態異常が観察されなかった (Fig. 1)。

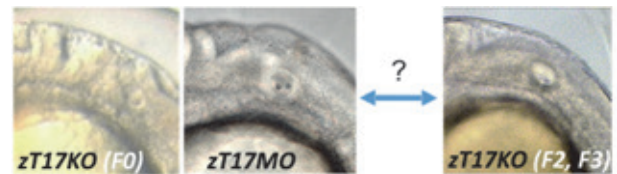


Fig. 1 Morphology of *galnt17* mutants

galnt17 F0 mosaics and *galnt17* morphants had similarly disorganized hindbrains. On the other hand, *galnt17* mutants were apparently normal.

最近、ゼブラフィッシュにおいて、モルホリノアンチセンスオリゴを用いた遺伝子発現阻害により生じる表現型異常が、同一遺伝子の変異体では、類似機能を持つ他の遺伝子の発現亢進により回避されることが報告された。我々の結果においても、*galnt9* および *galnt17* ホモ変異体で類似の機能を有するタンパク質の発現が上昇していることが考えられる。そこで、*galnt17* ホモ変異体において他の *galnt* 遺伝子の発現を定量解析したところ、*galnt9* 等の同じサブファミリーに属する遺伝子の発現亢進が認められた。そこで、*galnt17* ホモ変異体にさらに *galnt9* に変異を導入したが、顕著な表現型の変化は認められなかった。今後は、変異体で特異的に発現上昇する分子の同定、さらには表現型異常を回避する機構を明らかにしムチン型糖鎖の脳内での働きを解明する。

3. Research projects and annual reports

We have been investigating roles of an O-linked sugar chain with the carbohydrate-protein linkage structure, GalNAc α 1→Ser(Thr), which is called a mucin-type carbohydrate. Its biosynthesis is initiated by a group of enzymes, 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* 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.

To investigate biological functions of four isozymes, we first tried to produce *galnt17* mutants using CRISPR/Cas9. For this purpose, single guide RNA and mRNA for Cas9 with a nuclear localization signal in the N-terminus were injected into zebrafish embryos. Genome edition was so efficient that ~80% of *galnt17* allele contained mutations and the resultant F0 mosaics exhibited altered hindbrain development as was found with *galnt17* zebrafish morphants. We then generated F1 hetero, and F2 homomutants by crossing zebrafish. The F2 homomutants showed apparently normal phenotype (Fig. 1). Recent reports demonstrate that in some knockout organisms functions of the mutated genes were compensated with other family genes. In fact, expressions of other family isozymes, *galnt8*, *galnt9*, and *galnt18* were upregulated in the *galnt17* knockout zebrafish, demonstrating that they may compensate for the *galnt17* functions in the brain.

We then introduced *galnt9* mutations into *galnt17* knockout zebrafish, and obtained mutants lacking both *galnt9* and *galnt17*. The double mutants, however, were apparently normal. We are now analyzing mechanism of genetic compensation to rescue *galnt17* phenotypes.

Thus, deletions of more than one isozyme would be necessary to observe phenotypic alterations.

4. 論文, 著書など

N. Nakamura, A. Kurosaka, Mucin-type glycosylation as a regulatory factor of amyloid precursor protein processing. *Journal of Biochemistry* (2019) **165**(3) 205-208.

R. Baker*, N. Nakamura*, I. Chandel*, B. Howell, D. Lyalin, V.M. Panin, Protein O-mannosyltransferases affect sensory axon wiring and dynamic chirality of body posture in the *Drosophila* embryo. *Journal of Neuroscience* (2018) **38**(7) 1850-1865. *Equally contributed.

5. 学会発表など

N. Nakamura, Y. Tsujimoto, Y. Nakayama, M. Konishi, A. Kurosaka: Phenotypic analysis of double mutants that lack vertebrate-specific polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase genes. 第41回日本分子生物学科年会, 横浜市, 2018. 11.28-30.

I. Chandel, R. Baker, N. Nakamura, L. Melbern, B. Howell, V. Panin, Function of protein O-mannosyltransferases 1/2 in connectivity of sensory neurons and control of muscle contractions in *Drosophila*. 2018 Annual Meeting of Society for Glycobiology, New Orleans, LA. 2018. 11. 5-8.

6. その他特記事項

1) 学外活動

黒坂 光: 日本生化学会評議員, 日本薬学会関西支部委員

2) その他 なし

7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

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研究助教は極めて重要な研究指導を行っている。セミナー, 日々の実験指導を通じて生化学, 分子生物学などの実践的な知識を身につけるとともに, 遺伝子組換えなどの技術を修得した。また, フレッシュアップセミナー, 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, 学部全体の教育研究レベルを向上させている。



2018年秋 菖蒲池にて

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。最初はほぼ均一な細胞集団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、ノードに代表されるエピブラスト領域の異所移植の効果を解析すること。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し、特定の細胞種を生み出すための中心的な機構を明らかにするには、これまで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、特定の体細胞を発生させるための基本機構も研究している。

2. 本年度の研究成果

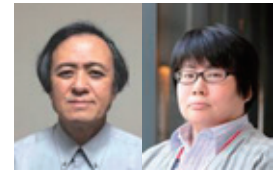
(1) エピブラストの中に異なった領域を成立させる過程が、さまざまな体細胞系列を発生させるための第一段階である。エピブラストの中にできる際立った構造は Node と原条である。マウス胚のエピブラスト幹細胞から、培養条件下で Node 様の組織状態を作り、それから中内胚葉前駆体(FOXA2 を発現する)を効率よく作り出すための条件を検討した。Wnt シグナルを抑制したうえで、基底膜の主成分である Laminin の matrix が共存する条件下でエピブラスト幹細胞を3次元培養すると、中内胚葉を生み出す Node 近傍での原腸陥入を模倣することができた。さらに、cell sorter を用いて FOXA2 発現細胞を精製した。

教授 近藤寿人

Prof. Hisato KONDOH, Ph.D

助教 寺元万智子

Assist. Prof. Machiko TERAMOTO, Ph.D.



(2) 胚の神経系原基の成立における転写因子 SOX2 と ZIC2 の機能的な協同作用

転写因子 SOX2 は、神経系原基の成立と維持において中心的な役割を果たすが、SOX2 の機能は協同して働くパートナー転写因子に依存していることから、神経系原基において SOX2 がどの転写因子をパートナーとするのかが重要な課題である。これを明らかにするために、*Sox2* 遺伝子の発現を、胚発生の早期から、そして神経系全体で制御する D1 エンハンサーが受ける転写制御を研究した。

440 塩基対の長さを持つ D1 エンハンサーを A から E までの5領域に分けて、それぞれ単独、あるいは組み合わせさせてエンハンサー活性を検討した。それらの領域を tkEGFP レポーターにつなげてニワトリ胚に electroporation して、それらの領域の組み合わせが持つエンハンサー活性を評価した。その結果、中心に位置する CD 領域の組み合わせが、神経系原基における D1 エンハンサーの活性を担っていることがわかった。

CD 領域に様々な変異を導入してエンハンサー活性への影響を調べた結果、SOX 因子結合配列と ZIC 因子結合配列の変異が、エンハンサー活性を著しく低下させた。D1 エンハンサー活性は、SOX2 と ZIC2 の組み合わせによって活性化される。これらのことから、神経系原基の制御においては、SOX2 は ZIC2 をパートナー因子として機能していること、またこれらの因子の組み合わせが *Sox2* 遺伝子の自己制御にも関わっていることが示唆された。

(3) 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と、二次的な脳が形成される。この過程における細胞集団の動きを、mCherry を発現するトランスジェニックウズラの Node と、蛍光標識したニワトリ胚エピブラストを組合わせて、ライブイメージングによって追跡し、その画像解析を行った。

(4) 内胚葉からは消化管が発生するが、消化管の領域化に対応して、特定の転写因子を発現する。消化管の頭部側は転写因子 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。マウス胚の内胚葉で *Sox2* 遺伝子を失活させると、内胚葉から発生する食道の上皮が気管上皮の性質を持つようになることがわかった。さらに、それ自体では SOX2 を発現していない

上皮を取り囲む間充織も、食道タイプから気管タイプに変化することを見出した。これまで内臓器官の領域特性は、間充織の作用によって決定される場合が強調されてきたが、逆のプロセスの存在が示された。

- (5) Hedgehog シグナルが伝わらない変異を持つウズラ系統 HMM のホモ接合体では、下垂体原基周辺に複数の異所的な水晶体が発生することを見出し、その発生過程を解析した。LHX3を発現する下垂体原基は通常1箇所が生じてラケ囊と呼ばれるが、HMM 変異体ではそれが口腔外胚葉の複数の場所に生ずることがわかった。それらの下垂体原基の様々な場所で LHX3 の発現が低下するとともに、水晶体発生を開始させる PROX1 が発現されて、複数の異所的な水晶体発生をもたらすことがわかった。Hedgehog シグナルが、下垂体原基が持つ水晶体発生能を抑制していると結論された。

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, e.g., SOX2 and signaling factors, e.g. Wnts, in epiblast cells and in the somatic cell lineages derived 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 (EpiSC) lines derived directly from mouse embryo epiblasts to analyze *in vitro* the process of regionalization of the epiblast cell population; (3) Derivation of stem cell lines representing an intermediate step of somatic development from the epiblast stem cells, in order to investigate regulations that take place in the early stages of the somatic lineage development; and (4) Use of avian embryo epiblast to investigate the effect of ectopic grafting of specific epiblast regions such as node.

The occurrence of the developmental process that gives rise to cell types that are usually not associated with the cell lineage is referred to as “transdifferentiation.” Investigation of trans-differentiation phenomena will provide new insights into

the mechanisms underlying cell lineage-dependent cell differentiation.

- (1) The first step in the specification of somatic cell lineage is the regionalization of the epiblast cell population. The most prominent structures caused by the epiblast regionalization are the Node and the primitive streak. From the epiblast surrounding the node, mesendoderm develops. We sought for an EpiSC culture condition that generate node and mesendoderm precursors that express FOXA2. Three dimensional EpiSC aggregates that are cultured under Wnt signal inhibition and in a laminin-rich matrix produced mesendoderm precursors. These FOXA2-expressing cells were successfully purified via fluorescence-activated cell sorting.

- (2) Possible functional cooperation between SOX2 and ZIC2 in the establishment of embryonic neural primordia

The transcription factor SOX2 plays a central role in the development and maintenance of neural primordia. Because the function of SOX2 relies on the interacting partner transcription factor, it is important to determine which transcription factor cooperate with SOX2 as the partner factor in the neural primordia. To address this problem, we investigated the D1 enhancer of the *Sox2* gene, which is activated at an early stage of neural development, and in a pan-neural fashion.

We divided the D1 enhancer sequence of ~440 bp into the blocks A to E, and assessed the enhancer activity of the blocks using ptkEGFP reporter, which was electroporated into chicken embryos. We found that the centrally located blocks C and D in combination bear the major regulatory function of the D1 enhancer.

Mutational analysis of the block C + D sequence indicated that a SOX binding sequence and a ZIC binding sequence are involved in the D1 enhancer activation. Further analysis indicated that D1 enhancer is activated by the combination of SOX2 and ZIC2, suggesting that the novel pair of transcription factors SOX2 and ZIC2 plays important roles in the regulation of neural stem cells, including *Sox2* autoregulation.

- (3) The secondary brain tissues develop when an exogenous node is grafted at an ectopic site of host epiblast. Using mCherry-labeled quail donor and EGFP-labeled chicken host epiblast, we investigated the cellular processes involved in the secondary brain tissue development via live imaging and image analysis.
- (4) The endoderm-derived alimentary tract epithelium is regionalized with expression of the transcription factors. SOX2 is expressed in esophagus and stomach precursors. Inactivation of the *Sox2* gene in the endoderm resulted in transformation of the esophagus epithelial tube into trachea/bronchus epithelial tube. Importantly, the mesenchymal tissues surrounding the epithelia tubes, which by themselves do not express SOX2, were also transformed concordantly. Concerning the alimentary tract regionalization, the mesenchymal effects on epithelial tubes have been emphasized, but our results highlight the cellular influences in the opposite direction.
- (5) We investigated involvement hedgehog signaling in the pituitary precursor development and in the lens precursor potential of pituitary precursors, using a hedgehog signaling-defective mutant Japanese quail embryos. The homozygous mutant embryos developed multiple pituitary precursor-like pouches expressing LHX3 from the oral ectoderm, in addition to normally positioned Rathke's pouch. Some parts of these pituitary pouches activated PROX1 with concomitant loss of LHX3 expression. This was followed by the development of small lens tissues. Thus, hedgehog signaling inhibits lens potential of oral ectoderm-derived pituitary precursor.

4. 論文, 著書など

原著論文

Sugahara S, Fujimoto T, Kondoh H, Uchikawa M. (2018) Nasal and otic placode specific regulation of Sox2 involves both activation by Sox-Sall4 synergism and multiple repression mechanisms. *Dev Biol.* 433(1):61-74.
doi: 10.1016/j.ydbio.2017.11.005.

Kondoh H. (2018) Roles of ZIC2 in Regulation of Pluripotent Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 1046:339-351.
doi: 10.1007/978-981-10-7311-3_17.

Okamoto Y, Nishimura N, Matsuda K, Ranawakage DC, Kamachi Y, Kondoh H, Uchikawa M. (2018) Cooperation of Sall4 and Sox8 transcription factors in the regulation of the chicken Sox3 gene during otic placode development. *Dev Growth Differ.* 60(3):133-145. doi: 10.1111/dgd.12427.

5. 学会発表など

Hisato Kondoh. Mechanisms underlying lens transdifferentiation from neural retina and pituitary. Gordon Research Conference on Visual System Development. Il Ciocco, Italy, May 20-24 (2018).

Koya Yoshihi, Kagayaki Kato, Hisato Kondoh. Live imaging of node graft and host cells to establish its role in head development. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Hideaki Iida, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh. Regulation of a pan-neural Sox2 enhancer D1. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Machiko Teramoto, Ryo Sugawara, Atsushi Kuroiwa, Yasuo Ishii, Hisato Kondoh. SOX2-dependent determination of tissue identities in the foregut. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Hisato Kondoh. The pairing interaction dynamics of the transcription factor SOX2 with partner factors. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave." Otsu, Japan. August 26-29 (2018).

Hisato Kondoh. Mechanisms underlying lens transdifferentiation in neural retina cells and pituitary precursors. The 23rd Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, Belfast, UK, September 9-13 (2018).

Hisato Kondoh. A drastic change in the major regulatory TFs from SOX2- POU5F1 to ZIC2-OTX2 in the pluripotent stem cells representing preimplantation and post-implantation stages. EMBO WORKSHOP 2018 "Molecular Mechanisms of Regenerative and Developmental Biology." Singapore, November 11-13 (2018).

飯田 英明、内川 昌則、近藤 寿人. D1エンハンサーによる、胚の中枢神経系と頭部神経堤におけるSox2発現の制御. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

寺元 万智子、菅原 諒、黒岩 厚、石井 泰雄、近藤 寿人. 内胚葉で発現されるSOX2が前腸の上皮と間充織の双方を食道に発生させる. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

近藤 寿人、中村 香絵、渡邊 優作、藤井 麻衣、稲森 祥子、飯田 英明. エピプラスト幹細胞を用いて、着床後に体細胞系列が生み出される機構を研究する. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).



6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(B)

課題名:体細胞系列の選択的な発生をもたらすエピプラストの領域化と転写制御ネットワーク

研究代表者:近藤寿人、取得年度:H29-32年(4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

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

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

研究助教の寺元万智子は、in situ hybridization をはじめとする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、研究の推進に大きく貢献している。特に、マウス胚を使った消化管の発生の研究では、短期間に斬新な研究成果を得た。学部学生や大学院生に対してきめ細やかな指導を行って、その教育効果は大きい。特に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の幅広い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、生命システム英語 II の担当、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、実質的な貢献をしている。

発生情報学研究室

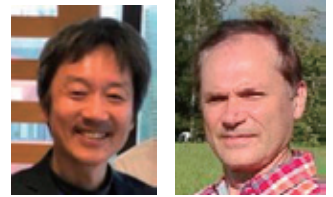
Laboratory of Cell Signaling and Development

教授 佐藤 賢一

Prof. Ken-ichi Sato, Ph.D.

助教 トクマコフアレクサンダー

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



1. 研究概要

がん関連遺伝子(原がん遺伝子およびがん抑制遺伝子)のなかには、その相同遺伝子が比較的単純な体制をもつ多細胞生物種や単細胞生物種に存在するものがある。このことは、がん関連遺伝子が、地球上における生命の長い進化の過程で古くから保存されてきたこと、そしてその主たる機能は「がん」だけでなく、より基本的あるいは正常な生命活動に欠くことのできないものであることを示唆している。本研究室では、アフリカツメガエルの卵や初期胚、およびヒトの培養がん細胞の細胞機能(受精と発生開始、発がんと悪性機能の発現・維持)における原がん遺伝子 Src(サーク)、およびその周辺(細胞膜近傍および細胞質)ではたらくシグナル伝達分子群(UPIII や MAP キナーゼなど)の役割を明らかにする、というテーマに取り組んでいる。アフリカツメガエルの卵や初期胚を用いた研究(卵細胞プロジェクト)では以下の3点に重点を置いている。1) 膜ドメイン UPII-Src システムの形成と受精機能、2) 卵アポトーシスの分子機構、3) 卵母細胞の排卵/成熟システムの分子機構。また、ヒトがん細胞を用いた研究(がん細胞プロジェクト)では、以下の3点に重点を置いている。1) がん細胞の血清飢餓抵抗性の細胞増殖、2) Src 依存的チロシンリン酸化の生理的意義、新規 Src 基質シグナル分子の探索。

これらの研究は、総合生命科学部プロジェクト研究(2015~2019 年度)「有性生殖機構における生殖細胞膜シグナル伝達の研究」の一環として、2018 年においては主に生命科学研究科生命システム学コース修士2年生1名(荒井 華菜香)、生命システム学科4年生5名(栗村 美咲、磯部 拓海、里 和憲、法花津 いづみ、吉田 初芽)および同3年生3名(中川 奏、西川 幹基、森近 雄大)からなるチーム体制で取り組んだ。

また、アメリカで開発された質問づくりメソッド QFT (question formulation technique)を活用した「問いを創る学び場ハテナソン」の研究開発と実装試験を本研究室の新たなテーマとして本格稼働し、生命科学と社会のよりよいコミュニケーションのあり方の探索、そして様々な学術研究分野と一般社会の様々なステークホルダーが協働的に社会課題に取り組む超学際研究(Transdisciplinary Research)におけるハテナソンの発展的な活用に着手している。

2. 本年度の研究成果

ツメガエル卵細胞の形成・成熟・受精のバイオロジー

両生類モデル生物のアフリカツメガエル *Xenopus laevis* とネッタイツメガエル *Xenopus tropicalis* を用いて次の進捗が得られた。

昨年度に樹立に成功したツメガエル卵細胞のホルモン依存的な排卵(卵巣組織からの離脱)と成熟(受精可能

となるために必要な細胞周期の再稼働などの卵細胞内における質的変化)の再構成系(in vitro ovulation system)を活用し、プロテインキナーゼ MAPK およびマトリクスメタプロテイナーゼ MMP の働きについて、それぞれの特異的阻害剤(U0126 および GM6001)を用いた検証実験系を確立した(アフリカツメガエル)。MAPK 活性は同タンパク質のリン酸化状態を免疫ブロッティング法により、MMP 活性は蛍光標識された人工基質を用いた高層反応系により、それぞれ検証することとした。in vitro



図1 アフリカツメガエルの(a)成体、(b)卵巣、(c)卵巣内の未成熟卵母細胞、(d)産卵された成熟卵母細胞/未受精卵(Sato 2017)

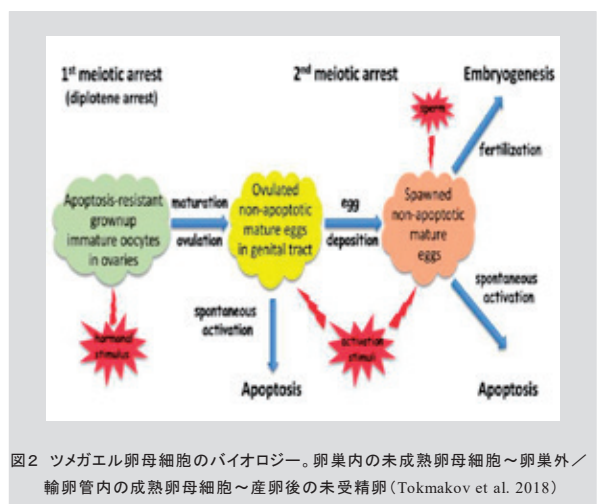


図2 ツメガエル卵母細胞のバイオロジー。卵巣内の未成熟卵母細胞~卵巣外/輸卵管内の成熟卵母細胞~産卵後の未受精卵(Tokmakov et al. 2018)

ovulation system)における卵母細胞の卵巣組織からの離脱(O)と成熟反応(M)の順序(O→M および M→O)、およびそれら一連の過程におけるMAPKとMMPの関与についての暫定的な結論は次のとおりである。MAPK 阻害剤はOとM両方に、MMP阻害剤はOにのみ抑制効果

を示す。現在は MAPK および MMP 活性の卵母細胞および臏胞細胞それぞれにおける測定を試みている。

問いを創る学び場ハテナソンの研究開発と実装試験

ハテナソンは、はてな(?)とマラソンを組み合わせた造語で、アメリカ発の質問づくりメソッド QFT (Question Formulation Technique) を中核として設計・運営する「質問づくりの学び場」を意味する。質問駆動型学習 (QDL: Question-driven Learning) とは、ハテナソンというコンセプトと技法のもとで「問題はなにか? 優先課題はなにか?」を学習者が自ら問い、焦点化された指導やガイドを受け、同学者と協働的に学ぶ学習スタイルの新概念である。2018 年度の主な取り組みとして、京都産業大学・総合生命科学部・生命システム学科の2年次必修専門教育科目の一つである「発生生物学」におけるハテナソン～QDL を設計・運営し、その成果・課題を報告した。学習者は「発生生物学」の起源と重要概念の概要を知識として取り込み、自らの考える力を涵養するために、超参加型読書法、QFT、形成的評価試験、振り返りを3回繰り返しおこない、適宜教員からの焦点化した、またはガイド的な指導を受けた。この一連の学びをへて、学習者は「発生生物学とはどのような学問であるのか」という問いを繰り返し問い、あるいは問われ、加えて「何をどのように学べば、発生生物学の基本的知識が身に付くのか」という学びのプロセスに対しても省察した。

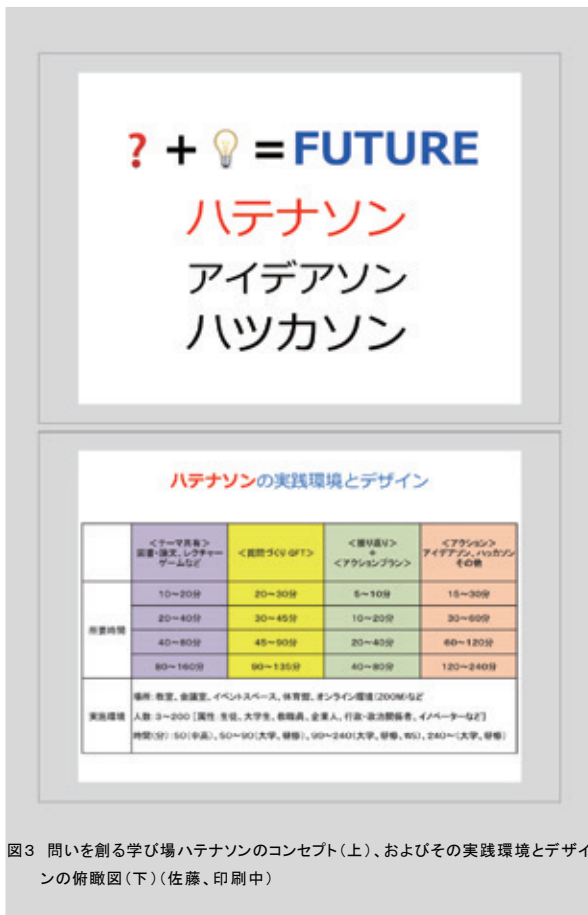


図3 問いを創る学び場ハテナソンのコンセプト(上)、およびその実践環境とデザインの俯瞰図(下)(佐藤、印刷中)

上記の取り組みに加え、学外では防災科学技術研究所、チームサイエンスコモンズおよび総合地球環境学研究所コアプロジェクト「環境社会課題のオープンチームサイエンスにおける情報非対称性の軽減」(プロジェクトリーダー:近藤康久・総合地球環境学研究所准教授)などに参加し、持続可能な開発目標 (SDGs) と防災、チームサイエンス科学の日本における推進、そして琵琶湖と周辺地域の保全などに関する超学際研究、それぞれをテーマとするハテナソンの発展的活用に従事している。

3. Research projects and annual reports

Research in our laboratory primarily focuses on the molecular and cellular mechanism of growth, maturation, fertilization, and apoptosis in oocyte/egg of the African clawed frog *Xenopus laevis* (Egg Project), and of malignant functions such as anti-apoptotic proliferation and drug-resistance in human bladder carcinoma cells (Cancer Cell Project). In the Egg Project, we demonstrate that oocyte maturation and follicle rapture can be recapitulated in vitro in the presence of progesterone and low concentrations of the matrix metalloproteinase (MMP). Inhibition of the MAPK pathway suppresses both oocyte maturation and follicle rapture, whereas inhibition of MMP activity only delays follicular rapture. Further nature of the in vitro ovulation system is under investigation.

Hatenathon is a newly coined word. It is a combination of a word 'hatena', which means a question mark in Japanese, and a marathon. Hatena Son is a concept of question-driven learning (QDL). Through hatena Son, teachers develop and provide a brand-new learning environment. The core process used in hatena Son is based on Question Formulation Technique (QFT) developed by Dan Rothstein and Luz Santana in the Right Question Institute. Design and implementation of hatena Son approaches was made in the class of Developmental Biology in the Department of Molecular Biosciences, Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University in the 2017 Autumn semester, and the results and discussion were reported in the 2018 issue of Kyoto Sangyo University Higher Education Forum.

4. 論文、著書など

Tokmakov AA, Sato K, Stefanov VE. (2018) Postovulatory cell death: why eggs die via apoptosis in biological species with external fertilization. *J Reprod Dev.* 64(1):1-6. doi: 10.1262/jrd.2017-100.

Sato K (2018) Fertilization and Protein-tyrosine kinase signaling: Are they merging or emerging? in *Diversity and Commonality in Animals*, Kazuya Kobayashi et al. (Eds): Reproductive and

Developmental Strategies, The Continuity of Life ISBN: 978-4-431-56607-6, (book chapter) pp.569-589.

Sato K, Tokmakov AA. (2019) Membrane microdomains as platform to study membrane-associated events during oogenesis, meiotic maturation, and fertilization in *Xenopus laevis*. in *Vertebrate Embryogenesis: Embryological, Cellular, and Genetic Methods, 2nd Edition* (Ed. F. Pelegri). Methods Mol. Biol., 1920:59-73.

Tokmakov AA, Sato K. (2019) Reconstitution of intracellular calcium signaling in *Xenopus* egg extracts. in *Vertebrate Embryogenesis: Embryological, Cellular, and Genetic Methods, 2nd Edition* (Ed. F. Pelegri). Methods Mol. Biol., 1920:41-57.

王 戈, 佐藤 賢一, 近藤 康久, 松尾 由美 (2018) 集会報告 第 1 回 チームサイエンスの科学の日本での推進×ハテナソン 情報管理 60(7)284-287.

佐藤 賢一 (2018) ハテナソン: 質問駆動型学習の設計・運営と成果・課題: 生命科学専門教育科目における実践と調査 高等教育フォーラム 8, 41-58.

木村 成介, 佐藤 賢一, 千葉 志信, 村田 英雄 (2018) 高大接続授業におけるハテナソンの実践: 「問われる立場」から「問う立場」への転換を目指して 高等教育フォーラム 8, 21-39.

5. 学会発表など

王 戈, 佐藤 賢一, 松尾 由美 「チームサイエンスの科学とは何か: 研究開発マネジメントとの比較に基づく検討」プロジェクトマネジメント大会2018年度春季研究発表大会、東洋大学(東京)、2018年3月8日(口頭発表)

近藤 康久, 奥田 昇, 浅野 悟史, 石川 可奈子, 加納 圭, 鎌谷 かおる, 熊澤 輝一, 佐藤 賢一, 下山 紗代子, 藤澤 栄一, 松下 京平, 脇田 健一 「琵琶湖の水草資源活用に向けたオープンガバナンスアプローチ」日本地球惑星科学連合 2018 年大会、幕張メッセ(千葉)、2018 年 5 月 20~24 日(口頭発表)

Wang G, Sato K. 「A Hatenaathon Approach Report on Promoting SciTS in Japan」 Science of Team Science 2018 Conference (テキサス、USA)、2018 年 5 月 21~24 日(口頭発表)

佐藤 賢一 「質問を創る学び場“ハテナソン”授業の設計・運営と成果・課題」大学教育学会第40回大会、筑波大学(つくば)、2018年6月9~10日(口頭発表)

佐藤 賢一 「質問を創る学び場ハテナソンの研究開発と実装試験」 科学技術振興機構フェア(東京)、2018年8月30~31日(ブース展示)

Sato K. Transdisciplinary Research Summer School (リュネブルグ、ドイツ)、2018年9月2~7日(セミナー参加)

王 戈, 佐藤 賢一, 木村 成介 「チームサイエンスの科学の日本における推進×ハテナソン」第65回日本グループ・ダイナミクス学会、神戸大学(神戸)、2018年9月8日(ワークショップ企画・運営)

トクマコフ アレクサンダー, 井口 将, 岩崎 哲史, 佐藤 賢一 「カエル卵母細胞および未受精卵の排卵後エイジング」日本動物

学会第89回大会、札幌コンベンションセンター(札幌)、2018年9月13~15日(ポスター発表)

養田 龍也, 岸川 淳一, 岩尾 康宏, 横山 謙, 佐藤 賢一, 井尻 貴之 「アフリカツメガエル卵成熟におけるATPの影響とタンパク質リン酸化の解析」日本動物学会第89回大会、札幌コンベンションセンター(札幌)、2018年9月13~15日(ポスター発表)

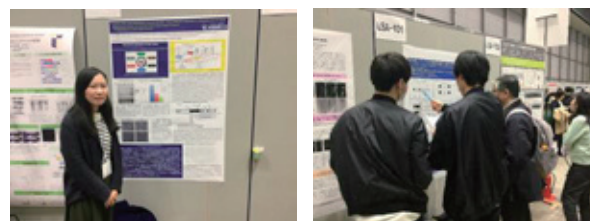
王 戈, 佐藤 賢一, 木村 成介 「チームサイエンスの科学の日本における推進×ハテナソン」日本科学哲学会第51回大会、立命館大学(京都)、2018年10月13~14日(ワークショップ企画・運営)

佐藤 賢一 「SDGs×ハテナソン」サイエンスアゴラ、テレコムセンター(東京)、2018年11月9~11日(ワークショップ企画・運営)

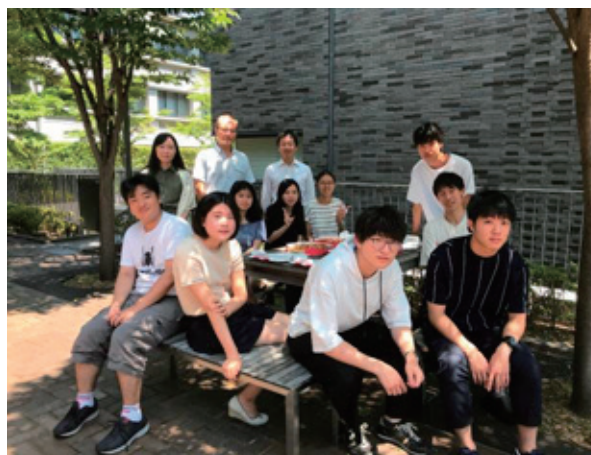
Arai H, Nishikawa H, Iwasaki T, Kamada S, Tokmakov AA, Sato K 「Src/FAK-dependent tyrosine phosphorylation contributes to the cell proliferation accompanied by anti-apoptotic mechanism and cell motility in human bladder carcinoma cells」日本分子生物学会第41回年会、パシフィコ横浜(横浜)、2018年11月28-29日(ポスター発表)

磯部 拓海, 里 和憲, 吉田 初芽, 粟村 美咲, 法花津 いづみ, 松本 裕汰, 佐藤 賢一, トクマコフ アレクサンダー 「In vitro reconstruction of oocyte life cycle: from ovulation to apoptosis」日本分子生物学会第41回年会、パシフィコ横浜(横浜)、2018年11月28-29日(ポスター発表)

Tokmakov AA, Sato KI. 「Detection of SA-β-gal activity in *Xenopus* oocytes using SPiDER-β-gal」日本分子生物学会第



2018 年度日本分子生物学会年会(横浜市)での発表風景 (2018 年 11 月撮影)



15 号館と 16 号館の間にて(2018 年 8 月撮影)

41回年会、パシフィコ横浜(横浜)、2018年11月28-29日(ポスター発表)

王 戈, 佐藤 賢一「チームサイエンスの科学の日本における推進×ハテナソン」第17回科学技術社会論学会年次研究大会、名城大学(東京)、2018年12月8~9日(ワークショップ企画・運営)

6. その他特記事項(学内外での諸活動)

1) 外部資金

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究(2016-2018) 課題番号: 281027 Tokmakov AA (PI), Ijiri TW. Postovulatory ageing of *Xenopus* eggs. Collaboration Research Grant with Kobe University, 取得年度: 2016~2018年度

科学技術振興機構プログラムマネージャー育成・活躍推進プログラム第2ステージ 課題名: 質問する学び場ハテナソンの研究開発および実装試験、研究代表者: 佐藤 賢一、取得年度: 2017~2019年度

三井物産環境基金: 研究助成 課題名: オープンサイエンスと社会協働の融合に基づく琵琶湖流域圏水草資源活用コミュニティの形成 取得年度: 2017~2019年度 (代表者: 近藤 康久、佐藤 賢一は共同研究者)

2) その他

合同研究交流会 2018.2.9. 摂南大学理工学部生命科学科 西村 仁教授研究室・井尻 貴之講師研究室。

卒業研究発表会 2018.2.23. 京都産業大学総合生命科学部6研究室での合同。

大学コンソーシアム京都第23回FDフォーラム(京都府立大学など) 2018.3.3~4. 実行委員長。

大学コンソーシアム京都第24回FDフォーラム(京都産業大学) 企画検討委員長 2018.6.~2019.3. 佐藤 賢一

京都産業大学・科学技術振興機構プログラムマネージャー育成・活躍推進プログラム共催ハテナソン国際フォーラム 2019(京都産業大学)実行責任者 (2019.3.22~23)

科学技術振興機構さくらサイエンスプログラム(京都産業大学) 2018.7.24~8.2 韓国Kangwon University学部生・大学院生など3名の研究室活動への受け入れ

卒業研究中間発表会(松の浦セミナーハウス) 2018.8.7. 京都産業大学総合生命科学部10研究室での合同。

高大接続・模擬授業 2018.1.12 高陽東高校、4.6 川西明峰高校、4.12 甲南高校、4.14 洛西高校、4.21 山城高校、7.13 洛西高校、8.21 大阪高校、10.13 国際技術コンテスト強化講座(四日市高校)、10.31 高松桜井高校

大学・高校等教職員研修会、ワークショップなど 2018.1.2 SDGs×ハテナソン(札幌)、1.11 京都産業大学学生ファシリテータ研修(京都)、1.12 教職員研修(高陽東高校)、1.15 チームサイエンス科学×ハテナソン(科学技術振興機構)、1.20 大学コンソーシアム京都FD塾分科会(京都)、1.31 関西若手議員の会(交野)、2.18 SDGs×ハテナソン2件(東京)、2.20 SDGs×ハテナソン(京都)、2.24 教職員研修(摂南大学)、2.25 ファシリテータ養成講座(東京)、3.9 SDGs×ハテナソン(京都)、3.10 滋賀教職員組合定期総会(近江八幡)、3.16 SDGs×ハテナソン(大阪)、3.23 SDGsワークショップ(東京)、3.24 SDGs×ハテナソン(東京)、3.26教職員研修(高陽東高校)、3.27 チ

ームサイエンス科学×ハテナソン(京都)、3.31 ファシリテータ養成講座(京都)、4.1 SDGs×ハテナソン(京都)、4.13 滋賀グリーン購入ネットワーク研修会(大津)、4.22 SDGs×ハテナソン(東京)、総合地球環境学研究所ワークショップ(京都)、京都産業大学ボランティアセンターワークショップ(京都)、5.26 SDGs×ハテナソン(京都)、6.22 教職員研修(九州大学)、6.23 ファシリテータ養成講座(東京)、6.23 SDGs×ハテナソン(東京)、7.4 教職員研修(高陽東高校)、7.13 SDGs×ハテナソン授業(龍谷大学)、7.15 環人ネットワークショップ(草津)、7.21 SDGs×ハテナソン(旭川)、7.27 科学技術振興機構プログラムマネージャー研修(東京)、7.28 SDGs×ハテナソン(京都)、8.22 教員研修(紫野高校)、8.24 SDGs×ハテナソン(東京)、8.25 SDGs×ハテナソン(甲府)、8.26 ファシリテータ養成講座(東京)、8.27-28 職員研修(産業技術総合研究所)、9.1 SDGs×ハテナソン(名古屋)、10.4 教員研修(福山平成大学)、10.13 SDGs×ハテナソン(名古屋)、10.19 防災科学技術研究所ワークショップ(つくば)、11.2 チームサイエンス科学×ハテナソン(北海道大学)、11.4 SDGs×ハテナソン(甲州)、11.23 ABD×QFTハテナソン(東京)、11.28 ともいき講座(京都文教大学)、12.1 ワークショップデザイン講座(東京)、12.7 京都府高校数学研究会(宮津)、12.14 チームサイエンス科学×ABD読書会キックオフ記念イベント(東京)、12.16 オンラインフェスティバル(ハテナソンワークショップ出展)

学内外におけるその他の諸活動(2018/平成30年度)

- ・京都産業大学教育プログラム支援制度 代表受給者
- ・京都産業大学国際シンポジウム開催支援制度 代表受給者
- ・京都産業大学教育支援研究開発センター長(9月まで)
- ・京都産業大学全学自己点検評価運営委員長(9月まで)
- ・京都産業大学生命科学部設置準備運営委員長
- ・京都産業大学放射線安全委員会 委員
- ・京都産業大学組換えDNA実験安全委員会 委員
- ・大学コンソーシアム京都 運営委員、国際事業部長
- ・京都文化力プロジェクト総合監修者事業検討会 メンバー
- ・広島大学両生類研究センター 客員研究員
- ・総合地球環境学研究所 客員研究員
- ・大学基準協会 大学評価委員会 幹事
- ・神戸国際大学外部評価委員会 委員長
- ・特定非営利活動法人ハテナソン共創ラボ 代表理事
- ・特定非営利活動法人アイデア創発コミュニティ推進機構 理事

7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

わたしたちの活動は、総合生命科学部プロジェクト研究(2015~2019年度)「有性生殖機構における生殖細胞膜シグナル伝達の研究」のもと、トクマコフ アレクサンデル研究員(研究助教)の雇用支援を受けて、おこなっている。その教育効果は、「5. 学会発表」に記した研究室分属生(特別研究履修生)を筆頭発表者とする学会ポスター発表(磯部ら1件)や、査読付き英文学術論文の公表(2018年度においては投稿準備中、2019年度においては受理・公表済みのものが2件)のかたちで顕在化している。

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

私たちの研究室の目的は、病気の原因となる細胞内シグナル伝達の異常を明らかにし、シグナル伝達経路の中で特に異常な活性を示す分子をターゲットとして、その分子の活性を制御することにより、患者の治療に役立つ方法を開発することです。現在は、がん患者の治療と遺伝性の疾患において、細胞増殖因子とその受容体、および下流のシグナル伝達経路に異常が見られる課題に取り組んでいます。

2. 本年度の研究成果

1) VEGF-A/ニューロピリン 1(NRP1)の細胞内シグナル伝達を阻害する細胞透過性ペプチドは、がんの浸潤と転移を抑制する

がん細胞の浸潤転移はがん悪性化の最も重要な過程である。多くの悪性腫瘍は血管内皮増殖因子(VEGF-A)を高発現し、腫瘍周辺の正常血管を腫瘍に呼び寄せることで栄養と酸素を供給させる。正常血管を形成する血管内皮細胞のVEGF-A受容体は、チロシンキナーゼドメインを持つVEGFR2と細胞内領域が44アミノ酸配列と短く、チロシンキナーゼドメインを持たないニューロピリン1(NRP1)がある。悪性腫瘍ではVEGFR2の発現は低いかわりに検出できないが、NRP1の発現は悪性化が進むにつれて高くなる。また、NRP1の発現が高くなるとがん患者の予後が悪いことが報告されている。本研究では、がんにおけるVEGF-A/NRP1の細胞内シグナルを明らかにし、それを阻害することによって、がん細胞の浸潤と転移を阻害できるかを検討した。ヒト転移性皮膚がん、グリオブラストーマ、前立腺がん由来の細胞株を用いた実験で、VEGF-AまたはNRP1のノックダウンによりin vitro assayでがんの浸潤が抑制された。以前の研究で、VEGF-A/NRP1の下流では低分子量Gタンパク質RhoAが活性化されることを明らかにしていたが、VEGF-A刺激により、NRP1の細胞内ドメインに足場タンパク質であるGIPC1が結合し、さらにRhoGEF活性を持つSyxが活性化されることがわかった。そこで、GIPC1とSyxの相互作用を阻害する細胞透過性ペプチドを作成して、その効果を調べた。細胞透過性ペプチドは、細胞内に取り込まれ、RhoAの活性化を阻害した。さらに、ヌードマウスにグリオブラストーマU87MGを移植して、細胞透過性ペプチドを投与することによって、腫瘍形成と転移への効果を調べ

た。その結果、遠位リンパ節への転移を41%阻害した。以上の結果から、VEGF-A/NRP1シグナルの下流タンパク質であるGIPC1とSyxの相互作用を阻害することで、がんの転移抑制に効果が得られることが示された。

2) 食道がんにおけるFGFR3IIIcアイソフォームの高発現は抗がん剤耐性を獲得させ、患者の予後を悪くさせる

日本における全がんの平均5年生存率は約60%に対し、食道がんの5年生存率は40%と低く、予後が悪いことが報告されている。以前の研究で、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り正常間葉細胞系に発現するFGFR3IIIcが食道がん細胞に発現することでがんの悪性化に関与していることを示した。大阪北野病院消化器外科との共同研究により、FGFR3IIIcの発現量とステージなどの食道がん患者情報との相関性を解析した。FGFR3IIIc特異的な抗体を用いて、患者試料を免疫組織染色で解析したところ、がん部/非がん部のFGFR3IIIcの発現比が高いと再発する傾向が高くなり、特に術前術後化学療法無群においてはFGFR3IIIcの発現比が高いと全生存期間が短くなるとの相関傾向(R=0.436)を示した。また、FGFR3IIIc発現上昇によるがん悪性化の作用として抗がん剤耐性の獲得について検討した。食道がん細胞株KYSE220を用いて、FGFR3IIIcを発現させると、ドセタキセル及び5-Fuの抗がん剤耐性IC50が約3倍上昇した。以上の結果からFGFR3IIIcは食道がんの再発と食道がん患者の全生存期間の短縮、及び抗がん剤耐性獲得に関わっていると考えられる。今後は、FGFR3IIIcの発現が食道がんの上昇するメカニズムと、その結果、なぜ患者の予後が悪くなるのかを明らかにしたいと考えている。

3. Research projects and annual reports

1) The cell-penetrating peptide blocking VEGF-A/NRP1 signaling inhibits cancer invasiveness and metastasis

Cancer invasiveness is one of the most important processes of cancer progression. Many malignant tumors express high levels of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and its receptor neuropilin-1 (NRP1), but not VEGFR1, VEGFR2 and VEGFR3. Previously, we have reported that VEGF-A stimulates cancer cell proliferation and invasiveness in human skin cancer cells,

prostate cancer cells and glioblastoma through NRP1 signaling in an autocrine-manner. Upon VEGF-A binding to NRP1, it induces the interaction between the intracellular domain of NRP1 and a scaffold protein, GIPC1. GIPC1 forms a complex with Syx, a RhoGEF, thus, leading to activating the small G protein RhoA. As a result, active RhoA induces degradation of p27, CDK inhibitor, to enhance cancer cell proliferation. Diminished endogenous expression of VEGF-A, NRP1, GIPC1, or Syx by siRNA in human cancer cells suppressed VEGF-A-induced RhoA activation, anchorage-independent proliferation, and invasiveness. In this study, we examined the effect of the cell penetrating peptide corresponding to the sequences of eight amino acids of Syx C-terminus interfering with GIPC1 interaction on cancer cell proliferation, invasiveness and metastasis. The targeting peptide inhibited cancer cell proliferation and invasiveness. To assess whether the targeting peptide suppress cancer metastasis *in vivo*, we inoculated U87MG glioblastoma cells into nude mice and the targeting peptide was intraperitoneally injected every other day. The targeting peptide inhibited metastasis to the distant lymph node compared to the Scrambled peptide 41% less *in vivo*. Taken together, strategies to inhibit the VEGF-A/NRP1 signaling are promising for the creation of new cancer therapeutics.

2) Enhanced FGFR3IIIc expression is correlated with poor prognosis in human esophageal cancer patients and induces acquired resistance to cancer drugs.

5-year survival rate in esophageal cancer (EC) is 40%, indicating that EC has poor prognosis. Our laboratory has reported that the elevated expression of FGFR3 IIIc in EC patients is involved in the progression of malignant EC. In this study, clinical significance of the increased expression of FGFR3IIIc was examined by analyzing the correlation between FGFR3IIIc expression levels and clinical information of the EC patients. We obtained ESCC tissues from Kitano Hospital (20 patients) and performed the immunohistochemical (IHC) analysis using FGFR3IIIc isoform-specific polyclonal antibody (Yamasa Co., Cat#80131). We analyzed the relationship between FGFR3IIIc expression in EC and recurrence after surgery and overall survival of EC patients (n=20). We further investigated whether the expression of FGFR3IIIc in EC confers the increased resistance for

anticancer drugs. We tested IC50 to Cisplatin, Fluorouracil, or Docetaxel in EC cell line KYSE220 overexpressing FGFR3IIIc. Polyclonal anti-FGFR3IIIc antibody specifically recognized FGFR3IIIc in paraffin-embedded human ESCC from EC patients. The FGFR3IIIc expression levels in the EC were higher than those in the normal esophagus epithelium ($p < 0.01$). In addition, the ratio of FGFR3IIIc expression levels in the EC patients was negatively correlated with overall survival (OS) ($r = -0.436$). OS in the EC patients with higher expression levels of FGFR3IIIc was shorter than that in those with lower expression levels of FGFR3IIIc ($P < 0.01$). KYSE220 cells expressing FGFR3IIIc had higher IC50 for Fluorouracil and Docetaxel. In conclusion, FGFR3IIIc has the potential to be an important marker for the progression of malignant EC, suggesting that FGFR3IIIc is a molecular target for EC therapy. Further studies should be required to clarify the mechanism why FGFR3IIIc confers cancer drug-resistance in EC.

4. 論文, 著書など

Shimizu A, Zankov D P, Kurokawa-Seo M, Ogita H. Vascular endothelial growth factor exerts diverse cellular effects via small G proteins, Rho and Rap. *Int J Mol Sci*, (2018) 19(4). pii: E1203. doi: 10.3390/ijms19041203.

5. 学会発表など

太田成美、上野信洋、上田修吾、菖蒲池香奈、米倉寛人、神吉正太郎、瀬尾美鈴。食道がん細胞におけるFGFR3IIIc発現と抗がん剤耐性の獲得。第65回日本生化学会近畿支部例会、西宮市 2018.5.26 (口頭発表、ポスター発表)

Seo M, Yoshida A, Ueno N, Palashikar G, Hayata Y., Ohta N., Nagayasu R., Tochio R., Fukumitsu K., Nakanishi S., Yonekura H., Yamaguchi, A., Asano H., Kadonosono T., Kondoh S., et al. The cell-penetrating peptide blocking VEGF-A/NRP1 signaling inhibits cancer invasiveness and metastasis. 第41回分子生物学会年会、横浜市、2018.11.8 (ポスター発表)

6. その他特記事項

外部資金

1) 科学研究費補助金・基盤(C)

課題名: 食道がん悪性化における FGFR3IIIc の分子メカニズム解析

研究代表者: 瀬尾美鈴, 取得年度: H29-31 年

2) 科学研究費補助金・基盤(C)

課題名: フォスフォジエステラーゼ 3A 遺伝子は小児期の成長
と思春期発来に関与する遺伝子か?

研究分担者: 瀬尾美鈴, 取得年度: H30-32 年

3) 知財権等 なし

4) 学外活動 瀬尾美鈴: 日本生化学会評議員

日本生化学会男女共同参画推進委員

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

5) 受賞等 なし

6) 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 62 回
京都府発明等功労者の審査を行った。2018 年

交換留学生受け入れ: 平成 30 年度春学期

Mr. Raymond Abbott, Edith Cowan Univ., Australia

外国人特別生(大学院生)受け入れ: 2018 年 6 月 3 日から 8
月 15 日 Ms.Gargi Palashikar, Dept Chem Biomol Engineer.,
School of Engineer. Applied Sci., Univ. Pennsylvania,
U.S.A.

写真

(右上) 卒業式 (2019.3.17)

(右下) 栢尾君

(左上) アメリカペンシルバニア大学化学と生物分子工学専攻
大学院生 Gargi Palashikar さん(右側)とオーストラリアエディ
スコーワン大学交換留学生 Raymond Abbott 君(左側)、京都
瑠璃光院で撮影(2018.8.29.)

(左下) 研究室で Gargi さんと学生の交流



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

単純化すれば、生命活動は主にタンパク質が触媒する生化学的反応の集合体と見なすことができるが、タンパク質をはじめとする生体分子やエネルギー源を人為的に混ぜただけでは生命は誕生しない。他にも様々な要素が必要であり、例えば、生体分子の合成と配置の時空間制御も必要である。

当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置(局在化)の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスであり、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がる。加えて、我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止(アレスト)する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その合成量をリアルタイムに調整する役割を担っている。MifM の発見に先駆け共同研究者である伊藤維昭氏らが見出した大腸菌 SecM も、翻訳の途上で機能を発揮する因子のひとつである。それらの「働く翻訳途上鎖」の発見は、遺伝子の機能発現についての我々の理解を拡張するものであり、我々は、「翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象」にも着目している。その研究を通じて、「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。なお、千葉研究室は 2014 年 4 月に発足以来、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。本年報では、伊藤維昭氏の活動のうち、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) 枯草菌 MifM による翻訳アレスト機構の解明

枯草菌の調節性新生鎖である MifM は、翻訳の途上で、自身の翻訳伸長をアレストする。この翻訳アレストは、MifM の C 末端付近に存在する特定の amino 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ことが以前示されていた。今回、遺伝学的、生化学的解析から、MifM とリボソームとの相互作用が、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ものであることが示唆された(Fujiwara 2018 Sci. Rep.)。

(2) 新規翻訳アレスト因子の同定

真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子のうち 3 つ(SecM, MifM, VemP)は、タンパク質局在化装置をコードする遺伝子の 5' 側にコードされている。今回、400 種類以上の真正細菌のゲノム情報を網羅的に探索し、タンパク質局在化装置遺伝子の 5' 側にコードされている翻訳アレスト因子を、さらに 3 つ見出した。大腸菌、枯草菌の翻訳系を用いた遺伝学、生化学的解析から、これらはいずれも翻訳アレストを引き起こすことが示された。いずれも、ある特定のコードン 1 カ所で翻訳停止を引き起こすことも示された。変異解析から、それぞれのアレスト因子による翻訳アレストに重要な配列を同定した。興味深いことに、細菌の進化の過程でそれぞれ独立に生じたと思われるこれらのアレスト因子には、共通の amino 酸配列が見出された。このことの意味合いについて、解析を進めている。

(3) 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の新規基質の探索

枯草菌には、それぞれ SpoIIIJ、YidC2 と呼ばれる 2 つの YidC ホモログが存在する。枯草菌の YidC 経路で膜挿入されることが明確に示されている基質は、現在 MifM のみである。枯草菌における YidC 依存的タンパク質膜組込経路の重要性や生理的意義、分子機構を理解するために、枯草菌 YidC の新規基質を探索している。MifM の翻訳アレストモチーフを C 末端側に付加する事により、膜挿入を感知できる系を構築し、様々な枯草菌膜タンパク質の膜挿入における YidC 依存性を検証した。その結果、複数の SpoIIIJ 依存性を示す膜タンパク質を見出した。現在、さらに基質の探索を進めるとともに、これらの膜タンパク質が YidC のどのような機能に依存して膜挿入されるのか解析している。

3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM, which monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying this class of proteins called ‘regulatory nascent chains’, which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis on the ribosome. A remarkable property of this class of gene products is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those comprising the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the downstream target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, these regulatory nascent chains serve as a co-translational substrate of the protein localization pathway to be monitored, such that the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the effectiveness of the localization machinery under given conditions of the cell. Thus, these nascent chains represent unique biological sensors that enable real-time feedback regulation of the target machinery. 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 capacity of membrane protein biogenesis. As introduced above, 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 should 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) Extensive interactions between MifM and the ribosome contribute to 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. Our current analysis revealed that elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the MifM nascent polypeptide chain and the ribosomal components including those on the ribosomal external surface (Fujiwara 2018 Sci. Rep.).

2) Identification of novel translation arrest peptides in eubacteria

Three regulatory arrest peptides previously found in eubacteria (SecM, MifM and VemP) function as a cis-regulator of the protein translocation machinery. They are encoded by a gene that resides upstream of the gene that encodes possible target component of the protein translocation machinery. We searched for novel regulatory arrest peptides from more than 400 bacterial genome sequences, resulting in the establishment of three novel arrest peptides. We confirmed that they were able to stall *B. subtilis* or *E. coli* ribosomes at a single specific site of the coding sequence. Systematic mutagenesis allowed us to identify amino acid residues that are required for the arrest-provoking function of the nascent peptides. Interestingly, they seem to illuminate some common amino acid sequence features.

3) Identification of YidC substrates in *B. subtilis*

B. subtilis has two YidC homologs, SpoIIIJ and YidC2, but their substrates have not been identified, except for MifM, which is known to engage in either insertase function. To further understand the physiological roles and molecular mechanisms of the YidC pathways of membrane protein insertion in this bacterium, we are attempting at identifying novel YidC substrates. We use the translation arrest element of MifM followed by LacZ as a *cis* sensor of membrane insertion of membrane proteins predicted to span the membrane once or twice. So far, we have identified several putative YidC substrates.

4. 論文, 著書など

原著論文

Yura, T., Miyazaki, R., Fujiwara, K., Ito, K., Chiba, S., Mori, H. and Akiyama, Y. Heat shock transcription factor $\sigma(32)$ defective in membrane transport can be suppressed by transposon insertion into genes encoding a restriction enzyme subunit or a putative autotransporter in *Escherichia coli*. *Genes Genet Syst.* (2018) **93**, 229-235.

Fujiwara, K., Ito, K. and Chiba, S. MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome. *Sci Rep.* (2018) **8**, 10311.

英文総説

Ito, K., Mori, H. and Chiba, S.: Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. *FEMS Microbiol Lett.* (2018) **365**, 11.

日本語解説記事

田口英樹、茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭(2018) 終止コドンに依らず翻訳を途中終了させる酸性アミノ酸の連続配列。バイオサイエンスとインダストリー(B&I) **76**, 239-241.

千葉志信(2018) 調節性翻訳アレストペプチドによる細胞機能の制御。生化学 第90巻第2号, 147-157.

茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹(2018) 翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化とその生理的意義。実験医学 Vol. 36, No. 8(5月号)1364-1367.

伊藤維昭(2018) タンパク質を配置する細胞の仕組み。日本の科学者 **53**, 12-17.

伊藤維昭(2018) 蛋白質の居場所決定における生体膜への組み込み。医学のあゆみ **267**, 959-965.

5. 学会発表など

榎祐太郎、千葉志信: 枯草菌 EF-P 修飾酵素の同定とその重要性の解明。新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

向川結紀子、丹羽達也、田口英樹、藤原圭吾、千葉志信: 新生鎖-リボソームトンネル相互作用が枯草菌プロテオーム構成に果たす役割。新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

塩田成未、千葉志信: 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の新規基質の探索。新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifM の翻訳アレストを解除できるシス因子の探索と解除機構の解析。新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

Koreaki Ito: Dynamic translation entails nascent polypeptides as active players in gene regulation and protein biogenesis. Seminar at Academia Sinica. 2018.6.8 Taipei, Taiwan

Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Identification and characterization of novel translation-arrest peptides in bacteria. International symposium Proteins; from the cradle to the grave 2018. 8/26-8/29 滋賀県比叡山延暦寺会館

Koreaki Ito: Things that I am proud of, ...or rather trivial? International symposium Proteins; from the cradle to the grave 2018. 8/26-8/29 滋賀県比叡山延暦寺会館

千葉志信、崎山歌恋: 新規翻訳アレスト因子の探索。2018 年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議 2018. 8/31-9/1 KKR ホテル熱海

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: 枯草菌 MifM を利用したタンパク質動態の解析。2018 年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議。2018. 8/31-9/1 KKR ホテル熱海

Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Characterization of novel translation-arrest peptides encoded upstream of genes for protein localization machinery. CSHL meeting: Translational control 2018. 9/4-9/8 CSHL, NY, USA

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: 翻訳アレスト配列を用いた新生ポリペプチド鎖の動的挙動の解析。第 5 回リボソームミーティング 2018. 9/13-9/14 新潟大学中央図書館ライブラリーホール

Koreaki Ito, Hiroyuki Mori, Shinobu Chiba: Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. BACTERIAL PROTEIN EXPORT 2018. 2018. 9/30-10/3 Leuven, Belgium

Shinobu Chiba: Translation arrest as a universal mechanism of gene regulation of bacterial protein localization machineries. Seminar in University of Hamburg. 2018. 10/5 Hamburg, Germany.

Koreaki Ito: Real-time regulation by monitoring substrates and nascent chain handling of the ribosome. Seminar in University of Hamburg. 2018. 10/5 Hamburg, Germany

千葉志信: 新規調節性アレストペプチドの探索。Identification and characterization of novel regulatory arrest peptides. 第 41 回日本分子生物学会年会。2018. 11/28-11/30 パシフィコ横浜

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) 学外活動

千葉志信:タンパク質動態研究所・新学術領域「新生鎖の生物学」合同国際シンポジウム「Proteins; from the Cradle to the Grave」世話人

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

3) アウトリーチ活動

千葉志信、藤原圭吾:日本・アジア青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」(代表者:加藤啓子・京産大総合生命科学部教授)に協力 2018年7月24日-8月1日

千葉志信:模擬授業(常翔学園) 2018年7月9日



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、また、生命システム演習 IV において、専任教員と協力して教育活動を行っており、それらを通じて学部教育にも貢献している。さらに、アウトリーチ活動であるさくらサイエンスプランにおいても、海外からの短期留学生と学生との間の橋渡しや技術指導を行うなど、教育面で貢献した。

免疫糖鎖生物学研究室

Laboratory of Immunoglycobiology

1. 研究概要

1-1 MUC1 及び関連タンパク質による腫瘍悪性化

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。

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ー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。

Flag-tagged 野性型 Trop-2cDNA をヒト大腸癌由来細胞株、HCT116 細胞に導入した (HCT116/WT 細胞)。リン酸化 Trop 2 と非リン酸化 Trop 2 を区別する目的で、Trop 2 を N-グリカナーゼで消化後、phostag を含むゲルを用いた SDS-PAGE を行ったところ2つのバンドが検出され、一

教授 中田 博

Prof. Hiroshi Nakada, Ph. D.



助教 山下 智子

Assist. Prof. Tomoko Yamashita, Ph. D.

部の Trop 2 がリン酸化されていることがわかった。リン酸化部位を特定する目的で、303Ser あるいは 322Ser を Ala に変異した Trop 2 を発現する HCT116/S303A 細胞と HCT116/S322A 細胞を作成した。これらの細胞の Trop 2 のリン酸化を解析することにより、リン酸化部位は 322Ser であることがわかった。次いで、リン酸化 322Ser の負電荷が下流の生物学的イベントに関連すると想定し、リン酸化 322Ser をミミックして、Glu に変異した Trop 2 を発現する HCT116/S322E 細胞も作成した。HCT116/WT と HCT116/S322E は緩く結合し、その多くは繊維芽細胞様のスピンドル形をしていた。一方、HCT116/S322A と HCT116/Mock 細胞は強く結合し、シート状の形状をしていた。さらに、Trop 2 の誘導機構の解析とリン酸化酵素の同定を試みた。

2. 本年度の研究成果

2-1 MUC1 による Trop-2 の誘導

MUC1による腫瘍悪性化のメカニズムを明らかにする目的でヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞に MUC1 遺伝子を導入した MUC1 過剰発現細胞(HCT116/MUC1)を作成した。HCT116/MUC1 及び Mock 細胞(HCT116/ Mock)を用いて、DNA マイクロアレイを行い、これらの細胞で発現レベルの異なる mRNA を検索した。この中で Trop-2 は HCT116/MUC1 細胞において Mock 細胞と比較して 47 倍の mRNA が発現していることがわかった。ルシフェラーゼアッセイによって、Trop-2 のプロモーター活性を比較しても HCT116/MUC1 細胞において上昇が認められた。また、2つの細胞の免疫化学的染色によっても HCT116/MUC1 細胞における発現上昇が確認された。また、様々なヒト腫瘍組織において MUC1 と Trop-2 を免疫染色すると同様の分布を示すことがわかった。さらに、ヒト乳癌由来細胞株 MCF7 は内在性の MUC1 と Trop-2 を発現することをフローサイトメーターと免疫ブロットで確認した上で、本細胞を MUC1siRNA 処理することで、MUC1 の発現を低下させると Trop-2 の発現も低下し、Trop-2 の発現が MUC1 によって制御されていることが示唆された。

次に、Trop-2 発現に対する種々の転写阻害剤やキナーゼ阻害剤の効果を検討したところ、ミトラマイシン A (Sp1 阻害剤) のみに効果が認められた。ミトラマイシン A は濃度依存的に Trop-2 の発現を抑制した。従って、転写因子 Sp1 が Trop-2 の転写に関わっていることがわかった。また、

HCT116/MUC1 及び HCT116/Mock 細胞より、核画分を調製し、Sp1 のレベルを比較すると前者において高い Sp1 が検出された。MCF7 細胞においてもミトラマイシン A 処理あるいは Sp1siRNA による Sp1 のノックダウンにより Trop-2 の発現が抑制された。さらに、MCF7 細胞のライセートからの MUC1 免疫沈降物中に Sp1 が含まれることがわかり、Sp1 は MUC1 の細胞質側ペプチドにリクルートされていることが示唆された。

Trop-2 はホモフィリックな結合により細胞接着に関与していることも報告されていることから、MCF7 細胞を異なる細胞培養密度で培養し、Trop-2 の発現を比較した。高密度の培養によりより高い Trop-2 の発現がタンパク質及び mRNA レベルで確認された。MUC1 と共枕する Sp1 も細胞培養密度依存的に増加し、Sp1 が Trop-2 転写制御因子であることが示唆された。

ガレクチン-3 は MUC1 に結合することが知られているが、MCF7 細胞に発現する MUC1 にもガレクチン-3 が結合することをガレクチン-3-セファロースを用いて確認した。MCF7 細胞をガレクチン-3 で処理後、細胞のライセートより MUC1 を免疫沈降した。共枕した Sp1 はガレクチン-3 処理により増加し、処理後 30 分でピークとなった。従って、ガレクチン-3 の結合に伴い、Sp1 がリクルートされ、MUC1 を介したシグナル伝達を開始されるものと理解される。さらに、HCT116/MUC1 細胞において、ガレクチン-3 をノックダウンすると Trop-2 の発現が低下すること、同細胞をガレクチン-3 処理すると Trop-2 が回復することもわかった。このように、がん組織微小環境において、ガレクチン-3 の結合によってオートクライン/パラクライン的に惹起された MUC1 によるシグナル伝達が制御不能のがんの進展をもたらしていると考えられる。

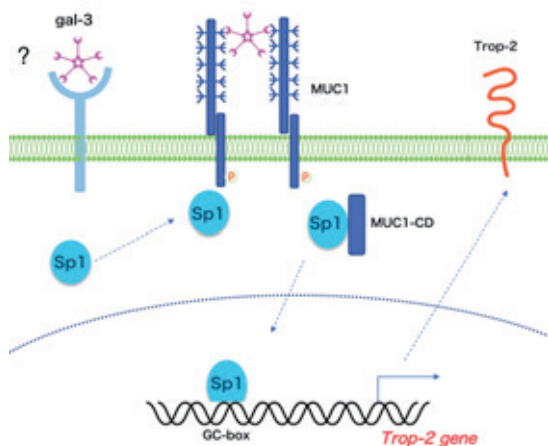


図 1 Trop 2 の誘導機構

2-2 Trop-2リン酸化酵素の同定

まず、リン酸化された Trop-2 の細胞質ペプチドを免疫原として抗リン酸化 Trop-2 抗体を調製した。抗体の特異性は免疫ブロットとプレートアッセイで検討した。HCT116/WT 細胞より免疫沈降した野性型 Trop-2 を Phostag-SDS-PAGE 後、免疫ブロットした。抗リン酸化 Trop-2 抗体はリン酸化 Trop-2 に反応したが、非リン酸化 Trop-2 には反応しなかった。また、リン酸化あるいは非リン酸化 Trop-2 ペプチドを固相化したプレートへの抗体の結合を調べるとリン酸化 Trop-2 のみへの結合が確認された。次に、HCT116/WT 細胞に発現している PKC と PKD のアイソフォームを DNA マイクロアレイにより調べた。複数のアイソフォーム、すなわち PKC α 、 δ 、 ϵ 、 η 、 ζ 、 τ 及び PKD2、3が発現していることがわかった。異なる特異性をもつ PKC 及び PKD 阻害剤の Trop-2リン酸化に対する阻害効果を調べた。HCT116/WT 細胞を様々な阻害剤存在下で培養後、さらに PMA で PKC を活性化し、ライセートを得た。Trop-2 を免疫沈降し、電気泳動、免疫ブロット後にリン酸化 Trop-2 を検出した。Trop-2 のリン酸化は阻害剤 BIM-1 及び Go6983 により効果的に阻害されたが、他の PKC 阻害剤、Go6976、Hispidin および HBDDE、PKD 阻害剤、CID755673 では、阻害は認められなかった。また、他のキナーゼ阻害剤、LY294002 (PI3K 阻害剤)、SB203580 (p38MAPK 阻害剤)、PD98059 (MEK1/2 阻害剤)、SP600125 (JNK1/2/3 阻害剤)でも Trop-2 のリン酸化は阻害されなかった。この DNA マイクロアレイの結果と阻害剤の効果から、予想される PKC 及び PKD を対象に siRNA によるノックダウンによる効果を調べた。その結果、PKC α と PKC δ のノックダウンが最も Trop-2 のリン酸化を抑制することがわかった。しかしながら、個々の PKC のノックダウンではかなりの Trop-2 リン酸化活性が残存した。従って、複数の PKC が協同して Trop-2 をリン酸化していることが予想された。実際、PKC α と PKC δ の両方の酵素発現をノックダウンすることにより、Trop-2 のリン酸化がほぼ完全に抑制された。

3. Research projects and annual report

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 a 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.

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 its biological function.

Flag-tagged wild-type Trop 2 cDNA was introduced into human colorectal cancer cell line, HCT116 cells (HCT116/WT cell). To distinguish phosphorylated Trop 2 from nonphosphorylated Trop 2, N-Glycanase-treated Trop 2 was subjected to SDS-PAGE using phostag-containing acrylamide gel, followed by western blotting. Two bands were clearly detected, indicating the phosphorylation of Trop 2 in HCT116/WT cells. To determine the phosphorylation site, mutated Trop 2 with Ala instead of Ser³⁰³ or Ser³²² was generated using a site-directed mutagenesis, and expressed in HCT116 cells (HCT116/S303A, HCT116/S322A). Analyses of mutated Trop 2 revealed that Ser³²² residue was phosphorylated.

Furthermore, we speculated that negative charge of the phosphorylated Ser³²² residue might be relevant to the downstream event. Thus, we prepared Trop 2 mutated with Glu instead of Ser³²² residue in order to mimic Trop 2 with negative charge on 322 amino acid (HCT116/S322E). HCT116/WT and HCT116/S322E cells contacted loosely, many of which showed fibroblastic-spindle shape, whereas HCT116/S322A and HCT116/Mock cells showed tightly associated sheet-like shape. Furthermore, we tried to analyze the mechanism of Trop-2 induction and identify the enzyme to phosphorylate Trop-2.

1) MUC1-dependent induction of Trop-2

To determine how MUC1 induces tumor progression, we generated MUC1-overexpressing cells by introducing human MUC1cDNA into a human colon cancer cell line, HCT116 cells (HCT116/MUC1), and performed microarray analysis of mRNA using HCT116/MUC1 and HCT116 Mock cells to identify the differently expressed mRNA in these cells. Among some genes that were differently expressed in the two types of cells, we focused on that of Trop-2, the expression of which was elevated about 47 -fold in HCT116/MUC1 cells as compared with in HCT116/Mock cells. To confirm the induction of Trop-2 in HCT116/MUC1 cells, we performed luciferase assay. Trop-2 transcriptional activity was enhanced in HCT116/MUC1 cells as compared with in HCT116/Mock cells. Furthermore, increased expression of Trop-2 in HCT116/MUC1 cells was observed by immunostaining.

To further investigate the distribution of Trop-2 and MUC1, human tumor tissues were immunostained with anti-Trop-2 and anti-MUC1-ND antibodies. Expectedly, the distribution of Trop-2 coincided with that of MUC1 in tumor tissues. Relationship between MUC1 and Trop-2 was also investigated by using a human breast cancer cell line, MCF-7 cells.

Expression of endogenous MUC1 and Trop-2 in MCF-7 cells was confirmed by flow cytometry and Western blotting. When MCF-7 cells were treated with MUC1 siRNA, expression of Trop-2 was down-modulated in relation to the decrease of MUC1. These results indicate that MUC1 is involved in the induction of Trop-2 expression. Next, to investigate what kind of transcription factors and protein kinase are involved in the regulation of Trop-2 expression, we tried to examine the effect of various transcriptional inhibitors such as mithramycin (Spl

inhibitor), JSH(NF- κ B inhibitor) and PNU-74654 (β -catenin inhibitor), and kinase inhibitors such as PP2 (Src inhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor) on Trop-2 expression in HCT116/MUC1 cells. HCT116/MUC1 cells were treated with these inhibitors, and the cell lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting and detection. These inhibitors except for mithramycin A showed no effect on Trop-2 expression. Mithramycin A reduced the expression of Trop-2 in a dose dependent manner, suggesting that a transcriptional factor, specificity protein 1 (Sp1), may be involved in the regulation of Trop-2 transcription. Level of Sp1 in nuclear fraction was compared between HCT116/MUC1 and HCT116/Mock cells. Proteins in nuclear fraction were subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting. Higher level of Sp1 in the nuclear fraction of HCT116/MUC1 cells was detected compared with that of HCT116/Mock cells. Expression of Trop-2 in MCF-7 cells was clearly decreased by the treatment with mithramycin A and knockdown of Sp1. Next, to investigate the correlation between MUC1 and Sp1, coimmunoprecipitation assay was performed. MUC1 was immunoprecipitated from the lysate of MCF-7 cells, and subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting and detection of MUC1-CD and Sp1. Sp1 was coimmunoprecipitated with MUC1, suggesting that Sp1 may be recruited to MUC1-CD. These results suggest that complex formation of MUC1 and Sp1 may play a role in the induction of Trop-2.

Trop-2 belongs to the tumor-associated calcium signal transducer (*TACSTD*) gene family that has a regulatory role in cell-cell adhesion. Thus, we compared the level of Trop-2 expressed in MCF-7 cells cultured under different cell density conditions. Higher expression of Trop-2 protein and mRNA in MCF-7 cells cultured under high cell density condition was observed compared with that in MCF-7 cells cultured under low cell density condition. Furthermore, MUC1 was immunoprecipitated from each cell lysate, and subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting. Coimmunoprecipitated Sp1 was also increased in a cell density dependent manner, suggesting that Sp1 is a transcriptional factor of Trop-2.

It has been reported that MUC1 is a natural receptor for endogenous galectin-3 and the binding of galectin-3 to MUC1 gives rise to some biological effects. Lysates of MCF-7 cells were incubated with galectin-3-Sepharose and bound proteins were subjected to SDS-PAGE, followed by

Western blotting and detection. MUC1-ND and -CD were detected in the proteins bound to galectin-3 in the absence of lactose but not in those in the presence of lactose. MCF-7 cells were incubated with galectin-3 for 30 and 60 min, and then solubilized. MUC1 was immunoprecipitated from the cell lysate with anti-MUC1-ND antibody, and subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting and detection of Sp1 and MUC1-CD. Recruitment of Sp1 to MUC1 clearly increased at 30 min after the binding of galectin-3 to MUC1, indicating that galectin-3 initiates MUC1-mediated signaling to lead the induction of Trop-2. We also tried the silencing of galectin-3 in HCT116/MUC1 cells by using galectin-3 shRNA and established HCT116/MUC1-Gal-3/Si cells. The level of Trop-2 in HCT116/MUC1-Gal-3/Si cells was estimated by DNA microarray analysis and SDS-PAGE. Trop-2 mRNA and protein were reduced by the knockdown of galectin-3. Conversely, treatment of this cell with galectin-3 increased the expression of Trop-2, suggesting that galectin-3 up-regulates the expression of Trop-2.

Thus, in tumor microenvironment, constitutive activation of MUC1-mediated signaling in an autocrine/paracrine manner caused by ligation of galectin-3 promotes uncontrolled tumor cell malignancy.

2) Identification of enzymes to phosphorylate Trop-2

First, we prepared an anti-phosphorylated Trop-2 antibody by using the phosphorylated peptide of the Trop-2 cytoplasmic domain as an immunogen. The specificity of the antibodies was examined by immunoblotting and plate assays. Wild-type Trop-2 prepared from HCT116/WT cells was subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting. The anti-phosphorylated Trop-2 antibodies bound to the phosphorylated Trop-2 but not to unphosphorylated Trop-2. Furthermore, phosphorylated and unphosphorylated Trop-2 cytoplasmic peptides were adsorbed to the plate, and incubated with the anti-phosphorylated Trop-2 antibodies. The antibodies bound only to the phosphorylated Trop-2 peptide.

Next, we investigated which PKC and PKD isoforms are expressed in HCT116/WT cells. DNA microarray analysis revealed the presence of multiple isoforms including one classical (PKC α), three novel (PKC δ , ϵ , η) and two atypical (PKC ζ , ι) isoenzymes, and PKD2, 3. Furthermore, PKC inhibitors with different subclass specificities and a PKD inhibitor were used to determine which PKCs and/or

PKDs are responsible for Trop-2 phosphorylation. Elevated phosphorylation of Trop-2 by treatment with PMA was effectively inhibited by BIM-I and Gö6983, which are inhibitors of both classical and novel PKCs, whereas other PKC inhibitors, Gö6976, Hispidin, and HBDDE, and a PKD inhibitor, CID755673, had no effect on Trop-2 phosphorylation. In addition, other kinase inhibitors, LY294002 (phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor), SB203580 (p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) inhibitor), PD98059 (MAPK kinase 1/2 (MEK1/2) inhibitor), and SP600125 (c-Jun N-terminal kinase 1/2/3 (JNK1/2/3) inhibitor), did not inhibit Trop-2 phosphorylation at all.

Based on the results of DNA microarray analysis and the effects of pharmacological PKC and PKD inhibitors on Trop-2 phosphorylation, knockdown of relevant PKCs and PKDs which might phosphorylate Trop-2 in HCT116/WT cells was performed by using PKC or PKD isoform-specific siRNAs. It was revealed that knockdown of PKC α or PKC δ was most effective in reducing the phosphorylation of Trop-2, but considerable activity of Trop-2 phosphorylation remained even after the knockdown of individual PKCs, suggesting that Trop-2 may be phosphorylated by multiple PKCs, and that the activity may be retained due to compensation by other PKCs. Furthermore, we tried to examine the inhibitory effect on Trop-2 phosphorylation with various combinations of PKC knockdown. It was demonstrated that knockdown of both PKC α and PKC δ abolished the phosphorylation of Trop-2 almost completely.

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 株式会社カネカとの委託研究開発
課題名: ガレクチン-3 阻害剤の評価系の検証
- 2) 知財権等 特許出願
癌転移抑制剤、及び癌転移抑制剤候補物質の選抜方法
- 3) 学外活動
中田 博: 徳島大学非常権講師
NEDO ビアレビューアー
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

7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

支援制度による助教の活動は、学部ゼミ生(基礎特研、応用特研)や大学院生の教育研究に大いにいかされている。研究を通じて教育をする立場より、研究という枠に止まらず一般的な問題解決能力の涵養などに効果的である。学部生の大学院進学はその成果の具体的目安の1つとも言えるが、2期目の本制度で6名(本学)、2名(他大学)(定年に伴い、昨年より大学院募集は停止)が大学院に進学した。

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、従来4つの主要なプロジェクトについて研究を進めてきた。そのうち、博士研究員であった山本洋平をヘッドとして進めてきた、新規遺伝子 ERdj8 によるオートファゴソームのサイズの調節機構の研究は、山本が大阪大学歯学部助教として採用されたことから、現在も共同研究を進め、これまでの成果は論文の revise 中であるが、本研究テーマからは外している。以下の3つのテーマについては、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た。

1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 は 1986 年、永田らによって発見された新規タンパク質であり、コラーゲン合成において必須の役割を果たしている。その後の研究から、Hsp47 はまた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。Hsp47 阻害剤の探索を行い、得られた Hsp47 阻害化合物の一部について論文を発表した(*JBC* 2017)。現在、より阻害効果の高い阻害化合物を探索し臨床応用を目指している。このプロジェクトは製薬会社と産業技術総合研究所らとの共同研究に発

展し、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 (ACT-M) に採択され、精力的に研究が進められている。またドイツの製薬会社とのあいだのライセンス契約の締結に向けて準備が進んでいる。本研究は、博士研究員の伊藤進也をヘッドとした研究チームによってなされている。

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

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)。この過程で潮田らにより、2008 年に ERdj5 という還元酵素が発見され、ミスフォールドタンパク質の品質管理機構において重要な役割を果たしていることをすでに報告してきた (*Science* 2008, *Mol. Cell* 2011 など)。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 (*PNAS* 2016)。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。小胞体はよく知られたように酸化的環境下にあるが、この酸化的環境において ERdj5 が還元活性を発揮するためには、何らかの方法によって還元力を得なければならない。言い方を変えれば、電子はどのようにして ERdj5 に伝達されるのか、小胞体はどのようにしてサイトゾルから電子を得ているのか、が避けて通れない大きな問題となる。これは小胞体というオルガネラに残された細胞生物学上の最大の謎の一つでもある。本研究室では潮田亮助教を中心としたチームによって、従来知られてきたのとはまったく異なる新たな方法によって、小胞体に電子が供給されているメカニズムを明らかにしつつある。

3) もやもや病責任遺伝子ミステリンの機能解析

もやもや病は東アジア地域に多い重篤な脳血管疾患であり、一部に家族性の発症を認める。我々はもやもや病の責任遺伝子ミステリンをクローニングし (*PLOS ONE*, 2011)、生理・病態機能の解明を目指して、解析を続けてきた。これまで、ミステリンタンパク質が 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、USP15 による正の制御を受けることなどを明らかにして

きた (*Sci Rep* 2014, 2015, 2017)。さらに最近、ミステリンが脂肪貯蔵の制御因子であり、もやもや病責任変異によりこの機能が障害されることをつきとめた (*J Cell Biol*, in press)。これまでももやもや病と脂質代謝の関連についてほとんど議論されたことがなく、ミステリンが脂肪滴蓄積の制御因子であったことは驚くべき新展開であると言える。本研究は森戸大介主任研究員のチームによって行われてきた。森戸研究員は、平成30年度より、昭和大学医学部講師として新たな活動の場を得、引き続き本研究室との共同研究を進めている。

2. 本年度の研究成果

1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

Hsp47 は小胞体に局在し、コラーゲン生合成に必須の分子シャペロンとして、我々が発見してから長年研究を続けてきたタンパク質であるが、近年コラーゲン以外のタンパク質にも結合し、コラーゲンの分泌に関与することが示唆されている (Ishikawa et al, *PNAS*, 2016)。新規結合パートナーを含む Hsp47 の最新のトピックを総説として報告した (Ito S and Nagata K *J Biol Chem*. in press)。

Hsp47 はコラーゲンの異常蓄積を特徴とする線維化疾患の増悪因子ともなり、Hsp47 の発現を抑制すると線維化が抑制されることから、有望な分子標的とされてきた。我々は Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害する低分子化合物の探索を行い、詳細な解析の後、得られた Hsp47 阻害化合物の一部について特許を取得し、既に論文として発表している (Ito S et al, *J Biol Chem*. 2017)。今年度は、生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) 法を用いて、この阻害剤が確かに小胞体内で Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害していることを示した。これまで、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を細胞内で検出するには、その結合解離定数からクロスリンカーを用いて結合を固定する必要があり、結合解離が不可逆的になることから、相互作用阻害剤の評価が難しかった。BRET 法は近接するタンパク質間相互作用をエネルギー転移で見積もるため、正しい結合解離を捕らえることができる。BRET 法による Hsp47-コラーゲン間小胞体内相互作用の検出に成功し、阻害剤の効果を評価した (論文投稿中)。この方法により、より有望な化合物の探索を行っている。

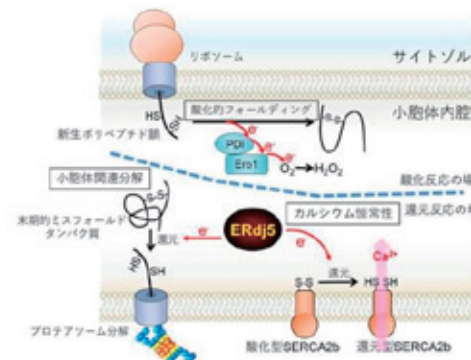
Hsp47 阻害剤プロジェクトは製薬企業及び産業技術総合研究所との共同研究に発展し、日本医療研究開発機構 (AMED) 産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-M) に採択され、臨床応用に向け、*in vitro* での構造活性相関、*in cell* での阻害能評価及び *in vivo* での薬効評価を総合しながら、研究が進められている。

(文責: 伊藤)

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

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。我々は小胞体でジスルフィド還元活性に特化した還元酵素 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 は小胞体でミスfold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)。東北大学の稲葉教授らとの共同研究において SERCA2b の結晶構造が解明に成功しており (Inoue *et al.*, *Cell Rep.* in press)、今後、詳細なポンプ活性化メカニズム解明が期待される。現在進行中のカルシウム制御として、ERdj5 がカルシウムチャネル IP3 受容体の活性をレドックス依存的に制御することも見い出しており、ポンプとチャネルを ERdj5 の還元活性を介して、reciprocal にかつ合目的的に制御するという、極めて巧妙な制御機構を明らかにしつつある。また、ERdj5 の還元メカニズムに関して、新生鎖を電子ドナーとする全く新しいメカニズムを明らかにし、現在、論文投稿準備中



これまで、小胞体はEro1-PDIを中心とした酸化反応の場として捉えられていたが、還元酵素ERdj5の発見により、ジスルフィド還元反応が「タンパク質品質管理」、「カルシウム制御」を含む小胞体恒常性にとって非常に重要であるということが明らかになった。

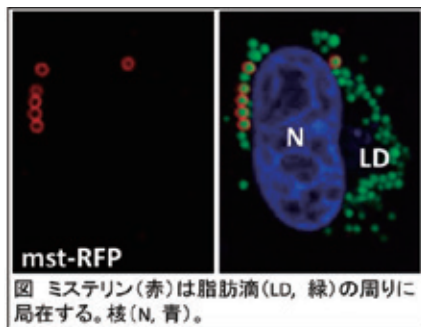
である。

(文責：潮田)

3) もやもや病責任遺伝子ミスチリンの機能解析

ミスチリンの酵素活性(ATPアーゼ/ユビキチンリガーゼ)、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、ミスチリンの細胞内局在について詳細な解析を行い、ミスチリンが中性脂肪の貯蔵サイトである脂肪滴に局在し、脂肪分解を負に制御する因子であることを明らかにした(Sugihara et al., *J. Cell Biol.* 2019)。ミスチリンの局在・機能はユビキチンリガーゼドメイン内のもやもや病原因変異により顕著に障害されていた。

(文責：森戸)



3. Research projects and annual reports

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

1: Functional analysis of collagen-specific molecular chaperone Hsp47. A collagen-specific molecular chaperone Hsp47 localizes in the endoplasmic reticulum (ER) and has essential role for collagen synthesis in vertebrate. Recently, several new binding partners of Hsp47 were identified, they may co-work with Hsp47 in collagen synthesis in the ER. We summarized such recent topics of Hsp47 as a mini-review in *J Biol Chem* (Ito S and Nagata K *J Biol Chem.* in press).

Hsp47 could be a promising target for the management of fibrosis. We screened small-molecule compounds that inhibit the interaction of Hsp47 with collagen from chemical libraries and found that a molecule Col003 competitively inhibited the interaction and caused the inhibition of collagen secretion (Ito S et al, *J Biol Chem.* 2017).

We are developing new screening systems and are searching for more effective Hsp47 inhibitor. Herein, we established a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system for assessing Hsp47-collagen interaction

dynamics within the ER. After optimization and validation of the method, inhibition of the interaction between Hsp47 and collagen by a small molecule (Col003) was demonstrated for the first time in the ER. Using the BRET system, we found that Hsp47 interacts not only with (Gly-Pro-Arg) but also weakly with (Gly-Pro-Hyp) motifs of triple helical collagen in cells. This method can provide valuable information on PPIs between Hsp47 and collagen, and the effects of PPI inhibitors important for the treatment of fibrotic disorders (*under submission*). We are searching for more promising compounds by this method.

The project of Hsp47 inhibitor has developed into collaborating research with pharmaceutical companies and the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), and was adopted by ACceleration Transformative research for Medical Innovation (ACT-M) of Japan Agency for Medical Research and Development (AMED). Aiming for clinical application, our research on Hsp47-collagen interaction also integrates *in vitro* structure-activity relationship, in-cell inhibitory activity evaluation and *in vivo* efficacy evaluation.

2: Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and Ca²⁺ flux. We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in the 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 facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by the 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 SERCA2b, a Ca²⁺ pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2b. It suggests that redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca²⁺ homeostasis in the ER (R. Ushioda *et al.*, *PNAS* 2016). Furthermore, Inaba group (Tohoku Univ.) and we elucidated the structure of SERCA2b (Inoue et al. *Cell Rep.* 2019). This information may help to understand the activation mechanism of SERCA2b pump through ERdj5. On the other hand, we have revealed the mechanism of the electron transfer to ERdj5 from the nascent chain.

3: 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 and pathological functions in cells remain 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). Moreover, we recently identified its significant involvement in lipid metabolism in cells. This function is largely impaired by moyamoya disease mutations (Sugihara, *Morito et al., *J Cell Biol*, in press).

4. 論文、著書など

S. Ito, M. Saito, M. Yoshida, K. Takeuchi, T. Doi & K. Nagata: A BRET-based assay reveals collagen-Hsp47 interaction dynamics in the endoplasmic reticulum and small-molecule inhibition of this interaction. *J Biol. Chem.* in press

M. Yoshida, M. Saito, S. Ito, K. Ogawa, N. Goshima, K. Nagata & T. Doi: Structure-Activity Relationship Study on Col-003, a Protein-Protein Interaction Inhibitor between Collagen and Hsp47. *Chem. Pharm. Bull.* in press

S. Ito & K. Nagata: Roles of the endoplasmic reticulum-resident, collagen-specific molecular chaperone Hsp47 in vertebrate cells and human disease. *J Biol. Chem.* In press

R. Ushioda & K. Nagata: Redox-Mediated Regulatory Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* "Protein Homeostasis SECOND EDITION" Cold Spring Harbor Laboratory press in press

M. Inoue, N. Sakuta, S. Watanabe, Y. Zhang, K. Yoshikaie, R. Ushioda, Y. Kato, J. Takeda, T. Tsukazaki, K. Nagata & K. Inaba: Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay. *Cell Rep.* in press

M. Sugihara, D. Morito, S. Ainuki, Y. Hirano, K. Ogino, A. Kitamura, H. Hirata & K. Nagata: The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin cytoplasmic lipid droplets *J. Cell. Biol.* in press

S. Hirayama, M. Sugihara, D. Morito, S. Iemura, T. Natsume, K. Nagata: Nuclear export of ubiquitinated proteins via the

UBIN-POST system *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115(18): E4199-4208 (2018)

P. Sasikumar, K.S. AlOuda, W.J. Kaiser, L.M. Holbrook, N.Kriek, A.J. Unsworth, AP. Bye, T. Sage, R. Ushioda, K. Nagata, R.W. Farndale, J.M. Gibbins: The chaperone protein HSP47: a platelet collagen binding protein that contributes to thrombosis and hemostasis *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 16: 1-14 (2018)

C. Caba, Hyder A. Khan, J. Auld, R. Ushioda, K. Araki, K. Nagata, B. Mutus: Conserved Residues Lys57 and Lys401 of Protein Disulfide Isomerase Maintain an Active Site Conformation for Optimal Activity: Implications for Post-translational Regulation *Frontiers in Molecular Biosciences* 10:3389 (2018)

A. Kitamura, Y. Ishida, H. Kubota, CG. Pack, T. Homma, S. Ito, K. Araki, M. Kinjo, K. Nagata: Detection of substrate binding of a collagen-specific molecular chaperone HSP47 in solution using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 497:279-284 (2018)

D. Sepulveda, D. Rojas-Rivera, DA. Rodriguez, J. Groenendyk, A. Köhler, C. Lebeaupin, S. Ito, H. Urra, A. Carreras-Sureda, Y. Hazari, M. Vasseur-Cognet, MMU. Ali, E. Chevet, G. Campos, P. Godoy, T. Vaisar, B. Bailly-Maitre, K. Nagata, M. Michalak, J. Sierralta, C. Hetz.: Interactome Screening Identifies the ER Luminal Chaperone Hsp47 as a Regulator of the Unfolded Protein Response Transducer IRE1 α . *Mol Cell.*, 69:238-252 (2018)

伊藤進也、永田和宏: Hsp47 (コラーゲン特異的分子シャペロン) —線維化治療の標的因子として。医学のあゆみ「蛋白質代謝医学—構造・機能の研究から臨床応用まで」(医歯薬出版) Vol.267, No13, p.941-947 (2018)

潮田亮: 蛋白質品質管理のための小胞体関連分解。医学のあゆみ「蛋白質代謝医学—構造・機能の研究から臨床応用まで」(医歯薬出版) Vol.267, No13, p.1034-1040

潮田亮: レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明。実験医学増刊号(羊土社) p79-86 (2018)

森戸大介: ミステリン—もやもや病の責任遺伝子産物。医学のあゆみ「蛋白質代謝医学—構造・機能の研究から臨床応用まで」(医歯薬出版) Vol.267, No13, p.1105-1110 (2018)

永田和宏、梶島健治: 鍛えよ、知の体力を。週刊医学界新聞(医学書院) 第3297号 (2018)

永田和宏: Cell Stress and Proteostasis Dysfunction in Aging and Disease. ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム 30th ニュースレター(医学書院) p.13-15 (2018)

5. 学会発表など

招待講演

永田和宏：細胞内ストレス防御の分子機構. 新学術領域研究「予防を科学する炎症細胞社会学」公開シンポジウム、東京都、2018.02.09

Kazuhiro Nagata : Role of ER J protein for the maintenance of ER homeostasis. International workshop of CSSI, Gdansk (Poland), 2018.4.6

Kazuhiro Nagata : Redox-mediated regulation of ER homeostasis. Cold Spring Harbor Meeting “Protein Homeostasis in Health and Disease”, Cold Spring Harbor(USA), 2018.4.20

永田和宏：タンパク質品質管理機構の破綻：加齢と病態. 第60回日本老年医学会学術集会特別講演、京都市、2018.06.14

Kazuhiro Nagata : ERdj5 as a master regulator of the ER homeostasis: crosstalk of Ca²⁺ and redox homeostasis. FASEB Meeting “Protein Research Conferences”, Bonaventure(USA), 2018.07.28

Kazuhiro Nagata : Nascent polypeptide as a source of reductive power in the ER. International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27

学会発表

森戸大介：Physiological and pathological functions of moyamoya disease-associated gene *mysterin*. 第327回熊本大学発生医学研究所セミナー、熊本市、2018.1.31（口頭発表）

潮田亮：ジスルフィド還元酵素による小胞体恒常性維持機構の解明. 第1回ユビキチン研究会、東京、2018.01.19（口頭発表）

葛西綾乃、山本洋平、瀧野友愛、杉原宗親、上田洋行、梅本哲雄、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、八田知久、Richard I. Morimoto、夏目徹、荒井律子、和栗聡、吉森保、Shoshana Bar-Nun、永田和宏：Turnover of ERdj8 through the endoplasmic reticulum associated degradation regulates the size of autophagosomes. 第1回ユビキチン研究会、東京都、2018.01.18（口頭発表）

Ryo Ushioda : Maintenance of ER Homeostasis through Disulfide Reductase ERdj5. 東京工業大学化学生命科学研究国際フォーラム、東京都、2018.03.5（口頭発表）

Ryo Ushioda : Maintenance of ER homeostasis through disulfide reductase ERdj5. International workshop of CSSI, Gdansk (Poland), 2018.4.6

Daisuke Morito : Structure and Function of AAA+

ATPase/ubiquitin ligase *mysterin*. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Kyoto, 2018.04.22-26

潮田亮：小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の還元ドナーの探索. 平成30年度生理学研究所研究会、岡崎市、2018.04.26（口頭発表）

山下龍志、潮田亮、永田和宏：小胞体還元酵素 ERdj5 の欠損はミトコンドリアの断裂を引き起こす. 平成30年度生理学研究所研究会、岡崎市、2018.04.26（ポスター優秀発表賞）

藤井唱平、潮田亮、永田和宏：レドックス依存的な小胞体カルシウムチャネルの動態解析. 新学術研究「新生鎖の生物学」第5回若手ワークショップ、蔵王市、2018.05.14-15

上垣日育、潮田亮、永田和宏：新生鎖による小胞体還元力導入機構の解明. 新学術研究「新生鎖の生物学」第5回若手ワークショップ、蔵王市、2018.05.14-15

葛西綾乃、永田和宏：小胞体ミスフォールドタンパク質の選択的オートファジー分解. 第70回日本細胞生物学会、第51回日本発生生物学会合同大会、東京都、2018.06.05-08

伊藤進也：コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析. 京都バイオ計測センター研究交流発表会、京都市、2018.06.21（口頭発表）

伊藤進也、永田和宏：小胞体内におけるコラーゲンとその特異的分子シャペロン間の相互作用の検出と阻害. 第18回日本蛋白質科学会年会、新潟市、2018.06.26-28

Ayano Kasai, Yo-hei Yamamoto, Tomoe Takino, Richard I. Morimoto, Miyuki Sato, Ken Sato and Kazuhiro Nagata : Physiological role of a novel ER membrane protein, ERdj8, which determines the size of autophagy. FASEB Meeting “Protein Research Conferences”, Bonaventure(USA), 2018.07.22-27

Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : Deficiency of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology. FASEB Meeting “Protein Research Conferences”, Bonaventure(USA), 2018.07.22-27

Ryo Ushioda, Kaiku Uegaki, Kazuhiro Nagata : Nascent chain as Electron donor for disulfide reductase in the ER. International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27-29

Daisuke Morito, Shiori Ainuki, Munechika Sugihara and Kazuhiro Nagata : The unique AAA+ ATPase/ubiquitin ligase *mysterin* is involved in the cellular fat metabolism. International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27-29

Shinya Ito, Koji Ogawa, Koh Takeuchi, Masahito Yoshida, Takatsugu Hirakawa, Takayuki Doi, Naoki Goshima, Tohru Natsume and Kazuhiro Nagata : A small-molecule compound inhibits a collagen- specific molecular chaperone Hsp47 and could represent a potential remedy for fibrosis International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27-29

Shohei Fujii, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Distinct cysteine pairs contribute to assembly and regulation of ins(1,4,5)P3 receptors International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27-29

Chika Tsutsumi, Kaiku Uegaki, Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Zinc-dependent functional switching of ERp18, a novel ER thioredoxin. International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27-29

Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Deficiency of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27-29

Shiori Ainuki, Daisuke Morito, Munechika Sugihara and Kazuhiro Nagata : Regulation of lipid metabolism by 591 kDa AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, and its impairment by moyamoya disease mutations International Symposium “Proteins:from the Cradle to the Grave”, Hieizan, 2018.08.27-29

Shohei Fujii, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Distinct cysteine pairs contribute to assembly and regulation of ins(1,4,5)P3 receptors. The 15th International Meeting of the European Calcium Society, Hamburg, 2019.9.10-13

Shinya Ito, Kazuhiro Nagata : Collagen-specific molecular chaperone Hsp47 would be a therapeutic target for fibrotic diseases. 19th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism, Kyoto, 2018.09.11

山下龍志、潮田亮、永田和宏 : Deficiency of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology. 線虫研究の未来を考える会、三島市、2018.09.14-15

伊藤進也、永田和宏 : コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能制御. 第 13 回小胞体ストレス研究会、宮崎市、2018.11.16-17 (口頭発表)

潮田亮、上垣日育、永田和宏 : 酸化的環境で還元反応の場を提供する新生鎖の役割. 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜市、2018.11.28-30

6. その他特記事項

1) 外部資金

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

課題名：小胞体恒常性維持機構：Redox, Ca²⁺, タンパク質品質管理のクロストーク、研究代表者：永田和宏、取得年度：2013-2018 年

科学研究費補助金・基盤研究 A

課題名：小胞体における活性酸素除去に関わる新たな分子機構の解明、研究代表者：永田和宏、取得年度：2018-2021 年

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・基本スキーム（ACT-M）

課題名：コラーゲン分泌阻害低分子による抗線維化薬、研究代表者：永田和宏、取得年度：2018-2020 年

武田科学振興財団・特定研究助成 [I]

課題名：細胞機能発現制御におけるオルガネラ恒常性とクロストークの重要性、研究代表者：永田和宏、取得年度：2015-2018 年

資生堂

研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2019 年

大塚製薬

研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2018 年

バイエル薬品

研究代表者：永田和宏、取得年度：2018 年

科学研究費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」

課題名：新生鎖による小胞体レドックス制御－新生鎖による還元力の獲得、研究代表者：潮田亮、取得年度：2017-2018 年

科学研究費補助金・新学術領域「細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解読」

課題名：レドックスゾーンで切り拓く小胞体恒常性維持、研究代表者：潮田亮、取得年度：2018-2019 年

科学研究費補助金・基盤研究 C

課題名：レドックス制御によるカルシウム恒常性維持機構、研究代表者：潮田亮、取得年度：2018-2020 年

加藤記念バイオサイエンス振興財団

課題名：小胞体における還元ネットワークの構築とその制御、研究代表者：潮田亮、取得年度：2018-2019年

東北大学 CORE ラボ共同研究

課題名：レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明、研究代表者：潮田亮、取得年度：2018年

科学研究費補助金・若手研究

課題名：タンパク質間相互作用の新規 in vivo 検出法、研究代表者：伊藤進也、取得年度：2018-2019年

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の還元メカニズムの還元、研究代表者：上垣日育、取得年度：2017-2019年

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：TMX4 を中心とする小胞体膜近傍での還元ネットワークの解明、研究代表者：堤智香、取得年度：2018-2020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：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「ケモテクノロジーが拓くユビキチンフロンティア」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：文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「予防を科学する炎症細胞社会学」外部評価委員

永田和宏：ロレアル-ユネスコ女性科学者日本奨励賞 審査員

永田和宏：安田記念医学財団 理事

永田和宏：大隅基礎科学創成財団 評議員

永田和宏：生命誌研究館 顧問

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

Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : Deficiency of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology. FASEB Meeting “Protein Research Conferences”, Bonaventure(USA), 2018.07.22-27 (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

ゴルジ体は、分泌経路の中央に位置する細胞小器官であり、小胞体で新規合成されたタンパク質を受け取り、糖鎖や硫酸基の付加やペプチド鎖の切断などの修飾を行い、リソソームや細胞膜などの目的地に応じて選別し発送する機能を担っている。ゴルジ体の存在と機能は、単細胞の酵母や原生動物から、多細胞の植物・動物までほとんどの真核生物に保存されている。ゴルジ体は、囊あるいは槽と呼ばれるリン脂質二重層で覆われた袋状の構造物であり、ほとんどの脊椎動物や高等植物では、扁平な形状の槽が積み重なった層板構造を取っている (Fig.1 左)。さらに脊椎動物では、層板が側方で繋がりあってリボン状の高次構造を形成している (Fig.1 右)。当研究室では、このゴルジ体の構造形成の分子機構と、構造の生理的意義の理解を目指して研究を進めている。

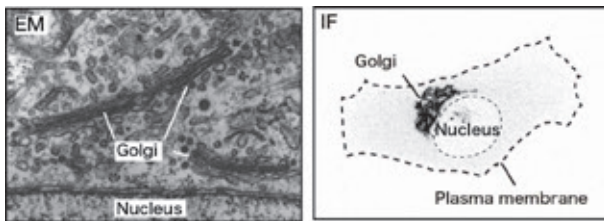


Fig. 1 The structure of the Golgi apparatus
(Left) Stacked cisternal structure
(Right) Ribbon like structure near the nucleus

ゴルジ体は、分裂期に解体され、娘細胞に均等に分配されたのちに再構成される。これまでに我々は、ゴルジ体の解体分散が GM130 のリン酸化によって引き起こされることを明らかにした (Nakamura et al., Cell 89 p445, 1997)。また一方、ゴルジ体の解体分散は分裂期の進行に必須の役割を持っていることも明らかにした (Yoshimura et al. J. Biol. Chem. 280 p23048, 2005)。さらに、間期のゴルジ体は中心体付近の微小管に絡むようにして局在しており、ゴルジ体の再構成は、細胞運動時に進行方向を変化させるために重要であること、また、GM130 のパートナータンパク質である GRSASP65 のリン酸化がこのゴルジ体の再構成に重要であることも明らかにしている (Bisel et. al. J. Cell Biol. 182 p837, 2008)。

最近の研究から、ゴルジ体の構造や機能の不全がアミロイド繊維形成を誘導してアルツハイマー病や ALS (筋萎縮性側索硬化症) などの神経変性疾患を導く可能性や、ゴルジ体に局在するタンパク質群が細胞骨格や細胞極性の調

節、また、細胞内情報伝達系の調節に関与しており、これらのタンパク質の機能不全が、細胞の癌化に関わることなどが次々と明らかになってきた。これらのゴルジ体の構造変化や機能不全から生じる疾患は、「ゴルジ体病」と名づけられ、その研究が注目を集めている (中村暢宏 生化学 90 p21, 2018)。培養細胞やゼブラフィッシュを用いた研究から、細胞レベル、そして個体レベルでのゴルジ体や GM130, GRASP65, YIPF (Yip domain family: 後述) などの機能を明らかにすることで、癌や神経変性疾患などの各種疾患の病理の解明や新規治療標的の発見が期待される。

2. 本年度の研究成果

(1) YIPF タンパク質の機能解析

YIPF タンパク質群は我々が 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 と協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。Saccharomyces cerevisiae には、Yip1p, Yif1p, Yip3p, Yip4p の 4 種の YIPF が存在し、一方、ヒト YIPF では、YIPF1~6, YIP1B, YIF1A, YIF1B の 9 種が存在する。また、Saccharomyces cerevisiae の Yip1p および Yif1p のホモログがペアとなって複合体を形成する (Yoshida, Y., et al. Exp. Cell Res. 314, 3427–3443, 2008; Tanimoto, K. et al., Cell Struct. Funct. 36, 171–185, 2011; Soonthornsit, J., Exp Cell Res, 2017)。ヒト YIPF は、3 種の独立した複合体 1~3 を形成し、それぞれゴルジ体上流 (ERGIC), 中流 (cis-Golgi), 下流 (medial-, trans-Golgi, TGN) に分かれて局在している (Fig. 2)。

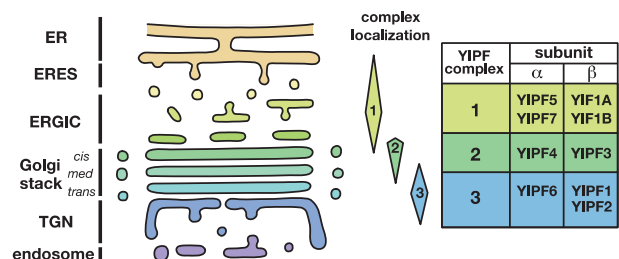


Fig. 2 Three YIPF complexes and their localization

YIPF タンパク質の配列を用いてタンパク質配列データベースの検索を行ったところ、若干の例外を除いてほとんど全ての真核生物で、Saccharomyces cerevisiae の YIPF タンパク質 4 種のオルソログ全てが存在することが確認された。また、動物界 (Metazoa) を含む Holozoa では、単細胞生物

の *Salpingocea rosetta* を含めてほとんど全ての種に、ヒト YIPF のうちの 6 種 (YIPF1, YIPF3, YIPF4, YIPF5, YIPF6, YIF1A) のオルソログが存在していた。Holozoa 以外の生物では、ヒト YIPF3, YIPF4 に相当するタンパク質の存在は見られず、これらのゴルジ体中流 (*cis*-Golgi) に局在する YIPF 複合体の誕生が、多細胞化と動物界の進化に重要な役割を果たした可能性が考えられた。また、硬骨魚類から哺乳類に至る Teleostomi では、鳥類(Aves)を除いて、ヒト同様の 9 種のオルソログが存在していた。このことから、脊椎動物の硬骨化にこれらのホモログの増加が何らかの役割を果たした可能性が考えられた。

(2) GlcNAcTI-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュの小型卵殻表現型の発現機序解析

ゼブラフィッシュの初期発生での、ゴルジ体の構造変化とその生理的意義を解析する目的でゴルジ体マーカーである GlcNAcTI-GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。作成したトランスジェニックゼブラフィッシュの F₁ 世代メスに卵殻の直径が 70%程度縮小した卵を産卵する個体を見出した。この小型卵殻表現型を示す卵では、正常型に比べて強い GFP 蛍光が観察された。トランスジーン産物は GlcNAcTI 活性を保持していると考えられるため、小型卵殻表現型がゴルジ体での GlcNAcTI 活性上昇によって起こる可能性が示唆された。GlcNAcTI 活性上昇とそれに伴う小型卵殻表現型は、(1) 高発現を導く染色体部位への組み込み、あるいは(2) 複数の GlcNAcTI-GFP の組み込みによって起こる可能性が考えられる。これらの可能性を明らかにするため、まず、inverse PCR 法によって組み込み部位の特定を行った。

昨年までに、小型卵殻表現型を示さないトランスジェニックゼブラフィッシュ系統は 23 番染色体にトランスジーンが組み込まれているが、小型卵殻表現型を示す個体のゲノムでは、23 番染色体以外の部位にトランスジーンを組み込みがあることが明らかにしていた。今年度は、この組み込み部位の探索を行った。まず、生命資源環境学科の木村教授・坂本助教との共同研究によって全ゲノム解析を行ったところ、25 番染色体の 31514547 から 31514557 の部位 (GRCz11) へトランスジーンが組み込まれている可能性が明らかになった。PCR によって組み込み部位の特定を行ったところ、実際にトランスジーンが 25 染色体の 31514547 から 31514557 の部位 (GRCz11) への組み込まれていることが確認された。一方、驚いたことに、小型卵殻表現型を示す雌を含む siblings の多くで 23 番および 25 番染色体の 2カ所への組み込みが見られたことから、ゲノムの異なる部位 2カ所への組み込みによるトランスジーンの高発現が小型卵殻表現型を導いた可能性が示唆された。

3. Research projects and annual reports

Golgi apparatus is situated at the center of the secretory pathway. There, newly synthesized secretory proteins are modified with glycosylation, sulfation and the peptide chain processing. The fully modified proteins are then sorted and dispatched for their final destinations, such as lysosome and plasma membrane. The Golgi apparatus is conserved widely in eukaryota from monocellular fungi and protozoa to multicellular plants and animals. The Golgi apparatus has a cisternal structure. In most of animals and plants, the Golgi cisternae are stacked in several layers and these are further connected laterally to form a ribbon like structure in vertebrate (Fig. 1). We are trying to understand the supporting molecular mechanism and physiological significance of this peculiar structure of the Golgi apparatus.

Golgi apparatus is disassembled and equally inherited to the daughter cells during the mitosis. We found that disassembly is primed by the phosphorylation of GM130 (Nakamura et al., Cell 89 p445, 1997). We also found that the disassembly is necessary for the onset of mitosis (Yoshimura et al. J. Biol. Chem. 280 p23048). On the other hand, the Golgi apparatus is closely bound to centriole and surrounding microtubules in interphase. Continuous reassembly of the Golgi apparatus is necessary to re-orientate the centriole to the front of the cells, which enables the directed movement of the cells. We found that the phosphorylation of GRASP65 is important for this reorganization of the Golgi apparatus (Bisel et. al. J. Cell Biol. 182 p837).

Recently, it was reported that the disorganization of the structure or function of the Golgi apparatus can cause neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease and ALS. It was also reported that some Golgi resident proteins are involved in the control of cytoskeleton, cell polarization and signal transduction and the dysfunction of these proteins can cause cancer. The diseases caused by the structural and functional defects of the Golgi apparatus are now called as "Golgiopathy" and the research in these subjects became important to understand the pathology and find new targets to treat these diseases.

(1) The analysis of the function of YIPF proteins

We found YIPF proteins as a family of multi-span transmembrane proteins localizing in the Golgi apparatus. They are candidate target proteins for GM130 and GRASP65 and supposed to function in the structural

maintenance of the Golgi apparatus. *Saccharomyces cerevisiae* has four family members (Yip1p, Yif1p, Yip4p, Yip5p) while human has nine family members (YIPF1~6, YIP1B, YIF1A, YIF1B). A homologue of Yip1p binds a Yif1p homologue as a pair and form a complex. There are three distinct complexes (1~3) in human cells. Complex 1 localizes at early Golgi (ERGIC), complex 2 localizes at middle (i-Golgi) and complex 3 localizes at late Golgi (*medial-, trans-Golgi*, TGN) (Fig. 2).

All 4 orthologues corresponding to *Saccharomyces cerevisiae* YIPFs were identified in virtually all eukaryotes in protein sequence database. In addition, two more orthologues corresponding to human YIPF3 and YIPF4, YIPF5 were identified in holozoa including metazoa. No orthologues for YIPF3 or YIPF4 was identified in eukaryotes other than holozoa suggesting that evolution of these proteins played some important role in multi cellularization and evolution of metazoa, i.e. animals.

Nine orthologues were identified from Telesotomi to mammals suggesting that the increase of the homologue number played some role for ossification of vertebrate.

(2) The mechanism of small chorion phenotype of GlcNAcTi-GFP transgenic zebrafish

We have found that some females of GlcNAcTi-GFP transgenic zebrafish lay eggs with smaller chorion (70% diameter). It was found that this phenotype was correlated with stronger GFP florescence. Therefore, it was suggested that the phenotype was caused by the higher expression level of GlcNAcTi-GFP, which is predicted to retain enzymatic activity.

Until last year, we identified integration of transgene (Tg) on 23rd chromosome in normal chorion fishes. This year, we identified integration of transgene (Tg) on 25th chromosome in small chorion fishes from the collaboration with Dr. Sakamoto and Prof. Kimura (Dpt. Bioresource and Environmental Sciences). This was confirmed by PCR analysis. Surprisingly, many small chorion fishes showed integration of Tg at both 23 and 25 chromosomes. Therefore, it was suggested that the higher Tg expression from two integration site caused the small chorion phenotype.

4. 論文, 著書など (Publications)

中村 暢宏, *生化学* (2018) 特集. ゴルジ体病とゴルジ体の新機能 90(1): 21-26

5. 学会発表など (Meeting Reports)

Shaheena Shaik, Shiho Osako, Shusuke Ijiri, Yurika Sasaki, Soonthornsit Jeerawat, **Nobuhiro Nakamura**, Knockdown of YIPF1, YIPF2 caused delay in the Golgi to PM transport, *The 2018 Golgi meeting: Membrane trafficking in cell organization and homeostasis* 15-19 October 2018, Sorrento, Italy

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(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

平成28~30年度: 文部科学省科学研究費補助金・基盤(C) (ゴルジ体にはタネがある! ? / 研究代表者: **中村暢宏** / 平成28年~30年: 380万円) [25440092]

2) 知財権 (Patents): 該当なし

3) 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~)

Review Editor: *Frontiers in Cell and Developmental Biology; Membrane Traffic* (2018.4.10~)

4) 受賞等 (Awards): 該当なし

5) その他 (Others)

論文等査読 (Paper Referee)

Frontier of cell and developmental biology: 1件

Nature metabolism: 1件

Cell Structure and Function: 1件

その他査読等

競争的資金申請査読: Assessment of research proposal, Research Grants Council, Hong Kong, China 1件

2018 Laboratory Members: Shaheena Shaik (D2), Himani Pandey (ポスドク), 中川慎一郎 Shinichiro Nakagawa (B4), 奥村美月 Mitsuki Okumura (B4), 木下優里花 Yurika Kinoshita (B4), 林亮太朗 Ryotaro Hayashi (B4), 長崎貴郁 Takafumi Nagasaki (B3), [Satish Kumar Thirumalasetti (外国人特別生)]



神経回路発生研究室

Laboratory of Neural Network Development

1. 研究概要

われわれが外界からの刺激を知覚し、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に満ちた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、混沌とした脳に一定の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、シナプス間隙に視点を据えたシナプスの分化機構と、シナプス間隙が関与する脳機能の制御機構の解明を目指している。

a) Hig タンパク質によるアセチルコリン受容体の局在制御機構

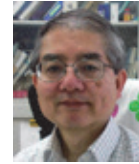
活動性の低下を示す変異の原因遺伝子として同定された *hikaru genki* (*hig*) 遺伝子 (Hoshino *et al.*, 1993 Neuron) がコードするタンパク質 Hig は、コリン作動性シナプスの間隙に局在し (Nakayama *et al.*, 2014 J. Neurosci.)、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の局在量を制御している (Nakayama *et al.*, 2016)。中枢神経系における nAChR の局在制御機構は動物種を問わず解明されていないことから、その分子機構を Hig タンパク質を解析の出発点として明らかにしていく。

b) シナプス間隙マトリックスの構成タンパク質群の同定と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

教授 浜 千尋

Prof. Chihiro Hama, Ph. D.



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 がそれぞれ示す分子コンパートメント (Nakayama *et al.*, 2016, J. Neurosci.) とシナプス構造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。

c) Hig および nAChR の睡眠への関与

hig 変異体は、成虫時に活動性の低下を示す。この行動上の不活性状態は、Hig タンパク質が睡眠に何らかの関わりをもつことを期待させる。また、睡眠がシナプス活性を反映したものであるとするならば、Hig によって局在制御を受ける nAChR も睡眠を制御している可能性がある。そこで、Hig および nAChR の睡眠への関与を調べ、今までに Hig の解析によって得られた情報を睡眠の研究に反映させる。

2. 本年度の研究成果

a) nAChR サブユニット Dα5 は Hig と相互作用しながら nAChR の局在を抑制的に制御する

hig 変異体が示す活動性および寿命の低下が回復するサブレッサー変異の分離を試みたところ、独立に2種の変異株を同定した。塩基配列の解析の結果、いずれの変異も AchR サブユニットの一つである Dα5 に生じたアミノ酸置換変異であることが判明した。そこで、新たに Dα5 遺伝子の機能欠損変異を 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、Dα5 遺伝子の機能欠損が *hig* 変異をサブレッサーすると結論した。ショウジョウバエには nAChR サブユニットが10種類あるが、*hig* 変異体の中で各遺伝子の発現を RNAi により抑えると、Dα5 だけが *hig* 変異体の寿命を回復させた。したがって、サブユニットの中で Dα5 が特異的に *hig* 遺伝子のサブレッサーとして機能することが明らかとなった。Hig と Dα5 は、それぞれ互いの変異株においてシナプス局在量が減ること、さらに、Dα5 を強制発現させるとシナプス間隙での Hig の量が増えることから、Dα5 と Hig は直接あるいは間接的に結合していると考えられる。それでは、なぜ Dα5 の機能欠損が Hig の機能欠損をサブレッサーするのだろうか。*hig* 変異体の脳のシナプスでは、Dα5、Dα6、Dα7 のいずれの局在量も減少するが、*hig* と Dα5 二重変異体では、Dα6 の局在量が野生型以上になることが確認された。また、Dα5 変異体では、Dα6 と Dα7 の局在量が野生型以上となった。すなわち、シナプス間隙に存在する Hig がなくなると、シ

ナプス後膜上での Da5 の局在量が減少し、それと共に Da5 を含む AchR を構成する他のサブユニットの量も減少する機構が考えられる。Da5, Da6, Da7 の3種のサブユニットについてN 端側の細胞外ドメインとC 端側の膜貫通および細胞内ドメインに分けてキメラを作成したのちに強制発現させ、Hig のシナプスにおける局在量を調べた。その結果、Da5 と Da7 の細胞外ドメインには Hig との結合能があるが Da6 にはないことが判明した。さらに、Da5 の C 端側の配列を持つキメラタンパク質を発現させると、Hig 非存在下で異常な局在パターンを示すようになり、そのタンパク質は初期エンドサイトーシスのマーカーである Rab5 と共局在していた(図1)。また、Da6 と Da7 の C 端

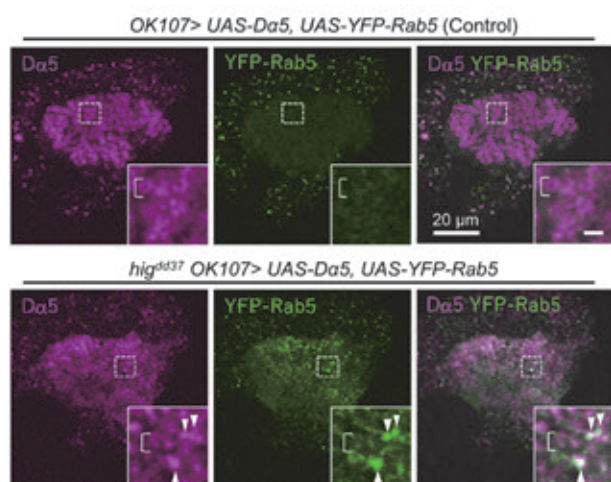


図1 *hig*変異脳において過剰発現した Da5 と Rab5 の局在パターン 緑:Rab5, 紫:Da5, バー:20 μm

側の配列を持つキメラタンパク質では、そのような現象は観察されなかった。これらのことから、Da5 の C 端側の配列にはエンドサイトーシスを受けるための配列が存在し、Hig の非存在下では、Da5 がエンドソームに取り込まれる頻度が増加し、その結果、AchR のうち Da5 を含むヘテロペンタマーが減少するというモデルを立てた。このように、AchR を構成するサブユニットは、それぞれ個性をもち、その中で受容体の局在に関して Da5 が中心的な役割を持つという重要な知見が得られた。

b) *hig* 変異体の睡眠パターン

hig 変異体に Hig を一過的に発現させてレスキュー実験を行うと、蛹の時期に発現させることにより活動性が回復する。このことは、Hig タンパク質が発生過程で機能していることを示している。一方、Hig は成虫時においても多量に発現しており、発生後の脳においても機能していることが示唆される。その Hig の可能性のある機能として睡眠の制御に注目して解析を行った。*hig* 変異体の成虫の活動量を活動モニターで計測して、睡眠量を算出すると、

野生型に比べて約半分であった。さらに、1 回の睡眠時間の長さごとに睡眠総量を調べると、*hig* 変異体は野生型に比べ短時間の睡眠が多いことが明らかとなった(図2)。ただし、この結果は、Hig 欠損による発生過程の異常によりもたらされている可能性があるため、成虫時にのみ Hig が存在しない状態で解析する必要がある。

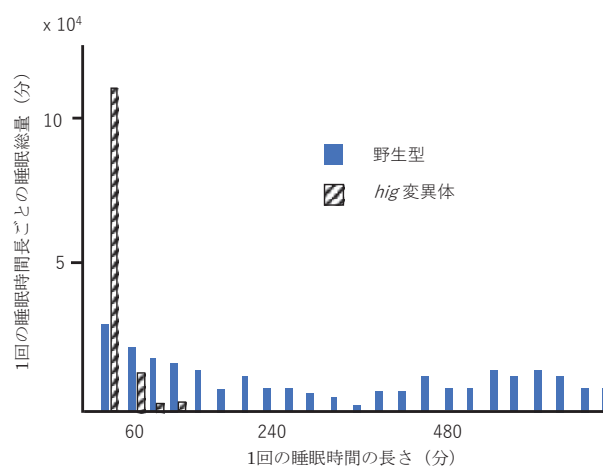


図2 *hig*変異が示す1回の睡眠時間の長さの分布

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 circuits 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 and an Immunoglobulin domain. 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, 2016). 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:

The synaptic cleft protein Hig prevents an inhibitory role for the nAChR subunit Da5 in maintaining the receptor levels.

Presentation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) on the postsynaptic membranes is a crucial step for synaptic differentiation that leads to the generation of brain functions. However, the molecular mechanisms underlying the regulation of synaptic nAChR levels remain to be revealed in the central synapses. A genetic screening for suppressor mutations of *hig*, which encodes a secretory protein specifically localized to cholinergic synaptic clefts in *Drosophila*, resulted in identifying two recessive mutations in the gene encoding nAChR subunit *Da5*. The suppressor mutations as well as null mutations of *Da5* rescued the lethal phenotype of *hig* mutants, whereas loss of functions of other nAChR subunits did not as revealed in RNAi experiments. Thus, *Da5* notably causes a lethality in the animals that fail to produce Hig. The synaptic levels of nAChR subunits *Da5*, *Da6* and *Da7* were all decreased in *hig* mutants, but the loss of *Da5* in *hig* mutants increased *Da6* levels and also upregulated both *Da6* and *Da7* levels in the wild type. In addition, overexpression of *Da5* caused a decrease in *Da6* and *Da7* levels. These data indicate that *Da5* inhibitorily controls the synaptic levels of nAChR, and the inhibition is enhanced by the loss of Hig that anchors *Da5* on the postsynaptic membranes. Domain-swapping experiments among *Da5*, *Da6* and *Da7* indicate that the extracellular domains of *Da5* and *Da7* are able to interact with Hig and the succeeding C-terminal domain of *Da5* functions in reducing nAChR levels, possibly through endocytosis. *Da5*, *Da6* and *Da7* subunits make a distinct contribution to the control of nAChR levels.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

Minoru Nakayama, Osamu Nishimura, Shigehiro Kuraku, Masaki Sone, Chihiro Hama

Synaptic cleft protein Hig inhibits endocytosis of an AchR subunit *Da5* to regulate AchR clustering.

The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 26, 2018 (Oral presentation),

Kobe Convention Center

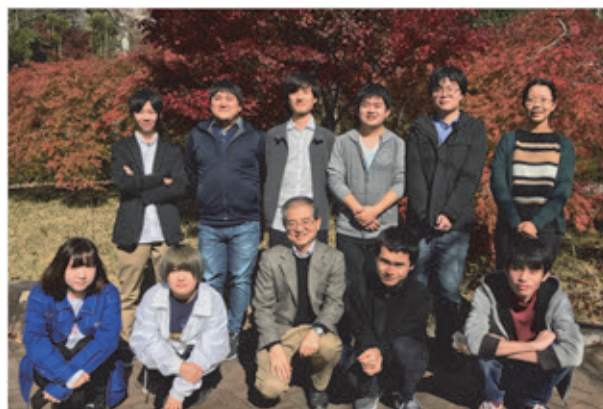
6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名: シナプス間隙コンパートメントの構築機構と機能

研究代表者: 浜 千尋, 取得年度: 2018-2020 年 (3 年)



RNA 制御学研究室

Laboratory of RNA Regulation

准教授 三嶋 雄一郎

Associate Prof. Yuichiro Mishima, Ph.D.



1. 研究概要

遺伝子発現は、ゲノム DNA からの転写段階のみならず、転写後の mRNA 制御によっても巧妙に調節されている。特に mRNA の安定性はタンパク質発現の量とタイミングを規定する主要因であり、その制御は個体発生のような複雑な生命現象に必須である。しかし現在までに解明されている mRNA 安定性制御機構は氷山の一角に過ぎない。我々は、小型淡水魚ゼブラフィッシュをモデルとした研究から、受精直後の mRNA 安定性がコドン組成によって規定されており、コドンには mRNA を安定化するものと不安定化するものが存在することを見出した。この現象はリボソームによる翻訳に依存していることから、コドンが tRNA によって読み取られる際の動態が mRNA の安定性に影響を及ぼしていると考えられる。このようなコドン機能の新知見に加え、コドンを解読する tRNA の量や修飾の状態、リボソームの構成や結合因子も、細胞の状態や種類に応じて動的に変化することが明らかとなってきている。

このような背景のもと、本研究室ではゼブラフィッシュをモデルとして、個体発生過程においてコドンによる mRNA 安定性制御のしくみと生理的意義を明らかにすることを目的に研究を行なっている。現在は、(1)次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドなコドン効果の検証方法の開発(2)ゲノム編集技術によるリボソーム結合因子や tRNA の修飾酵素のゼブラフィッシュ変異体系統の作成(3)リボソーム結合因子の生化学的な解析方法の構築を進めているところである。発生生物学、遺伝学、生化学、分子生物学、生物情報学を組み合わせて、遺伝暗号に隠された mRNA の安定性制御情報の解読に挑戦している。

2. 本年度の研究成果

(A)コドン効果の包括的解析方法の開発

コドンが mRNA の安定性に与える効果を実験的かつ網羅的に検証するために、特定のコドンを 20 回繰り返すコドンタグ配列を GFP の 3'末端に挿入したレポーター(コドンレポーター)を全コドンに対応する種類構築した。in vitro 転写により合成したコドンレポーター mRNA のライブラリをゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入し、RNA-seq によって解析することで、61 センスコドンが mRNA の安定性に及ぼす影響を一括して定量できる実験系を開発した。

この方法を Parallel Analysis of Codon Effects (PACE) と名付けた。

(B) Znf598 のゼブラフィッシュ変異体の解析

翻訳の伸長中にリボソームの異常な停滞が生じると、そのリボソームは Ribosome Quality Control (RQC) 経路によって乖離され、鋳型の mRNA は No-go decay (NGD) により分解される。この過程にはリボソームに結合する E3 ユビキチンライゲースである Znf598 が必要である。NGD とコドンによる mRNA 分解との関係性を明らかにするために、当研究室で作成したゼブラフィッシュ Znf598 変異体において PACE 法を実施した。その結果、Znf598 変異体では NGD は起こらないが、コドンが mRNA の安定性に与える影響は維持されていることが明らかとなった。

(C) tRNA キューオシン修飾酵素 Qtrt1 のゼブラフィッシュ変異系統の確立

コドンの解読効率には、tRNA の量だけではなく tRNA の化学修飾が大きな影響を及ぼす。tRNA 修飾がコドンによる mRNA 分解現象に与える影響を検証するために、Tyr, His, Asn, Asp tRNA のアンチコドンの 1 塩基目に導入されるキューオシン修飾に着目した。キューオシン修飾酵素である Qtrt1 のゼブラフィッシュ変異体を作成するために、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行い、qtrt1 のエキソン 4 内部でフレームシフトを引き起こす変異系統を確立した。

3. Research projects and annual reports

Gene expression is regulated not only by the transcriptional mechanisms but also by the post-transcriptional control of mRNAs. mRNA stability is a major determinant of both amount and timing of protein expression, thereby essential for complex biological processes such as development. By using zebrafish embryos as a model system, we discovered that codon composition determines mRNA stability after fertilization. These codon effects on mRNA stability are dependent on translation by the ribosome, indicating that the codon effects stem from the decoding process by tRNAs. In addition to this novel function of codons, recent studies highlighted prevalent changes in tRNA amount and modifications, ribosome and its binding factors under different cellular environments.

Our laboratory studies the molecular mechanisms and biological roles of codon-mediated control of mRNA stability during zebrafish embryogenesis by combining a wide variety of approaches in biology. We have achieved the following progress in this year.

(A) To precisely characterize the effects of codons on mRNA stability, we developed a simplified reporter system that allows detection of the effect of every single codon on mRNA stability in zebrafish embryos. We constructed a codon reporter mRNA library in vitro and analyzed their stability in zebrafish embryos by mRNA injection. We named this approach "Parallel analysis of codon effects (PACE)."

(B) Analysis of the zebrafish znf598 mutant

When the ribosome aberrantly stalls during translation, the stalled ribosome is rescued by Ribosome Quality Control (RQC), and the template mRNA is degraded via No-go decay (NGD). Znf598, an E3 ubiquitin ligase that binds to the stalled ribosome, is essential in these processes. To analyze the relationship between NGD and codon-mediated mRNA decay, we have performed PACE in zebrafish znf598 mutant embryos. Our results indicated that codon-mediated mRNA decay occurs independently of Znf598 and NGD.

(C) Establishment of a zebrafish mutant for tRNA modification enzyme Qtrt1

The codon-decoding process is affected not only by tRNA amounts but also their chemical modifications. To analyze the effect of tRNA modifications on codon-mediated mRNA decay, we focused on a queuosine modification, which is present at the first position in anticodons of tRNA Tyr, His, Asn, Asp. To generate a zebrafish mutant lacking a queuosine modification enzyme Qtrt1, we performed genome-editing by CRISPR-Cas9 and obtained a mutant line that causes frameshift within exon 4 of qtrt1.

4. 論文, 著書など

Y. Fujino, K. Yamada, C. Sugaya, Y. Ooka, H. Ovara, H. Ban, K. Akama, S. Otsuka, H. Kinoshita, K. Yamasu, **Y. Mishima**, A. Kawamura: Deadenylation by the CCR4-NOT complex contributes to the turnover of hairy-related mRNAs in the zebrafish segmentation clock. *FEBS Letters*. (2018) **592**, 3388-3398.

Y. Mishima: PAINTing translation. *Nat Chem Biol*. (2018) **14**, 832-833 (論文解説)

5. 学会発表など

三嶋雄一郎: コドン依存的 mRNA 分解の分子機構. 第6回 CCR4-NOT研究会, 白浜町, 2018.5.12-14

Y. Mishima: Codon-mediated mRNA decay in zebrafish embryos. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave", 大津市, 2018.8.26-29

Y. Mishima: Codon-mediated mRNA decay in zebrafish embryos. The 2nd Joint Australia-Japan/ Japan-Australia joint RNA meeting 2018, 札幌市, 2018.11.5-7

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名: コドンによる遺伝子発現制御のダイナミズム

研究代表者: 三嶋雄一郎, 取得年度: H30-R2 年 (3 年)

科学研究費補助金・新学術領域 新生鎖の生物学(公募研究)

課題名: 新生鎖合成中のリボソームによる mRNA 安定性制御機構の解明

研究代表者: 三嶋雄一郎, 取得年度: H29-30 年 (2 年)

科学研究費補助金・新学術領域 RNA ネオタクソミ(公募研究)

課題名: mRNA 制御因子としての tRNA ネオタクソミ

研究代表者: 三嶋雄一郎, 取得年度: H29-30 年 (2 年)

科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名: RNA 結合蛋白質が細胞シグナルに応答して制御する翻訳と mRNA 分解との連携機構

研究代表者: 藤原俊伸 取得年度: H28-30 年 (3 年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

三嶋雄一郎: 日本 RNA 学会 キャリアパス担当

同会 年会プログラム委員

三嶋雄一郎: 日本分子生物学会 ポスター編成委員

4) 受賞等 なし

5) その他 なし



研究室の様子(2018年9月)



基礎特別研究配属の3年生
(2018年9月)

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り、生命がエネルギーを使いやすい形に変え、それを使う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 は、主にミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素により作られる。作られた ATP は運動することや、生体分子を作ったり、分解したり、運ぶことに使われる。たとえば、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) は、ATP を使って小胞内にイオンを輸送し、その酸性化を通して様々な生理現象を担う。V-ATPase のように、ATP を使って基質を運ぶタンパク質は輸送体と呼ばれ、その仕組みは、それぞれの輸送体の構造を明らかにすることでだいぶわかってきたが、不明な点も残っている。ちっぽけなタンパク質からなる分子機械がどうやって ATP のエネルギーを輸送や運動に変換するのかは、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。この分子機械の仕組みを解明するには、その動きと形を見る必要があり、そのための手法として我々は、1 分子回転観察とクライオ電顕による構造生物学を用いてきた。

一方で、生命がエネルギーを利用する過程は、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決めることも報告されている。我々は、エネルギー通貨である 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、密接な関係があることが明らかになった。このように、生体エネルギー学の視点から老化・寿命・疾病の問題に取り組んでいる。

1) V-ATPase の分子機構の解明

V-ATPase は、真核生物の酸性小胞 (リソゾーム、エンドソームなど) に存在する ATP 駆動性のプロトンポンプであり、小胞内の酸性化を通して、タンパク質の品質管理や物質代謝を担っている。ATP 合成酵素 F_0F_1 と同様の回転触媒機構で ATP のエネルギーを回転力に変えてプロトンを輸送する。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組み合わせ、生体内で最も重要なプロトンポンプであり、かつ創薬ターゲットでもある V-ATPase の機能・構造の解明を進めている。回転触媒機構によるエネルギー変換やプロトン輸送機構の解明、V-ATPase を標的とした創薬につながる構造情報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を突破口とした生命現象の解明

ATP は、その重要性から細胞内では一定のレベルに保たれていると考えられていたが、直近の研究成果は、ATP レベルはダイナミックに変化し、ATP そのものがシグナル因子として働くことが示唆されている。ATP レベル変化が引き起こす V-ATPase 活性の変化、リソゾームとミトコンドリア間のクロストーク、タンパク質のクリアランス活性と老化との関係、を線虫 *Caenorhabditis elegans* や培養細胞を材料にして明らかにする。

3) クライオ電子顕微鏡による構造生物学

クライオ電子顕微鏡は、今や構造生物学の主流となり、分子の構造だけでなく、オルガネラや細胞全体の構造を、時には原子分解能近くの精度で見ることが可能にする。我々は、この技術をいち早くとり入れ、世界に先駆けて V 型 ATP 合成酵素の回転に伴う構造変化を明らかにした。酸性小胞をトモグラフィーという手法で見ることにより、小胞内に存在する V-ATPase の挙動を活写することも可能である。この手法をさらに発展させ、細胞内での分子の挙動を高分解能に明らかにし、細胞内で起こっている現象を原子レベルで記述するのが目標である。また、ATP 動態を司る ATP チャネルや ATP 受容体、ATP 輸送体も研究対象とし、取り組み始めたところである。

2. 本年度の研究成果

1) V-ATPase 全体構造の決定

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。電子直接検出器の登場および解析手法の発展により、タンパク質分子を時には原子分解能で構造決定することが可能になった。我々は、大阪大学高圧電顕センターにあ

る自動撮影装置を備えた Titan Krios (FEI)により、V-ATPase の単粒子画像から 5.0 Å 分解能でモデルを組み立てることができ、その研究成果を *Nature Communications* 掲載した。今年度は、分解能を上げるために、解析法、試料調製を含むクライオグリッドの作成法を検討した。分解能を向上させるためには、S/N 比の良い電子顕微鏡画像を多く撮影する必要がある。LMNG で可溶化した V_0V_1 の画像をさらに撮影し、100 万程度の単粒子画像を抽出し、解析を行った。特に一番分解能の良いクラスに注目し、Focused Classification など解析法を工夫することで、軸がやや傾いたサブクラスを得ることができた。ただ、クラス分けをすることで単粒子数が減り分解能は以前 5 Å 程度で、原子分解能に至っていない。平行して可溶化条件の異なる試料の撮影も行った。ナノディスクは、膜タンパク質の疎水性部分に円盤状の脂質領域を作り出し、膜タンパク質を水溶液中に分散させる方法である。界面活性剤がないので、ミセルによる S/N 比の低下や、表面張力の低下による氷厚調整の難しさを回避することができる。ナノディスクへの V_0V_1 の組み込み条件を検討した結果、単分散性の良い試料を得ることができた。この試料を使ってクライオグリッドを作製し、観察したが、乖離したと思われる V_1 の単粒子が沢山観察され、 V_0V_1 の歩留まりが悪かった。調製直後の V_0V_1 は、ゲル濾過で検定しても単一ピークを示すことから、 V_1 部分の乖離は、クライオグリッド作製時に起きていると考えられる。歩留まりが悪いながら、6-7 Å 程度の分解能の構造が得られている。 V_0 の単粒子解析にも着手し、比較的良好な電子顕微鏡画像を得ることができた。さらに金を基盤としたグリッドを使用したところ、さらに分解能を上げることができた。今後この条件で撮影を続け、粒子数を稼ぐことで原子分解能モデルを構築する。

34 frames Data Summary of Image Processing in RELION

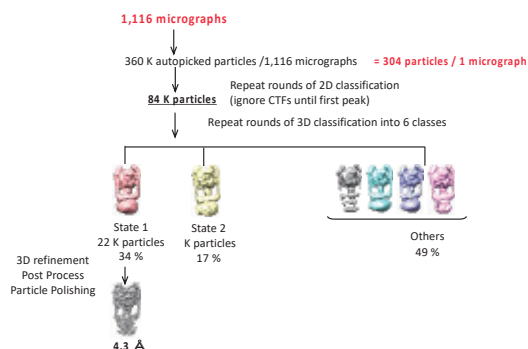


図 クライオ EM を用いた SPA による立体構造決定のフローチャート。金グリッドを使用し、Falcon Hack でフレームを増やし、ナノディスクで包埋した試料を用いることで、少ない粒子数で高分解能を得ることができた。

2) 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。この成果は今年の PLOS One に掲載された。

3. Research projects and annual reports

We have been studying the bioenergetics which is a biological field including the study of energy conversion in living organisms and the cellular processes such as metabolism, respiration, and ATP production. Our final goal is to clarify and describe how living organism transform and use energy to live.

Based on these points, we have carried out three themes;

- (1) Molecular mechanism of rotary ATPase/synthases, V-ATPase and FoF.
- (2) ATP homeostasis in living cells
- (3) Structural biology using Cryo electron microscopy

Achievements in 2018

1) CryoEM structure of V type ATP synthase

Vacuolar type ATPases (V-ATPase) 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 our labo, we have attempted to determine the structure of V-ATPase by single particle analysis using cryo electron microscope. For imaging of V-ATPase, LMNG was used for solubilization detergent to reduce detergent concentration. Cryo-images of V-ATPase particles were obtained by cryo-EM Titan krios(FEI). Single particle images of V_0V_1 were picked up by RELION, then 2-D averaged class images were reconstructed from the collected images. Finally, we obtained three 3D averaged class images from nearly ~220k particles at resolution of 5.0 Å, 6.6 Å, and 8.3 Å, respectively. These structure revealed, (i) how the surrounding stator parts move during rotation of central rotor, (ii) these structures are 2-ADP form corresponding to ADP inhibited structure, (iii) aqueous cavity in membrane embedded domain was visible, likely responsible for proton translocation. This results were published in Nature Communication (2018). Furthermore, we improved the

resolution of cryoEM map by using gold grid and Falcon Hack which allowed us to correct the beam induced motion of each single particle of V_0V_1 .

2) Reduction of ATP levels in cells by general anesthesia

General anesthetics are indispensable for effective clinical care. Although lipid bilayers and proteins have been discussed as the target of general anesthetics, the action mechanism of general anesthetics remains controversial. In this study, we focused on the relationship between cellular ATP levels and general anesthesia. The ATP levels of nematodes and cultured mammalian cells were decreased by exposure to three general anesthetics: isoflurane, pentobarbital, and 1-phenoxy-2-propanol. Furthermore, these general anesthetics abolished mitochondrial membrane potential, resulting in the inhibition of mitochondrial ATP synthesis. These results suggest that this decrease of cellular ATP level is a common phenomenon by general anesthetics.

4. 発表、著書など

*Corresponding author

1. Nakanishi A, Kishikawa J, Tamakoshi M, Mitsuoka K, *Yokoyama K. Cryo EM structure of intact rotary H^+ -ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *Nat Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-017-02553-6
2. Kishikawa J, Inoue Y, Fujikawa M, Nishimura K, Nakanishi A, Tanabe T, Imamura H, *Yokoyama K. General anesthetics cause mitochondrial dysfunction and reduction of intracellular ATP levels. *PLoS One.* (2018) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190213>

5. 学会発表など

招待講演、シンポジウム等

1. 横山 謙 クライオ EM による好熱菌由来 V 型 ATP 合成酵素の単粒子解析 ナノテクノロジープラットフォーム研究成果発表会 招待講演、2018/3/3、大阪大学 (大阪・茨木市)
2. 中西 温子、光岡 薫、横山 謙 クライオ電顕で明らかになった ATP 合成酵素の形と動き 第 80 回 応用物理学会秋季学術講演会 (名古屋) 招待講演 9/2018、名古屋国際会議場 (名古屋市)
3. 中西 温子、岸川 淳一、玉腰 雅忠、光岡 薫、横山 謙 “Single Particle Analysis of V-type ATP Synthase from *Thermus thermophilus* by Cryo EM. 招待講演 第 91 回日本生化学会 9/2018、京都国際会館 (京都市)

4. 横山 謙 “Single Particle Analysis of V-type ATP Synthase from *Thermus thermophilus* by Cryo EM.” 招待講演 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 発見 50 周年記念研究会 9/2018 熱川ハイツ (静岡県・熱川市)
5. 中西 温子、岸川 淳一、玉腰 雅忠、光岡 薫、横山 謙 “クライオ電子顕微鏡による好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 V 型 ATP 合成酵素の単粒子解析” 日本生物物理学会 (若手公演シンポジウム) 9/2018 (岡山市)

学会発表

1. 中西 温子、岸川 淳一、玉腰 雅忠、光岡 薫、横山 謙 “クライオ電子顕微鏡による V_0V_1 の単粒子解析” 第 18 日本蛋白質科学会 6/2018 朱鷺メッセ (新潟市)
2. 岸川 淳一、中西 温子、玉腰 雅忠、光岡 薫、横山 謙 “Structural dynamics of V-ATPase via cryo-EM single molecule analysis.” 第 18 回日本蛋白質科学会年会 6/2018 朱鷺メッセ (新潟市)
3. Jun-ichi Kishikawa, Mihori Baba, Atsuko Nakanishi, Kaoru Mitsuoka, Ken Yokoyama “*De novo* designed axis works as a rotor of rotary motor.” European Bioenergetics Conference 2018. 8/2018 (Hungary, Budapest)
4. 中西 温子、岸川 淳一、表 弘志、光岡 薫、横山 謙 “ヒト V-ATPase の発現系構築およびトモグラフィ解析の試み” 第 43 回日本生体エネルギー研究会討論会 12/2018 千葉大学、(千葉市)
5. 岸川 淳一、中西 温子、古田 綾、光岡 薫、加藤 貴之、横山 謙 “V 型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイン V_0 の単粒子解析” 第 44 回日本生体エネルギー研究会討論会 12/2018 千葉大学 (千葉市)

6. その他特記事項

- 1) 外部資金
科学研究補助金 基盤研究 B
課題名：液胞型 ATPase の全体構造解明を突破口としたプロトン輸送機構の解明
研究代表者：横山 謙 取得年度 H29-31 (3 年)
武田科学振興財団 ライフサイエンス研究助成
課題名：クライオ ET 法による膜蛋白質超複合体の構造解析
研究代表者：岸川 淳一 取得年度 H30-34 (5 年)
- 2) 知財権等 なし

- 3) 学外活動：日本生物物理学会
日本生体エネルギー研究会 常任幹事
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：中西 温子研究員が日本生物物理学会招待
講演賞を受賞
- 5) その他： 科学研究費審査委員

2018 年度の研究室メンバー



生命資源環境學科

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年の秋セメスター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、吉田(貴)
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	奥山
化学演習	1	森本
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(徹)
化学実験	2	津下、老田、安井、吉田(徹)
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、吉田(貴)、吉田(徹)、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、吉田(貴)、坂本、藤原
基礎特別研究	3	金子、河邊、木村、高橋、津下、寺地、野村、本橋、山岸
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	金子、河邊、木村、高橋、津下、寺地、野村、本橋、山岸

下線は非常勤講師

ゲノム生物学研究室

Laboratory of Genomics

教授 金子 貴一

Prof. Takakazu Kaneko, ph.D



1. 研究概要

植物の体内と表面には、微生物が定着することが多い。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) オルガネラゲノムの中でも、植物のミトコンドリア DNA(mtDNA)は、様々な反復配列を多く含む特徴がある。その反復配列間の相同組換えが原因で、DNA 分子内、分子間の組換えにより、さまざまな構成の DNA 分子がつくられているようである。また、mtDNA 組換えにより、細胞質雄性不稔(CMS)を引き起こす遺伝子が生じることが知られている。タマネギでも mtDNA が原因となる CMS を引き起こすことがある。そこで、タマネギ系統間での mtDNA の違いの解析とタマネギミトコンドリアの転写産物解析をおこなった。mtDNA 構成は NGS と PFGE により解析した。タマネギ品種「もみじ 3 号」では mtDNA が3つの複製単位で構成されていた。転写産物解析からは RNA 編集位置が同定された。6 つの遺伝子(*nad1*, *nad4L*, *atp6*, *atp9*, *ccmFC*, *orf725*)では RNA 編集がされていた。RNA 編集されている *orf725* は CMS の候補遺伝子であった。

(2) マメ科植物と根粒菌の窒素固定共生は、2 つの共生者間の複雑な相互作用によって成立する。宿主の Fix-変異体は根粒を形成するが、根粒菌の窒素固定を誘導できない。*Lotus japonicus apn1* は、Fix-変異体であり、*Mesorhizobium loti* TONO 株を接種すると根粒形成するが、

根粒内の感染細胞は崩壊し、続いて壊死するという、典型的な早期老化を示す。ところが、*M.loti* MAFF303099 株を接種した場合には、正常な根粒が形成される。*apn1* の原因遺伝子は、ネペンテシン型アスパラギン酸ペプチダーゼ(LjAPN1)をコードする。そこで、機能既知の *Arabidopsis* アスパラギン酸ペプチダーゼ CDR1 を *apn1* に導入して発現させると、菌株特異的 Fix-表現型を補完することができた。LjAPN1 は典型的な後期ノジュリンであり、その遺伝子発現は根粒発生中に誘導される。LjAPN1 は根粒の感染細胞で特に多く発現している。LjAPN1 は、根粒菌系統依存的に、根粒の発生と機能的共生の持続に必要である。つまり、窒素固定レベルで *M.loti* と *L.japonicus* 間の適合性を決定することを示す。

3. Research projects and annual reports

Diversified microorganisms are able to colonize the intercellular, and sometimes also intracellular, spaces of plant tissues, without causing apparent damage to the host plant. Rhizobia and bacterial endophytes have been isolated from several tissues in numerous plant species. Such many bacterial strains have beneficial effects on plant growth and health. Since the addition of such characteristics to plants by colonizing microorganisms is useful as a material for agricultural production, some strains of them are studied in terms of the molecular mechanisms of establishment inside plants and their functions well. We have been studying the genomes of environmental microorganisms, especially plant-related bacteria, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azospirillum*. The genomic information provided valuable insights into the life of the bacteria, including information about interactions with host plants. The plant interaction properties of bacteria that colonize plants often do not correlate with the microbial lineage, and they vary among closely related lineages, so the factors remain largely unknown. Environmental genomic analysis also shows that uncultured microorganisms may constitute a majority of such microbial populations. Against this background, we will study symbiotic systems based on information obtained from genome research on plants and symbiotic microorganisms, with the aim of clarifying how plants and microorganisms can coexist.

(1) Among organelle genomes, plant mitochondrial DNA (mtDNA) is characterized by a large number of different repetitive sequences. Homologous recombination between the repeated sequences appears to be responsible for the intramolecular and intermolecular recombination that generates DNA molecules of varying composition. It is also known that such mtDNA recombination produces genes that cause cytoplasmic male sterility (CMS). Onions can also cause mtDNA CMS. Therefore, we analyzed mtDNA differences among onion lines and onion mitochondrial transcripts. The mtDNA composition was analyzed by NGS and PFGE. In the onion variety "Momiji 3", mtDNA is composed of 3 replication units. RNA editing positions were identified from the transcript analysis. RNA editing was detected in each 6 gene (*nad1*, *nad4L*, *atp6*, *atp9*, *ccmFC*, *orf725*). The RNA-edited *orf725* is a candidate gene for CMS.

(2) The nitrogen-fixing symbiosis of legumes and rhizobia is established by a complex interaction between the two symbionts. Host Fix⁻ mutants form nodules but cannot induce nitrogen fixation of rhizobia. *Lotus japonicus apn1* is a Fix⁻ mutant that shows typical premature senescence when inoculated with the *Mesorhizobium loti* TONO strain to form nodules, but the infected cells in the nodules disintegrated and successively became necrotic. However, when inoculated with *M. loti* strain MAFF 303099, effective nodules are formed. The identified causal gene of *apn1* encodes nepenthesin-type aspartate peptidase (LjAPN1). Thus, the expression of a functional *Arabidopsis* aspartate peptidase, CDR1, in *apn1* complements the strain specific Fix⁻ phenotype. LjAPN1 is a typical late nodulin, and its gene expression is induced during nodulation. LjAPN1 is abundantly expressed in infected cells of nodules. LjAPN1 is required for the development of nodules and the persistence of functional symbiosis, depending on the rhizobial strain. Thus, it is shown that the compatibility between *M. loti* and *L. japonicus* is determined at the nitrogen fixation level.

4. 論文, 著書など

- M. Tsujimura, T. Kaneko, T. Sakamoto, S. Kimura, M. Shigyo, H. Yamagishi, T. Terachi: Multichromosomal structure of the onion mitochondrial genome and a transcript analysis., *Mitochondrion*. 2018. **S1567-7249**, 30091-6
- H. Yamaya-Ito, Y. Shimoda, T. Hakoyama, S. Sato, T. Kaneko, M. S. Hossain, S. Shibata, M. Kawaguchi, M. Hayashi, H. Kouchi,

Y. Umehara: Loss-of-function of ASPARTIC PEPTIDASE NODULE-INDUCED 1 (APN1) in *Lotus japonicus* restricts efficient nitrogen-fixing symbiosis with specific *Mesorhizobium loti* strains. *Plant J*. 2018. **93**, 5-16

5. 学会発表など

- 板倉学, 木村成介, 上ノ山華織, 金子貴一, アブラナ科半水生植物 *Rorippa aquatica* における異形葉性と共生微生物の群集構造, 第12回日本ゲノム微生物学会年会, 京都市, 2018.3.5-7
- 板倉学, 原新太郎, 渡辺剛, 三屋公佑, 金子貴一, 南澤究, 土着 USDA110系統ダイズ根粒菌のゲノム多様性と共生窒素固定能, 日本微生物生態学会第32回大会, 宜野湾市, 2018.7.12-13
- 板倉学, 木村成介, 上ノ山華織, 金子貴一, アブラナ科半水生植物 *Rorippa aquatica* における異形葉性の誘導と共生細菌叢の変化, 植物微生物研究会第28回研究交流会, 鳥取市, 2018.9.19-21
- 西田裕貴, 芳村紗奈恵, 蒲生雄大, 板倉学, 岡崎伸, 佐藤修正, 金子貴一, 根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 共生アイランド上の菌株特異的共生因子, 第12回日本ゲノム微生物学会年会, 京都市, 2018.3.5-7
- 日下部翔平, 金子貴一, 安田美智子, 三輪大樹, 岡崎伸, 佐伯和彦, 佐藤修正, *Bradyrhizobium elkanii* USDA61株の3型分泌エフェクターにより誘導される根粒菌の侵入阻害に関与する宿主側因子の解析, 第59回植物生理学会年会, 札幌市, 2018.3.28-30
- 蒲生雄大, 板倉学, 南澤究, 金子貴一, 根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* 系統のゲノミックアイランド多様性, 植物微生物研究会第28回研究交流会, 鳥取市, 2018.9.19-21
- 日下部翔平, 金子貴一, 安田美智子, 三輪大樹, 岡崎伸, 佐伯和彦, 佐藤修正, *Bradyrhizobium elkanii* USDA61株の3型分泌エフェクターはミヤコグサに複数の防御反応を誘導する, 植物微生物研究会第28回研究交流会, 鳥取市, 2018.9.19-21

6. その他特記事項

なし

集団遺伝学研究室

Laboratory of Population Genetics

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

准教授 河邊昭

Assoc. Prof. KAWABE, Akira.

研究助教 川邊隆大(3月まで)

Res. Assoc. KAWANABE, Takahiro.

研究助教 吉田貴徳(4月から)

Res. Assoc. YOSHIDA, Takanori.



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

2) 転移因子の進化パターンの解析

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

3) エピジェネティックな制御機構の進化に与える影響の解明

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

2. 本年度の研究成果

本年度は転移因子の解析に関して、アブラナ科植物におけるトランスポゾンファミリーの存在様式の調査をおこなった。複二倍体種に関して両親種由来のファミリーがどのような進化パターンを示すのかを調査し、複二倍体種の進化過程や個別のトランスポゾンファミリーの動態を解析している。また、イネ科植物を用いて転移能を有するコピーの検出を試みている。いくつかの候補が得られ今後詳細な解析を進める予定である。

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。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、動原体領域の解析をおこなった。ハタザオの動原体領域はこれまでに知られているパターンとは異なり複雑なリピート構造を持つことが明らかになった。今後、染色体ごとに異なるパターンがどのように成立したのかや染色体の分離に及ぼす影響を明らかにしていきたい。

更にアブラナ科のいくつかの種に関して葉緑体でみられるRNAエディティングの解析を進めている。種ごとに特異的なエディティングパターンが系統関係と相関があることやいくつかのサイトに関してはエディティングを決定している遺伝子座を特定することが出来た。更にアブラナ科全体でのRNAエディティングの進化様式の解明に取り組んでいく予定である。

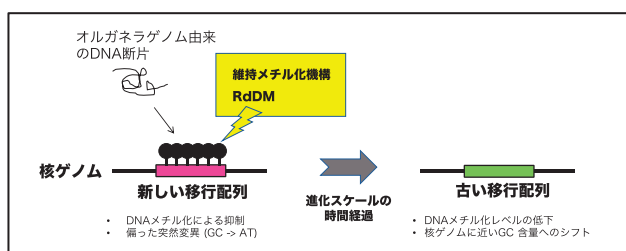


図. 核ゲノムへ挿入された葉緑体ゲノム由来 DNA 断片の進化的挙動の模式図

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. *T. galbra* also has

very complicated repeat structure with chromosome specificities.

2) Patterns of Transposable Element Evolution

Genomic organization of transposable elements were analysed in Brassicaceae species. Intergenomic transpositions were detected in several families of transposons in allopolyploid species suggesting expansion of transposon copies and also influences of genome shock during polyploidization process. Also, some active transposons were determined by using wheat background that can be used for tools for breeding

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. We also analysed patterns of DNA methylation in chloroplast derived nuclear genomic regions. The directions of DNA substitutions were highly biased depending on the time of integration of chloroplast genomic DNAs to nuclear genome. The biased mutation might be related to cytosine methylation. We confirmed that the DNA methylation was regulated only partly by RNA dependent DNA methylation machinery but mainly by chromatin remodeling mechanisms.

4) RNA editing evolution among Brassicaceae species

We determined complete chloroplast genomes of several Brassicaceae species to analyse RNA editing in chloroplast genome. The presence-absence of RNA editing are related to phylogenetic clustering indicating conserved nature of RNA editing variations. We also determined several genes associated with the RNA editing by comparing the pattern of divergence of RNA editing.

4. 論文, 著書など

Masuta Y, Kawabe A, Nozawa K, Naito K, Kato A, Ito H (2018)

"Characterization of a heat-activated retrotransposon in *Vigna angularis*." *Breed. Sci.* 68: 168-176.

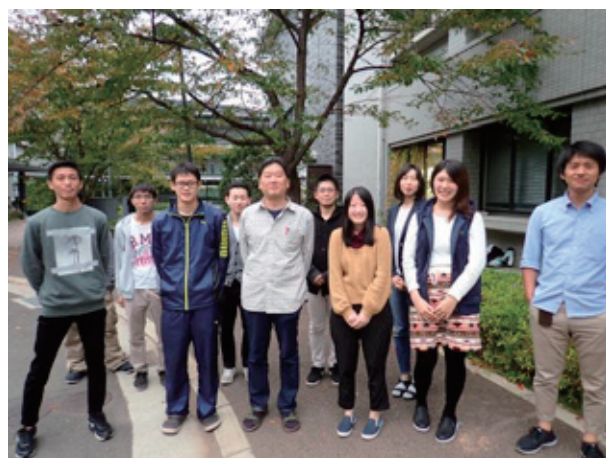
Kawabe A, Nukii H, Furihata H (2018) "Exploring the history of chloroplast capture in arabis using whole chloroplast genome sequencing." *Int. J. Mol. Sci.* 19: 602.

Kawanabe T, Nukii H, Furihata H, Yoshida T, Kawabe A (2018) "The complete chloroplast genome of *Sisymbrium irio*." *Mitochondrial DNA part B* 3: 488-489.

Yoshida T, Kawanabe T, Bo Y, Fujimoto R, Kawabe A (2018) "Genome-wide analysis of parent-of-origin allelic expression in endosperms of Brassicaceae species, *Brassica rapa*" *Plant Cell Physiol.* 59: 2590-2601.

Yoshida T, Tarutani Y, Kakutani T, Kawabe A (2018) "DNA Methylation Diversification at the Integrated Organellar DNA-Like Sequence." *Genes* 9: E602.

研究室集合写真 (2018年9月)



5. 学会発表など

吉田貴徳、川邊隆大、河邊昭、*Brassica rapa* にみられるインプレント遺伝子とその分子進化 日本遺伝学会第90回大会

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3月までは川邊隆大が、4月からは吉田貴徳が研究教育にあっている。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の確な指示・指導をおこなうことが可能になっている。特に専門がより近い内容の実験において担当教員以外に深い知識を持っている研究助教の存在は受講生にとっていい効果を上げていると考えられる。

植物生態進化発生学研究室

Laboratory of Plant Ecological and Evolutionary

Developmental Biology

教授 木村 成介

Prof. Seisuke Kimura, Ph. D.

助教 坂本 智昭

Assist. Prof. Tomoaki Sakamoto, Ph. D.



1. 研究概要

生物の形の多様性が生じる仕組みを、「発生」「進化」「環境」の3つの観点から理解しようとするのが生態進化発生学である。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3つの研究を展開している。

(1) 葉の形態の表現型可塑性の研究

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

2. 本年度の研究成果

(1) 葉の形態の表現型可塑性の研究

R. aquatica をモデルとしてトランスクリプトーム解析などを行うためには、ゲノム配列情報が必要となる。これまでの研究で、*R. aquatica* のゲノムをイルミナおよびPacBioプラットフォームでシークエンスし、1,797本の配列からなるドラフトゲノム (Genome size = 440Mbp, N₅₀ = 1,355,881bp) を得て

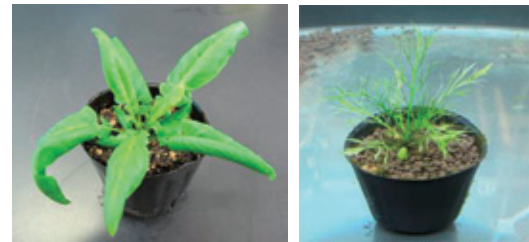


図1 *Rorippa aquatica*

左: 陸上の形態 右: 水中の形態

いた。*R. aquatica* の染色体数は $2n=30$ で、近縁の *Cardamine hirsuta* の染色体数は $2n=16$ である。これまでの研究で、*R. aquatica* では全染色体倍数化の後、染色体同士が融合することで現在の染色体数になったことが示唆されていた。今回、Hi-C法により各染色体の連続性の情報を取得することで、断片化しているコンティグから染色体スケールのスキュフォールド作成を試みた。3D de novo assembly pipelineを用いた自動クラスタリングと手動での修正により、15本の染色体配列 (総塩基長414.3 Mbp) と、染色体にクラスタリングされなかった2043本のスキュフォールド (総塩基長37.9 Mbp) を得ることができた。BUSCO解析の結果、15本の染色体配列から植物全体で保存されている遺伝子の大部分が見つかった。また、*C. hirsuta* との相対比較解析の結果からも、全染色体倍数化と染色体同士の融合の過程を経ていることが支持された。

(2) 葉の形態の多様性の進化発生学的研究

半水生のシダ植物であるミツデヘラシダ (*Microsorium pteropus*) では、変種によって、分岐無し、2又分岐、単軸分岐の3種類の葉の形態が観察される。今回、7種のミツデヘラシダとその変種を用いて、葉の分岐構造の多様性が生じる要因について研究した。まず、ミツデヘラシダとその変種について分子系統解析を行い、全て近縁であることを確かめた。次に、タイムラプス撮影による葉の形の形成過程の観察を行い、葉が先端成長することや成長部位で分岐が起こることを明らかにした。S期の細胞を特定するEdU標識を用いたパルス&チェイス実験によって葉の先端の成長部位に集中的に細胞分裂が起こっており、葉身が分岐する過程で細胞分裂が起こる位置が次第に左右に分かれていくことが分かった。また、葉に2又分岐を持つウェンディロフという変種では分岐構造を持つ葉の方が分岐構造を持たない葉よりも成長速度が速くなっている傾向が見

られた。葉の先端部の細胞増殖の様式や葉の成長速度が分岐の有無に影響している可能性が示唆された。

(3) 植物の栄養繁殖機構の研究

*R. aquatica*は、自然界において、水の流れなどの影響でちぎれた葉の断面から新しい個体を再生することで栄養繁殖をしている。この際、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。再生のメカニズムを分子レベルで明らかにするために経時的なトランスクリプトーム解析を行なった。基部側と先端部側で遺伝子発現を比較したところ、基部側でのみで再生に関わる遺伝子群の発現が誘導されていることがわかった。これまでの研究で、切断後、葉の切断後に極性輸送によりオーキシンが葉の基部側に蓄積することが根の再生を促進することがわかってきた。一方、シュートの再生がどのように引き起こされるのかはわかっていなかった。トランスクリプトーム解析の結果から、葉の切断後しばらくするとサイトカニン関係の遺伝子の発現に変動がみられた。サイトカイニンの内生量を測定すると、サイトカニン前駆体の量がシュートが再生してくるタイミングで上昇することがわかった。また、サイトカニンを添加するとシュートの再生が促進された。以上の結果から、再生過程におけるシュートの再生にはサイトカニンが重要であることが示された。

3. Research projects and annual reports

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

(1) Analysis of phenotypic plasticity of leaf shape

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 performed genomic analysis. To obtain chromosome level assembly, clustering and scaffolding of draft assembly sequences using 3D DNA pipeline with Hi-C (Chromatin conformation capture sequencing) reads was performed. After computational analysis and manual curation, 15 chromosome like sequences and 2043 scaffolds that is not grouped into chromosome cluster were obtained. To validate assembled sequences, BUSCO

(Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) analysis was performed. In the results, 94.4% of orthologs that conserved among land plant species were found from *R. aquatica* chromosome like sequences. It showed that chromosome sequences covered almost all coding region. And also, 49.4% of single copy genes were duplicated in *R. aquatica*. It suggested that *R. aquatica* genome underwent large scale chromosome duplication.

(2) The evolutionary-developmental study on leaf shape

Leaf shape is one of the most diverse character all in biology and divarication patterns are key factors that determine leaf shapes. We analyzed a variation in the divarication patterns of leaves of *Microsorium pteropus*, a semi-aquatic fern, and its varieties. Time-lapse imaging analysis revealed localized growths and dissections of blades near leaf apex. Restricted cell divisions responsible for the apical growths were confirmed using a pulse-chase analysis using EdU labeling assays.

(3) Molecular studies on the mechanisms of vegetative propagation

Some plant species have an amazing regenerative capacity and naturally regenerate entire individuals from explants, while many other species require optimized hormonal application. Although vegetative propagation by regeneration is widely observed across various plant species, the underlying regulatory mechanisms are mostly unknown owing to the lack of suitable experimental models. We have established a novel model system to study these mechanisms using an amphibious plant, *Rorippa aquatica* (Brassicaceae), which naturally undergoes vegetative propagation via regeneration from leaf fragments. Time-series RNA-seq analysis revealed that auxin and cytokinin responses were activated after cutting the leaves, and the expression of genes related to the regeneration pathway were upregulated at the proximal side of the leaf fragments. The results of cultivating leaf fragments on medium containing auxin, cytokinin, gibberellin, and their inhibitors indicated that both auxin and gibberellin are required for root regeneration, and cytokinin is important for shoot regeneration in *R. aquatica*.

4. 論文, 著書など

Saori Miyoshi, Seisuke Kimura, Ryo Ootsuki, Takumi Higaki, Akiko Nakamasu: Developmental analyses of divarications in

- leaves of an aquatic fern *Microsorium pteropus* and its varieties. **PLOS ONE** in press
- Mai Tsujimura, Takakazu Kaneko, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Masayoshi Shigyo, Hiroshi Yamagishi, Toru Terachi: Multichromosomal structure of the onion mitochondrial genome and a transcript analysis. *Mitochondrion* in press
- 木村成介、山本大地: 平成29年度「海外サイエンスキャンプ」の成果と課題、**高等教育フォーラム** in press
- 池松朱夏、木村成介: 葉の形から迫る植物の温度感知メカニズム (解説) **アグリバイオ 研究者の広場** in press
- Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura: Plant Temperature Sensors. (Review) **sensors** **18**: 4365
- Kaoru Okamoto Yoshiyama, Seisuke Kimura: Ser-Gln sites of SOG1 are rapidly hyperphosphorylated in response to DNA double-strand breaks. **Plant Signaling and Behavior** **13**: e1477904
- 木村成介、佐藤賢一、千葉志信、村田英雄: 高大連携授業におけるハテナソンの実践 – 「問われる立場」から「問う立場」への転換を目指して– **高等教育フォーラム** **8**: 21-39
- Hokuto Nakayama, Tomoaki Sakamoto, Yuki Okegawa, Kaori Kaminoyama, Manabu Fujie, Yasunori Ichihashi, Tetsuya Kurata, Ken Motohashi, Ihsan Al-Shehbaz, Neelima Sinha, Seisuke Kimura: Comparative transcriptomics with self-organizing map reveals cryptic photosynthetic differences between two accessions in North American Lake cress. **Scientific Reports** **8**: 3302
- Naoyuki Uchida, Koji Takahashi, Rie Iwasaki, Ryotaro Yamada, Masahiko Yoshimura, Takaho A. Endo, Seisuke Kimura, Hua Zhang, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara, Keiko U. Tori: Chemical hijacking of auxin signaling with an engineered auxin-TIR1 pair. **Nature Chemical Biology** **14**: 299-305
- 水見栄成、木村成介: ハテナソンにより高校理科授業における主体的・対話的で深い学びを促す – 生物基礎・地学基礎の授業実践から – **京都産業大学教職研究紀要** **13**: 1-32
- 吉井優太郎、木村成介: 小学校におけるハテナソンの実践 – 主体的・対話的で深い学びを実現するための手法として – **京都産業大学教職研究紀要** **13**: 33-46
- T Ikeda, W Tanaka, T Toriba, C Suzuki, A Maeno, K Tsuda, T Shiroishi, T Kurata, T Sakamoto, M Murai, H Matsusaka, T Kumamaru and HY Hirano. *BELLI*-like homeobox genes regulate inflorescence architecture and meristem maintenance in rice. **Plant J** in press
- N Ogita, Y Okushima, M Tokizawa, YY Yamamoto, M Tanaka, M Seki, Y Makita, M Matsui, K Okamoto-Yoshiyama, T Sakamoto, T Kurata, K Hiruma, Y Saijo, N Takahashi and M Umeda. Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in *Arabidopsis*. **Plant J** **94**: 439-453
- S Tanabashi, K Shoda, C Saito, T Sakamoto, T Kurata, T Uemura and A Nakano. A Missense Mutation in the *NSF* Gene Causes Abnormal Golgi Morphology in *Arabidopsis thaliana*. **Cell Struct Funct** **43**: 41-51
- 5. 学会発表など**
- 小山治、木村成介、長期有給インターンシップにおける学生の成長過程 – むすびわざコーオペセミナープログラムの事例 –、日本キャリア教育学会第40回研究大会、早稲田大学(東京都新宿区)、2018.12.8-9
- 木村成介、水草に見られる水中適応形質の進化、植物科学若手研究会2018、阿蘇草原保全活動センター(熊本県阿蘇市)、2018.11.18-20
- Yuhki Nishikawa, Tsutomu Tachibana, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura and Seiji Takeda, Morphological and genetic analysis for revealing petal development of *Habenaria radiata*, The 4 th Joint Symposium on “Basic and Applied Studies of Plant Natural Products for Agriculture and Human Health”, Kagoshima University (Kagoshima, Japan), 2018.11.8-9
- Seiji Takeda, Makiko Yoza, Gaku Yamazaki, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, and Issei Ohshima, Molecular mechanism of insect-induced gall development in plants, The 4 th Joint Symposium on “Basic and Applied Studies of Plant Natural Products for Agriculture and Human Health”, Kagoshima University (Kagoshima, Japan), 2018.11.8-9
- チームサイエンスの科学の日本推進を考えるハテナソン、王戈、佐藤賢一、木村成介、日本科学哲学会第51回大会、立命館大学衣笠キャンパス(京都府京都市)、2018.10.14
- Rorippa aquatica*は茎生葉上の新奇分裂組織を栄養繁殖に用いる、池松朱夏、木村成介、新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ、小豆島ふるさと村(香川県、小豆郡)、2018.10.4-6
- Rorippa aquatica*を用いた葉の断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、木村成介、新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ、小豆島ふるさと村(香川県、小豆郡)、2018.10.4-615.
- Adaptation of plants to aquatic environments: Studies on heterophylly and vegetative propagation in semi-aquatic plant, *Rorippa aquatica*, Seisuke Kimura, Ikematsu Shuka, Tomoaki Sakamoto, Rumi Amano, The 46th Naito Conference on “Mechanisms of Evolution and Biodiversity”, CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Japan, 2018.10.2-5

- 水陸両生植物 *Rorippa aquatica* における水没にตอบสนองした気孔形成抑制メカニズムの解析、馬瀬樹志、木村成介、新学術領域研究環境記憶統合第4回若手の会、中京大学青木湖セミナーハウスレイクビュー白馬(長野県・大町市)、2018.9.27-29
- 異形葉植物 *Rorippa aquatica* の比較ゲノム解析、坂本智昭、木村成介、新学術領域研究環境記憶統合第4回若手の会、中京大学青木湖セミナーハウスレイクビュー白馬(長野県・大町市)、2018.9.27-29
- Rorippa aquatica* の温度にตอบสนองした異形葉性の制御メカニズム、池松朱夏、木村成介、新学術領域研究環境記憶統合第4回若手の会、中京大学青木湖セミナーハウスレイクビュー白馬(長野県・大町市)、2018.9.27-29
- 表現型が異なる *Aegilops mutica* 細胞質置換コムギ2系統の葉緑体ゲノムの比較解析、山下健太、辻村真衣、上ノ山華織、木村成介、寺地徹、日本育種学会第134回講演会、岡山大学(岡山県岡山市)、2018.9.22-23
- 植物DNA損傷応答のマスターレギュレーターSOG1が果たす役割、愿山(岡本)郁、坂本智昭、上ノ山華織、木村成介、日本遺伝学会第90回大会、奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市)、2018.9.19-22
- Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、坂本智昭、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- サギソウの花形態形成に関する遺伝子発現解析、西川友貴、立花耕、坂本智昭、木村成介、武田征士、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- 水陸両生植物 *Rorippa aquatica* における水没にตอบสนองした気孔形成抑制メカニズムの解析、馬瀬樹志、野口楓子、池松朱夏、坂本智昭、木村成介、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- 異形葉性植物 *Rorippa aquatica* の比較ゲノム解析、坂本智昭、木村成介、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- シロイヌナズナを用いた新規耐病性検定法・トランスクリプトーム解析による、植物免疫活性化化合物の評価、中野正貴、北畑信隆、安江啓人、吉田亜祐実、末次真悠、佐藤静香、来須孝光、石賀貴子、石賀康博、木村成介、諸橋賢吾、浅見忠雄、朽津和幸、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- Rorippa aquatica* の温度移行にตอบสนองした葉形決定メカニズムの解析、池松朱夏、北野つくし、坂本智昭、笠原博幸、木村成介、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- シロイヌナズナ小胞体品質管理変異株が高温ストレス下で示す花粉成熟異常の解析、西川周一、宇治周平、坂本智昭、山本雅也、杉山智之、木村成介、遠藤斗志也、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- イネの葯タバート細胞のプログラム細胞死制御における転写制御ネットワーク・オートファジー・ROS生成酵素の役割と花粉成熟における意義、澤田隼平、福永任吾、花俣繁、小野聖二郎、木村成介、野々村賢一、来須孝光、朽津和幸、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場(広島県広島市)、2018.9.14-16
- Rorippa aquatica* を用いた葉断面からの栄養繁殖機構の解析、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、坂本智昭、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、日本植物形態学会第30回大会、広島県情報プラザ(広島県広島市)、2018.9.13
- サギソウの複雑な花弁形態を作り上げるメカニズム解明、西川友貴、立花耕、坂本智昭、木村成介、武田征士、第1回植物インフォーマティクス研究会、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)、2018.9.10
- チームサイエンスの科学の日本での推進を考えるハテナソン、王戈、佐藤賢一、木村成介、第65回日本グループ・ダイナミクス学会、神戸大学(兵庫県神戸市)、2018.9.8
- モデル植物シロイヌナズナを用いた虫こぶ形成機構の分子生物学的解析、佐藤雅彦、岡本彩花、木村成介、齊藤悠馬、田中玲帆、大島一正、平野朋子、第36回日本植物細胞分子生物学会、金沢商工会議所会館・石川県文教会館(石川県金沢市)、2018.8.26-28
- 質問を創る学び場“ハテナソン”授業の設計・運営と成果・課題 生命科学専門教育科目における実践と調査、佐藤賢一、木村成介、大学教育学会第40回大会、筑波大学(茨城県つくば市)、2018.6.9-10
- Development Ab-GALFA method, a novel assay method for analyzing molecular mechanisms underlying the gall formation process using a model plant, Arabidopsis thaliana, Masa H. Sato, Ayaka Okamoto, Issei Ohshima, Seisuke Kimura, Tomoko Hirano, 第59回日本植物生理学会年会シンポジウム「Amazing Development -Revealing Unusual Developmental Phenomena in Plants 植物が見せるユニークな発生および成長様式を読み解く」、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018.3.28(招待講演)
- Adaptation of plants to aquatic environments: Studies on vegetative propagation in semi-aquatic plant, *Rorippa aquatica*, Seisuke Kimura, 第59回日本植物生理学会年会シンポジウム「Amazing Development -Revealing Unusual Developmental Phenomena in Plants 植物が見せるユニークな発生および成長様式を読み解く」、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018.3.28(招待講演)
- アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の水中生活適応に伴う花成抑制機構の解析、池松朱夏、坂本智昭、中山北斗、木村成介、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター

(北海道札幌市)、2018.3.28-30

A leading compound that regulate stomatal development, Hitoshi Endo, Seisuke Kimura, Naoyuki Uchida, Keiko Torii, 第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018.3.28-30

ミズナとミブナ (*Brassica rapa*)に見られる葉形変異の遺伝学的背景と育種の歴史の解明、川勝弥一、坂本智昭、中山北斗、上ノ山華織、五十嵐香理、矢野健太郎、久保中央、木村成介、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018.3.28-30

*Rorippa aquatica*の栄養繁殖を制御する遺伝子群の探索、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、桶川友季、本橋健、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018.3.28-30

スルデアブラムシの虫液処理によるシロイヌナズナの形態変化および遺伝子発現変化、岡本彩花、斎藤悠馬、田中玲帆、大島一正、木村成介、平野朋子、佐藤雅彦、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018.3.28-3.30

ROS生成・トランスクリプトーム解析・耐病性検定に基づく、新規植物免疫活性化化合物の解析、中野正貴、北畑信隆、吉田亜祐美、斎藤優歩、佐藤静香、安江啓人、来栖孝光、石賀貴子、石賀康博、木村成介、諸橋賢吾、浅見忠男、朽津和幸、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018.3.28-30

アブラナ科半水生植物 *Rorippa aquatica* における異形葉性と共生微生物の群集構造、板倉学、木村成介、上ノ山華織、金子貴一、第12回日本ゲノム微生物学会年会、京都大学桂キャンパス、2018.3.5-7

Insights into mechanisms of gall morphogenesis and the origin of gall induction, Antoine Guiguet, Issei Ohshima, Seisuke Kimura, Seiji Takeda, Françoise Laurans, Véronique Lainé-Prade, Carlos Lopez-Vaamonde, David Giron, 7th International Symposium on Cecidology –Ecology and Evolution of Gall-Inducing Arthropods, Huisun Experimental Forest Station, Taiwan, 2018.3.3-8

質問作りワーク「ハテナソ」で生物授業における主体的・対話的で深い学びを促す、木村成介、氷見栄成、佐藤賢一、日本生物教育学会第102回全国大会、熊本大学(熊本県熊本市)、2018.1.6-8

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:水陸両生植物の水環境への適応に寄与する環境応

答統御システムの解析

研究代表者:木村成介、取得年度:H30-31年(2年)

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:植物の栄養繁殖をモデルとした再生と幹細胞性の維持機構の解明

研究代表者:木村成介、取得年度:H30-31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
ー統合オミックス解析による展開ー

研究代表者:木村成介、取得年度:H27-31年(5年)

公益財団法人住友財団 基礎科学研究助成

課題名:イネの薬分化における活性酸素シグナルを介した転写・脂質代謝制御ネットワークの解明

共同研究者:木村成介、取得年度:H30年(1年)

公益財団法人武田科学振興財団2018年度中学校・高等学校理科教育振興助成

課題名:植物の環境応答と遺伝子発現制御を学ぶ生物実験系の確立

共同研究者:木村成介、取得年度:H30年(1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59回日本植物生理学会年会シンポジウム「Amazing Development -Revealing Unusual Developmental Phenomena in Plants 植物が見せるユニークな発生および成長様式を読み解く」オーガナイザー、2018.3.28

木村成介 第53回植物バイオテクノロジーシンポジウム「再生と改変～植物の再分化能力の秘密に迫る～」オーガナイザー、2018.3.28

木村成介 Dr. Gholamereza Gohari (Assistant Professor, Department Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh) を客員研究員として受け入れ、2018.7.12-2018.9.10

木村成介 あそびとまなびの玉手箱(サイエンスコミュニケーション研究会サングラスによる商業施設での子供向け科学体験イベント)オーガナイザー、2018.8.10

木村成介 かみがもラボ(サイエンスコミュニケーション研究会サングラスによる小学校児童向け科学体験イベント)オーガナイザー、2018.12.9

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ス解析についてはウエットからドライの解析まで一貫して高い技術を持っている。坂本博士は、その高い技術をもとに大学院生の研究指導だけでなく、基礎特別研究や応用特別研究の指導にもあたっており、学生教育に直接貢献している。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。



集合写真



たこ焼きパーティー



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.



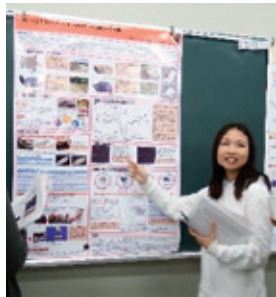
1. 研究概要

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

カメの保全を目的とした非侵襲的 DNA 採取法の開発 (浅見真莉)

本研究では、カメの保全遺伝学的研究を行うために野生個体への影響が小さい DNA 採取方法の開発を試みた。サンプルとして、ニホンイシガメ(2017年9月、京都)およびクサガメ(2018年8月、京都)、リュウキュウヤマガメ(2018年11月、沖縄本島)、ヤエヤマセマルハコガメ(2018年10月、西表島)を利用し、コントロ

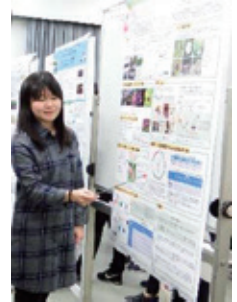


ールとしてアカミガメを利用した。非侵襲的 DNA 採取方法として綿棒による口腔内細胞と体表からの DNA 抽出方法を行った。さらに、骨からヒトの抽出キットを用いて DNA 抽出を行った。その結果、いずれの方法からも高分子の DNA を抽出することができ、PCR で増幅が確認できた。また、これらの DNA を利用して次世代シーケンサーにより、ミトコンドリア DNA の全長配列を決定し 13PGC 領域で分子系統樹を作成することができた。今回開発した非侵襲的 DNA 採取方法により天然記念物のカメを対象とした保全遺伝学的研究に利用することが期待できる。また、分子系統解析からは日本のクサガメが大陸から持ち込まれたものであることが示唆された。

北海道・ユリ島で発見されたシュレンクマルハナバチの遺伝的固有性(梅澤実鈴)

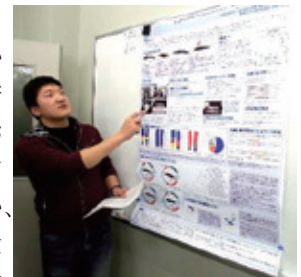
北海道・ユリ島に上陸し、島内で訪花している 25 個体のマルハナバチを採集し、外部形態と DNA バー

コーディング法を用いて種同定を行った。分析の結果、23 個体はシュレンクマルハナバチ *Bombus schrencki* と同定され、残り 2 個体はナガマルハナバチおよびニセハイロマルハナバチであった。今回初記録のシュレンクマルハナバチが優占種となっていた。ユリ島のシュレンクマルハナバチの固有性を明らかにするために解析した。根室半島を含む他地域で 2014~2018 年に採集した根室半島 17 個体、野付半島 5 個体、富良野 3 個体、サハリン島 1 個体のミトコンドリア DNA COI 遺伝子配列を解析した。得られた 10 個のハプロタイプを比較したところ、ユリ島の個体は固有のハプロタイプを持っていることが分かった。また、根室半島とユリ島のミトコンドリア全長配列を比較したところ、13 個の PCGs の 11043 塩基のうち 11 塩基で置換が確認され、根室半島集団とは遺伝的に隔離されていることが明らかになった。さらにユリ島のシュレンクマルハナバチ集団の分岐年代を推定したところ、島の成立時から生息していることが示唆された。これらの結果からユリ島はマルハナバチにおいても重要な保全地域であることが分かった。



日本産ナマズ属の環境 DNA 解析手法の開発(岸本友)

環境 DNA 解析法を用いて山口県きらら浜、大阪府淀川、芥川(淀川支流)における魚類を対象としたモニタリング調査を季節ごとに行い、ナマズ属の検出が可能か検証した。また、国内 4 種のナマズ属特異的なプライマーの作成に必要な DNA 配列データがデータベース上に存在しないので、次世代シーケンス(NGS)とサイクルシーケンスにより滋賀県瀬田川産のマナマズ、琵琶湖産のピワコオオナマズ、イワトコナマズ、愛知県豊川市産のタニガワナマズのミトコンドリア DNA の全長配列を決定し、データベース上に存在する他のナマズ属の 13PCGs を含めた分子系統樹を作成



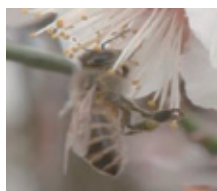
した。さらに決定した配列から4種のナマズ属それぞれ



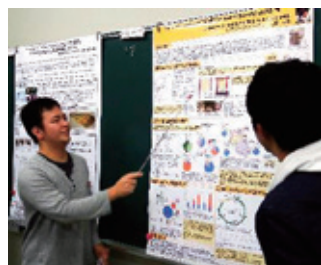
に特異的なプライマーの開発を試みた。淀川、さら浜でのモニタリング調査によりナマズが検出されたため、環境 DNA 解析によるナマズ属の検出に使用できることが分かった。分子系統解析よりイワトコナマズとタニガワナマズが姉妹種であることが判明した。ミトコンドリア DNA の全長配列決定により、タニガワナマズに特異的なプライマーが開発できたため、タニガワナマズの環境中における在・不在が評価できるようになるだろう。

ニホンミツバチにおける重要生息地域の遺伝的多様性評価(松尾祐弥)

本研究では、6 個体のニホンミツバチのミトコンドリア DNA の全長配列を解読し、その配列をもとに COI 遺伝子のプライマーを設計した。次に、生物多様性が高い地域



である屋久島(60 個体)及び白神山地(96 個体)、伝統養蜂が盛んな地域である対馬島(42 個体)、伝統養蜂が行われており果樹栽培が盛んな地域である和歌山県(389 個体)及び長野県(90 個体)の5地域を選定し、ミトコンドリア DNA の COI 遺伝子の解析による遺伝的多様性を評価した。今回得られたミトコンドリア DNA の COI 遺伝子の配列より、5 地域で17 個のハプロタイプが検出され、5 地域に共通したメジャーハプロタイプが存在することが確認された。和歌山県及び対馬島には他地域には存在しない固有ハプロタイプが5 個以上存在し、遺伝的固有性が高いことが示唆された。また、対馬島及び長野県は遺伝的多様性が比較的高く、和歌山県及び屋久島、白神山地は解析個体の大半をメジャーハプロタイプが占め、対馬島及び長崎県よりも遺伝的多様性が低いことが示された。本種では、対馬島及び和歌山県、長野県という伝統養蜂が盛んな地域で、遺伝的固有性、多様性が高くなっていることから、これらの維持には養蜂が重要である可能性が示唆された。伝統養蜂による住処や食糧の提供が、環境の変化による個体数の減少を抑え、本種の遺伝的多様性を維持することに繋がったと考えられる。また、解読したミトコンドリア DNA の配列を用いてアジア地域を含めたトウヨウミツバチの分子系統解析を行った結果、ニホンミツバチはアジア大



陸から対馬島を経由して日本に移動し、別亜種に分化した可能性が高いことが示唆される。

3. Research projects and annual reports

The draft genome sequence of the Japanese honey bee, Apis cerana japonica (Hymenoptera: Apidae)

Honey bees are not only important for honey production but also as pollinators of wild and cultivated plants. The Eastern honeybee (Apis cerana) is more resistant to several pathogens than the Western honeybee (Apis mellifera), and the genomes of two strains of the nominotypical subspecies, A. cerana cerana, northern (Korea) and southern (China) strains, have been sequenced. Apis cerana japonica, another subspecies of A. cerana, shows many specific features (e.g. mildness, low honey production and frequently absconds) and it is important to study the molecular biological and genetic aspects of these features. To accelerate the genetic research on A. cerana japonica, we sequenced the genome of this subspecies. The draft genome sequence of A. cerana japonica presented here is of high quality in terms of basic genome status (e.g. N50 is 180 kbp, total length is 211 Mbp, and largest contig length is 1.31 Mbp) and BUSCO results. The gene set of A. cerana japonica was predicted using AUGUSTUS software and the set of genes was annotated using Blastp and InterProScan, and GO terms were added to each gene. The number of genes is higher than in A. mellifera and in the two strains of A. cerana cerana sequenced previously. A small number of transposable elements and repetitive regions were found in A. cerana japonica, which are also in the genomes of A. mellifera and the northern and southern strains of A. cerana cerana. Apis cerana is resistant to several pathogens that seriously damage A. mellifera. We searched for 41 orthologs related to the IMD and Toll pathways, which have key roles in the immune reaction to invading pathogens. Some orthologs were not identified in the genome of the northern strain of A. cerana cerana. This indicates that the Toll and IMD pathways function in the same way as in A. mellifera and Drosophila melanogaster. Use of the draft genome sequence of A. cerana japonica provided herein and those of the other Apis (sub)species may help to accelerate comparative research on the genome of honey bees.

4. 論文, 著書など

1. Takeuchi T, Sasaki T, Mitsuhata M, Kiyoshi T, Nishimoto M (M2), Nomura T, Takahashi J. 2019. Low mitochondrial DNA variation in the endangered bumble bee *Bombus cryptarum florilegus*. *Journal of Apicultural Research*. DOI: 10.1080/00218839.2019.1614735
2. Yamasaki K, Takahashi R(M2), Harada R(B4), Matsuo Y(B4), Nakamura M, Takahashi J. 2019. Reproductive interference by alien hornet *Vespa velutina* threatens the native populations of *Vespa simillima* in Japan. *The Science of Nature*. 106:15. DOI 10.1007/s00114-019-1609-x
3. Ilyasov R, Nikolenko A, Tuktarov V, Goto K, Takahashi J, Kwon HW. 2019. Comparative analysis of mitochondrial genomes of the honey bee subspecies *A. m. caucasica* and *A. m. carpathica* and refinement of their evolutionary lineages. *Journal of Apicultural Research*. DOI: 10.1080/00218839.2019.1622320
4. Takahashi J, Okuyama H, Martin SJ. 2019. Complete mitochondrial DNA sequence of the small hive beetle *Aethina tumida* (Insecta: Coleoptera) from Hawaii. *Mitochondrial DNA Part B*. 4:1522-1523.
5. Asami M(B4), Okuyama H, Takahashi J. 2019. Complete mitochondrial DNA sequence of the three-keeled pond turtle *Mauremys reevesii* (Reptilia: Testudines). *Mitochondrial DNA Part B*. 4:1520-1521.
6. Asami M(B4), Okuyama H, Takahashi J. 2019. Complete mitochondrial DNA sequence of the endemic Japanese pond turtle *Mauremys japonica* (Reptilia: Testudines). *Mitochondrial DNA Part B*. 4:1450-1451.
7. Takahashi J, Hosaka K, Martin SJ, Kawabe A. 2019. Asian Honey Bee *Apis cerana* Foraging on Mushrooms. *Bee World*. 96:10-11. DOI: 10.1080/0005772X.2018.1556964
8. Takahashi J, Okuyama H, Kiyoshi T, Takeuchi T, Martin SJ. 2019. Origins of *Vespa velutina* hornets that recently invaded Iki Island, Japan and Jersey Island, UK. *Mitochondrial DNA Part A*. 30:434-439. DOI: 10.1080/24701394.2018.1538366
9. Yokoi K, Uchiyama H, Wakamiya T(M2), Yoshiyama M, Takahashi J, Nomura T, Furukawa T, Yajima S, Kimura K. 2018. The draft genome sequence of the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica* (Hymenoptera: Apidae). *European Journal of Entomology*. 115: 650–657. DOI: 10.14411/eje.2018.064
10. Maeda M(B4), Nakagawa I(B4), Chikano M(M1), Okuyama H, Murray R, Takahashi J. 2018. The complete mitochondrial genome of the dusky brown-gray-colored honeybee, *Apis mellifera* (insecta: Hymenoptera: Apidae) of New Zealand. *Mitochondrial DNA Part B*. 3:996-997. Doi: 10.1080/23802359.2018.1507641
11. Ilyasov R, Park JH, Takahashi J, Kwon HK. 2018. Phylogenetic Uniqueness of Honeybee *Apis cerana* from the Korean Peninsula Inferred from The Mitochondrial, Nuclear, and Morphological Data. *Journal of Apicultural Science*. 189-214. DOI: 10.2478/jas-2018-0018
12. Nishimoto M(M2), Umezawa M(B4), Okuyama H, Kumano N, Nomura T, Takahashi J. 2018. The complete mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus hypocrita sapporensis* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) from Hokkaido Island, Japan. *Mitochondrial DNA Part B*. 3:354-356. DOI: 10.1080/23802359.2018.1450673
13. Okuyama H, Hill J, Martin SJ, Takahashi J. 2018. The complete mitochondrial genome of a Buckfast bee, *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) in Northern Ireland. *Mitochondrial DNA Part B*. 3:338-339. DOI: 10.1080/23802359.2018.1450660
14. Takahashi J, Deowanish S, Okuyama H. 2018. Analysis of the complete mitochondrial genomes of two dwarf honeybee species, *Apis florea* and *Apis andreniformis* (Insecta: Hymenoptera: Apidae), in Thailand. *Mitochondrial DNA Part B*. 3:350-353. DOI: 10.1080/23802359.2018.1450672
15. Takeuchi T, Takahashi M, Nishimoto M(M2), Kiyoshi T, Tsuchida K, Nomura T, Takahashi J. 2018. Genetic structure of the bumble bee *Bombus hypocrita sapporoensis*, a potential domestic pollinator for crops in Japan. *Journal of Apicultural Research*. 57:203-212. DOI: 10.1080/00218839.2017.1412879
16. Takahashi R(M2), Okuyama H, Minoshima YN, Takahashi J. 2018. Complete mitochondrial DNA sequence of the alien hornet *Vespa velutina* (Insecta: Hymenoptera) invading Kyushu Island, Japan. *Mitochondrial DNA Part B*. 3:179-181. DOI: 10.1080/23802359.2018.1437823
17. Nakagawa I(B4), Maeda M(B4), Chikano M(M1), Okuyama H, Murray R, Takahashi J. 2018. The complete mitochondrial genome of the yellow coloured honeybee *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) of New Zealand. *Mitochondrial DNA Part B*. 3:66-67. DOI: 10.1080/23802359.2017.1422401
18. Nomura T, Takahashi J. 2018. Comparison of four mating systems for maintenance of honeybee colonies in terms of the inbreeding coefficient and effective population size. *The Journal of Animal Genetics*. 46:3-10.
19. 梅澤実鈴 (B4)・浅見真莉 (B4)・高田令子・外山雅大・高橋純一 北海道・ユルリ島からのシュレンクマルハナバチの初分布記録. *昆虫*. 2019. 22:6-8.

20. 竹内剛・高橋稜一(M2)・高橋純一 東アジアとヨーロッパに侵入したツマアカスズメバチ. *昆虫と自然*. 53:31-35.
21. 奥山永・高橋純一 岩崎島北部でのツマアカスズメバチの採集記録. *長崎県生物学会誌*. 82:9-10.
22. 西本愛(M2)・竹内剛・高橋純一 オオマルハナバチの遺伝構造と系統解析. *昆虫と自然*. 2019. 53:22-26.
23. 高橋純一・小野正人 世界のミツバチ属(*Apis*)の最新の分類体系. *昆虫と自然*. 2018. 53:4-8.

5. 学会発表など

1. 稲本哲朗・松尾祐弥(B4)・万谷洋平・横山俊史・星信彦・北川浩・高橋純一 ミツバチにおける全身組織標本作製法の開発とニホンミツバチワーカーの全身臓器の把握. 口頭発表. 第63回日本応用動物昆虫学会. 2019年3月27日. 筑波大学.
2. 廣川諭・手塚俊行・森修二郎・小原慎司・伊藤健司・三浦早貴・高橋純一 紫外線カットフィルムがマルハナバチ類に及ぼす影響Ⅱ. エゾオオマルハナバチとオオマルハナバチに及ぼす影響. 口頭発表. 第63回日本応用動物昆虫学会. 2019年3月27日. 筑波大学.
3. 高橋純一 梅システムとミツバチ. 招待講演. 世界農業遺産フォーラム. 2019年3月27日. 南部町.
4. 奥山永 和歌山県のニホンミツバチの遺伝的多様性評価. ポスター発表. 世界農業遺産フォーラム. 2019年3月27日. 南部町.
5. 岸本友(B4) 日本産ナマズ属の環境 DNA 解析手法の開発. ポスター発表. 世界農業遺産フォーラム. 2019年3月27日. 南部町.
6. 井上諒(B3)・今井静香(B3)・溝端丞之介(B3)・吉田達也(B3) 第3回京都産業大学出張オープンキャンパス. 2019年3月27日. 南部町.
7. 高橋純一 ミツバチのすぐれた能力とハチミツの効能について. 京都・土庄むすびわぎ大学. 2019年2月11日. 小豆島.
8. 新村友理(M2)・近野真央(M1) 多種多様なハチミツについて. ポスター発表. 京都・土庄むすびわぎ大学. 2019年2月11日. 小豆島.
9. 浅見真莉(B4) カメの保全を目的とした非侵襲的 DNA 採取法の開発. ポスター発表. 京都・土庄むすびわぎ大学. 2019年2月11日. 小豆島.
10. 梅澤実鈴(B4) 北海道・ユルリ島で発見されたシュレンクマルハナバチの遺伝的固有性. ポスター発表. 京都・土庄むすびわぎ大学. 2019年2月11日. 小豆島.
11. 岸本友(B4) 日本産ナマズ属の環境 DNA 解析手法の開発. ポスター発表. 京都・土庄むすびわぎ大学. 2019年2月11日. 小豆島.
12. 松尾祐弥(B4) ニホンミツバチにおける重要生息地域の遺伝的多様性評価. ポスター発表. 京都・土庄むすびわぎ大学. 2019年2月11日. 小豆島.
13. 井上諒(B3)・今井静香(B3)・溝端丞之介(B3)・吉田達也(B3) 第2回京都産業大学出張オープンキャンパス. 2019年2月11日. 小豆島.
14. 高橋純一 北海道在来マルハナバチ類のトマト授粉能力とミトコンドリアDNAの全長比較. ポスター発表. 関西昆虫研究会. 2019年1月12日. 大阪自然史博物館.
15. 梅澤実鈴(B4)・浅見真莉(B4)・高田令子・外山雅大・高橋純一 北海道・ユルリ島で発見されたシュレンクマルハナバチの遺伝的固有性. 口頭発表. 関西昆虫研究会. 2019年1月12日. 大阪自然史博物館.
16. 松尾祐弥(B4)・奥山永・高橋純一 ニホンミツバチにおける重要生息地域の遺伝的多様性評価. 口頭発表. 関西昆虫研究会. 2019年1月12日. 大阪自然史博物館.
17. 奥山永・井上諒(B3)・溝端丞之介(B3)・竹内剛・SJ Martin・高橋純一 国内および英国に侵入したツマアカスズメバチの侵入起源と系統について. ポスター発表. 関西昆虫研究会. 2019年1月12日. 大阪自然史博物館.
18. 松尾祐弥(B4)・奥山永・高橋純一 対馬に生息しているニホンミツバチの遺伝的多様性の評価. ポスター発表. 対馬学フォーラム2018. 2018年12月9日. 対馬市.
19. 浅見真莉(B4)・梅澤実鈴(B4)・岸本友(B4) 第1回京都産業大学出張オープンキャンパス. 2018年12月9日. 対馬市.
20. 高橋純一 生物資源と生物多様性について. 出前講義. 京都府立園部高等学校. 2018年11月13日. 園部市.
21. 奥山永・竹内剛・SJ Martin・高橋純一 ミトコンドリアDNAによる日本および英国に侵入したツマアカスズメバチの侵入起源の推定. ポスター発表. 第62回日本応用動物昆虫学会. 2018年3月26日. 鹿児島大学.
22. 奥山永・竹内剛・高橋純一 ミトコンドリアDNAによるノサップマルハナバチの遺伝構造と分子系統解析. ポスター発表. 日本昆虫学会近畿支部会. 2017年12月16日. 大阪府立大学 I-site. 大阪市.
23. 西本愛(M2)・竹内剛・高橋純一 オオマルハナバチ亜種間の分子系統とトマトへ授粉能力に関する比較調査の結果について. ポスター発表. 第62回日本応用動物昆虫学会. 2018年3月26日. 鹿児島大学.

6. その他特記事項

1) 外部資金

1. 農林水産省 農業における昆虫等の積極的利活用技術の開発

研究分担者：高橋純一、研究代表者：與語靖洋、平成 29-33 年度(5 年)

2. 科学研究費補助金 基盤研究 B 北海道産マルハナバチの高受粉能力系統の造成と受粉効率の評価

研究分担者：高橋純一、研究代表者：野村哲郎、平成 29-33 年度(5 年)

3. 科学研究費補助金 基盤研究 C 侵略的外来種ツマアカスズメバチの帰化状況と生態情報にもとづいた防除法の確立
研究代表者：高橋純一、平成 26-28 年度(3 年)

4. 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

研究分担者：高橋純一、研究代表者：椿宜高、平成 28-30 年度(3 年)

2) 学外活動

高橋純一 一般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

高橋純一 近畿有害生物研究会：顧問



学部卒業式



大学院修了式

3) 受賞等

1. 松尾祐弥(B4) 対馬学フォーラム 2018. ポスター発表優秀賞.

2. 松尾祐弥(B4) 平成 30 年度生命資源環境学科卒業研究発表会. 優秀賞.



卒業祝賀式



和歌山県・石神田辺梅林での学外ゼミ



北海道・根室半島海岸で見つけた鯨骨標本(夏合宿)

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。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。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

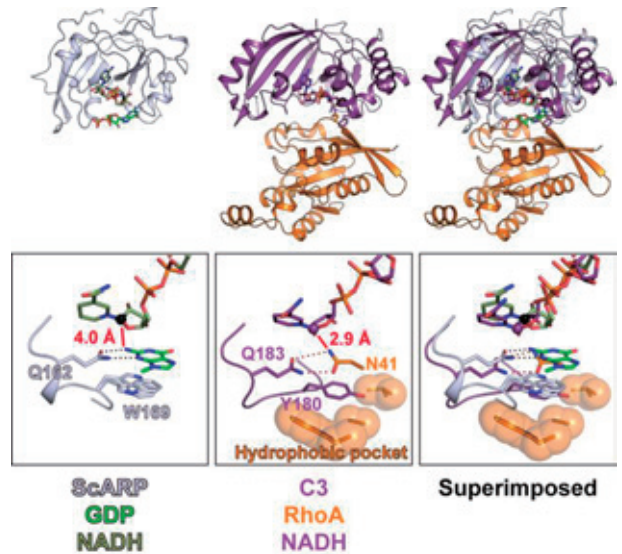
(1) ADP リボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学: 様々な病原微生物は ADP リボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な ADP リボシル化毒素(酵素)とその基質複合体での結晶構造解析を進めている。

(2) 細菌トランスロコンの構造と輸送機構の解明: *C.perfringens* が持つバイナリー毒素は上述したアクチンを ADP リボシル化する Ia とこれを膜内へ輸送するトランスロコン Ib からなる。トランスロコン Ib の構造と機能に焦点を当てた研究を進めている。

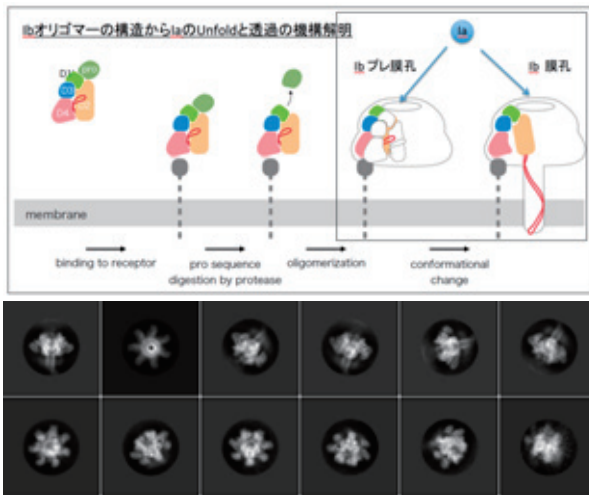
2. 本年度の研究成果

(1) モンシロチョウに存在する酵素ピエリシンは DNA を ADP リボシル化する酵素として、国立がんセンター杉村らによって見出された。ピエリシンは、種々のがん細胞に対して細胞傷害活性を示すことから研究が進められてきた。我々のグループでは、タンパク質を標的とした細菌由来の ADP リボシル化毒素の構造と機能を、特に基質タンパク質との複合体から明らかにする研究を長年行っている。その基質認識についてさらなる理解を進めるために、DNA を ADP リボシル化する酵素の構造と機能に興味をもち研究を行った。放線菌にもこれに似た酵素 ScARP が存在する。ピエリシンと ScARP の違いは、ピエリシンは二重らせんの DNA を好んで認識し、ScARP は低分子のグアニンに対して特異性を示すことであった。このグアニン特異性について知りたいと考え、ScARP と GDP の共結晶化を行いその構造を明らかにした。得られた構造を、既に我々が構造を明らかにしている、RhoA の Asn を ADP リボシル化する C3 毒素と対比した。どちらも酵素の ARTT ループ上の Gln(Q)が ScARP ではグアニンを、もう一方の C3 では Asn の認識を行っていた。その基質認識機構は、

ARTT と NAD⁺と基質の相対配置は、基質が塩基とアミノ酸と別のものでありながら、驚くほど似ている(図参照)。普遍的な ADP リボシル化の基質の認識機構を明らかにした。



(2) *C.perfringens* が持つ binary 毒素である、膜孔形成毒素 Ib の構造と機能解析を進めている。膜孔形成毒素 Ib はアクチン特異的 ADP リボシル化する酵素 Ia を膜透過させるトランスロコンである。Ia がアクチンの ADP リボシル化毒性を発揮するためには Ib が①水溶性プレ膜孔オリゴマーを形成、次に細胞膜上で構造変化をおこし②Ib オリゴマーからなる膜孔を形成、③これに Ia が結合し、Ia の立体構造がほどけて、④Ia が Ib オリゴマー膜孔を通過する、この4つのステップが必要となる(下図)。最初の構造解析の目的は、500KDa のオリゴマーを作るプレ膜孔および膜孔の構造を明らかにすることである。Ib は 20KDa のプロ配列(pro)と 75KDa の4つのドメインからなるボディ(Ib)からなる。大腸菌で発現させた GST-pro-Ib をトリプシン、キモトリプシンで処理し、GST と pro を切断、ゲルろ過でオリゴマーフラクションを取り、負染色電子顕微鏡画像およびクライオ電子顕微鏡データを取得した。さらに cryo EM を用いた単粒子解析をおこなった。現在その解析の継続と、サンプル調整を変えることで、より良い分解能のデータを取得できないかを検討を加えている。



Ib-oligomer 単粒子解析 2D クラス画像

(3) 腸炎ビブリオは主に海水中に生息する細菌であり、本菌で汚染された魚介類を生食することで、ヒトに感染して腸炎ビブリオ食中毒を発症させる。エフェクターVopCはtypeIIIの分泌装置を介して分泌され、Rho GTPaseであるCdc42のGlnを脱アミド化することで、宿主細胞に影響し、感染しやすくする場を作っていると考えられる。食中毒原因菌の毒素の作用機作を明らかにするためVopCの結晶構造解析を行った。既にVopCと似た毒素である大腸菌のCnf1の構造は明らかになっているが、その基質特異性は異なり、Cnf1ではRhoA特異的である。これらの脱アミド化毒素のRho GTPaseの認識機構と反応機構は、基質タンパク質との複合体の構造が明らかでないためによくわかっていない。我々は単体の結晶構造だけでなく、Cdc42複合体での構造解析と、認識機構を知るための基質変異体を用いた機能解析を進めている。その単体の構造が得られ、その結果を、生化学にフィードバックして研究を進めている。

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. These basic researches were expected to find a novel drug in infectious disease.

(1) ScARP is a member of the pierisin family of DNA-targeting ADP-ribosyltransferases (ARTs). Pierisin group enzymes ADP-ribosylate the N² amino groups of guanine residues in DNA to yield N²-(ADP-ribos-1-yl)-2'-deoxyguanosine. Though the structures of pierisin-I and Scabin were revealed recently, the mechanism of specific substrate recognition was poorly understood because of a lack of substrate-binding structure. We revealed the structure of ScARP bound to NADH and GDP (substrate). The structure

showed that guanine of GDP was trapped between N-ribose of NADH and Trp159. Interestingly, N² and N³ of guanine form hydrogen bonds with OE1 and NE2 of Gln162, respectively. We present the first direct observation that the ADP-ribosylating toxin turn-turn (ARTT)-loop including Trp159 and Gln162 plays a key role in the specificity of DNA-targeting guanine specific ART as well as protein-targeting ART such as C3 exoenzyme. We propose that the ARTT-loop recognition is a common substrate recognition mechanism in the pierisin family. Furthermore, this complex structure with minimum elements of ADP-ribosylation sheds light on similarities and differences among two major subclasses that are distinguished by conserved structural motifs: H-Y-E in the ARTD subfamily and R-S-E in the ARTC subfamily. The spatial arrangements of electrophile and nucleophile are same, providing the first clear insight of the common reaction mechanism in both ARTs. ARTC (ScARP) uses the ARTT-loop to recognize substrate whereas ARTD (Arr) uses the C-terminal helix instead of the ARTT-loop. These characterizations would facilitate to make better inhibitors of ARTs.

(2) Iota-toxin from *C. perfringens* type E is a binary toxin composed of an enzymatic component (Ia) and a pore-forming protein translocon (Ib). Ia is an ADP-ribosylating toxin that ADP-ribosylates actin. ADP-ribosylation of G-actin at arginine 177 causes the depolymerization of the actin cytoskeleton and finally leads lethal and dermonecrotic in mammal cells. On the other hand, Ib of binary toxin is important machinery for protein translocation: Ia translates over the membrane to the cytosol via Ib pore-forming translocon.

We would like to reveal the structure of pre-pore and pore of Ib using cryoEM and crystallography. Our final purpose is to understand the mechanism of Ia translocation via Ib.

(3) Effector of *V. parahaemolyticus*

Vivrio parahaemolyticus is a Gram-negative marine bacterium that causes acute gastroenteritis in humans. The virulence is dependent of a type III secretion system and VopC is one effector which is homologue of the catalytic domain of cytotoxic necrotizing factor (CNF). VopC was reported to deamidate Rac1 and Cdc42 but not RhoA. To understand the mechanism of recognition of Rho GTPase and ADP-ribosylation, we are going to solve the structure of VopC together with biochemical studies.

4. 論文著書など

Yoshida T. and Tsuge H. Substrate N² atom recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting, guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP.

Journal of Biological Chemistry,293(36):13768-13774(2018)

Suzuki Y., Tsuge H., Hondoh H., Kato Y., Uehara Y., Maita N., Hosokawa K., and Ueta S. Precipitant-Free Lysozyme Crystals Grown by Centrifugal Concentration Reveal Structural Changes.

Crystal Growth and Design, 18 (8):4226-4229(2018)

5. 学会発表など

Yoshida T, Yamada T, and Tsuge H Membrane transport and ADP-ribosylation mechanism of binary toxin *C. perfringens* iota toxin, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”, 比叡山延暦寺会館 (京都), 2018.8.26-29. (口頭発表)

Yoshida T. and Tsuge H Substrate recognition and reaction mechanism of DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”, 比叡山延暦寺会館 (京都), 2018.8.26-29.

Yamada T, Yoshida T. and Tsuge H Cryo-EM single particle analysis of *C. perfringens* binary toxin, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”, 比叡山延暦寺会館 (京都), 2018.8.26-29.

津下英明: DNAを標的としたADPリボシル化酵素の基質認識機構, 第453回ビタミンB 研究協議会, オークラホテル高松 (香川), 2018.8.31

津下英明: From Protein to DNA Modification: Substrate recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP, 日本分子生物学会 ワークショップ ADP-ribosylation in intra- & extracellular communication and diseases, パシフィコ横浜, 2018.12.3-6 (口頭発表)

津下英明: Clostridium Binary Toxin: 膜孔形成タンパク質トロンスロコンの作用機構について, 京都薬科大学, 2018.2.25

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「クライオ電子顕微鏡と X 線結晶構造解析による二成分毒素トランスロコンの構造機能解析」研究代表者: 津下英明, 取得年度: H30-H32 年 (3 年)

科学研究費補助金・若手研究 (B)

課題名「モノ ADP リボシル化毒素に不可欠な 2 種類の特異性を理解する」 研究代表者: 吉田徹, 取得年度: H29-H31 年 (3 年)

(2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

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

7. 総合生命科学部教育研究活性化支援制度の教育効果
すべての研究は、総合生命科学部教育研究活性化支援制度、研究助教の吉田徹の強力なサポートで行われた。また、実験実習や授業で、また基礎特別研究、応用特別研究で、研究助教を含めた複数の教員関わった教育と実験指導は、学生に対する高い教育効果をあげた。



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、工学部生物工学科時代に遡る30年以上も前から、「高等植物のオルガネラゲノム」に関連する研究を継続している。その中でも特に、コムギ (*Triticum aestivum*)、ダイコン (*Raphanus sativus*)、トマト (*Solanum lycopersicum*) 及びレタス (*Lactuca sativa*) 等の作物、ならびにタバコ (*Nicotiana tabacum*) 及びベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) 等のモデル植物を材料に、これらの葉緑体ゲノムあるいはミトコンドリアゲノムの解析を様々な観点から行ってきた。ここ数年は「次世代シーケンサーを活用したミトコンドリアゲノムの構造解析」と「葉緑体の遺伝子組換え」を研究の二本柱に、それらの研究から派生した学術的な課題について実験を進めている。より具体的には、以下の1)~5)のプロジェクトが進行中である。

- 1) 葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物の育成
- 2) 葉緑体内で自律複製する形質転換ベクターの開発
- 3) 雄性不稔を示す作物のミトコンドリアゲノムの解読
- 4) ダイコンの雄性不稔・稔性回復システムの分子機構の解明
- 5) 細胞質置換コムギをモデルとした核とミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究

これらの研究は、以前に実施した私学助成のプロジェクトを学内の植物ゲノム科学研究センターに引き継いだものであるが、ここから派生した学術的に興味ある課題を新たなプロジェクトとして学術振興会の科研費に申請し、その採択を受けて本格的に実験を実施しているものもある。特に上記2)のプロジェクトについては、平成29年4月に科研費の基盤(B)に採択された。それ以前に採択された挑戦的萌芽研究の課題(平成27年4月~平成30年3月)とともに、現在、大学院生・学部生が精力的に実験を行っている。

個々のプロジェクトの内容を紹介すると、1)で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いる。そのため細胞質置換、細胞融合及び葉緑体の遺伝子組換え等の技術を駆使して、作物に新たな付加価値を与えることを目指している。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おり、栽培タバコの葉緑体ゲノムへ外来遺伝子を導入する実験は当研究室でも既にルーティン化している。その成果をもとに、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が、レタスでは組換え体が複数得られたものの、パンコムギとトマトでは未だ組換え体を得られていない。

上記2)のプロジェクトは、1)の研究から派生したものであり、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の1つ、APX、の遺伝子を葉緑体ゲノムに導入した際、偶然生じた「斑入りを示す組換えタバコ」が新たな研究材料となった。すなわち、この斑入りの組換えタバコでは、葉緑体ゲノムが140kbの大きさを持つサークルと22kbの大きさを持つサークル(ミニサークルと呼ぶ)の2つに分割されて存在しており、ミニサークルのコピー数が異常に増加しているという珍しい特性がある。ミニサークルの増加と斑入りとの関係はまだ明白ではないが、このミニサークルは明らかに葉緑体DNAの複製に必要な配列を含む。そこでこのミニサークルを、葉緑体内で自律複製するベクターの開発に利用するという着想を得て、新しい葉緑体形質転換ベクターの開発に着手した。これまでの実験で、ミニサークルに含まれる葉緑体DNA断片と抗生物質耐性遺伝子(*aadA*)を持つ大腸菌のプラスミドベクターは、タバコの葉緑体内で自律複製可能であること、そのベクターが種子を通じて次世代へ伝達される場合があること等がわかっている。

3)~5)のプロジェクトは、いずれもミトコンドリアゲノムに関連するものである。3)では、品種育成に雄性不稔が利用されている作物のミトコンドリアゲノムの構成を、次世代シーケンサーを活用して解明しようとしている。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。その中で、細胞質遺伝するものは、原因遺伝子がミトコンドリアゲノムに存在するという共通点はあるものの、遺伝子自体はそれぞれの作物に固有なので、個別に研究する必要がある。ミトコンドリアゲノムの解読では、当該植物のミトコンドリアゲノムの特徴を明らかにするとともに、雄性不稔原因遺伝子の特定、さらにはその起源に関する新知見を得ようと考えている。4)では、ダイコンを材料に雄性不稔と稔性回復システムの分子機構を包括的に研究している。前述のように、雄性不稔の原因遺伝子(ダイコンでは *orf138*)はミトコンドリアゲノムに存在するが、その働きを抑える稔性回復遺伝子(*Rf* 遺伝子)は核ゲノムに存在する。雄性不稔と稔性回復は、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おり、当研究室でも日本各地のハマダイコンを材料に、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 *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きた。なお、5)のプロジェクトでは、細胞質置換コムギという希少な材料を用いて、コムギの近縁種であるエギロプス属植物やライムギのミトコ

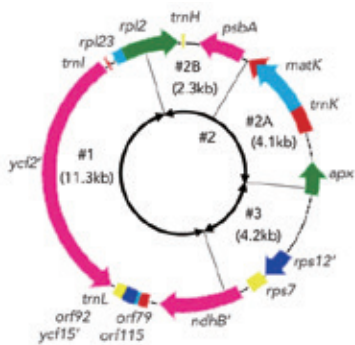
ンドリアゲノムの構成を調べている。

2. 本年度の研究成果

本年度、1)のプロジェクトについて、新たな進展はなかった。以前に作出したタバコおよびレタスの組換え系統のいくつかを閉鎖系温室で育成し、世代更新を行ってはいるが、新たな組換え体を作成する研究は実施しなかった。特にコムギでは、植物材料の調製(播種から未熟胚の調製等)に多大な労力が必要とされる。今年度はこのテーマを選択する大学院生はおらず、実験自体を実施できなかった。一方、トマトについては、4回生が卒業研究で組換え体の作出に取り組んだ。トマトでは、形質転換の外植片に子葉を用いる必要がある。そのため本年度、品種‘マイクロトム’を温室で栽培し、大量に種子を得た。続いて、トマト用に設計された形質転換ベクターを、パーティクルボンバードメント法で子葉に導入する実験を何度も行ったが、現時点で組換え体は得られていない。

2)のプロジェクトでは以下の実験を通じていくつかの成果が得られた。ミニサークルを *Hind*III によって3つの断片に分割した。次に各断片を、大腸菌のプラスミドベクター(pBluescript II)へクローニングを試み、#1 および #3 断片を持つプラスミドを得た。一方、この方法でクローニングできなかった#2 の断片を#2A および#2B の2つに分割し、In-Fusion 法によって、再度 pBluescript II へクローニングしたところ、#2A の断片についてのみクローニングに成功した(右図)。

これら3種の断片(#1、#2A および #3)を持つプラスミドに、葉緑体で働くプロモーターおよびターミネーターを連結した *aadA* カセットを挿入し、葉緑体導入用のプラスミドコンストラクトとした。パーティクルボンバードメント法を用いて、これら3種のプラスミドをタバコ葉緑体へ導入し、抗生物質含有培地で選抜した結果、複数のシュートを得ることができた。これらのシュートから全 DNA を抽出し、大腸菌へトランスフォームしたところ、#2A 系統からは撃ち込んだプラスミド#2A が、また#1 および#3 系統からは、撃ち込んだプラスミドよりもサイズの大きなプラスミド(プラスミド #1ins、#3ins)がレスキューされた(#3 の1個体を除く)。PCR およびシーケンシングによる解析の結果、ミニサークルに由来する3つの断片すべてが、葉緑体で複製起点として働く配列を含む可能性が示された。



この結果を受け、葉緑体の複製起点として働く配列をより詳細に解明するため、上記ミニサークル由来の3つの断片のうち、最も多くの形質転換体を生じた1つの断片(#2A)に着目した。まず、#2A を部分的に欠失させたコンストラクトを7種類と、#2A 断片を持たないプラスミドの合計8種類のプラスミドを作成し、合計 396 回のパーティクルボンバードメントにより、これらのプラスミド DNA をタバコの葉へ導入した。その結果、2種類のプラスミドから合計7個体の形質転換体を得られ、葉緑体内で導入プラスミドに自律複製をもたらす配列を、#2A 内の約 500bp にまで絞り込むことができた。

ここまでの実験結果から、葉緑体ゲノムにはミニサークルに含まれる配列以外にも、複製起点となり得る配列が複数存在するのではないかという仮説を立てた。本年度は、この仮説を検証する実験を初めて行なった。すなわち、*aadA* カセットを繋いだ大腸菌のプラスミドベクターに、異なる葉緑体ゲノム断片をクローニングし、合計 14 種類のプラスミドコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトの3種類を1組とし、各組を 36 回ずつ、合計 180 回のパーティクルボンバードメントによりタバコの葉に導入した。その結果、合計9個体の形質転換体を得られ、それらの解析により、作製した 14 種類のプラスミドのうち4種類のプラスミドが葉緑体で自律複製可能であることが判明した。また、この4種類のプラスミドのうち2種類には、前述のミニサークルの配列(下図 j, k)が含まれていた。一方、ミニサークルには含まれない葉緑体ゲノム断片(下図 e, m)を持つ2種類のプラスミドも葉緑体内に維持されていることが明らかになり、本研究を開始する際に立てた、葉緑体ゲノムには複製起点として働く配列が多数存在するという仮説は、ある程度正しいことが証明された。

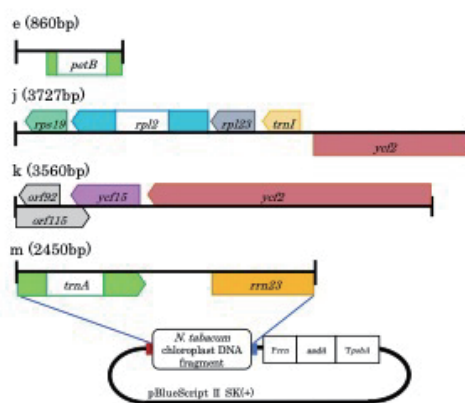


Figure. Gene map of chloroplast DNA fragment maintained in the transplastomic plants.

上記3)のプロジェクトについては、今年度も以前からの実験を継続している。その結果、雄性不稔タマネギ、可稔タマネギ各1品種のミトコンドリアのゲノム解読が完了し、その結果を論文ならびに図書として公表した。なお、上記4)のプロジェクトについては、山形県の調査で発見されたハマダイ

コン(野ダイコン、弘法ダイコンとも呼ばれる)の2個体に注目している。これらの個体は、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可能性がある。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。そこでこの個体について、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した。データは、現在も解析中であり、この個体の後代の育成も行っている。

上記5)のプロジェクトの一環として、本年度は昨年度に引き続き、ライムギ(*Secale cereale*)細胞質を持つパンコムギのミトコンドリアゲノムの解読を進めている。

3. Research projects and annual reports

We have proceeded with the following five projects:

- 1: Production of useful transplastomic plants.
- 2: Development of a new chloroplast transformation vector that can replicate autonomously in chloroplast.
- 3: Comparative mitochondrial genomics of male-sterile crops using NGS.
- 4: Studies on the molecular mechanism of the male-sterility/fertility restoration system in radish.
- 5: Comparative mitochondrial genomics of *Triticum* and *Aegilops* using alloplasmic lines of common wheat.

The first project aims at producing various transplastomic plants that are 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 has been produced.

The second project is inspired by the results of the first project; 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 develop a new chloroplast transformation vector, we are now conducting several experiments related to this subject.

In the third project, mitochondrial genomes of several crops such as barley, rye and onion have been analyzed.

The fourth 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 fifth project concerns the mitochondrial genome of *Triticum* and *Aegilops* species. It is well known that the mitochondrial genome of some species in the genera influences on the phenotype of alloplasmic lines of common wheat. In order to reveal a mitochondrial gene(s) responsible for the phenotypic difference between alloplasmic and euplasmic lines of common wheat, their complete mitochondrial genome sequences have been determined using the next-generation sequencer.

4. 論文、著書など

Tsujimura, M. and Terachi, T.: "Cytoplasmic genome", in *The Allium Genome*, eds. Shigyo M., Khar A., Abdelrahman M. 2018. Springer. 89-98.

5. 学会発表など

山岸博, 田中義行, 椎葉菜, 橋本絢子, 福永明日美, 寺地徹: クロダイコンの細胞質による雄性不稔の誘起. 日本育種学会 第134回講演会, 岡山市, 2018.9.22-23

児島和志, 植村香織, 寺地徹: 葉緑体形質転換ベクターに自律複製能を付与する葉緑体DNA断片の探索. 日本育種学会 第134回講演会, 岡山市, 2018.9.22-23

植村香織, 高見常明, 加藤裕介, 坂本亘, 寺地徹: 分割された葉緑体ゲノムを持つ葉緑体形質転換タバコの特徴づけと転写・翻訳物の解析. 日本育種学会 第134回講演会, 岡山市, 2018.9.22-23

山下健太, 辻村真衣, 上ノ山華織, 木村成介, 寺地徹: 表現型が異なる*Aegilops mutica*細胞質置換コムギ2系統の葉緑体ゲノムの比較解析. 日本育種学会 第134回講演会, 岡山市, 2018.9.22-23

田中恵美, 寺地徹, 村井耕二: 花成遅延を誘発する細胞質置換コムギ系統において春化で発現上昇する新規ミトコンドリア遺伝子の探索. 日本育種学会第134回講演会, 岡山市, 2018.9.22-23

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費助成事業・基盤研究(B)

課題名: 葉緑体と大腸菌の双方で自律複製可能なシャトルベクターの開発

研究代表者: 寺地徹, 取得年度: H29-31年(3年)

2) その他

日本学術振興会 科研費審査委員

農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業

研究課題評価分科会委員 1次(書面)審査専門評価委員

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」



福井県立大学・関西福祉科学大学との合同セミナー(於 松の浦
セミナーハウス)

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) 盲導犬の選抜基準の構築

現在、日本では約 1000 頭の盲導犬が利用されているが、盲導犬の利用を希望する人は 3000 人を超えている。このような盲導犬の不足を解決するために、育種技術を用いて盲導犬を効率的に生産する繁殖集団を造成することを課題として研究を進めている。今年度は、盲導犬の適性試験の結果から選抜基準を構築するための統計学的検討を行った。

現在利用されている盲導犬の適性試験は、刺激に対する反応、動作量、おとなしさなどに関する 42 項目を 5 段階で評

価するものである。各項目を選抜基準にすることは、その数の多さから現実的ではない。そこで、アジア盲導犬繁殖ネットワーク(AGBN)から提供を受けた適性試験の結果に因子分析を施し、各項目の評点に重み付けをした線形式で表される 4 つの選抜基準を構築した。

さらに、構築した 4 つの選抜基準について量的遺伝解析を行い、遺伝率、遺伝相関、個体の育種価を推定した。



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

4 つの選抜基準の遺伝率の推定値

形質 Trait	遺伝率 Heritability
興奮性、落ち着き (excitability or composure)	0.860±0.100
ストレスコントロール (ability to control stress)	0.356±0.156
ハンドラーへの集中 (concentration on handler)	0.205±0.102
人に対する不安・恐怖 (fear and anxiety of human)	0.525±0.122

4 つの選抜基準間の遺伝相関の推定値

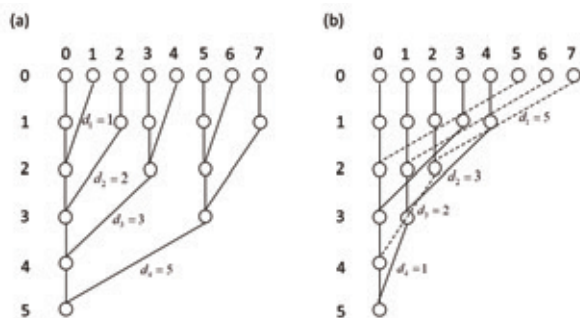
	興奮性、落ち着き excitability or composure	ストレスコントロール ability to control stress	ハンドラーへの集中 concentration on handler
ストレスコントロール ability to control stress	-0.139±0.191		
ハンドラーへの集中 concentration on handler	0.600±0.212	-0.156±0.299	
人に対する不安・恐怖 fear and anxiety of human	0.128±0.171	0.158±0.221	0.242±0.271

2) 半倍数体生物における近交最大回避交配について

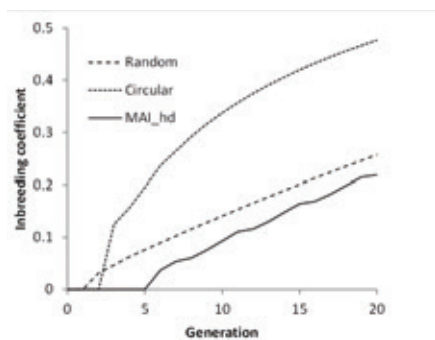
近交最大回避交配 (maximum avoidance of inbreeding: MAI) は、可能な限り血縁関係が遠い個体間で組織的に交配を行う交配様式である。この交配様式は、小集団における近親交配の有害な影響を軽減する上で有効であり、希少種の繁殖において重要である。2 倍体生物における MAI は個体数が 2 のべき乗(2^m)の集団について定義され、MAI の下では集団中のすべての個体は m 世代前に異なる 2^m 個体の祖先を持つ。

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。

さらに、世代行列を用いて MAI の下での近交係数をランダム交配と半きょうだい循環交配と比較した。MAI は初期の世代の近交係数の上昇を最小化するが、長期的には近交係数の上昇率がランダム交配や半きょうだい循環交配よりも大きくなることが明らかになった。これらの性質は、2 倍体生物の MAI と共通するものであった。



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



近交最大回避交配 (MAI-hd)、ランダム交配(Random)、半きょうだい循環交配(Circular)の下での近交係数の変化

3) マルハナバチのコロニー密度の推定法の開発

マルハナバチは野外の顕花植物の重要な送粉者(ポリネーター)であるとともに、ハウス栽培のトマトの授粉昆虫として利用されている。近年、アメリカやヨーロッパで在来のマルハナバチの減少が報告されている。マルハナバチの保全を考える際、生息地におけるコロニー(巣)の密度が重要な情報になる。そこで、本年度は生息地で採集されたワーカー(働き蜂)のマイクロサテライト解析から、生息地におけるコロニー密度を推定するために、以下のような理論を開発した。

生息地の 1 か所に設けた採集地点で得られた多数のワーカーをマイクロサテライト解析し、アリル共有度から姉妹関係を推定する。マルハナバチは一夫一妻性の繁殖システムを持つので、姉妹と判定された個体群は同一のコロニーに由来する。この情報とワーカーの採餌探索距離の推定値から、コロニー密度を推定するための式を導いた。

得られた方法を用いて、国内の希少種ノサップマルハナバチの根室半島におけるコロニー密度を推定するための研究を進めている。



ノサップマルハナバチ。国内では根室半島、野付半島、知床半島にのみ生息が確認されている希少種。低温、強風、濃霧にさらされた生息地の植物相の形成に重要な役割を果たしているものと考えられる。

3. Research projects and annual reports

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

- 1: Construction of selection criteria in guide dog breeding
Suitability for guide dog has been judged by evaluation

with 42 items. For the purpose of selective breeding, the evaluation items should be condensed into a small number of selection criteria. We applied principal component analysis to result of the evaluation in Asia Guide dogs Breeding Network (AGBN), and extracted four principal components. With the factor loadings in the principal components, four selection criteria were constructed.

2: 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. Numerical comparison with random mating and circular half-sib mating showed that as in diploid populations, MAI in haplodiploid populations attains a lower inbreeding coefficient in early generations at the expense of a higher asymptotic rate of inbreeding.

3: Development of statistical method for estimating colony density in bumblebee populations using microsatellite markers

Bumblebees (*Bombus* spp.) are important pollinators of both wildflowers and crops. In recent year, declines of population size have been reported in many Bumblebee species in various countries. In order to design effective conservation plans, nest (colony) density in a habitat is an essentially important information. We proposed a novel method for estimating nest density using molecular genetic markers, by extending the concept of neighborhood size in population genetics. The obtained method will be applied to an endangered bumblebee species in Hokkaido.

4. 論文・著書など

Nomura T. (2018) Maximum avoidance of inbreeding in haplodiploid populations. *Mathematical Biosciences* 306:49-55.

Nomura T., Takahashi J. (2018) Comparison of four mating systems for maintenance of honeybee colonies in terms of the inbreeding coefficient and effective population size. *Journal of Animal Genetics* 46: 1-8.

野村哲郎 (2018) 分子遺伝マーカーからマルハナバチ集団のコロニー密度を推定するための新規な方法. *計量生物学* 39:23-36.

上西美緒・古橋博昭・水谷由美・諏訪義典・高橋誠之・柳澤嘉紀・齋藤敏之・野村哲郎 (2018) アジア盲導犬繁殖ネットワークの盲導犬集団の繁殖構造. *日本介助犬学会誌* 12: 40-46.

Takeuchi T., Takahashi M., Nishimoto M., Kiyoshi T., Tsuchida K., Nomura T., Takahashi J. (2018) Genetic structure of the bumble bee *Bombus hypocrita sapporoensis*, a potential domestic pollinator for crops in Japan. *Journal of Apicultural Research* 57:203-213.

Takeuchi T., Sasaki T., Mitsuhashi M., Kiyoshi T., Nishimoto M., Nomura T., Takahashi J. (2019) Low mitochondrial DNA variation in the endangered bumble bee *Bombus criptarum florilegus*. *Journal of Apicultural Research* 58:591-596.

5. 学会発表など

野村哲郎・上西美緒 「主成分分析による BCL データからの主要因子の抽出と選抜指標の構築」. 第3回 盲導犬育成ジャパンセミナー. 日本盲導犬協会神奈川訓練センター. 2018.2.7.

野村哲郎 「希少種ノサップマルハナバチのコロニー数の推定」 日本動物遺伝育種学会シンポジウム. 京都市動物園. 2018.9.20

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費. 基盤研究(B)「北海道産マルハナバチの高受粉能力系統の造成と受粉能力の評価」(研究代表者)

2) 学外活動

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、CO₂固定が行われる。植物にとって光合成は非常に重要な機能であるため、様々な制御機構を備えている。私たちはこの中でも高等植物葉緑体におけるレドックス制御機構について、その生理機能と分子メカニズムの解明を目指し、研究を行っている。

葉緑体のレドックス制御機構では、チオレドキシソと呼ばれるタンパク質がその制御に中心的な役割を果たす。チオレドキシソファミリータンパク質の生理学的機能の解析を中心として、以下の具体的な研究項目を設定し、研究を進めている。

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

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

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

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

教授 本橋 健

Prof. Ken MOTOHASHI, Ph. D.



研究助教 桶川 友季

Assist. Prof. Yuki OKEGAWA, Ph. D.

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

2. 本年度の研究成果

1) 葉緑体レドックス制御機構における *m* 型チオレドキシソの生理機能

葉緑体のチオレドキシソは、光合成の際に CO₂ 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ソ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ソが存在する。しかし、実際の植物体内で、数多くのチオレドキシソ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。これまで試験管内での実験結果をもとに、カルビンサイクル酵素を始めとする主要な葉緑体酵素は *f* 型によって優先的に制御され、*f* 型チオレドキシソ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、*f* 型チオレドキシソを欠失した変異体は、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、その成長に大きな影響があると考えられたが、実際の *f* 型チオレドキシソ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* 型チオレドキシソ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ない。*in vivo* においては、カルビンサイクル酵素の活性化に、*m* 型チオレドキシソ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。

また、*m* 型チオレドキシソの欠失による植物の生育不良は、光合成サイクリック伝達に関与する因子の欠失株と掛け合わせるとその生育不良が回復することを見いだした。現在、光合成サイクリック電子伝達と *m* 型チオレドキシソの制御機構の関係に注目し研究を進めている。



Arabidopsis thalianaのm型チオレドキシン欠損変異株

2) 分子生物学に用いる新規技術開発

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 α 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 $^{\circ}$ 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。これを Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) 法とよぶ。この手法は私たちのグループが 2015 年に発表した。

この手法を用いると、ベクターなどの DNA 配列の改変が容易となる。本年は、この SLiCE 法を用いて PCR クローニングを効率的に行うことができる 3 種のクローニングベクターを新たに開発した。開発した pCRT、pCRZero、pCRZeroT のうち、pCRT と pCRZeroT は TA クローニング用として使用でき、pCRZero と pCRZeroT は、平滑端クローニングのために用いることができる。pCRZero と pCRZeroT では大腸菌致死遺伝子を使用しているため、PCR 産物が組み込まれたクローンのみを容易に選抜することができる。これらのベクターは、米国のプラスミドレポジトリである Addgene に寄託され、世界中の研究者が入手できる体制を整えた。

3. Research projects and annual reports

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

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

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

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

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 recently started to research functional relationship between light reaction and redox regulation by thioredoxin.

2: *Development of a simple and efficient tool for molecular biology.*

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. By using the SLiCE-method, we constructed a novel series of high efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. These three vectors for PCR cloning showed high efficiency cloning rate and low cost for vector preparation. Three pCRT, pCRZero, and pCRZeroT plasmids are available from plasmid repository Addgene.

4. 論文, 著書など

Ken Motohashi*: A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. *Sci. Rep.* **9**, 6417 (2019)

桶川友季, 本橋健: チオレドキシシステムによる光合成の調節機構 ～変動する光環境で植物はどのように効率良く光合成を行っているのか?～ *化学と生物* **56**, 452-453 (2018)

Hokuto Nakayama, Tomoaki Sakamoto, Yuki Okegawa, Kaori Kaminoyama, Manabu Fujie, Yasunori Ichihashi, Tetsuya Kurata, Ken Motohashi, Ihsan Al-Shehbaz, Neelima Sinha and Seisuke Kimura*: Comparative transcriptomics with self-organizing map reveals cryptic photosynthetic differences between two accessions of North American Lake cress. *Sci. Rep.* **8**, 3302 (2018)

本橋健*: シームレスクロニング法 ～古典的な制限酵素とDNAリガーゼを用いないクロニング～ *生物工学* **96**, 20-24 (2018)

5. 学会発表など

桶川友季, 本橋健: m型TrxはPGR5/PGRL1依存のPSIサイクリック電子伝達経路を制御する 第10回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 京都市, 2019.5.25-26

本橋健: PCRクロニング用の効率の良い新規ベクターの開発 第10回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 京都市, 2019.5.25-26

桶川友季, 本橋健: m型チオレドキシは光化学系Iサイクリック電子伝達を負に制御する 第60回日本植物生理学会年会, 名古屋, 2019.3.13-15

Yuki Okegawa, Ken Motohashi: Regulation of cyclic electron transport around Photosystem I by thioredoxin, International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018, 7-10 November 2018, Kurashiki, JAPAN

Yuki Okegawa, Ken Motohashi: Roles of thioredoxin-dependent redox regulation in photosynthesis, Japan-Finland Seminar 2018, 23-28 September 2018, Kobe, JAPAN

桶川友季, 本橋健: チオレドキシによる光化学系Iサイクリック電子伝達の制御メカニズム解析 第9回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 仙台市, 2018.5.26-27

桶川友季, 本橋健: チオレドキシによる光化学系Iサイクリック電子伝達制御機構の解析 第59回日本植物生理学会年会, 札幌市, 2018.3.27-30

天野瑠美, 中山北斗, 桃井理沙, 群司玄, 竹林裕美子, 桶川友季, 本橋健, 笠原博幸, Ferjani Ali, 木村成介: *Rorippa aquatica*の栄養繁殖を制御する遺伝子群の探索 第59回日本植物生理学会年会, 札幌市, 2018.3.27-30

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)

科学研究費補助金・新学術領域「新光合成」(公募研究)

課題名: チオレドキシによる光化学系Iサイクリック電子伝達の制御機構解明

研究代表者: 桶川友季, 取得年度: H29-30年(2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により、各学生への教育・実験指導が細かな点まで行えるようになっていく。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、身近な存在として研究生活がどのようなものであり、どのように向き合うのかを示すモデルとなっている。これは大学院生の研究意欲を向上させるのに大いに貢献している。



研究室集合写真 (2018年10月)

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 F₁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 F₁品種の急速な普及であった。このような高い育種効果を有する F₁育種においては、確実かつ効率的に F₁種子を採種することが極めて重要な意味を持つ。効率的な F₁採種を可能にする植物の遺伝的特性として細胞質雄性不稔性があり、実際にこの特性が多くの作物の F₁育種で利用されている。細胞質雄性不稔性はミトコンドリアゲノム上の遺伝子によって誘起される。その一方で、多くの場合核内にこの雄性不稔に対する稔性回復遺伝子が存在し、雄性不稔が表現型として最終的に発現するかどうかは、ミトコンドリアの遺伝子と核の稔性回復遺伝子の相互作用によって決定される。

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

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

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出し、タイプの異なる雄性不稔系統を2系統得た。これらを用いてキャベツ類の実用的な雄性不稔系統の開発を進めるとともに、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 F₁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 F₁育種が主流となっていることを示す。その一方で、一部の品種に我国の栽培・野生ダイコンでは見出されていなかった H タイプの *orf138*が存在することが明らかになった。

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

2) シロイヌナズナを用いた細胞融合による新しい細胞質雄性不稔の開発

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種に由来する後代がBC₆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。

BC₆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 BC₆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, F₁ hybrids have many genetic advantages and contribute to the increase of worldwide crop production. For the efficient and stable F₁ hybrid production, cytoplasmic male sterility (CMS) is the most useful genetic characteristic. Besides the practical importance of the CMS, it is useful to study the interactions between nuclear genes and mitochondrial ones from scientific view points, especially for molecular and evolutionary genetics. Thus, we have been studying the CMS of various plants both in order to know the evolutionary processes and to exploit new breeding materials.

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 F₁ 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 BC₆ progenies. The BC₆ progenies were segregated into completely male sterile plants and partially fertile plants. However, all the BC₆ 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

Multichromosomal structure of the onion mitochondrial genome and a transcript analysis

Mai Tsujimura, Takakazu Kaneko, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Masayoshi Shigyo, [Hiroshi Yamagishi](#), and Toru Terachi
Mitochondrion. Accept (30-May-2018) In press

Complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oxyrrhina* and comparative analysis of the region containing *orf108*, a male sterility gene for mustard (*Brassica juncea*), among *B. oxyrrhina*, *Diplotaxis erucooides* and *Sinapis* species

Akihito Mukai, Megumi Jikuya, Mai Tsujimura, Toru Terachi and [Hiroshi Yamagishi](#)
Plant Breeding. 138., (DOI) -10. 1111/ pbr. 12710

Mitochondrial *orf463* causing male sterility in radish is possessed by cultivars belonging to the ‘Niger’ group. Euphytica 215: 109.

[Hiroshi Yamagishi](#), Yoshiyuki Tanaka, Shiori Shiiba, Ayako Hashimoto, Asumi Fukunaga, Toru Terachi. 2019.
Euphytica 215:109.

5. 学会発表など

児玉 慧太, 辻村 真衣, 橋本 絢子, 高橋 亮, 齊藤 猛雄, [山岸 博](#):
花粉稔性回復遺伝子を持つナスにおけるPPRタンパク質遺伝子の発現. 日本育種学会第134回講演会, 岡山市, 2018.9.22-23

[山岸 博](#), 田中 義行, 椎葉 菜, 橋本 絢子, 福永 明日美, 寺地 徹:
クロダイコンの細胞質による雄性不稔の誘起. 日本育種学会第134回講演会, 岡山市, 2018.9.22-23

6. その他特記事項

1) 学外活動:

農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 評価委員

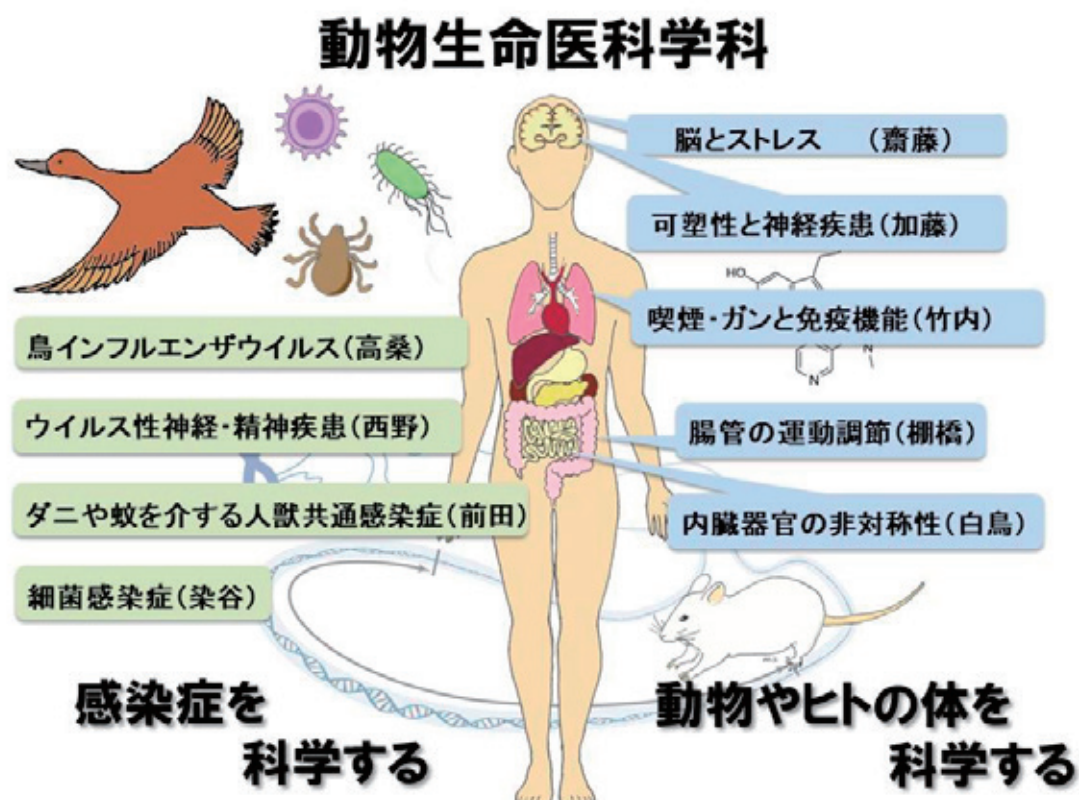


動物生命医科学科

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、京都市など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9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30年度は12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・白鳥・染谷・高桑・竹内・棚橋・西野・前田
生物学通論A	1	西田
生命倫理	1	前田
化学通論A・B	1	棚橋
生物学通論B	1	白鳥・前田
生化学実習	1	西野・染谷
動物遺伝学/実験動物遺伝学	1	加藤
動物遺伝学実習/生物学実習	1	齋藤・白鳥・高桑・前田
微生物学I	1	染谷
生理学	2	齋藤
解剖学	2	加藤
解剖学実習 生理学実習/解剖生理学実習	2	加藤・齋藤
科学英語I	2	染谷
微生物学II	2	西野
動物感染症学	2	高桑
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
実験動物医学	2	白鳥
食品栄養衛生学	3	加藤・西野
動物感染症予防学実習/微生物学・公衆衛生学実習	3	白鳥・染谷・高桑・前田
実験動物学実習	3	白鳥
科学英語III	3	齋藤・竹内・棚橋・前田
基礎特別研究	3	加藤・齋藤・白鳥・染谷・高桑・竹内・棚橋・西野・前田
応用特別研究1・2	4	加藤・齋藤・白鳥・染谷・高桑・竹内・棚橋・西野・前田

動物神経解剖学研究室

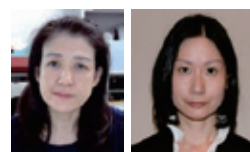
Laboratory of Animal Anatomy and Neurobiology

教授 加藤啓子

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

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に変化する。またグリア細胞の活性化等も知られている。しかしながら、いまだ分子レベルの裏付けに基づくメカニズムの全容を知るための研究課題は山積であり、現在の研究レベルはスタート地点から少し前に進んだ状況である。我々は、海馬一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を目的に研究を進めている。さらには、メカニズムの解明をもとに、てんかん～うつ病・不安症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序と代謝との関連性

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、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で、てんかん発症の閾値を決定することを発見した。

さらに『シアル酸転移酵素 ST3Gal4』が側頭葉てんかんの原因分子であることを見つけた。それは、ST3Gal4を欠失したマウスが、扁桃体(情動中枢)へのてんかん誘導刺激に反応しない、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。加えて、てんかん発症に ST3Gal4-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調べるため、シアル酸修飾と脂質代謝との関連性を調べてきた。

平成30年度は、最終代謝産物である尿中の揮発性有機化合物(VOCs)に着目し、てんかんモデルマウスで有意に排出量が増加した尿中 VOCs の特定を試みた。ヘッドスペース固相マイクロ抽出(SPME)法によりマウス尿から VOC を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分

析計(GC-MS)により解析した結果、13VOCsを抽出することに成功した。13VOCsのすべてが、 >0.8 ものROC曲線下面積(AUC)を示し、著しく評価の高いバイオマーカーであった。また、抽出したVOCs化合物と代謝との関連性を精査したところ、側頭葉てんかんが、腸内細菌叢の変化をもたらす、その結果、末梢組織における代謝変化を誘導した可能性を示唆するに至った。次年度は、てんかん発作と尿中VOCsの間を埋めるため、体内の代謝システムを明らかにし、てんかん発作の制御につなげたい。

1-2) てんかん共存症の発症機序と代謝との関連性

てんかん患者の30%が、睡眠障害、うつ、不安障害を含む神経精神障害を示し、薬剤の副作用がその原因のひとつと考えられているが、そのメカニズムは不明である。一方で、シアル酸転移酵素(ST3Gal4)を欠失したマウスは、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。ST3Gal4は、マウス脳・視床中継核神経細胞発現し、特に感覚系中継核ニューロンで、刺激応答性に発現を示す。またその欠失により、視床内側膝状体(聴覚系中継核)において、 $\alpha 2, 3$ -結合のシアル酸結合N型糖鎖が減少する知見を得た。

平成30年度は、うつ、不安症様症状を示すST3Gal4-KOマウスにおいても、最終代謝産物である尿中の揮発性有機化合物(VOCs)に着目した。結果、16種のVOCsが抽出され、主成分分析とクラスター分析により4グループが分類抽出された。その内訳は、(1) 週齢が進むとKO/WT間で尿中量が異なる2VOCs; (2) KO/WT共に、社会性行動の誘導前後で尿中量が異なる3VOCs; (3) 社会性行動の誘導前に、KOの尿中量が多い3VOCs; (4) KO/WT間の尿中量が異なり、その差が驚愕反応と関連づけられた6VOCs(ピアソンの相関係数、 $r = 0.89$)であった。

中でもグループ3では、フェロモン・ファルネセンがKOオスマウスで高く維持され、発情前期のddYメスへの接触を避ける。これは、KOマウスが非自己に対する忌避物質を多く尿中に分泌し、発情期のメスに対しても忌避反応を示したことを示唆する。

尿中には複数の情動行動に関連したVOCsが排出されることを、世界で初めて見つけた。これは、複数の

情動行動が、複数の代謝システムに影響することを提案している。そして、ST3Gal4は、複数の情動行動に関連づけられた代謝システムを総括的に調節していることがわかった。現在、シアル酸修飾を受ける基質を探索し、シアル酸化がどのようにてんかんや、その共存症や副作用（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。また、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。一方ヒトでは、“GWAS Catalog (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/docs/about>)”により、ヒトのコレステロール血症やアテローム動脈硬化症にST3GAL4 SNPsが見つかり、平成30年度は、高齢者うつバイオマーカーとして有意である3VOCsを特定し、次年度の再解析につなげる。



図1. 尿中揮発性有機化合物から代謝を見ることで、ヒトと精神疾患モデルマウスをつなぐ

2. 本年度の研究成果

平成28年度以降、研究の方向性について、精神疾患の発症と代謝との関連性の解明に舵を取ってきた。てんかん～うつ・不安症の発症後にもたらされる、中枢から末梢における代謝の変化が、さらなる精神疾患に影響する知見を得てきている。平成29年度の二つの特許出願に続き、平成30年度も一つの特許出願に至った。現在、投稿中1報と改訂中1報に加え、さらなる次年度の原著論文の発信につなげる。

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. In this year, 13 urinary volatile organic compounds (VOCs) exhibited differential abundance between epileptic and control mice, and the corresponding areas under the receiver operating characteristic (ROC) curve were greater than 0.8. TLE induced by amygdala stimulation could affect both endogenous metabolites and the gut flora.

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.

Third, access numbers of sexually naive male mice to female at stages of pro-estrus to early estrus (P/E) were low in the ST3Gal4-deficient mice and showed high levels of β -farnesene and α -farnesene (pheromone) in urine before

encounters with female, which was different from wild-type showing the high levels only after the encounters. It suggested that St3gal4 was related to production of pheromone (hydrocarbon) in the social behaviors. In this year, 16 urinary VOCs exhibited differential abundance between St3gal4-KO and the littermate wild-type mice, and principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis based on these VOCs classified four groups, in which (1) 2 VOCs showing differences between St3gal4-KO and WT aged mice; (2) 3VOCs showing differences between before and after encounter of male with female at estrus stage in both KO and WT; (3) 3VOCs showing high urinary contents in KO before encounter of male with female at estrus stage; (4) 6 VOCs showing differences between KO and WT that were correlated with startle test. Finally, we suggested that urinary VOCs were correlated with several emotional behaviors and St3gal4 modulated metabolic system related with several emotional behaviors.

2: Neuropsychiatric disorders induced by metabolic loading and sialylation.

Oil-rich diets differentially modulate anxiety and depression in normal and anxious ST3Gal4 deficient mice. On the other hand, using the GWAS Catalog (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/docs/about>), human ST3Gal4 SNPs were found in the hypercholesterolemia and atherosclerosis that are related to the lipid metabolism. In this year, we found that common metabolites were related with depression in both human and mouse accompanying with the aging. Finally, these results reached three patent application.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

1. 太田真菜美, 藤田明子, 加藤啓子 側頭葉てんかんモデルマウスにおける代謝変化 第140回関西実験動物研究会 2018.12.7 聖護院御殿荘 (口頭)
2. 奥野貴哉, 藤田明子, Siriporn Tangsdjai, 織田弥伽, 加藤啓子 シアル酸転移酵素ST3Gal4欠損オスマウスにおける生殖行動と代謝変化について 第140回関西実験動物研究会 2018.12.7 聖護院御殿荘 (口頭)
3. 加藤啓子他 シアル酸転移酵素ST3Gal4欠損マウスの統合失調症陰性症状について 第161回獣医学会 2018.9.12 つくば国際会議場 (口頭)
4. 加藤啓子 マウスうつによる環境, 医薬, 食品のスクリーニング イノベーション・ジャパン 2018.8.30-31 国際展示場 (ポスター)

5. 奥野貴哉, 藤田明子, 織田弥伽, Paitoon Srimontri, 加藤啓子 シアル酸転移酵素ST3Gal4欠損・オスマウスにおける生殖行動と代謝産物の関連性 第65回日本実験動物学会総会 2018.5.16 富山県民会館 (ポスター)

6. 加藤啓子, 藤田明子, 伊川正人 シアル酸就職に起因する精神神経疾患の発症, 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 2018.1.24-25 琵琶湖ホテル (口頭)

6. その他特記事項

1) 知財権 特願2018-233113 出願日(平成30年12月13日)

2) 科学研究費: 挑戦的研究(萌芽)フレイル予防を目指した精神疾患の非侵襲性定量検法の開発 (研究代表)

3) 学会活動

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; 日本獣医学会誌編集委員

4) マイナビ進学フェスタ2018「匂いと心と思い出と」担当(平成30年7月12日)

5) 平成30年度さくらサイエンス 日本・アジア青少年サイエンス交流事業 (A. 科学技術体験コース) 「新規開拓を目指した, 食品工学分野と最先端生命科学との融合」担当(平成30年7月24日~8月2日)

6) ホームページ <http://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/l/kato-keiko.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3年半が経過した。平成29年度の2件, 平成30年度1件の特許出願を達成した。原著論文は, 投稿中と改訂中がそれぞれ1報, さらに2報を現在作成中である。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, 5回ずつ担当。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む。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目標として写っている。



動物生理学研究室

Laboratory of Animal Physiology and Neurobiology

教授 齋藤 敏之

Prof. Toshiyuki Saito, DVM, Ph.D.



1. 研究概要

動物生体機能学分野・動物生理学研究室では、「ストレスが脳に与える影響と傷害を受けた脳の機能回復」を主なテーマとして研究を進めている。

生体がストレス刺激を受けると、体内で視床下部・下垂体・副腎軸 (HPA 軸) が活性化されるとともに、交感神経活動も亢進する。このようなストレス反応は種々の環境変化に対して体を適応させる反応であるが、長期にわたりストレス負荷が続く、あるいは重度のストレス負荷を受けると、前頭前野や海馬の縮小や神経変性などが生じることが知られている。

動物生理学研究室では、ストレスによる脳の神経変性機構を明らかにするため、脳内の酸素環境変化、脳の神経炎症との関わり、それに伴う情動系における神経活動変化などの解析を進めている。

これらの研究で得られる成果は、ストレスで傷害を受けた脳の再生と機能修復法の開発につなげたいと考えている。

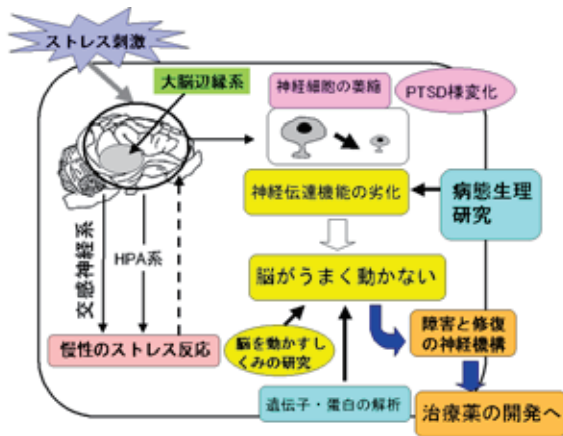


図 1. 本研究の概略

の活動が亢進する時には脳内の血流分配が変化し、一時的に酸素濃度が過剰になる領域と、逆に、酸素濃度が少なくなる領域が生じると推測している。そこで、低酸素プローブを用いて、リポポリサッカライド (LPS) を投与した後の脳内の低酸素領域を解析した。その結果、HPA 軸の抑制に関わると考えられる海馬の一部領域で低酸素に陥る可能性が示唆された。

2) ストレス反応と脳のミクログリア動態

ラットに LPS を投与することによって、血中の副腎皮質ホルモン濃度が上昇するとともに、脳の海馬などでは多数の分枝をもつ Iba-1 免疫陽性細胞 (ミクログリア) が認められた。一方、一時的な拘束ストレスでは分枝の少ない Iba-1 陽性細胞が観察された (図 2)。しかし、Iba-1 はマクロファージにも発現していることから、脳内のミクログリアの動態を調べるためには脳内ミクログリア特有のマーカーについて免疫染色を行い、可視化する必要がある。現在、そのための予備検証を進めている。

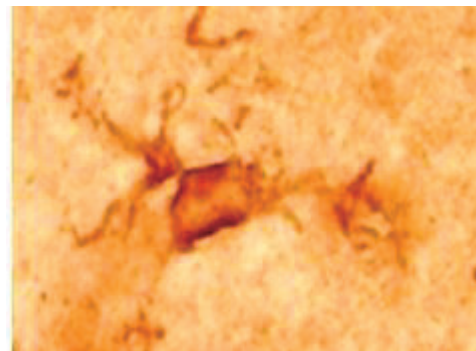


図 2. ラット脳における Iba-1 免疫陽性細胞 (DAB 発色)

2. 本年度の研究成果

1) 脳のストレス反応と脳内酸素環境

ストレス刺激による HPA 軸の活性化は、その調節に深く関与する脳内の神経活動を亢進させることを意味する。脳の神経細胞のエネルギー源は酸素とグルコースであるが、脳

3) 拘束ストレスと腸内細菌叢変化、脳のミクログリア変化

最近の研究では、ストレス負荷によって腸内細菌叢が変わることが報告されている。また、ストレスによる腸内細菌叢の変化は脳の情動神経活動に影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで、ラットに短時間の拘束ストレスは1~2

週間負荷する実験を行い、糞便中の腸内細菌叢の変化を解析した。拘束ストレスにより、血中コレステロール濃度は一過性に顕著に増加した。一方、糞便中の腸内細菌叢の解析では、拘束ストレスを負荷することにより、ラクトバチルス¹の占める割合が若干変化するデータが得られた。ただ、このような腸内細菌叢の変化が脳内のミクログリアの変化、腸管粘膜の物質透過性の変化および情動神経系の伝達物質の素材となる前駆体に及ぼす影響は不明なままである。今後は、ヒト乳幼児における影響を含めて検証していくため、幼若子ブタを用いた研究を検証するとともに、脳²のミクログリア動態との関係を明らかにしていきたい。

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. Morphological changes in microglia are also focused on in this study, since microglia always monitor the situation of neuronal cells and can eat the damaged neurons due to cytokines and other chemical substances released in the brain by stressors. The microglia is a kind of immune cells in the brain, which is involved in neuro-inflammation. Stress-induced neuro-inflammation possibly affects neuronal functions in the brain.

Research topics:

- 1) Development of detection methods of neuronal signals related to degeneration of neurons by stressors in the brain and involvement of microglia.
- 2) Chemical substances to dysregulate neural communication released by exposure to stressors, and to promote

regeneration of the damaged neurons in the brain.

Annual reports:

1) Study on regulatory mechanisms for the HPA axis, and contribution of microglia to pathogenesis in stress-induced brain diseases

Using the anesthetized rats, we are examining how influence of systemic administration of lipopolysaccharide (LPS) has also been studied mechanisms to stimulate the HPA axis and to cause neurodegeneration with activation of microglia. Using antibody against Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), the immune-reactive Iba-1 positive cells (microglia; figure 1) were found in the limbic system and other brain regions. Furthermore, we are to analyze relationship between morphological and immune-histochemical changes in microglia and neuronal damages in the rat brain. In the brain from the restrained rats for short period (1-2 hour), there were the Iba-1 immuno-positive cells with few branches than those in the LPS-injected animals. To examine morphological changes in microglia, we are now exploring any microglia specific makers for the immune-histochemical study.

On the other hand, we are studying how morphological changes occur in the brain when the animals are exposed to stressors. In this study, we are analyzing changes in composition of the intestinal flora using the feces. One possibility has been suggested the Lactobacillaceae bacterium may be affected by the restraint stress to the animal.

2) 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 and disorders. Using preweaning piglets, we

are analyzing by histochemical techniques microglia and other cells in the brain.

4. 発表論文、著書など

上西美緒, 古橋博昭, 水谷由美, 諏訪義典, 高橋誠之, 柳澤嘉紀, 齋藤敏之, 野村哲郎. アジア盲導犬繁殖ネットワークの盲導犬集団の繁殖構造. 日本補助犬科学研究 12(1) : pp.40-45, 2018

5. 学会発表など

(学会発表)

齋藤敏之, 中嶋和佳子, 井森貴世, 大崎薫, 木下香菜子: リポポリサッカライド投与によるラットの副腎皮質ホルモン分泌亢進と脳内神経核の低酸素環境. 第 95 回日本生理学会大会, サポート高松・かがわ国際会議場, 2018. 3. 28-30.

窪田裕樹, 本田知之, 齋藤敏之, 西野佳以 : Dexamethasone enhances infection of Borna disease virus type 1 in mouse primary culture neurons. 第 66 回ウイルス学会学術集会, 京都テルサ, 2018.10. 28-30.

立花蓮, 山田泰唯, 深田彩人, 窪田裕樹, 木村亨史, 齋藤敏之, 西野佳以 : Effect of corticosterone in the mice persistently infected with mammalian 1 bornavirus. 第 66 回ウイルス学会学術集会, 京都テルサ, 2018.10. 28-30.

深田彩人, 山田泰唯, 立花蓮, 窪田裕樹, 木村亨史, 齋藤敏之, 西野佳以 : Corticosterone induces neuronal disorder in the mice infected with mammalian 1 bornavirus. 第 66 回ウイルス学会学術集会, 京都テルサ, 2018.10. 28-30.

6. その他の特記事項

1) 外部資金 なし

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 : 日本生理学会評議員

齋藤敏之 : 日本獣医学会評議員

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 : 平成 30 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) 学部内各種委員 : 動物生命医科学科・学科主任

(2) 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、胚発生期における各臓器の左右非対称な形態変化を観察し、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。

LRI は左右非対称に発現する遺伝子である。*LRI* KO マウスでは左右非対称性の異常が観察されており、解析を進めている。一方で、一部の KO マウス胚では左右軸形成より発生の早い時期において異常があることが示唆されてきており、この点についても研究を進める。

また、老化に関与するアミノ酸代謝経路因子 *Pycr2* の役割を解析する。*Pycr2* KO マウスは、早老症様(神経症状、痩せ、短命、繁殖率の低下など)の症状を示した。*Pycr2* トランスジェニックマウスや組織特異的な *Pycr2* 変異マウス、関連分子の変異マウスを作製・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

1) 左右非対称に発現する細胞外マトリックス因子 *LR1* の変異マウスの解析

左右非対称な器官形成を制御する細胞外環境を解明するために、細胞外マトリックス因子 *LR1* の変異マウスの表現型を解析した。昨年度に引き続き、B6 系統への戻し交配を進めた *LR1* 変異マウスの 18 日胚または新生仔を解剖して内臓を観察した。その結果、左右非対称性の異常を観察できた一方で、ヘテロ同士を交配させた仔においてホモ変異体がメンデル比より優位に少なく、ホモ変異体の一部が胚性致死であることが分かった。続いて、胚性致死となる発生ステージを特定するために、発生を

遡って胚の形態の観察と遺伝子型を調べたところ、受精後9日胚の時点でもホモ変異体がメンデル比より有意に少ないことが分かった。

2) 腎臓と肝臓の左右非対称性の確立機構の解析

腎臓、腎静脈、腎動脈は、いずれも左右非対称に形成される。その中でも腎動脈の左右非対称性が初めに確立され、続いて左右対称にできた腎臓と腎静脈が左右非対称に位置変化することを明らかにしてきた。本年度は、腎動脈がいつから左右非対称に形成されるのか、その過程を観察した。その結果、腎動脈の左右非対称性は 12.5~12.75 日胚で確立し、12.25 日胚における左右の非対称性は非常に小さいもしくは対称的であることが分かった。

肝臓は左右非対称な分葉構造をとっている。マウスにおける肝臓原基の形態を観察したところ、9.75 日胚では左右の葉の大きさや形に非対称性が表れていること、肝臓の尾葉は他の葉に比べて遅く 11 日胚で新規に外側右葉から分葉することが確認できた。

3) プロリン合成酵素 *Pycr2* の変異マウスの解析

Pycr2 変異マウスについて、主に脳神経系と皮膚の異常の解析を行った。

脳神経系については、*Pycr2* KO マウスの海馬と橋において形態異常があることが分かった。また、神経細胞特異的 *Pycr2* 変異マウスの行動観察を行ったところ、*Pycr2* KO マウスと同様の神経症状を示した。

皮膚については、*Pycr2* の発現様式を調べた結果、毛乳頭で発現していることが分かった。よって、*Pycr2* KO マウスの毛周期を調べたところ、野生型に比べて休止期が長いことが示唆された。一方、皮膚の遊離プロリン量は、成長期に比べて休止期の方が高かった。

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 observe morphogenesis of each organs in detail and 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, *Pycr2*, in amino acid metabolic pathway. The *Pycr2* KO mouse showed the premature aging-like phenotype. We want to know the mechanism for premature aging by abnormal amino acid metabolism.

1) *LRI* KO mouse.

LRI is an extracellular matrix factor and is L-R asymmetrically expressed in mouse embryo. We backcrossed the *LRI* KO to B6 and analyzed the phenotype of this KO mouse. The KO mice showed L-R defects at embryonic day 18 (E18), while some of the KO mice were embryonic lethal. It was revealed that these embryos die before E9.

2) L-R asymmetric morphogenesis in mouse visceral organs.

We also analyzed the mechanism of L-R asymmetric morphogenesis in kidney and liver. In the mouse, the kidney is situated more caudally on the right side than the left. We had known that the renal artery is initially set L-R asymmetrically, and then kidney and renal vein are subsequently arranged. Next, we observed the midgestation mouse embryos and found out that the asymmetric location of the renal artery is established at E12.5~12.75.

The mouse liver is asymmetrically lobulated. We observed the liver morphogenesis and saw that the liver primordium shows L-R asymmetry at E9.75 and that the caudal lobe of the liver is budded from the right lateral lobe at E11.

3) *Pycr2* KO mouse.

We analyzed the defects in the skin, the brain and nervous system of the *Pycr2* KO mouse. In the brain of the *Pycr2* KO mouse, we detected morphological abnormalities at the hippocampus and the pons Varolii.

Neural cell specific *Pycr2* mutant mouse had been generated and showed neural symptoms similar to those in *Pycr2* null KO mouse. We revealed that *Pycr2* is expressed at hair follicle dermal papilla cells in mouse skin. Searching the hair cycle, we suggested that the telogen in the *Pycr2* KO is longer than that in wild type. It was also suggested that the proline level in the anagen is higher than that in the telogen.

4. 論文, 著書など

Nabeshima R, Nishimura O, Maeda T, Shimizu N, Ide T, Yashiro K, Sakai Y, Meno C, Kadota M, Shiratori H, Kuraku S, Hamada H. Loss of Fam60a, a Sin3a subunit, results in embryonic lethality and is associated with aberrant methylation at a subset of gene promoters. *Elife*. 2018 Aug 2;7. pii: e36435.

5. 学会発表など

なし

6. その他特記事項

1) その他

学術研究推進支援制度 科研費再挑戦支援プログラム「特定課題研究(準備研究支援)

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

実験動物1級技術者資格取得のための実技練習を担当。12名が認定試験に合格した。



細菌学研究室

Laboratory of Bacteriology

准教授 染谷 梓

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



1. 研究概要

微生物はあらゆるところに存在しており、時に動物や人の健康を脅かすこともある。なかでも動物と人の双方に感染する微生物は、人と動物との関わり方が多様化する現代社会において、人獣共通感染症や食品衛生上の問題を引き起こす可能性があるため、大きな注目を集めている。当研究室では、動物と人との間に入って病原体の受け渡し役を担っているマダニや野生動物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(図)。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。

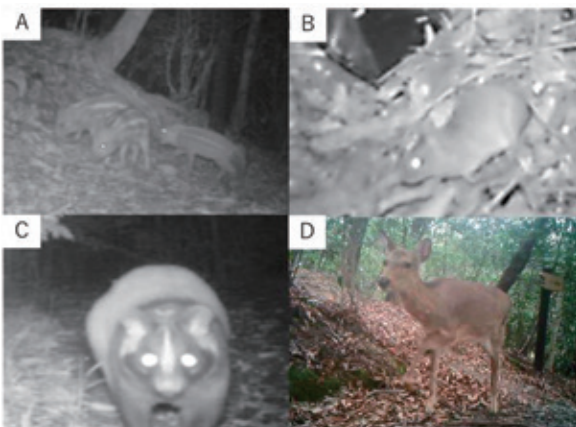


図. 調査地において撮影された野生動物。

A. イノシシ B. ネズミ C. ハクビシン D. シカ

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。2018年も前年同様に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。また、調査地には多数の野生動物が生息している。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、今年度も野生動物の赤外線カメラによる生態調査に加え、シャーメ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。さらに、ハクビシンにおけるバルトネラの感染状況を調査した。バルトネラはネコひっかき病などの人獣共通感染症を引き起こす細菌で、ノミなどの媒介によりヒトに感染する。近年、市街地への野生動物の侵入が問題となっており、野生動物からの感染症の伝播が危惧されている。調査の結果、これまでハクビシンから分離されたことのないバルトネラ種が分離された。このバルトネラの病原性などを現在詳細に解析中である。今後も引きつづき、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。

さらに、これまで収集してきたマダニの捕獲時の気温、湿度、照度などの気象要因や野生動物の観察数と、マダニ捕獲数の関係について単回帰分析および重回帰分析を試みたところ、シカをはじめとする野生動物の観察数とマダニの捕獲数に高い相関が認められた。

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進めている。

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多剤耐性を示すことが明らかとなった。また、アンピシリン耐性株において、耐性の接合伝達について解析したところ、耐性が伝達した株を得られた。これらの株は他の耐性遺伝子も保有しており、多剤耐性の一因としてインテグロンの関与が示唆された。今後も、耐性伝達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.



研究室メンバー

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

村岡綾, 古賀由希恵, 川道美枝子, 三宅慶一, 前田秋彦, 染谷梓. 京都市内で捕獲されたハクビシンにおける節足動物媒介性病原細菌の保有状況. 第161回日本獣医学会学術集会, つくば市, 2018.9.12

山形幸, 吉田彩乃, 原田真緒, 辻本絢香, 中塚聖菜, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. トゴウイルスのハムスターへの病原性. 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都市, 2018.10.28

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

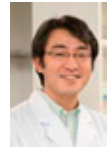
染谷梓: 関西野生生物研究所および三宅獣医科医院との共同研究

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いる。H5 亜型鳥インフルエンザは、アジアを中心に世界的に流行を繰り返している。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常在国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。高病原性の H5 亜型の鳥インフルエンザウイルスが野鳥から分離され、ベトナム国内および近隣諸国への鳥インフルエンザウイルスの伝播に野鳥が重要な役割を果たしていると考えられた。また、国内に飛来する野鳥からも、低病原性の H5N1 亜型を含む鳥インフルエンザウイルスを分離した。国内にも多数の鳥インフルエンザウイルスが、継続的に持ち込まれていることを示している。

H9N2 亜型インフルエンザウイルスはマウスに対してほとんど感染性を示さない。しかし、ベトナムの野鳥から近年分離された H9N2 亜型ウイルスはマウスへの感染性を示し、マウスによる継代により高い病原性を獲得することが明らかとなった。ウイルスの遺伝子解析により、PB2 または HA タンパク質の変異が、病原性に重要であることが示唆された。

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. Highly pathogenic avian influenza H5 virus has spread across worldwide, and outbreaks are now

endemic in several countries. 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. The highly pathogenic avian influenza H5 viruses were isolated from wild birds in Vietnam. Wild birds are considered to play a role in the introduction and dissemination of avian influenza virus in Vietnam and neighboring countries. In addition, we isolated avian influenza virus containing low pathogenic H5N1 virus from wild birds migrate to Japan in the winter. Therefore, it was suggested that many avian influenza viruses are being introduced continuously in Japan.

Most H9N2 influenza viruses are avirulent for mice. However, the H9N2 virus recently isolated from wild birds in Vietnam was found to be highly infective for mice and to acquire high virulence by passaging by mice. Genetic analysis suggested that PB2 or HA protein mutations are important for the increased pathogenicity in mammalian host.

4. 論文、著書など

なし

5. 学会発表など

木名瀬欽章, 丹智史, 名取ゆり, 蓼沼克嘉, 藪田淑予, 高桑弘樹, 大槻公一: 湖沼環境保全のためのヨード活性炭の適用可能性、第 17 回 世界湖沼会議、つくば市、2018.10.15-19

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

特許出願

特願 2018-088622「抗菌剤、並びに、抗菌方法」

新規 PCT 出願

特願 2018-047647「インフルエンザウイルスに対する消毒剤及びその製造方法、並びに、インフルエンザウイルス不活化方法」

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

高桑弘樹: 近畿ブロック病性鑑定ネットワーク協議会委員

高桑弘樹: 京都市衛生環境研究所と共同研究

4) 受賞等 なし

5) その他 なし



免疫病理学研究室

Laboratory of Immunopathology

教授 竹内 実

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



1. 研究概要

環境分野で重要な問題として取り上げられているタバコ喫煙に着目し、喫煙の免疫、癌増殖・転移、DNA 損傷への影響について、マウスを用いて研究している。喫煙と免疫と癌は、それぞれ密接に関係しており、これらの関係を解明することは大変意義がある。これまでの研究で、タバコ喫煙により肺胞マクロファージの貪食能、抗原提示能、細胞表面抗原、サイトカイン mRNA 発現などの免疫機能は抑制されているが、逆に活性酸素の産生能は増加する。そこで現在は、喫煙により増加した活性酸素により、肺胞マクロファージおよび肺組織の DNA 損傷が誘導され、その結果異常 DNA が形成され、肺癌の発生にこれらの要因と低下した免疫機構が関係している可能性について研究している。また抑制された免疫機能を回復するために、天然成分(アガリクス茸、蜂蜜)の免疫増強作用について研究し、新薬の開発を目指し、「喫煙と免疫と癌と天然成分を科学」し、以下の研究テーマについて研究を進めている。

1) タバコ煙による肺胞マクロファージへの影響と遺伝子損傷について

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



2) LPS およびスギ花粉の初期肺免疫応答について

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

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として利用されている。食用だけではなく、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、研究室でセイヨウ蜜蜂を飼育し、日本国産蜂蜜の免疫機能への影響を研究し、免疫機能を促進する作用があることを報告してきた。しかし、日本国産蜂蜜の中には、免疫機能に対して、抑制作用を示す蜂蜜がある可能性が考えられることから、今年度は日本国産蜂蜜の免疫を介した抗炎症作用について研究を開始している。



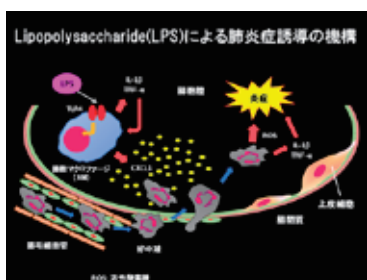
② アガリクス茸

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

2. 本年度の研究成果

タバコ主流煙暴露により、マウス肺胞マクロファージはタバコ煙粒子を食作用により取り込み、取り込まれた粒子成分が刺激となって、肺胞マクロファージから過剰な活性酸素が産生され、この活性酸素により DNA に損傷が引き起こされ、染色体 1~19 番および X 染色体の各部位にも幅広く遺伝子異常が確認された。喫煙により DNA 損傷を生じた肺胞マクロファージは、カスパーゼ 3 の遺伝子発現と活

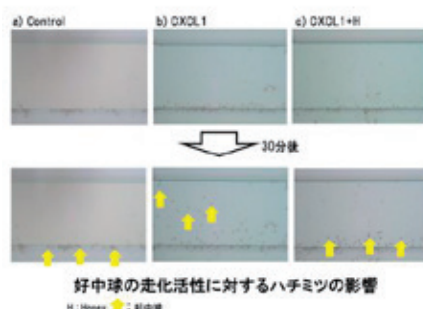
性の低下を示した。この結果から、喫煙曝露により影響を受けた肺胞マクロファージは、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死を引き起こさず



に生存し続けることが示唆された。異常を生じた肺胞マクロファージが喫煙関連肺疾患の発症に関与している可能性が考えられた。

LPS による肺の初期免疫応答に関しては、LPS の気管支内投与により、肺胞マクロファージが Toll Like Receptor(細菌認識受容体:TLR)を介して刺激され、IL-β が産生され、肺胞マクロファージにオートクラインに作用し、その後、好中球の走化因子である CXCL1 が産生されることが確認され、

肺毛細血管から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。天然成分に関して



は、日本国産蜂蜜に、好中球の走化活性を抑制すること、肺胞マクロファージの CXCL1 の産生を抑制し、日本国産蜂蜜が LPS 誘導性肺炎症に対して、好中球の肺への誘導を阻止し、抗炎症作用を有することが認められた。一方、アガリクス茸熱水抽出液は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。

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-1β and IL-6 mRNA expressions. Japanese honey enhanced IL-1β 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

竹内実 日本国産蜂蜜による好中球の走化活性 アグリバイオ
2(13):96-99,2018.

金森千香、竹内実 タバコ喫煙とスギ花粉アレルギーの関係 ア
レルギーの臨床 38(10):72-75,2018.

金森千香、竹内実 スギ花粉による肺胞マクロファージ、T 細胞の
免疫応答と喫煙の影響 アレルギーの臨床 38(6):83-86,2018.

5. 学会発表など

Yuki Hirano, Saki Hamada, Mayuna Uno, Minoru Takeuchi. Effect
of cigarette smoking on functions of LPS-induced lung
neutrophil in mice. 47th Annual Meeting of the Japanese Society
for Immunology, Hakata, December 10-12, 2018.

Saki Hamada, Yuki Hirano, Mayuna Uno, Shinichi Inoue, Hiroki
Takakuwa, Minoru Takeuchi. Effect of cigarette smoke extract on
expressions of cell surface receptors and DNA damage in
macrophage. 47th Annual Meeting of the Japanese Society for
Immunology, Hakata, December 10-12, 2018.

Uno Mayuna, Hirano Yuki, Hamada Saki, Takeuchi Minoru.
Anti-inflammatory effect of Japanese honey on
Lipopolysaccharide (LPS) induced lung inflammation in mice.
47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology,
Hakata, December 10-12, 2018.

M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Hirono, Y. Tanaka, K.
Koike, N. Ishida, KE. Pinkerton. Toxicity of Secondhand
Tobacco Smoke on Immune Functions of Alveolar Macrophages
in Mice. STP Annual Symposium 2018, Indianapolis, Jun 16-21,
2018.

Minoru Takeuchi, Masahito Nose, Chika Kanamori, Yoshiko
Tanaka, Kent E Pinkerton. Effect of cigarette smoke on immune
response to pollen allergen in the lung. ATS 2018 International
Conference, San Diego, May 18-23, 2018.

M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Hirono, Y. Tanaka, K.
Koike, N. Ishida, KE. Pinkerton. Immuno-toxicity of Cigarette
Smoke on Immune Functions and DNA damage in Alveolar
Macrophages. ACMT 15th Annual Scientific Meeting,
Washington DC, April 6-8, 2018.

M. Takeuchi, Y. Tanaka, C. Kanamori, M. Uno, M. Takasaki, Y.
Hirono. Cigarette smoke induced alteration of cell structure and
immune function via DNA damage in alveolar macrophage. BPS
2018, San Francisco, February 16-21, 2018.

竹内実 平成 29 年度 総合生命科学部シンポジウム 先端医科
学研究 「喫煙を科学する」 平成 30 年 2 月 27 日 京都

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名:受動喫煙による肺胞マクロファージ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:H29-31 年 (3 年)

2) 学外活動

京都府獣医師会理事

京都府府民公開事業推進委員

京都中央診療所倫理委員

公私立大学実験動物施設協議会評議員

Pulmonology 雑誌編集委員, WJR 雑誌編集委員など

3) その他

研究室: website <http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~mtakex/>



研究室メンバー



研究室同窓会(2018年9月9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+} 透過性イオンチャネルの活性が変化することにより、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。

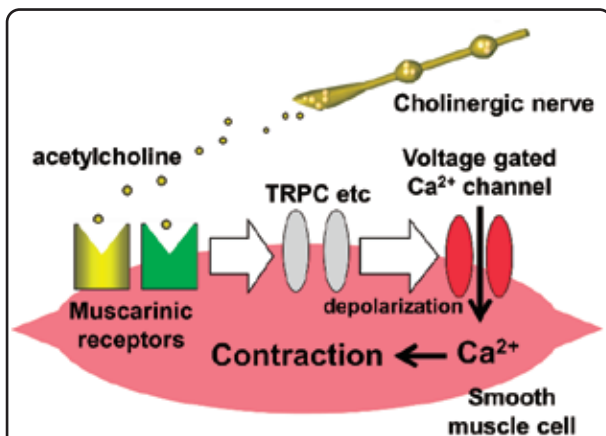


Figure 1. Regulation of smooth muscle contractility by cholinergic nerves

平滑筋収縮調節機構の一例としてコリン作動性神経による腸管平滑筋収縮調節機構の概略を示す。同神経から放出されたアセチルコリンにより、TRPCチャネルをはじめとする様々なイオンチャネルの活性が変化し、細胞が脱分極する。その結果、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介して細胞内に Ca^{2+} が流入し、筋は収縮する。

(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+} ストアから細胞質への 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

主な研究成果は以下の通りである。

(1) 胃腸管平滑筋には ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルが発現しており、その活性はムスカリン受容体により制御されている。我々は、マウス小腸平滑筋におけるムスカリン作動性 K_{ATP} チャネル調節機構、および、同調節機構の平滑筋収縮における役割について、検討を行ってきた。これまでに得られた結果から、小腸平滑筋細胞において、 K_{ATP} チャネルが静止膜電位の形成に関与しており、同チャネルの活性は M_3 ムスカリン受容体サブタイプにより抑制的に制御されていることが明らかとなった。この K_{ATP} チャネル抑制機構には、 $G_{q/11}$ タイプの G タンパク質および PLC が関与しており、膜の脱分極および筋収縮に寄与していると考えられる。これらの成果を *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* に投稿して公表した。

(2) ML204 は Transient receptor potential canonical 4 channel (TRPC4 チャネル) の強力な阻害薬であり、平滑筋収縮調節における同チャネルの関与について明らかにするための薬理的ツールとして、広く使用されている。しかしながら、ML204 が α アドレナリン受容体などの G タンパク質共役型受容体に結合することも報告されている。そこで、本研究では、ML204 のムスカリン受容体に対する効果について検討した。その結果、ML204 が M_2 と M_3 両サブタイプに対して拮抗作用を示すことが明らかとなった。ML204 がムスカリン受容体に対して拮抗作用を示す濃度は、

TRPC4 に対して抑制作用を示す濃度と重複していたことから、ML204 を TRPC4 チャンネルの阻害薬として使用する際は、今回明らかとなったムスカリン受容体に対する拮抗作用について考慮する必要がある。

3. Research projects and annual reports

Research Projects:

(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 Ca^{2+} -permeable ion channels.

Under normal conditions, intracellular concentration of 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 Ca^{2+} release from internal Ca^{2+} stores and Ca^{2+} entry into the cell through 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.

Annual Reports:

(1) ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels are expressed in gastrointestinal smooth muscles, and their activity is regulated by muscarinic receptor stimulation. We systematically investigated the physiological significance and mechanisms of the regulation of K_{ATP} channels by muscarinic receptors expressed on mouse ileal smooth

muscles. Our results indicated that K_{ATP} channels are constitutively active and contribute to the setting of resting membrane potential in mouse ileal smooth muscles. M_3 receptors inhibit the activity of these channels via a $\text{G}_{\text{q}/11}/\text{PLC}$ -dependent but PKC independent pathways, thereby contributing to membrane depolarization and contraction of smooth muscles.

(2) ML204, a potent transient receptor potential canonical 4 (TRPC4) channel blocker, is often used to elucidate the involvement of TRPC4 channels in receptor-operated signaling processes in visceral smooth muscles. However, it has been reported that ML204 also bound to G protein-coupled receptors. In the present study, we investigated the possible antagonistic actions of ML204 on muscarinic receptors, which mediate contractions in mouse ileal and detrusor smooth muscles. Our results suggested that ML204 might exhibit antagonistic actions on M_2 and M_3 muscarinic receptors. Therefore, these effects should be considered when ML204 is used as a TRPC4 channel blocker.

4. 論文, 著書など

Ban Wang, Yuri Murakami, Maiki Ono, Saki Fujikawa, Hayato Matsuyama, Toshihiro Unno, Kiyotada Naitou, Yasuyuki Tanahashi: Muscarinic suppression of ATP-sensitive K^+ channels mediated by the $\text{M}_3/\text{G}_{\text{q}/11}/\text{phospholipase C}$ pathway contributes to mouse ileal smooth muscle contractions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **315(4)**:G618-G630: **2018年9月のAPS selectに選ばれた。**

Yasuyuki Tanahashi: Muscarinic suppression of ATP-sensitive K^+ channels mediated by the $\text{M}_3/\text{G}_{\text{q}/11}/\text{phospholipase C}$ pathway contributes to mouse ileal smooth muscle contractions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **Video Abstract**, https://www.youtube.com/watch?v=G6SVyV_V_us

Firoj Alom, Masumi Miyakawa, Hayato Matsuyama, Hiroshi Nagano, Yasuyuki Tanahashi, and Toshihiro Unno: Possible antagonistic effects of the TRPC4 channel blocker ML204 on M_2 and M_3 muscarinic receptors in mouse ileal and detrusor smooth muscles and atrial myocardium. *J. Vet. Med. Sci.*, **80(9)**: 1407–1415.

Hiroshi Nagano, Yuki Sobue, Hayato Matsuyama, Shoichiro Saito, Hiroki Sakai, Firoj Alom, Yasuyuki Tanahashi, Toshiaki Ishii and Toshihiro Unno: Muscarinic M_2 receptor promotes vasopressin synthesis in mice supraoptic nuclei. *J. Endocrinol.*, **237**:207–216.

5. 学会発表など

Firoj Alom, Hayato Matsuyama, Hiroshi Nagano, Yasuyuki Tanahashi, Toshihiro Unno: Possible involvement of TRPM4 channels in the cholinergic contractile responses in mouse detrusor and ileal smooth muscles, WCP2018 Kyoto, Kyoto, 2018.7.1-6 ポスター発表

Hiroshi Nagano, Jeffrey G Tasker, Hayato Matsuyama, Yuki Sobue, Shoichiro Saito, Hiroki Sakai, Toshiaki Ishii, Yasuyuki Tanahashi, Toshihiro Unno: M2 muscarinic receptor mediates arginine-vasopressin synthesis possibly through decreasing presynaptic GABA release in the supraoptic nuclei, WCP2018 Kyoto, Kyoto, 2018.7.1-6 ポスター発表

永野宏, Jeffrey Tasker, 松山勇人, 棚橋靖行, 石井利明, 海野年弘: M2ムスカリン受容体はシナプス前性GABA放出を抑制し視索上核バゾプレシンニューロンの興奮を促進する, 第161回日本獣医学会学術集会, つくば市, 2018.9.11-13 口頭発表
棚橋靖行: 腸管平滑筋収縮におけるイオンチャネルの役割とその制御機構～ムスカリン作動性ATP感受性K⁺チャネル調節機構～, 鹿児島大学大学院共同獣医学研究科セミナー, 鹿児島市 2018.12.13 口頭発表(招待講演)



研究室メンバー

6. その他特記事項

1) 外部資金

該当無し

2) その他

- i. 担当講義科目: 化学通論 A、化学通論 B、動物医科学概論、科学英語Ⅲ、薬理学・毒性学、薬理・免疫毒性学実習、基礎特別研究、応用特別研究 1・2
- ii. 特別英語「英語サマーキャンプ」において、ネイティブ教員とともに授業および運営を行った。(2018.9.12(京都産業大学)、2018.9.13～9.14(あうる京北(京都府立ゼミナールハウス))
- iii. 短期海外生命科学英語実習の Leeds 大学のプログラムにおいて、学生指導および現地でのコーディネート(2018.8.17～9.3)を行った。
- iv. 京都産業大学オープンキャンパスにて実験紹介を担当した。(2018.5.5、2018.9.9、2019.3.24)
- v. 高校模擬出張授業: 「身近なくすりから学ぶ薬理学」をテーマにして高校生を対象に模擬授業を行った。(2018.7.11 京都学園高等学校)

ウイルス学研究室

Laboratory of Virology

1. 研究概要

私達は多くの微生物に囲まれて生きている。ウイルスは微生物の一員であるが、自己複製のために必要な最小限度の遺伝子しか持たないため、動物や植物に寄生し、宿主細胞内の小器官を拝借して増殖する。その結果、寄生した細胞の破壊、細胞機能の障害といった直接的な障害、あるいはウイルス抗原を発現した感染細胞が宿主免疫応答から「異物」と認識されて排除されたり、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(BoDV)感染により引き起こされるボルナ病に焦点を絞って研究を行っている。ボルナ病はウマやヒツジに持続的に感染し、時に致死的な神経疾患を引き起こす病気として 100 年以上前から知られていた。現在、ネコ、イヌ、アライグマ、ニホンザル、ウシ、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。長らく、ヒトにおける病原性は不明であったが、近年、感染リスから感染したヒトが脳障害により死亡したことが報告されたことから、本感染症が人獣共通感染症であり、ヒトでは重篤な脳障害を起こす可能性があることが示された。私達は、BoDV 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



准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino,

DVM, Ph.D



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)、神経細胞、グリア細胞などの初代培養細胞における病原性の解析、および野外の動物における感染疫学調査を中心に研究を行っている。

2. 本年度の研究成果

「ボルナ病ウイルス感染マウス初代培養神経細胞における神経学的異常副腎皮質ホルモンの作用機序について」

ボルナ病ウイルス(BoDV)は、モノネガウイルス目ボルナウイルス科に属する、マイナス鎖 1 本鎖 RNA ウイルスであり、神経向性を持つ持続感染ウイルスである。多くの哺乳類で自然感染しており、感染した動物が発症すると、行動学的異常や運動機能障害、および感覚異常などの神経症状(ボルナ病)を呈し、重篤な場合は致死的な神経疾患を引き起こす。近年、ドイツでリスのブリーダーが飼育していたリスから BoDV に感染し、神経疾患により死亡した。この報告から、ボルナ病が人獣共通感染症であることが初めて証明された。BoDV 感染後の症状の推移は、宿主要因やウイルス要因に起因することが報告されていることから、これらの要因が発症の程度に深く関わると考えられてきた。しかしながら、不顕性に持続感染が成立した動物が発症するきっかけは十分に明らかにされていない。発症機序を明らかにすることは野外に広く存在する BoDV 感染動物の発症を予防し、感染動物の QOL を維持するだけでなく、ヒトへの感染を防御することにつながるため重要な課題である。

動物では、ストレス負荷によって副腎皮質ホルモンである糖質コルチコイドの一種であるコルチコステロン(CORT)が分泌される。CORT の過剰分泌によって、脳の海馬や前頭前野では、神経障害やその領域が萎縮することが報告されている。デキサメタゾン(Dex)は、合成グルココルチコイドであり、CORT と同じグルココルチコイドレセプター(GR)に高い親和性を示す。これまでに、BoDV への副腎皮質ホルモンの影響は報告がないが、神経系に潜伏感染するヘルペスウイルスにおける影響は報告されている。例えば、エプスタイン・バーウイルス(EBV)は、再活性化を制御する遺伝子である BZLF1 遺伝子の発現量が Dex 処置により上昇すること、そしてこの影響は GR を介していることが示唆されている。本研究では、初代培養神経細胞(PCN)における BoDV 感染に副腎皮質ホルモンが及ぼす影響を解析することを目的にした。

妊娠 C57BL/6N マウスの胎仔(胎齢 14 日)から大脳皮質を取り出し、PCN を作製した。培養 4 日目に、マウス馴化株である BoDV-CRNP5 株を感染させ、培養 8 日目に Dex (10 μ M)あるいは CORT (10 μ M)を添加した。添加後 24 時間、48 時間、および 96 時間で BoDV-P 蛋白質および神経細胞を免疫染色し、PCN における BoDV 感染率を測定した。その結果、BoDV 感染 PCN に Dex を添加すると、添加後 96 時間に BoDV 感染率が有意に上昇した。次に、培養 1 日目に Ara-C 処理を行ない、グリア細胞などの増殖性のある細胞を抑えたところ、同様に Dex による感染率上昇効果が確認された。また、この時に 0.1、1、あるいは 10 μ M の Dex の添加による BoDV 感染率比較したところ、Dex による BoDV 感染率の上昇効果は、Dex の濃度依存的であった。GR への Dex の結合を阻害するミフェプリストンを培養 8 日目に Dex あるいは CORT 添加前に処理したところ、CORT および Dex による BoDV 感染率上昇効果が抑制された。

Dex の添加によって、感染率が上昇する原因を探るために、細胞内のウイルス局在を調べた。その結果、BoDV-P 蛋白質は、Dex の添加によって核だけでなく、細胞質への分布が増加していた。

以上の結果から、Dex は CORT と同様に PCN における BoDV の感染率を上昇させる効果があり、GR を介した反応であることが示唆された。原因として Dex や CORT が GR に結合することで、EBV と同様の機序でウイルス mRNA の転写が高くなった可能性が示唆された。このことから、Dex により BoDV の複製効率が上がり、核に存在していたウイルスリボヌクレオ蛋白質 (RNP) が細胞質へより大量に移動し、結果として BoDV の cell to cell 感染の伝播効率が增强されて感染率が上昇したことが推測される。

3. Research projects and annual reports

We are surrounded by a lot of microbes. Virus is one of microbes and causes disease on animal and plant. Our laboratory is focused to veterinary and zoonotic viral disease, especially neurovirology. We are interested in Borna disease virus (BoDV) that is etiological agent of Borna disease. Borna disease has been known over 100 years as a fatal neurological disease of horses and sheep in central Europe. At present, it is recognized as an emerging disease in cats, dog, birds, and a broad host range in warm-blooded animals, including humans. BDV infection in experimental animals has been used to study the pathogenesis of virus-induced central nervous system damage and as a model for specific human diseases, e.g.,

autism. Classical BD is in large part due to immunopathogenic damage to the nervous system by blood-borne inflammatory cells. Responses to BDV infection vary according to differences in host-specific factors, e.g., species, animal strain, or age of the host at the time of infection. However, the definite mechanism underlying disease outcome is not fully clarified yet. To study disturbances of movement and behavior in BDV-infected animals, we examined the following points: 1) comparing pathogenesis in rats infected with several viral strains, 2) contribution of gene expression of TGF- β family in CNS and viral pathogenesis, and 3) mechanism of changes in virus genome with adaptation to host.

The precise mechanism underlying the BoDV-1-induced onset of neurological disorders currently remains unclear. Corticosterone (CORT) causes immune suppression and neuronal damage in the brain due to long-term hyper secretion. In addition, adrenocortical hormone reactivates the herpes viruses. In this study we report the influence of CORT on the onset of Borna disease in detail.

A corticosteroid drug, dexamethasone (Dex) was added to BoDV infected mouse primary cultured neurons (PCN). As a result, Dex, like CORT, was effective in increasing the infection rate of BoDV in PCN, suggesting that this reaction was mediated by Dex binding to glucocorticoid receptor, GR. Furthermore, Dex increased the proportion of BoDV-P protein localized to the cytoplasm rather than the nucleus. It was suggested that Dex increases the replication efficiency of BoDV, and the virus ribonucleoprotein (RNP) present in the nucleus is transported to the cytoplasm in a larger amount, and as a result, the transmission efficiency of BoDV, cell to cell infection is enhanced.

4. 論文、著書など

西野佳以:「動物の感染症」第4版(共著)(II. 各論 馬、11 馬モルビリウイルス肺炎、12 馬痘、13 ボルナ病ウイルス感染症)近代出版、(2019)pp. 154-155.

5. 学会発表など

立花蓮、山田泰唯、深田彩人、窪田裕樹、木村享史、齋藤敏之、西野佳以、Effect of corticosterone in the mice persistently infected with mammalian 1 bornavirus. 第 66 回日本ウイルス学会、京都市、2018.10.28-30.

窪田裕樹、本田知之、齋藤敏之、西野佳以、Dexamethasone enhances infection of Borna disease virus type 1 in mouse primary culture neurons. 第 66 回日本ウイルス学会、京都市、2018.10.28-30.

深田彩人、山田泰唯、立花蓮、窪田裕樹、齋藤敏之、西野佳以、Corticosterone induces neurological disorder in the mice persistently infected with mammalian-1 borna virus. 第 66 回日本ウイルス学会、京都市、2018.10.28-30.

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: TGF- β ファミリーならびに副腎皮質ホルモンはいかにボルナウイルスを制御するのか。

研究代表者: 西野佳以、取得年度: H30-R2(3年)

2) 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

3) 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
- ・京都動物愛護センター運営委員会、委員
- ・獣医学共用試験センター、委員



卒業式 (2019年3月16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病原学的・分子生物学的解析

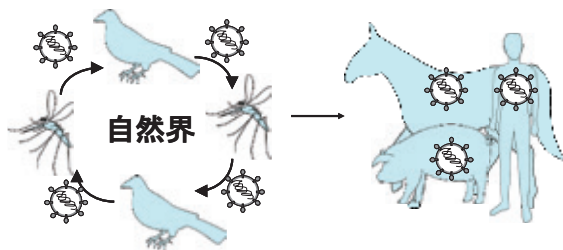


図 1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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、新規検査法やワクチンの開発

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ウイルス（THOV）HI-Kamigamo 25株の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病原学的・分子生物学的解析

京都市のマダニから分離した THOV の実験動物に対する病原性について検討した。5 週齢のマウスに THOV を感染させても、病原性は認められなかった。しかし、5 週齢のハムスターに THOV を接種すると、致死経過をたどった。肉眼病理所見では、腹水や胸水の貯留、各種臓器の出血が認められた。組織病理所見では、肝臓で、うっ血、出血、ネクロシス、アポトーシスが顕著に認められた。血液細胞学および血液化学的解析の結果、急性の播種性血管内凝固症候群（DIC）であると考えられた。

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) Pathological and 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 HI-Kamigamo 25 strain of Thogoto virus (THOV), which we isolated in Kyoto City, 2013, using protein A/G.

2) Pathological and molecular biological studies on mosquito- and tick-borne pathogens

In this year, we tested pathological effect of THOV-infection in mice and golden hamster. Although mice did not show any pathological change in THOV-infection, golden hamster showed serious hemorrhage and died within 3 to 4 days post infection. Macroscopic pathological findings included ascites and pleural effusion, and bleeding of various organs. Histopathological findings showed marked congestion, hemorrhage, necrosis, and apoptosis in the liver. As a result of hematology and hematological analysis, it was considered to be disseminated intravascular coagulation (DIC).

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

1. 前田秋彦. ダニや蚊などの昆虫が媒介する感染症について-人獣共通感染症の観点から-. 一般社団法人京都私立病院教会主催「感染症対策研修会」. 2019.3.7(京都)
2. 村岡綾, 古賀由希恵, 川道美枝子, 三宅慶一, 前田秋彦, 染谷梓. 京都市内で捕獲されたハクビシンにおける節足動物媒介性感染症の病原細菌の保有状況. 第 161 回日本獣医学会学術集会. 2018.9.11-13(筑波)
3. 山形幸, 吉田彩乃, 原田真緒, 辻本彩香, 中塚聖菜, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. トゴトウイルスのハムスターへの病原性. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 2018.10.28-30(京都)

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

前田秋彦: 京都府蚊媒介感染症対策連絡会議専門委員

前田秋彦: 平成 30 年度京都府畜産技術業績発表会助言者



2018年 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。2018年は、定期開催としては、春学期は4月4日に開催され、13名、秋学期は9月10日に開催され、105名の参加者がありました。なお、2018年の臨時開催は、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。2018年は、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110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



2018 年
総合生命科学部
研究トピックス

研究トピックス (1) : セミナー・シンポジウム開催状況

開催年月日	関係学科等	講演者 (所属先)	イベント名・講演タイトル
2018. 1. 25	生命システム	田畑 泰彦 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授)	バイオフィォーラム「バイオマテリアルからみた再生医療の世界ー再生治療と再生研究ー」(世話人: 板野 直樹)
2018. 2. 13	生命資源	高橋 俊一 (基礎生物学研究所 准教授)	バイオフィォーラム「サンゴの白化現象: サンゴは地球温暖化にどう立ち向かうのか」(世話人: 桶川 友季)
2018. 2. 27	動物生命医科	渡辺 英寿 (自治医科大学名誉教授 客員教授)、上田 裕紀 (関西学院大学保健館分室 診療長)、松田 修 (京都府立医科大学大学院 医学研究科教授)、竹内 実 (京都産業大学 総合生命科学部教授)	シンポジウム『先端医科学研究ー新たな医療への歩みを知る』 「光で見る脳機能ー光トポグラフィーの衝撃」(渡辺)、「糖尿病体質と疾患の克服」(上田)、「ダイレクト・リプログラミングが拓く再生医療の可能性」(松田)、「喫煙を科学する” ~免疫からのアプローチ~」(竹内)
2018. 3. 20	生命システム タンパク質動態研究所	Jeffrey L. Brodsky (Ph.D. University of Pittsburgh, USA)、Gerardo Z. Lederkremer (Ph.D. Tel Aviv University, Israel)	バイオフィォーラム・タンパク質動態研究所セミナー・第179回細胞生物学セミナー・総合生命科学部バイオフィォーラム 第1部「Endoplasmic Reticulum Associated Degradation, Substrate Selection, and Protein Conformational Disorders」(Brodsky)、第2部「Timing of glycoprotein folding quality control: too slow or too fast?」(Lederkremer) (世話人: 永田 和宏)
2018. 5. 2	生命資源	Linda Bonen (Ph.D. University of Ottawa, Canada)	生命科学セミナー「Plant mitochondria: unusual strategies of gene expression」(世話人: 寺地 徹)
2018. 5. 21	生命資源 タンパク質動態研究所	Catherine Goodman (『The Journal of Biological Chemistry』 scientific editor)	生命科学セミナー・タンパク質動態研究所セミナー「Publishing at JBC」(世話人: 津下英明)
2018. 7. 5	生命システム タンパク質動態研究所	矢原 一郎 (京都府立医科大学総合研究所 特別客員研究員)	生命科学セミナー・タンパク質動態研究所セミナー・第180回細胞生物学セミナー「適応応答と進化」(世話人: 永田 和宏)
2018. 8. 18	生命資源	津下 英明 (京都産業大学 総合生命科学部 教授)	ひらめき☆ときめき サイエンス~ようこそ大学の研究室へ~ 「目で見えるタンパク質の世界」※高校生向けプログラム
2018. 8. 24	生命システム タンパク質動態研究所	Alexander Mankin (Ph.D. University of Illinois at Chicago, USA)	生命科学セミナー・タンパク質動態研究所セミナー「Unconventional translation strategies that diversify the bacterial proteome」(世話人: 千葉 志信)
2018. 8. 26~ 8. 29	生命システム タンパク質動態研究所	大隅 良典 (東京工業大学 名誉教授)、Peter Walter (Ph.D. University of California, San Francisco, USA) 他 約30名	タンパク質動態研究所 国際シンポジウム「Proteins: from the Cradle to the Grave」(主催: 京都産業大学タンパク質動態研究所、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「新生鎖の生物学」)
2018. 11. 6	生命システム タンパク質動態研究所	Dr. Kenneth M. Yamada (M.D., Ph.D. National Institutes of Health, USA)	バイオフィォーラム・タンパク質動態研究所セミナー・第181回細胞生物学セミナー「Dynamic Cell-Matrix Interactions in Cell Migration, Invasion, and Organ Formation」(世話人: 永田 和宏)
2018. 12. 3	生命資源 感染症分子研究センター	加藤 治郎 (National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, USA)	生命科学セミナー・感染症分子研究センター「翻訳後修飾ADPリボシレーションと疾病ーアメリカ生活 18年間とともにー」(世話人: 津下英明)
2018. 11. 30	生命資源	岩瀬 哲 (理化学研究所 研究員) 他 3名	第53回植物バイテクシンポジウム「再生と改変 ~植物の再分化能力の秘密に迫る~」(主催: 京都植物バイテク談話会、京都産業大学生態進化発生学研究センター)
2018. 12. 14	生命資源	高野 敏行 (京都工芸繊維大学 教授)	バイオフィォーラム「ショウジョウバエから希少疾患へのアプローチ」(世話人: 河邊 昭)

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

HP掲載月	関係学科等	関係者	トピック内容
1月	生命システム	横山 謙 教授	V型ATP合成酵素の全体構造を解明 ※掲載: Nature Communications 掲載日: 2018年1月8日
1月	生命システム	横山 謙 教授	全身麻酔薬はミトコンドリアの機能不全と細胞内ATPレベルの減少を引き起こすことを発見 ※掲載: PLOS ONE 掲載日: 2018年1月3日
1月	大学院	児島 和志さん (生命科学研究所 博士前期課程・1年次)	2017年日本育種学会秋季大会でのポスター発表が、優秀発表賞を受賞
1月	生命システム	永田 和宏 教授 伊藤 進也 研究員	小胞体ストレス応答における重要なシグナル伝達タンパク質であるIRE1 α の新規調節因子として、小胞体分子シャペロンHsp47を同定 ※掲載: Molecular Cell 掲載日: 2018年1月18日
1月	生命資源	木村 成介 教授	植物ホルモンオーキシンの生理作用を自在に操作することを可能にする人工オーキシンと人工受容体の創出に成功 ※掲載: Nature Chemical Biology 掲載日: 2018年1月23日
2月	動物生命医科		難関! 実験動物一級技術者の資格認定試験に総合生命科学部の学生9名が合格
2月			温室棟の移設及び新築の安全祈願祭が執り行われる
2月	生命資源		第5回 生命資源環境学科 卒業研究発表会開催
4月	生命システム	永田 和宏 教授	世界初! 核内の分解標的タンパク質を核外に運び出すメカニズムを解明 ※掲載誌: Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)
4月	生命システム	遠藤 斗志也 教授	オルガネラ(細胞小器官)間相互作用の可視化に成功~細胞内構造のこれまでの概念を一新~ ※掲載: Scientific Reports 掲載日: 2018年4月18日
4月			ミツバチ同好会BOON!!が今年初となる探蜜を行う
5月			平成30年度 総合生命科学部奨励金授与式を挙げる
6月			オープンキャンパスで新しく誕生する生命科学部のイベントを開催
6月	生命システム	佐藤 賢一 教授	Lib.トーク 「未来型読書法 ABDを体験しよう」にて講演
6月			韓国・国立江原大学校動物生命科学部と生命科学分野における学術研究・教育に関する協定を締結
7月	動物生命医科	加藤 啓子 教授	「匂いと心と思い出と」マイナビ進学フェスタでゼミ・研究室体験ブースを出展
7月	タンパク質動態研究所		進学情報雑誌「研究力が高い大学」(2018年7月発行:(株)アネスタ)に、本学タンパク質動態研究所の取り組む研究が掲載
7月			京都府立山城高校・京都府立洛西高校との高大連携事業を実施
7月~8月			さくらサイエンスプラン支援 韓国 江原国立大学、タイ王国 国立カセサート大学、インドネシア共和国 スプラス・マレット大学との研究交流を実施
8月	生命資源	津下 英明 教授 吉田 徹 研究助教	DNAを基質とするADPリボシル基転移酵素の基質認識機構を解明 ※掲載: The Journal of Biological Chemistry 掲載日: 2018年8月2日
8月	大学院	山下 龍志 (生命科学研究所 博士前期課程・2年次)	アメリカ合衆国で開催された国際会議FASEB SRC (Science Research Conference) で優秀ポスター賞を受賞!
8月	生命システム	佐藤 賢一 教授	京都市立紫野高等学校でハテナソン教員研修を実施
9月			大阪高校1年生理系クラス向けの高大連携プログラムの開催
12月			サイエンスコミュニケーション研究会「サングラス」が上賀茂小学校で子供向け科学体験イベントを開催!

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9号 2018 (平成30年)

発行日 2019 (令和元) 年12月1日

発行者 京都産業大学総合生命科学部 / 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/faculty/lis/>