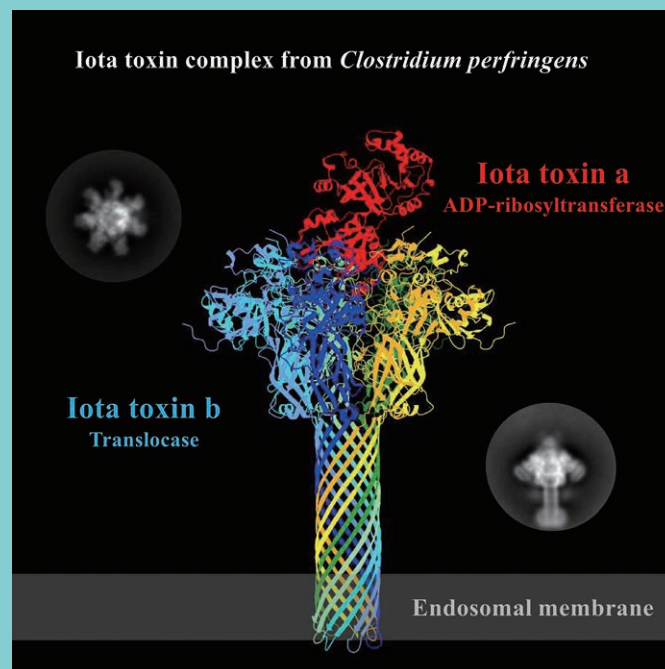


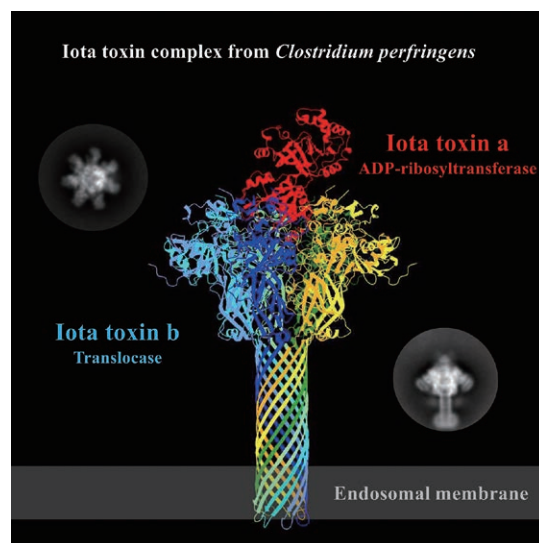
# 京都産業大学生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences  
Kyoto Sangyo University



《第 1 号》

2019 年度  
平成 31 年度/令和元年度



### 【クライオ電子顕微鏡によるウェルシュ菌イオタ毒素の複合体構造の解析】

イオタ毒素は二成分の毒素で細胞内でアクチンのADPリボシル化を行い、その重合を阻害する Ia と Ia を細胞内に透過させる Ib からなります。

Ib は膜に孔をあけ、Ia を透過させる装置として働きますが、その機構は不明でした。

Ib膜孔単体とIaが結合したIb膜孔複合体の構造をクライオ電子顕微鏡で明らかにし、

Ia と Ib 膜孔の結合により Ia のN末端が解け透過する最初の様子を捉えました。

(山田、吉田、津下ら : Nature Structural & Molecular Biology 2020 27(3):288-296)

# 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	
2019年活動記録		
先端生命科学科	先端生命科学科の教育研究活動	5
	板野直樹 教授	10
	遠藤斗志也 客員教授	13
	加藤啓子 教授	19
	金子貴一 教授	22
	川根公樹 准教授	24
	河邊昭 准教授	26
	黒坂光 教授(副学科主任)	29
	齋藤敏之 教授	31
	白鳥秀卓 教授	34
	瀬尾美鈴 教授	37
	高桑弘樹 教授	40
	高橋純一 准教授	42
	竹内実 教授	46
	棚橋靖行 准教授	49
	千葉志信 教授	52
	津下英明 教授	56
	中田博 教授	59
	中村暢宏 教授	68
	永田和宏 客員教授	72
	潮田亮 准教授	72
	西野佳以 准教授	78
	三嶋雄一郎 准教授	81
	本橋健 教授	83
	山岸博 教授	87
	横山謙 教授(学科主任)	90
産業生命科学科	産業生命科学科の教育研究活動	93
	川上雅弘 准教授	98
	木村成介 教授(副学科主任)	100
	佐藤賢一 教授(副学部長)	105
	三瓶由紀 准教授	109
	染谷梓 准教授	111
	寺地徹 教授(学部長)	113
	西田貴明 准教授	117
	野村哲郎 教授(学科主任)	119
	浜千尋 教授	122
	前田秋彦 教授	125
2019年	動物実験教育訓練および動物慰霊祭	127
2019年	生命科学部 研究トピックス	129

## 巻頭言

生命科学部長

寺地 徹

遠い国のできごとと傍観していた新型コロナウイルス感染症が、あれよあれよという間に我が国にも伝播し、第一波を抑えるための緊急事態宣言の発令、宣言解除後の第二波の襲来と、我々の住む社会は100年に一度の災禍に見舞われています。大学もその例外ではなく、オンライン授業の開始、キャンパスへの入構規制など前例のない対応に追われ、教育・研究の両面で大きな痛手を受けました。そのような中、ここに令和元年度の生命科学部年報（第1号）を例年通りお届けできること、学部長として安堵しております。

我々の学部は、昨年4月から生命科学部として新たな活動を開始しております。そこで、今年度より、総合生命科学部年報の「総合」をはずし、名称を生命科学部年報といたしました。また、学会活動や外部資金の受け入れ期間、雇用など、我が国の慣習にあわせて、年報への掲載の期間を年単位から年度単位にあらためました。すなわち、今年度の年報は2019年1月から2020年3月までの15ヶ月間にわたる、我々の教育・研究活動の記録です（次年度からは今年の4月から翌年の3月までの1年間のご報告となります）。

生命科学部では「よりよい教育はよりよい研究から」を学部の目標として掲げ、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おります。従来からの研究スタイルを踏襲する先端生命科学科に加え、この学部には生命科学と社会科学との接点を模索しようとする、産業生命科学科が新設されました。今後、この学科でどのような研究が積み重ねられていくのか、注目していただければと思います。また、生命科学部では、学生に質の高い教育を提供することも最重要のミッションのひとつです。現在、完成年度をめざして、新しい教育カリキュラムの実現に、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。仲間の研究に知的好奇心が刺激される一方、自身の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。新型コロナウイルス災禍による未曾有の事態にあっても、研究活動を止めるわけにはいきません。関係者の皆様におかれましては、生命科学部の今後の活動に、これまでもまして注目していただきますとともに、暖かくかつ厳しいご指導など賜れば、大変ありがたく存じます。

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	
先端生命科学科		教授	板野 直樹		小林 孝				
		客員教授	遠藤 斗志也		河野 慎	阪上 春花 松本 俊介 角田 千香 鈴木 純子 齊藤 知加	鈴木 俊治 須賀 比奈子 佐藤 久夫 渡邊 康紀 丹羽 一 荒磯 裕平 塩田 拓也 (5月から)	足立 織生	
		教授	加藤 啓子		藤田 明子			北村 元隆	渡邊 裕子
		教授	金子 貴一			板倉 学			
		准教授	川根 公樹			村田 真智子			
		准教授	河邊 昭		吉田 貴徳	吉田 初佳			
		副学科主任	教授	黒坂 光		中村 直介			
		教授	齋藤 敏之					矢田 桃子	
		教授	白鳥 秀卓						
		教授	瀬尾 美鈴					清水 昭男 上野 信洋	
		教授	高桑 弘樹					仲井 まなみ (8月から)	
		准教授	高橋 純一			奥山 永		伊地知 稔	
		教授	竹内 実				瀬田 真由子	石田 喬裕 小池 浩嗣	
		准教授	棚橋 靖行						
		教授	千葉 志信		藤原 圭吾	千葉 直美 天野 佐織			
		教授	津下 英明		吉田 徹	藪田 淑予		入倉 大祐 佐藤 優穂	
		教授	中田 博	森 勇伍	山下 智子			河野 正孝 稲葉 隆明	
		教授	中村 暢宏				PANDEY Himani		
		客員教授	永田 和宏		伊藤 進也	寺元 万智子 飯田 英明 石田 玉美 福田 泰子	森戸 大介 亞未 福永 秀蔵 種村 裕幸 (1月から)		
		准教授	潮田 亮						
		准教授	西野 佳以						
		准教授	三嶋 雄一郎			若林 貴美			
		教授	本橋 健		桶川 友季	佐藤 望			
	教授	山岸 博			橋本 絢子				
	学科主任	教授	横山 謙	岸川 淳一	平山 温子 池田 貴子		平山 温子 (9月から)		
	准教授	川上 雅弘							
産業生命科学科	副学科主任	教授	木村 成介		坂本 智昭	池松 朱夏 上ノ山 華織			
	副学部長	教授	佐藤 賢一		Tokmakov Alexander Alexandrovich		井尻 貴之	横山 朋子	
		准教授	三瓶 由紀						
		准教授	染谷 梓				平岩 悟 (8月から) 山崎 剛士 (8月から)		
	学部長	教授	寺地 徹			塚谷 真衣 植村 香織 永島 伊都子			
		准教授	西田 貴明						
	学科主任	教授	野村 哲郎				上西 美緒		
		教授	浜 千尋						
		教授	前田 秋彦				松本 耕三 好井 健太朗 (8月から) 本谷 匠 (8月から) 後藤 慶子 (8月から) 奥村 昌美 (8月から) 川崎 成人 (8月から) 木澤 正人 (8月から)		

大学院生	その他
西垣 大樹 (M2) 米原 由喜 (M1) 渡邊 優作 (M1) CHOKCHAITAWEEESUK Chatchadawalai (D3)	
	竹田 弘法 (学振 PD) 篠田 沙緒里 (学振 PD)
利川 泰博 (M2) 青木 仁星 (M2) 田村 聡哉 (M1) TANGSUDJAI Siriporn (D4)	
蒲生 雄大 (M2)	
服部 和泉 (M2) 梶田 春奈 (M1) 吉邨 正夢 (M1)	
柳田 正義 (M1)	
山口 裕樹 (M2)	
澁谷 みのり (M1) 横山 久留実 (M1)	
武内 莉夏 (M2) 橋本 唯 (M2) 下吉 桂輔 (M1) 藤井 麻衣 (M1)	
	PALASHIKAR Gargi Mahesh (外国人特別生・M1) RAYMOND Abbott (交換留学生)
上口 恭平 (M2) 内村 尚哉 (M2)	
近野 真央 (M2) 岸本 友 (M1)	
濱田 沙希 (M2) 平野 由貴 (M2) 中田 帆浪 (M1)	
藤川 咲 (M2) 齊藤 玲香 (M1)	
櫻 祐太郎 (M2) 桑折 悠 (M2) 塩田 成未 (M2) 向川 結紀子 (M2) 崎山 歌恋 (M1) 高橋 大海 (M1)	
半田 達也 (M2) 山田 等仁 (M2)	
押谷 麻里 (M2) 矢寺 夕貴 (M2)	井上 拓也 (委託生)
SHAIK Shaheena (D3)	THIRUMALASETTI Satish Kumar (外国人特別生)
藤井 唱平 (D3) 上垣 日育 (D3) 堤 智香 (D2) 葛西 綾乃 (D1) 山下 龍志 (D1) 阿部 真由子 (M2) 亀井 亮太 (M2)	
立花 蓮 (M2) 深田 彩人 (M1)	
宇賀神 希 (M1)	
古田 綾 (M2) 三谷 奈穂 (M2) 服部 拓磨 (M1)	
天野 瑠美 (D3) 馬瀬 樹志 (M2) 小俣 恵美 (M1)	
山下 健太 (M2) 中元 海里 (M1)	
佐々木 琢馬 (M2) 加茂 優也 (M1)	
西村 勇飛 (M1)	
辻本 絢香 (M2) 中塚 聖菜 (M2) 村岡 綾 (M2)	

## 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 生命科学部事務長	井上 朋広
教学センター 事務長補佐 (生命科学部事務室)	前田 好直
教学センター 課員 (生命科学部事務室)	木津 夏月美
教学センター 課員 (生命科学部事務室) (3月まで)	林 大介
教学センター 課員 (生命科学部事務室) (4月から)	上山 慧
教学センター 契約職員 (生命科学部事務室)	角 理恵子
教学センター 契約職員 (生命科学部事務室)	石野 都
教学センター 契約職員 (生命科学部事務室)	橋本 晶子
教学センター 契約職員 (生命科学部事務室)	片山 由架
教学センター 契約職員 (生命科学部事務室) (7月まで)	上原 麻美
教学センター 契約職員 (生命科学部事務室) (8月から)	吉田 綾子
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 嘱託職員 (実験補助員)	吉岡 倫世
教学センター 嘱託職員 (実験補助員) (12月まで)	渡邊 晴代
教学センター 嘱託職員 (実験補助員)	古賀 由希恵
教学センター 嘱託職員 (実験補助員)	内海 陽子
教学センター 嘱託職員 (実験補助員)	森見 友貴
教学センター 嘱託職員 (実験補助員)	村木 直子
教学センター 嘱託職員 (実験補助員)	福永 明日美
教学センター 嘱託職員 (実験補助員)	佐野峯 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	山岸 博
省エネルギー推進委員会	中田 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	金子 貴一
学部 FD/SD 推進ワーキンググループ (総合生命科学部)	佐藤 賢一
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)	佐藤 賢一
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	西田 貴明
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	西野 佳以 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	中村 暢宏
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	佐藤 賢一
人間科学教育カリキュラム部会	佐藤 賢一
教職課程教育センター運営委員会	高桑 弘樹 木村 成介
教育支援研究開発センター運営委員会	佐藤 賢一
GSC ワーキンググループ	棚橋 靖行

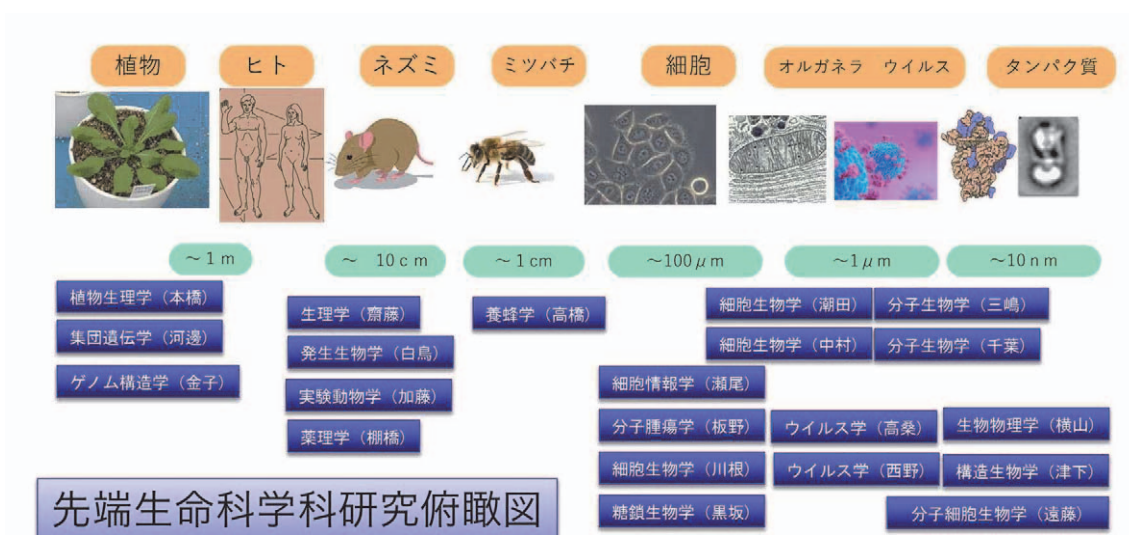
# 先端生命科学科

## 先端生命科学科

### 【研究】

生命科学は持続可能な社会の構築に不可欠であり、人類の生存に直結する「医療・健康」「食料・資源」「環境・生態」に集約される地球規模の諸問題と密接に関係している。この背景のもと、先端生命科学科では、生命科学の先端的分野における研究を牽引するとともに、社会に最先端の情報を発信できる人材の養成を目的としている。

先端生命科学科がカバーする研究領域としては、環境・生態、食料・資源といったマクロな視点から、細胞、オルガネラ、生体分子といったミクロな視点まで、多岐に渡る。具体的には、ミクロの領域では、人獣共通感染症を引き起こすウイルスに関する研究、糖代謝と癌の悪性化機構に関する研究、ミトコンドリアや小胞体等のオルガネラの構築原理やその機能解明、創薬につながるタンパク質の構造研究、タンパク質の合成と恒常性の維持機構の解明、根粒菌や植物のゲノム解析等、マクロな領域では、糖鎖修飾と行動との関連、ストレスと内分泌系との関連、環境保全型養蜂技術の確立等がある。これら多様な研究テーマを推進している教員が有機的に連携しながら、共同研究を展開できる環境が整っている。最先端の生命科学に基づく研究成果を発信し続けることで、実社会への貢献を目指す。





## 【教育】

先端生命科学科では、初年次に生命科学の基本となる基礎科目を専任教員が担当し、学年進行に伴って開講される専門科目の学びにつなげる積み上げ型のカリキュラム構成になっている。また、基礎科目での学びをいっそう確かなものにするために、専任教員による演習科目を各基礎科目に配置している。演習科目では、グループ学習や課題発表、討論会などを通じて基本科目の知識の定着を図るとともに、考える力、プレゼンテーションする力を養う。具体的には、初年次に生物学通論および化学通論および、対応する演習科目により生命科学の学びに必要な基本的な知識、考える力を修得する。さらに初年次後半に生化学の基礎を学ぶ物質生物化学を配置している。さらに2年次には、代謝生物化学、分子生物学、細胞生物学などの生命科学の基盤となる科目および対応する演習科目を配置し、その後に専門性のより高い科目として生命医科学1, 2、微生物学、タンパク質科学等を履修できるようになっている。また、初年次秋学期から化学実験、2年次春学期には生物学実験が開講され、化学・生物学の基本について、実習を通して学ぶとともに、基本的な実験手法を身につける。2年次からは「生命医科学コース」、「食料資源学コース」、「環境生態学コース」のいずれかのコースを選択し、選択したコースに配置された科目を中心に受講する。幅広い知識と視野を身に付けるために、選択したコース以外のコースに配置された専門科目も受講できる。学生は3年の秋 Semester の先端生命科学特別研究1から各教員の研究室へ分属し、最終年度には、先端生命科学特別研究2で本格的な卒業研究に取り組む。分属先研究室としては、先端生命科学科の21研究室に加え、産業生命科学科の7実験系研究室を選ぶこともできる。生命科学の専門性が高い人材育成が、学科目標のひとつであり、そのため大学院進学を積極的に推奨している。将来の進路としては、食品、製薬、バイオ関連企業のほか、中学高校の理科教員や、公務員などを見込んでいる。

科目名	配当学年	担当教員	科目名	配当学年	担当教員
フレッシューズセミナー	1	学科全教員	生物の基礎	1	千葉
生物学通論A	1	川根	化学実験	1	潮田、遠藤、津下、中村、西野、本橋
生物学通論B	1	高橋	先端生命科学演習1	1	潮田、棚橋
化学通論A	1	横山	先端生命科学演習2	1	川根、横山
化学通論B	1	津下	先端生命科学演習3	1	板野、高桑
生命科学概論	1	河邊、白鳥	英語サマーキャンプ1	1	三嶋、(田保橋)、(赤沢)、(サンドブルック)、(ドネラン)
物質生物化学	1	黒坂	海外サイエンスキャンプ	1	棚橋
化学の基礎	1	黒坂			

科目名	配当学年	担当教員	科目名	配当学年	担当教員
分子生物学	2	千葉	食料資源学1	2	高橋
代謝生物化学	2	遠藤	環境生態学1	2	高橋
細胞生物学	2	中村	植物生理学	2	本橋
解剖生理学	2	加藤、齋藤	先端生命科学演習4	2	中村、西野
遺伝学	2	河邊	先端生命科学演習5	2	瀬尾、千葉
生物統計学	2	河邊	先端生命科学英語1	2	川根、横山
生物学実験	2	板野、金子、川根、瀬尾、高桑、高橋	先端生命科学実習1	2	遠藤、川根、河邊、黒坂、高桑、高橋、千葉、津下、西野、横山
生命医科学1	2	板野	解剖生理学実習	2	加藤、齋藤、棚橋
発生生物学	2	白鳥	サイエンスキャリアプランニングセミナー	2	加藤、川根、黒坂、中村
微生物学	2	西野			
生命医科学2	3	潮田、川根	Modern Life Sciences in Our Life	3	潮田、遠藤、加藤
薬理学・毒性学	3	瀬尾、棚橋	先端生命科学英語2	3	遠藤、白鳥、千葉、本橋
バイオインフォマティクス	3	金子	先端生命科学実習2	3	板野、潮田、加藤、金子、木村、白鳥、瀬尾、中村、前田、三嶋、本橋
タンパク質科学	3	津下、横山	神経生物学	3	黒坂
環境生態学2	3	高桑	分子動態学	3	三嶋
実験動物学	3	加藤、白鳥	実験動物学実習	3	齋藤、白鳥、棚橋
生体物質分析化学	3	板野	先端生命科学特別研究1	3	学科全教員
食品栄養衛生学	3	加藤、西野	生命科学プロジェクト研究1	3	河邊、黒坂、高桑、高橋、西野、本橋、横山
先端生命科学特別研究2	4	学科全教員	生命科学プロジェクト研究2	4	河邊、黒坂、高桑、高橋、西野、本橋、横山
短期海外生命科学英語実習	4	加藤、黒坂、棚橋			

以下 総合生命科学部 令和元年度実施科目

科目名	配当学年	担当教員	科目名	配当学年	担当教員
代謝生物化学	2	遠藤、中田	生命システム実習 I	2	瀬尾、千葉、中田、横山
分子生物学	2	瀬尾、千葉	生命資源環境学実験・演習 I	2	金子、河邊、津下
生命システム英語購読 I	2	潮田	生命科学演習 III	2	三嶋、横山
科学英語 I	2	山岸	生体分子構造学	2	津下
生物学実験	2	板野、中村	生命システム実習 I	2	瀬尾、千葉、中田、横山
細胞生物学	2	中村、三嶋	植物栽培繁殖学、栽培植物起源学	2	山岸
発生生物学	2	白鳥	実験動物遺伝学、解剖学	2	加藤
遺伝子工学、生命科学演習 IV	2	千葉	解剖生理学実習	2	加藤、齋藤
基礎生態学	2	高橋	薬理学・毒性学	2	棚橋
生命システム英語購読 II	2	遠藤、瀬尾、中田	生命科学演習 V	2	中村
科学英語 II	2	河邊、高桑	バイオインフォマティクス入門	2	金子
薬理・免疫毒性学実習	3	棚橋、竹内	生命情報科学	3	金子
動物感染症学	3	高桑	微生物学 II	3	西野
生命システム英語購読 III	3	千葉	基礎特別研究	3	板野、遠藤、加藤、金子、川根、河邊、黒坂、齋藤、白鳥、瀬尾、高桑、高橋、棚橋、千葉、津下、中村、西野、三嶋、本橋、横山
科学英語 III	3	金子、齋藤、竹内、棚橋	実験動物学実習、実験動物医学	3	白鳥
生命システム実習 II	3	板野、遠藤、川根、黒坂、中村、三嶋	バイオ解析科学	3	板野
生命資源環境学実験・演習 II	3	高橋、本橋、山岸	生体分子機能学	3	津下
神経生物学	3	黒坂	植物生理学	3	本橋
免疫学	3	中田	植物育種学	3	山岸
薬理学	3	板野、(武藤)	集団遺伝学	3	河邊
腫瘍細胞生物学	3	瀬尾	分子生態学	3	高橋
再生医科学	3	潮田、川根	食品栄養衛生学	3	加藤、西野
タンパク質科学	3	永田、横山	微生物学・公衆衛生学実習	3	白鳥、高橋
生理学	3	齋藤	Modern Life Sciences in Our Life	3	潮田、遠藤、加藤
免疫病理学	4	竹内	短期海外生命科学英語実習	4	棚橋
応用特別研究1・2	4	学科全教員			

## 抗老化医学研究室

Laboratory of Anti-Aging Medicine

### 1. 研究概要

高齢化社会の急速な進行を背景として、介護など様々な問題の解決が急務の課題となっている。当研究室の目標は、老化に特徴的な病的な状態に介入し、長寿の質(元気に長寿を享受できる状態)を確保するための革新的な技術を確立することである。抗老化医学研究室では、この目的のため、分子生物学、細胞生物学、生化学、そして、遺伝子工学の先端技術を駆使して、以下の研究課題に取り組んでいる。

#### 1-1: ヒアルロン酸合成機構の解明とアンチエイジング技術への展開

関節機能の低下が原因で寝たきりになる高齢者が増えている。この要因として、関節でクッションや潤滑の役割をするヒアルロン酸の減少がある。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcA)が、 $\beta$ -1,3 と  $\beta$ -1,4 結合で交互に連結した2糖ユニットの繰り返し構造からなる高分子多糖であり、特に結合組織の細胞外マトリックス成分として広く存在している。細胞はこのマトリックスにヒアルロン酸受容体を介して接着し、細胞内情報伝達系を活性化して細胞増殖や移動の調節に働く(図1)。私達は、世界に先駆けて、動物のヒアルロン酸合成酵素を見出し、ヒアルロン酸合成機構の解明に取り組んできた。そして、合成酵素遺伝子組換えタンパク質を用いた試験管内ヒアルロン酸合成システムの開発に成功し、酵素を活性化する化合物の探索を始めている。今後、ヒアルロン酸合成機構の全容解明に取り組み、その研究を通じて、アンチエイジングへの技術展開を目指す。

#### 1-2: がん幹細胞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。従っ

教授 板野 直樹

Prof. Naoki Itano, Ph.D.

研究助教 小林 孝

Assist. Prof. Takashi Kobayashi, Ph.D.



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ことが重要である。本研究の主目的は、がん幹細胞性を支配している分子を同定し、がん幹細胞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

我々は以前の研究で、ヒアルロン酸を過剰産生する乳癌発症モデルマウスにおいて、進行性乳癌が高率に発症し、その乳癌で、がん細胞からがん幹細胞への転換が起こ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。そこで我々は、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リプログラミングについて検討し、ヘキソサミン合成経路(HBP)の代謝流束が著しく加速していることを明らかにした(図1)。

今年度我々は、HBP代謝流束の加速とがん病態との関連について研究した。そして、乳がん臨床検体の遺伝子発現データベースを解析し、HBP代謝酵素遺伝子群の発現が、乳がんに関連して上昇していることを見出した。HBPは、細胞内糖代謝の主要プログラムであり、最終産物のウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)の供給により、タンパク質のO-GlcNAc修飾やヒアルロン酸糖鎖シグナルを上流で調節している。そこで、乳がん臨床検体を用いて、ヒアルロン酸合成酵素(HAS)の遺伝子発現を解析し、ヒアルロン酸合成酵素2(HAS2)遺伝子が、乳がんの進展や予後と密接に関連して発現していることを明らかにした。この傾向は、HAS2とHBPの律速酵素であるグルタミン・フルクトース6-リン酸アミドトランスフェラーゼ(GFAT)との共発現において、より顕著であった。進行性乳がんモデルマウスの乳がんより樹立したがん細胞を用いて、HBP酵素遺伝子群とHAS2遺伝子の発現やタンパク質のO-GlcNAc修飾を解析し、がんの悪性化やがん幹細胞の割合と関連して、これら遺伝子発現やタンパク質修飾が亢進していることを明らかにした。

以上の研究成果は、HBP代謝経路とその下流で働くシグナルが、乳癌の悪性化やがん幹細胞性の制御に働くことを示唆しており、これらの経路を標的とした新規がん治療法の開発につながる成果と言える。

### 3. Research projects and annual reports

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

#### 1-2. Establishment of Therapies Targeting Cancer Stem Cell

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.

The main purpose of our research in this domain is to identify the molecular cues that govern the CSC properties and establish novel therapies to induce a state of cancer dormancy by controlling CSCs.

2. Our previous studies have demonstrated that transgenic mice exhibiting HA overproduction in mammary tumors rapidly developed aggressive breast carcinomas, in which plastic cancer cells reverted to stem-cell states. 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. Stable isotope-assisted tracing and mass spectrometry profiling disclosed an acceleration of metabolic flux in the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) (Fig. 1).

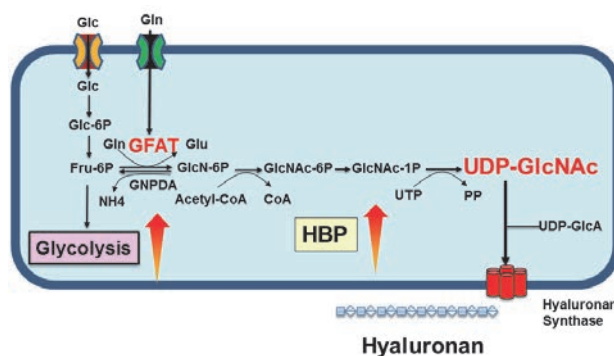


Figure 1. HA biosynthesis and HBP

We investigated the molecular events underlying cancer pathogenesis associated with enhanced HBP flux. Multidimensional analysis of microarray datasets demonstrated up-regulation of genes encoding HBP enzymes in clinical breast cancers and revealed that co-expression of hyaluronan synthase 2 (HAS2) and glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT), a rate limiting enzyme of the HBP, was strongly correlated with a poor prognosis in advanced cancer patients. Consistently with the clinical data, comparative analyses of distinct breast cancer mouse models demonstrated enhancement of the HBP gene expression in primary carcinoma cells, with elevation of Has2 expression and hyaluronan production in aggressive breast cancer cells. Overall protein *O*-GlcNAcylation was also elevated in association with HBP enhancement in aggressive cancer cells, and the modification exhibited overlapping but distinct roles from the hyaluronan signal in the regulation of CSC-like features. In this study, we uncovered that an enhanced HBP drove pro-tumorigenic signaling pathways involving HA and *O*-GlcNAcylation in aggressive breast cancer. Furthermore, the HA and *O*-GlcNAcylation signaling pathways exhibited overlapping but distinct roles in the regulation of CSC-like phenotypes. Designing the

most effective and appropriate strategy towards the prevention and interception of such pro-tumorigenic signals may therefore contribute to the achievement of breast cancer elimination.

#### 4. 論文、著書など

Chokchaitaweek C, Kobayashi T, Izumikawa T, Itano N.  
Enhanced hexosamine metabolism drives metabolic and signaling networks involving hyaluronan production and O-GlcNAcylation to exacerbate breast cancer. *Cell Death & Disease* 10:803 (2019)

#### 5. 学会発表など

Itano N. Enhanced hexosamine metabolism drives metabolic and signaling circuit involving hyaluronan production and O-GlcNAcylation to promote cancer stem-like properties. Hyaluronan 2019 (Cardiff, UK) (招待講演)

小林孝, Chatchadawalai Chokchaitaweek, 泉川友美, 板野直樹 ヒアルロン酸産生はヘキソサミン合成経路を介してがん幹細胞性を制御する 第38回日本糖質学会年会(名古屋)

Chatchadawalai Chokchaitaweek, 小林孝, 泉川友美, 板野直樹 ヒアルロン酸合成に伴うがんの悪性化とヘキソサミン合成経路の代謝流束およびO-GlcNAc修飾の亢進 第92回日本生化学会大会(横浜)

#### 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:ヘキソ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)

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究

課題名:がん幹細胞性制御に働くヘキソサミン代謝シグナルの解明と創薬

研究代表者:板野直樹, 取得年度:令和元年

##### 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小林研究助教は、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。小林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。また、小林研究助教との共同指導体制のもとで、博士後期課程の学生が学位を取得している。教育活動と並行して、研究活動にも精力的に取り組み、がん幹細胞化の機構に新たな知見が得られており、その成果は学術論文として発表している。

このように小林研究助教は、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

## 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 種類を超えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生合成や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、オルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体のクライオ電子顕微鏡(EM)構造の決定

ミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体は 1000 種におよぶほとんどのミトコンドリアタンパク質のミトコンドリア内への移行の搬入口として機能する。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

教授 遠藤斗志也

Prof. Toshiya Endo, Ph. D.

助教 河野 慎

Assist. Prof. Shin Kawano, Ph. D.



が 2 分子の 2 量体に変換すること、3 量体と (Tom22 を含まない) 2 量体は各々通過させる基質タンパク質の種類が異なることを見出していた (Sakaue et al., *Mol. Cell* 2019)。今回、われわれは酵母細胞から TOM 複合体 (Tom40, Tom22, Tom5, Tom6, Tom7 の 5 種類のサブユニットから構成される膜タンパク質複合体) を精製し、東京大学のクライオ電子顕微鏡を用いてその構造を 3.8Å の分解能で決定することに成功した (Araiso et al. *Nature* 2019)。全体構造は各サブユニット 2 個ずつから成る 2 量体で、タンパク質の通り道 (膜透過チャンネル) となる  $\beta$ -バレル構造の Tom40 同士の界面に、Tom22 二分子と脂質一分子が入り込んでいた。これは上述の Tom22 を含む 2 量体とは異なり、ミトコンドリアにメジャーに存在する 3 量体のコア部分に対応すると考えられた。一方、Tom40 のポリペプチド鎖の N 末端部分はチャンネル構造形成には関わらないが、Tom40 チャンネルの孔を外 (サイトゾル) 側から内 (膜間部) 側に向かって貫き、膜間部側に出てきた N 端部分を Tom5 がつなぎ止めていた。

TOM 複合体を通過した前駆体は、次の因子に引き渡されて、最終目的地に運ばれる。N 端にミトコンドリア行きシグナルとして「プレ配列」を持つものは、内膜の TIM23 複合体と呼ばれるトランスロケータに引き渡されて、内膜を通過してマトリクスに運ばれる。今回、TIM23 複合体のサブユニット Tim50 が、TOM 複合体のサブユニット Tom40 の C 端側や Tom22 の膜間部側のドメインと相互作用していることが分かった。これらのドメインは 2 量体の内側、2 つの Tom40 同士の界面の近くにあり、Tim50 を含む TIM23 複合体は TOM 複合体の 2 量体の「内側」で、通過してくるプレ配列を持つ前駆体を待ち構えていることになる。一方、多様な前駆体タンパク質のうち、プレ配列を持たない膜間部の可溶性タンパク質は、TOM 複合体から膜間部の Mia40 に引き渡される。今回、Mia40 は Tom40 のチャンネル内を貫いて膜間部側に出てくる Tom40 の N 端側と相互作用していることが分かった。すなわち、膜間部の可溶性タンパク質が Tom40 チャンネル内を通過して Tim40 に引き渡される出口は、TOM 複合体の 2 量体の「外側」にあることになる。このよ

うにタンパク質の膜透過チャネル内に、プレ配列を持つ前駆体タンパク質と持たない前駆体タンパク質専用の通り道と出口を別々に用意し、出口で待ち構える各輸送経路の下流の因子に前駆体タンパク質を別々に受け渡すことで、性質も機能も異なる 1000 種に及ぶ前駆体タンパク質の外膜透過を効率良く行っていることが明らかになった。

## 2) Msp1 によるタンパク質配送のやり直し機構の発見

タンパク質自身には働くべき場所が宛名として書き込まれ、細胞にはそれを読み取って目的地への配送を行うシステムが備わっている。タンパク質の目的地への配送はきわめて正確に行われ、その配送が狂うと細胞機能は損なわれ、様々な病気につながるものと考えられてきた。しかし、今回われわれは、タンパク質の細胞内配送には間違いが起こりうること、しかしいったん配送先を間違っても、配送をやり直す、すなわち校正を行うシステムが存在することをはじめて見出した。

われわれは、ミトコンドリアに誤配送されたタンパク質の分解に Msp1 というタンパク質が関わるという、最近の報告に注目した。ペルオキシソームに行くべき Pex15 というタンパク質の変異体 Pex15 $\Delta$ 30 (ミトコンドリアに誤配送される) を使って、Msp1 がどんなタンパク質と協力して Pex15 $\Delta$ 30 の分解を促すのかを調べた。そして、Pex15 $\Delta$ 30 はプロテアソームによってサイトゾルで分解されること、意外にもプロテアソーム分解の目印となるユビキチン付加はミトコンドリアではなく ER に存在する Doa10 というユビキチン化酵素によって行われることが分かった。ER には、内部に異常タンパク質が生じると、これを見出してユビキチン化し、サイトゾルに送り出してプロテアソームで分解する強力な「品質管理」システムが存在する。Doa10 はこの品質管理システムの一員であり、通常は Doa10 が ER 膜上の異常タンパク質をユビキチン化すると、サイトゾルから Cdc48 というタンパク質がやってきて異常タンパク質を ER 膜からサイトゾルに引き出し、プロテアソームに受け渡す。実際、Cdc48 が Pex15 $\Delta$ 30 の分解に必要であることも分かった。Pex15 $\Delta$ 30 は ER では本来のパートナータンパク質と複合体を作れないので異常タンパク質として認識されてしまうことが考えられる。そうであれば、異常タンパク質として認識されない Pex15 $\Delta$ 30 以外のタンパク質がミトコンドリアに誤配送された場合はどうなるであろうか。本来 ER 膜に組み込まれてからゴルジ体に配送されてゴルジ体膜上で働く Gos1 をミトコンドリア外膜に誤配送させてみたところ、Gos1 もミトコンドリア外膜から

Msp1 によって引き抜かれ、一部は ER 膜に移行することがわかった。興味深いことに Gos1 は ER 膜上で Doa10 によるユビキチン化を受けることはなく、本来の目的地であるゴルジ体まで小胞体から正しく配送された。Gos1 は ER の品質管理システムによって異常とはみなされず、いったん ER にさえ戻れば、ゴルジ体まで正しく運ばれることとなった。

Msp1 はミトコンドリア外膜に誤配送された Pex15 $\Delta$ 30 や Gos1 などのタンパク質を何らかの仕組みで見出し、ATP のエネルギーを使ってそれらを外膜から引き抜く。引き抜かれた Pex15 $\Delta$ 30 や Gos1 は膜タンパク質なので、おそらく多くは再びミトコンドリア外膜に組み込まれるが、一部は近くに存在する ER 膜にも組み込まれる。すなわちミトコンドリアに誤配送された Pex15 $\Delta$ 30 や Gos1 は配送をやり直す機会を Msp1 によって与えられたと考えられる。こうして、Msp1 はミトコンドリア外膜に誤配送されたタンパク質を ATP のエネルギーを使って引き抜き、近くにある ER などの膜に配送をやり直させる機会を与えている。これまでタンパク質の配送は正確に行われるべきであり、そのやり直しを行うタンパク質やシステムが存在するとは考えられていなかった。しかし Msp1 の新しい機能の発見は、細胞内ではタンパク質の配送は間違いが起こりうること、しかし間違いが起こっても Msp1 などによってそれをやり直すことで、タンパク質の正しい配送や、誤配送されたタンパク質の除去ができること、そのことで細胞の正常機能の維持を実現していることがわかった。

## 3. Research projects and annual reports

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

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  $\beta$ -barrel protein Tom40, and six  $\alpha$ -helical membrane proteins.

We determined here the cryo-electron microscope (EM) structure of the yeast TOM complex at 3.8Å resolution.

The cryo-EM structure of the TOM complex revealed two separate preprotein exits sites toward the IMS. That is, presequence-containing preproteins that constitute about 60% of mitochondrial proteins were suggested to leave the Tom40 pore at the *trans* site, which is formed by Tom22/Tom7/Tom40 in vicinity of the middle of the Tom40 dimer, and are then transferred to Tim50 of the TIM23 complex via the IMS domains of Tom22 and Tom40. Presequence-less preproteins, which include three different classes (MIA substrates and  $\beta$ -barrel and carrier precursors), were suggested to leave the Tom40 channel in proximity of Tom5 and the N-extension of Tom40 at the periphery of the Tom40 dimer. The IMS-exposed portion of the N-extension of Tom40 recruits small TIM chaperones and Mia40 close to the exit site to ensure an efficient transfer of precursor proteins. In this way, the TOM complex functions as the hub for the intramitochondrial sorting of mitochondrial precursor proteins.

Previous studies reported that a subset of tail-anchored (TA) proteins targeted to the ER were mislocalized to mitochondria by, for example, disruption of the GET pathway. The mitochondrial outer membrane AAA-ATPase Msp1 was reported to clear such mistargeted TA proteins as well as a model mistargeted TA protein Pex15 $\Delta$ 30. We found that mislocalized Pex15 $\Delta$ 30 was first recognized by Msp1 in the OM, then ubiquitinated by Doa10 and its co-factors in the ER membrane, and subsequently extracted from the ER membrane by Cdc48 for proteasomal degradation in the cytosol. Our results suggest that Msp1 constantly extracts substrate TA proteins like Pex15 $\Delta$ 30 from the mitochondrial OM at the expense of ATP hydrolysis, which are primarily reinserted into the OM, but the extracted TA proteins have a small chance of reinserting in the ER membrane. The substrate TA proteins transferred to the ER are, if aberrant, ubiquitinated by the ERAD system, Doa10 and its co-factors in the ER. If TA proteins transferred to the ER by Msp1 escaped recognition by the ERAD machinery like the case of

Gos1 in the absence of Get3, they may follow their inherent secretory pathways to reach their destinations. In this sense, Msp1 functions as an “extractase” that facilitates “proofreading” of the mistargeted TA proteins by promoting their transfer to the ER for further degradation or retrieval of sorting via the secretory pathway.

#### 4. 論文, 著書など (2019.1~2020.3)

- S. Nakamura, A. Matsu, S. Akabane, Y. Tamura, A. Hatano, Y. Miyano, H. Omote, M. Kajikawa, K. Maenaka, Y. Moriyama, T. Endo, and T. Oka, The mitochondrial inner membrane protein LETM1 modulates cristae organization through its LETM domain. *Commun. Biol.* 3, 99 (published online, March 5, 2020).
- Y. Watanabe, Y. Tamura, C. Kakuta, S. Watanabe, and T. Endo, Structural basis for inter-organelle phospholipid transport mediated by VAT-1. *J. Biol. Chem.* 295, 3257-3268 (2020) (Online published, Jan 31, 2020).
- M. Yamamoto, S. Uji, T. Sugiyama, T. Sakamoto S. Kimura, T. Endo, and S. Nishikawa, ERdj3B-mediated quality control maintains anther development at high temperatures. *Plant Physiol.* 182, 1979-1990 (2020).
- T. Endo and H. Sakaue, Multifaceted roles of porin in mitochondrial protein and lipid transport. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 1269-1277 (2019)
- Y. Arais, A. Tsutsumi, J. Qiu, K. Imai, T. Shiota, J. Song, C. Lindau, L.-S. Wenz, H. Sakaue, K. Yunoki, S. Kawano, J. Suzuki, M. Wischniewski, C. Schütze, H. Ariyama, T. Ando, T. Becker, T. Lithgow, N. Wiedemann, N. Pfanner, M. Kikkawa, and T. Endo, Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. *Nature* 575, 395-401 (published online, Oct 10, 2019).
- S. Matsumoto, K. Nakatsukasa, C. Kakuta, Y. Tamura, M. Esaki, and T. Endo, Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. *Mol. Cell* 76, 191-205 (online published, 2019 August 22).
- H. Sakaue and T. Endo, Regulation of the protein entry gate assembly by mitochondrial porin. *Curr. Genet.* 65, 1161-1163 (2019).
- T.K. Sato, S. Kawano, and T. Endo, Role of the membrane potential in mitochondrial protein unfolding and import. *Sci Rep.* 9(1):7637 (2019)
- 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.* 1949:57-67. (2019).
- H. Sakaue, T. Shiota, N. Ishizaka, S. Kawano, Y. Tamura, K.S. Tan, K. Imai, C. Motono, 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.* 73, 1044-1055 (2019).
- 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.* 9(1):1185 (2019)
- 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.* 26(3):518-528.e6 (2019)
- Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo, Organelle contact zones as sites for lipid transfer. *J. Biochem.* 65(2):115-123 (2019)
- 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.* 9(1):1372 (2019)
- 荒磯裕平, 遠藤斗志也, ミトコンドリアタンパク質搬入ゲート TOM 複合体〜クライオ電子顕微鏡による立体構造の解明, *実験医学* 38 増刊「イメージング時代の構造生命科学」 697-700 (2020).
- 阪上春花, 遠藤斗志也, ミトコンドリアタンパク質の膜透過装置, *実験医学* 37 増刊「ミトコンドリアと疾患・老化」 1903-1908 (2019).
- 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, オルガネラコンタクトサイトを介した脂質輸送と代謝, *実験医学* 37 増刊「ミトコンドリアと疾患・老化」 1909-1916 (2019) .
5. 学会発表など(2019.1~2020.3)
- Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis and maintenance: pathways and machineries (招待講演), Protein Biogenesis and Mitochondrial Dynamics, Baiersbronn, Germany, 2019.11.19-21.
- Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis and maintenance: pathways and machineries, Seminar at BMC, University of Munich, University of Munich, Germany, 2019.11.23.
- 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.
- 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(招待講演+ポスター), 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(招待講演), 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(ポスター), 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.
- 西川周一, 鈴木千晴, 河野慎, 渡邊信久, 遠藤斗志也: 極核融合因子シロイヌナズナ Gex1 タンパク質のシステインリッチドメインの構造と機能の解析, 第60回日本植物生理学会年会, 名古屋, 名古屋大学, 2019.3.13-15.
- Toshiya Endo: Pathways and machineries of mitochondrial protein import(招待講演), EMBO Workshop "Current Advances in Protein Translocation across Membranes", Sant Feliu de Guixols, Spain, 2019.3.23-27.
- 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り明らかとなったミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体の構造(口頭+ポスター), 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会ワークショップ「ミトコンドリアの機能理解におけるタンパク質科学からのアプローチ」, 神戸, 2019.6.24-6.26.
- 阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアのポリンは外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリーを制御する(口頭+ポスター), 第

19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア局在型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

新名真夏, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア形態維持における核膜・液胞間連携ゾーンの役割 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

後藤美稀, 遠藤斗志也, 田村康: 出芽酵母におけるミトコンドリア量を制御する因子の同定 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

松本俊介, 中務邦雄, 角田千香, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: Msp1 は, 小胞体-ミトコンドリアコンタクト部位でミスターゲットタンパク質を除去する AAA-ATPase である (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体コンタクトサイトの数を制御する分子メカニズムの解明 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

荒磯裕平, 包明久, 鈴木純子, 吉川雅英, 遠藤斗志也: Structural study of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane complex (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: リン脂質合成・輸送阻害剤のハイスループットスクリーニング (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

植田依里, 田村康, 遠藤斗志也: Mic19 のミリストイル化モチーフによるミトコンドリア局在化機構の解析 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

田代晋也, 名黒功, 遠藤斗志也, 田村康: 哺乳類ミトコンドリア・ER 膜間コンタクト形成に関与する因子の探索 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・

第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

田代晋也, 名黒功, 遠藤斗志也, 田村康: ヒトミトコンドリア・ER 膜間コンタクト形成に関与する因子の探索 (口頭+ポスター), 第 92 回日本生化学会大会, 横浜 (パシフィコ横浜), 2019.9.18-20.

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: リン脂質合成及び輸送阻害剤の探索 (ポスター), 第 92 回日本生化学会大会, 横浜 (パシフィコ横浜), 2019.9.18-20.

荒磯裕平, 包明久, 今井賢一郎, 阪上春花, 塩田拓也, 柚木芳, 鈴木純子, 河野慎, 吉川雅英, 遠藤斗志也: クライオ電子顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリア膜透過装置の構造と機能, 第 57 回生物物理学会年会 シンポジウム「クライオ電子顕微鏡でできること, できないこと〜構造生命科学の最先端」(招待講演), 宮崎 (シーガイアコンベンションセンター), 2019.9.24-26.

Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizuka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: Regulation of the protein entry gate assembly by mitochondrial porin (招待講演), 第 42 回分子生物学会年会 ワークショップ「The Biology of Mitochondria-Cytosol Communications」, 福岡, 2019.12.3-6.

遠藤斗志也: ミトコンドリアって, こんなにおもしろい, 京都産業大学タンパク質動態研究所講演会シリーズ「ようこそ、タンパク質の不思議な世界へ」第 3 回, 京都 (京都産業大学むすびわざ館), 2020.2.22.

## 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-R1 年度 (5 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名: ミトコンドリアトランスロケータ 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-R1 年度 (3 年)

科学研究費補助金・若手研究

課題名: X 線結晶構造解析によるミトコンドリアトランスロケータ SAM 複合体の構造基盤

研究代表者: 竹田弘法, 取得年度: H30-R2 年度 (4 年)

#### 科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名:ミトコンドリア外膜上で起こる分解経路の生理的意義の解明

研究代表者:篠田沙緒里, 取得年度:H31-R2 年度 (3年)

#### 2) 知財権等

#### 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: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

遠藤斗志也:第19回日本蛋白質学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同大会 大会長

#### 4) 受賞等

篠田沙緒里: 第19回日本蛋白質学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同大会 若手最優秀発表賞(日本細胞生物学会大会・EMBO Award)

#### 5) その他 なし

### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

「タンパク質と脂質の交通を基軸とするミトコンドリア合成の分子機構の統合的解明」では、タンパク

質の配送に関わるトランスロケータやその補助因子の精密構造の決定, 精密構造に基づく各因子の機能メカニズムの解明をめざすとともに, これまでほとんど手が付いていなかった脂質の配送と組成維持に関わる因子, 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きた。そのために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, 研究を推進してきた。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, さらにその情報に基づいて *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17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。



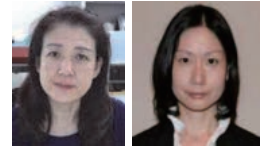
R1年9月 研究室(+関連研究者)のリトリート「オルガネラ研究会」(金沢)

# 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きた。その際、扁桃体を中心とする情動記憶に変調をきたすと、てんかん〜うつ病・不安症を発症する。こうした精神疾患は、相互の共存症が知られていると共に、代謝との関連性も、ヒトで指摘されていた。我々は、てんかんマウスモデルやうつ・不安症モデル（シアル酸転移酵素欠損）マウスを用いることで、これら精神疾患の発症に代謝が影響すると共に、代謝負荷が精神疾患に強く影響することを見つけてきた。こうした代謝との関連性を利用した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応答しない、てんかんを発症しないマウスであることを証明したことによる。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。

令和元年度は、ヒト難治てんかんの 50%を占める側頭葉てんかんのモデルマウス（扁桃体キンリングモデルマウス）と手術後未刺激コントロールマウスの尿を GCMS により解析した。結果、てんかんに関連する 11 種の揮発性有機化合物（VOCs）の特定に成功した。また、VOCs の変化から、てんかん発症に関わる体内代謝および、腸内細菌叢の代謝経路を特定し、てんかん発症を尿で検出する診断法の提案に至った（*Sci. Rep.*, 2019）。

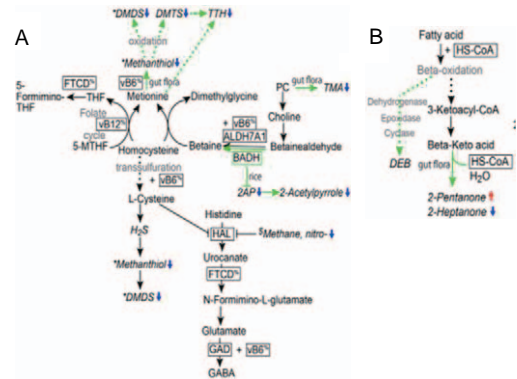


表. てんかんモデルマウスバイオマーカーの代謝経路

### 1-2) うつ・不安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、不安症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 (ST3Gal 4) を欠損したマウスは、てんかん発症を消失した副作用として、うつ、不安障害、睡眠障害を発症するマウスであった。ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) により、うつ、不安症モデルマウス (KO) と同腹子 (WT) の健康なマウスの尿を解析した。その結果、加齢に伴い、うつ、不安症に関連する 4 種の候補揮発性有機化合物 (VOCs) を検出し、標準品の保持時間とイオンピークの比較により、物質の特定に成功した。特定した VOCs 中、trimethylamine, 3-Penten, 2-one, texanol isomer (9) は脂質代謝産物であった。またオス KO マウスは、フェロモン・フェルネセンを尿中に多く排出し、発情前期の ddY メ

スマウスへの接触を避けた。以上のことから、情動行動に連動して揮発性物質が尿中に排出されることがわかった(*PLOS ONE*, 2019)。

## 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ていた。本年度は、尿中の代謝産物との関連性を知るため、血中の一般血液検査と、グリセリド由来の脂肪酸 14 種とアミノ酸 24 種を測定し、関連性を示唆する結果を得た。次年度の原著論文作成につなげる。

## 2. 本年度の研究成果

平成 28 年度以降、代謝負荷に関わる精神疾患の発症に着目し研究を進めてきた。本年度は、てんかんモデルマウスと、うつ・不安症モデルマウスを元に、原著論文 2 報と新聞 4 紙（読売新聞朝刊、夕刊、日刊工業新聞朝刊、京都新聞朝刊）の掲載に至った。

## 3. Research projects and annual reports

We investigate the mechanisms of developing emotional memory in the hippocampus-amygdala connections and the acquisition of neural plasticity in the limbic system. Furthermore, we aim to develop diagnostic methods and therapeutic drugs for the relief of epilepsy, anxiety, and mood disorders based on the clarification of the mechanism.

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

### 1: Clarification of mechanism of epilepsy progression and the comorbidity.

Amygdala-kindling model mice are analogous to secondarily generalized complex partial seizures and a model of temporal lobe epilepsy in humans, showing abnormal neural plasticity. Using kindled mice, we have found two molecules responsible for epileptogenesis, a growth hormone and a sialyltransferase.

First, we found that the expression of growth hormone was up-regulated along neural circuits during the

epileptogenesis. The administration of the hormone into the hippocampus markedly enhanced the progression of kindling. Furthermore, the infusion tests of growth hormone and the receptor antagonist demonstrated that the expression level of *Arc* mRNA was strongly correlated with locomotor activity level and that the correlation was completely discriminable among vehicle-, growth hormone-, and the receptor antagonist-groups. 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 (*Sci.Rep.*,2019) .

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, 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(*PLOS ONE*,2019).

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

Oil-rich diets differentially modulate anxiety and depression in normal and anxious ST3Gal4 deficient mice. In this year, we investigated plasma parameters, such as ALP, triglycerides, total cholesterol, lipoproteins, and total proteins, and fatty acids originated from plasma glycerides and free amino acids in non-fasting blood of ST3Gal4 deficient mice. Mostly we received results, then will make a published paper.

#### 4. 論文, 著書など

1. Fujita, A., Okuno, T., Oda, M., Kato, K. (2020). Urinary volatilome analysis in a mouse model of anxiety and depression PLOS ONE 15(2), e0229269. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229269>
2. Fujita A, Ota M, and Kato K. (2019) Urinary volatile metabolites of amygdala-kindled mice reveal novel biomarkers associated with temporal lobe epilepsy. Scientific Reports, 9:10586, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46373-8>

#### 5. 学会発表など

1. Keiko Kato Neuropsychiatric disorders induced by metabolic loading and sialylation, the 2019 International Symposium in Kangwon National University (KNU) (招待講演) Sep 19, 2019
2. Keiko Kato, Neuropsychiatric disorders induced by metabolic loading and sialylation, 2019. 8. 13韓国(招待講演) Joint International symposium of korean society of life science and interdisciplinary society of genetic & genomic medicine: Life Science & genetic medicine from bench to clinic 2019 Aug 13-14 Busan BEXCO Bldg. 2, 3F.
3. Tangsudjai Siriporn, Fujita Akiko, Ikawa Masahito, Kato Keiko, Distributions of epilepsy/ anxiety responsive, alpha2,3-sialyltransferase ST3Gal IV mRNA and visualization of mCherry in CRISPER/CAS mediated mCherry knock-in at ST3Gal4 locus of mouse (PB-471), 2019.7.26 Neuro2019 朱鷺メッセ, 新潟.
4. 利川 泰博, 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 Alteration of metabolism in temporal lobe epilepsy model mice (PB-475), 2019.7.26 Neuro2019 朱鷺メッセ, 新潟.
5. 加藤 啓子, 太田 真菜美, 藤田 明子, 側頭葉てんかん新規バイオマーカーの提案 Profiling of urinary volatile metabolites in amygdala-kindled mice and finding of novel biomarkers associated with temporal lobe epilepsy (PB-468), 2019.7.27 Neuro2019 朱鷺メッセ, 新潟.
6. 藤田 明子, 奥野 貴也, 織田 美伽, 加藤 啓子, うつ・不安症を示すST3Gal IV欠損マウスにおける尿中揮発性有機化合物の解析 Comparative analysis of urinary volatile organic compounds in Depression / Anxiety model animal ST3Gal IV KO mice, (PB-470), 2019.7.27 Neuro2019 朱鷺メッセ, 新潟.
7. 藤田 明子, 奥野 貴哉, Siriporn Tangsdjai, 織田 弥伽, 伊川 正人, 加藤 啓子 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 平成30年度【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会 (2019-1-30-1-31)

#### 6. その他特記事項

- 1) 科学研究費: 基盤研究(C) 代謝負荷が関わる精神神経疾患の共存症とシアル酸修飾

#### 2) 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; 日本実験動物学会評議員
- 3) 令和元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」主担当 (令和元年 7月 30日 ~ 8月 5日)
  - 4) 新聞掲載: 読売新聞朝刊 2019. 7. 23, 37面, てんかん「尿診断」へ道; 日刊工業新聞朝刊 2019. 7. 23, 29面, 「てんかん」目印発見; 京都新聞朝刊 2019. 7. 26, 27面, てんかん, 尿から判別; 読売新聞夕刊 2019. 8. 17, 6面, てんかん 尿での診断の可能性.
  - 6) ホームページ <http://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/ls/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

藤田氏の赴任最終年度であった。昨年度までの特許3件の論文が達成され, 原著論文2報を作成し, 現在原著論文4報準備中である。当該支援により, 研究が著しく発展し, 企業との共同研究に結びついた。学生の研究活動に大きく貢献した。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。



(2020年3月20日)

# ゲノム生物学研究室

Laboratory of Genomics

## 1. 研究概要

植物の体内には微生物が定着し、そ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い。これまでに多様な植物から微生物が分離されているが、そのうちいくつかは、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も報告されている。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可能性から、多方面で研究が進められてきた。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。そのようなバクテリアの植物への相互作用特性は、微生物系統に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) マメ科植物であるクサネムでは、いくつかの *Bradyrhizobium* 属根粒菌が III 型分泌系を用いて、Nod 因子と無関係に根粒形成し、共生する。この共生に関与する根粒菌の根粒形成因子はよくわかっていない。クサネム根粒菌 *Bradyrhizobium* 株 ORS 3257 の場合、いくつかのエフェクターが共生制御に関与しており、それらの変異体をクサネムに接種すると、様々な共生不能な特性を示す。あるエフェクターでは、その変異が根粒形成を中断させ、エフェクター欠損株を遺伝子相補すると、根粒形成能が復帰する。このエフェクターは *Bradyrhizobium* 属間に広く保存されるもので、「ET-Nod」と名付けられた。ET-Nod は植物細胞内で、核に輸送されて核酸と結合する。そして、クサネム根で発現させると、根粒様の器官形成を活性化する。したがって、III 型分泌系からは、いくつかの役割を持つエフェクターの混合物が植物細胞に送り込まれるが、ET-Nod は宿主植物の遺伝子発現に干渉し、植物の共生プログラムを活性化すると考えられる。
- 2) ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* は III 型分泌系を有することで、一部のダイズ系統の共生不和合性に関与することが知られている。マメ科植物-根粒菌共生にお

教授 金子 貴一

Prof. Takakazu Kaneko, ph.D



ける III 型分泌系を介したパートナー選択機構を明らかにするため、根粒菌に *B. elkanii* USDA 61 株、宿主植物にミヤコグサ実験アクセッションの組み合わせについて共生効果を検討したところ、宿主アクセッションごとに、T3SS に依存した異なる共生効果が誘導されることが示された。ミヤコグサ gifu 系統では、感染が抑制された。burtii 系統には、感染後に根粒成熟阻害が生じた。MG-20 系統では、根粒に早期老化様反応を示した。そこで、エフェクター遺伝子変異体を作成し、接種試験を実施することにより、2つの共生関連因子を同定した。感染阻害を誘発するエフェクターとして NopF、根粒の早期老化様反応を誘発するエフェクターとして NopM である。これらの結果は、ミヤコグサには、共生成立のいくつかのチェックポイントがあり、実験アクセッションごとにその構成は異なることを示している。つまり、ミヤコグサは、複数のチェックポイントにおいて、エフェクターを認識することにより、共生相手として好ましくない根粒菌を排除していると考えられる。

## 3. Research projects and annual reports

Microorganisms colonize the plant body, many of which do not cause harmful damage to the host plant. It has been isolated from a variety of plants. Some have also been reported to enhance host plant growth, disease resistance, and environmental stress resistance. The application of these properties to plants by colonizing microorganisms has been studied in various fields because of its potential usefulness as a material for agricultural production. We have studied the genomes of environmental microorganisms, especially plant-related bacteria, and reported the genetic information and diversity related to their life cycle and symbiosis. The interaction characteristics of such bacteria with plants are often not correlated with microbial lineages and vary among closely related lineages, so the factors are largely unknown. In some cases, uncultured microorganisms account for the majority of such microbial populations according to environmental genome analysis. Based on the information obtained from genome research on plants and symbiotic microorganisms, research on symbiotic systems is being carried out with the aim of clarifying how plants and microorganisms can coexist.

1) In the leguminous plant *Aeschynomene indica*, some *Bradyrhizobium* rhizobia use a type III secretion system to form nodules and symbionts, independent of Nod factors. The nodulation factors of rhizobia involved in this symbiosis are not well understood. In the case of *A. indica* rhizobium strain *Bradyrhizobium* ORS3257, several effectors are involved in symbiotic regulation, and when these mutants are inoculated into *A. indica*, they exhibit a variety of nonsymbiotic properties. In some effectors, the mutation interrupts nodulation and gene complementation of the effector-deficient strain restores nodulation. This effector is widely conserved among *Bradyrhizobia* and is named "ET-Nod". In plant cells, ET-Nod is transported to the nucleus and binds to nucleic acids. When expressed in *A. indica* roots, it activates nodule-like organogenesis. Thus, ET-Nod appears to interfere with host plant gene expression and activate symbiotic programs, whereas a mixture of effectors with several roles is delivered from the type III secretion system to plant cells.

2) *Bradyrhizobium elkanii*, a rhizobium with a relatively wide host range, possesses a functional type III secretion system (T3SS), which involved in symbiotic incompatibility against *Rj4* soybean (*Glycine max*) and some accessions of mung bean (*Vigna radiata*). To expand our knowledge of the T3SS-mediated partner selection mechanism in the symbiotic legume–rhizobia association, we inoculated three *Lotus* experimental accessions with wild-type and T3SS mutant strains of *B. elkanii* USDA61. The results revealed that different responses were induced by the T3SS in a host genotype–dependent manner. *Lotus japonicus* Gifu inhibited infection; *Lotus burtii* accepted infection but produced nodule maturation inhibition at the post infection stage; and both *L. burtii* and *L. japonicus* MG-20 displayed a nodule early senescence–like response. By conducting inoculation tests with gene mutants of previously reported and newly identified effector protein genes of *B. elkanii* USDA61, we identified NopF as the effector protein for triggering the infection inhibition, and NopM as the effector protein for triggering the nodule early senescence–like response, respectively. Consistent with this result, BenopF introduced into *Mesorhizobium japonicum* induced infection inhibition in *L. japonicus* Gifu but did not induce any response in *L. burtii* or *L. japonicus* MG-20. These findings suggest that *Lotus*

accessions possess multiple checkpoints to eliminate unfavorable symbionts, including at the post-infection stage, by recognizing different T3SS effector proteins at each checkpoint.

#### 4. 論文, 著書など

A. Teulet, N. Busset, J. Fardoux, D. Gully, C. Chaintreuil, F. Cartieaux, A. Jauneau, V. Comorge, S. Okazaki, T. Kaneko, F. Gressent, N. Nouwen, J.F. Arrighi, R. Koebnik, P. Mergaert, L. Deslandes, E. Giraud: The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019. **116**, 21758-21768.

S. Kusakabe, N. Higashitani, T. Kaneko, M. Yasuda, H. Miwa, S. Okazaki, K. Saeki, A. Higashitani, S. Sato: *Lotus* Accessions Possess Multiple Checkpoints Triggered by Different Type III Secretion System Effectors of the Wide-Host-Range Symbiont *Bradyrhizobium elkanii* USDA61. *Microbes and Environments*, 2020. **35**, 1-16.

#### 5. 学会発表など

M. Itakura, K. Mitsuya, T. Kaneko, K. Minamisawa: Investigation of genomic diversity and nitrogen fixation capability in indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens* strains, 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis & Nitrogen Fixation, Tohoku University, Sendai, 2019.5.15-17

板倉学、石塚裕樹、木村成介、上ノ山華織、金子貴一:Rorippa aquaticaにおける異形葉性誘導に伴う共生細菌叢の変動、植物微生物研究会第29回研究交流会、サンポートホール高松、高松市、2018.9.18-20

蒲生雄大、板倉学、榊原渉平、大谷真由、瀧井悠斗、匡紹敏、南澤究、金子貴一:ダイズ根粒菌*Bradyrhizobium elkanii*系統で保存されたゲノミックアイランド:GI02の比較解析、植物微生物研究会第29回研究交流会、サンポートホール高松、高松市、2018.9.18-20

板倉学、金子貴一、三屋公佑、南澤究:ダイズ根粒菌*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110系統におけるゲノム構造変化と共生窒素固定能力、第14回日本ゲノム微生物学会年会、ウイングあいち、名古屋市、2020.3.6-8

#### 6. その他特記事項

該当なし

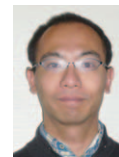


# 細胞死研究室

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)。

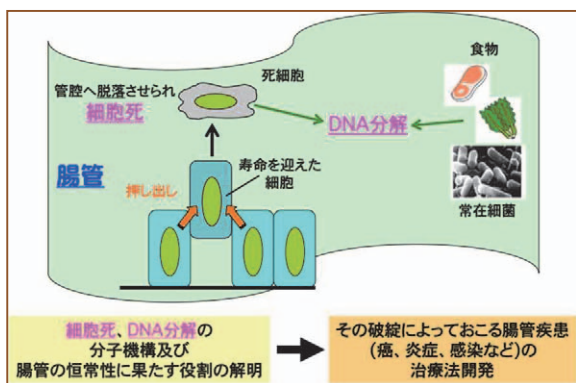


図 1. 腸管での細胞死と DNA 分解

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

私達はこれまでに、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する遺伝子を同定したが、中でも細胞の食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腸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食食されることがわかった。さらにこの断片化と食食は、脱落細胞が組織から突出するタイミングと同時におこることから、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。本年度は、この知見に基づいて研究を進め、断片化、食食の過程の内、断片化の過程が、細胞が組織から離脱する際の駆動力となっていることを示した(図 2)。

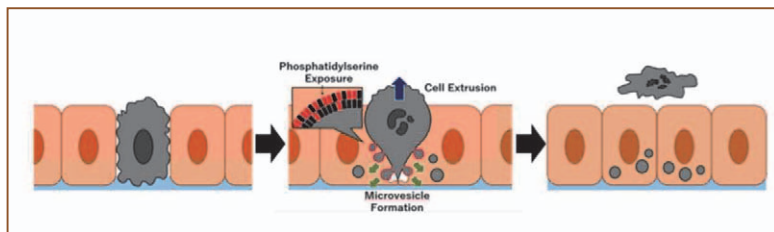


図 2. 脱落細胞における局所的細胞断片化が脱落の実行を駆動する

さらに、この断片化が、リン脂質フォスファチジルセリンの細胞膜外層への露出によって引き起こされる細胞外小胞の形成と放出であることも示した。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、小胞形成という膜動態が脱落の実行を駆動しているとい、細胞脱落の実行過程の新たな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 we 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. Further we showed that the fragmentation process is crucial step of cell extrusion and governed by a mechanism with which extracellular vesicles are formed and released.

### 4. 論文, 著書など

該当なし

### 5. 学会発表など

1. 服部和泉 吉良彰人 村田真智子 西藤圭祐 村木直子 佐藤沙耶 塚本雄太 加藤博己, 川根公樹: 「上皮細胞の細胞終焉様式である「細胞脱落」におけるマイクロベシクル形成」(口頭・ポスター), 第 42 回日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月, 福岡
2. 梶田春奈 服部和泉 中井彩香 村田真智子 木村成介, 川根公樹: 「細胞脱落における細胞接着の動態の解析」(ポスター), 第 42 回日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月, 福岡
3. 吉良彰人, 村田真智子, 勝山大暉, 服部和泉, 佐藤沙耶, 塚本雄太, 加藤博己, 川根公樹: 細胞脱落における脱落細胞の断片化と食食 第 28 回日本 Cell Death 学会学術集会, (口頭・ポスター)(最優秀ポスター賞受賞), 2019
4. Kohki Kawane. Phosphatidylserine exposure promotes efficient cell extrusion via fragmentation of extruding cells

(Keynote lecture), 1st Research Meeting on Cell Dynamics, October, 2019, Kyoto

### 6. その他特記事項

#### 1) 外部資金

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) 期間延長

#### 2) 知財権等 該当なし

#### 3) 学外活動

夢ナビライブ 2018 大阪 (7 月), 夢ナビライブ名古屋 2019 (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



## 集団遺伝学研究室

Laboratory of Population Genetics

准教授 河邊昭

Assoc. Prof. KAWABE, Akira.

研究助教 吉田貴徳

Res. Assoc. YOSHIDA, Takanori.



### 1. 研究概要

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

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

本研究分野では具体的に次の3点について研究を進めている。

#### 1) 動原体領域の進化機構

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

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

#### 2) 転移因子の進化パターンの解析

転移因子は多くの生物でゲノムの大部分を占めるなど染色体の構造を考える上で非常に重要な要素である。転移因子が生存上重要な遺伝子に挿入することで生物に有害な効果をもたらすことも有り、多くの生物で転移因子を不活化する機構が進化している。現在、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ねがれているのかなどについて明らかにしようとしている。

#### 3) エピジェネティックな制御機構の進化に与える影響の解明

エピジェネティックな制御機構により遺伝子発現やクロマチン構造の変化が起こることが知られている。エピジェネティックな制御は配列の違いによらず表現形に差異をもたらすことが可能であるが、クロマチン構造の変化により進化パターンに影響を与えると思われる。様々なエピジェネティック制御機構のうち特にゲノムインプリンティングや外来 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。

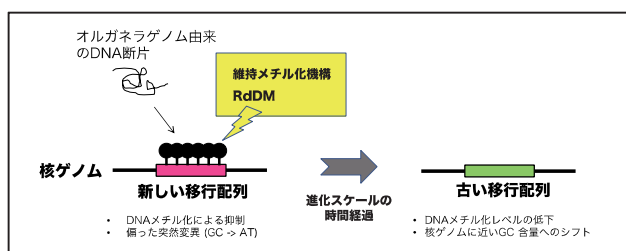


図. 核ゲノムへ挿入された葉緑体ゲノム由来 DNA 断片の進化的挙動の模式図

### 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. Intergenic

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

Takanori Yoshida, Hazuka Y. Furihata, Taiko K. To, Tetsuji Kakutani, and Akira Kawabe\* “Genome defense against integrated organellar DNA fragments from plastids into plant nuclear genomes through DNA methylation.” Scientific Reports, vol. 9, 2060.

Akira Kawabe\*, Hazuka Y. Furihata, Yudai Tsujino, Takahiro Kawanabe, Sota Fujii, and Takanori Yoshida “Divergence of RNA editing among Arabidopsis species.” *Plant Science*, vol. 280, p. 241-247.

## 5. 学会発表など

なし

## 6. その他特記事項

### 1) 学外活動

Genetica: 編集委員

BMC Plant Biology: 編集委員

Plants: 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

研究助教として吉田貴徳が研究教育にあたっている。研究助教の配置により学部学生の実験や解析に関して教員の目が届かない部分をサポートすることが可能になっている。また実験手順の指示や研究結果の確認をより頻繁におこなうことが可能になり、研究の進展や方針の決定などが円滑におこなえている。実習・演習においてもTAと嘱託職員に加えて研究助教が加わることで多くの学生により的確な指示・指導をおこなうことが可能になっている。特に専門がより近い内容の実験において担当教員以外に深い知識を持っている研究助教の存在は受講生にとっていい効果を上げていると考えられる。

研究室ゼミ風景



# 神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

## 1. 研究概要

糖鎖付加反応は、タンパク質の重要な翻訳後修飾反応である。糖鎖の構造はいくつかのタイプに分類されるが、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基との間に形成されるムチン型糖鎖(GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thr)に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。

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、*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。

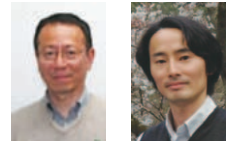
我々これまで、ゼブラフィッシュを用いて網羅的に GalNAc-T アイソザイム遺伝子 (*galnt*) を単離し、解析を行ってきた。ゼブラフィッシュとヒトの GalNAc-T の構成を比較すると全体的には保存性が高いものの、ゼブラフィッシュに固有の特徴がある。まず、ゼブラフィッシュでは 18 種類のアイソザイムが存在するが、*galnt15*, *galnt19* はコードされていない。また、ゼブラフィッシュでは部分的にゲノムの重複があり、*galnt8* で 5 種類、*galnt18* で 2 種類のパラログが存在する。また、*galnt5* については、以前のデータベースでは 10 番目以降のエクソンに逆位があり、コード領域中に終止コドンが認められたことから機能的な酵素遺伝子ではないと考えられたが、最近のデータベースでは逆位はなくなっており、*galnt5* がゼブラフィッシュで機能している可能性が考えられた。本年は、*galnt5* に着目し、*galnt5* cDNA の単離、発現解析、さらにゲノム編集による変異体作製を試みた。

## 2. 本年度の研究成果

我々はまず、ゼブラフィッシュ 初期胚から調製した全 RNA を用いて *galnt5* cDNA を単離し、塩基配列を決定した。ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 は他のアイソザイムより大

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中村直介

Assist. Prof. Naosuke Nakamura Ph. D.

きく、全長 781 アミノ酸残基 (2,343bp) からなる。このアイソザイムもファミリーに特徴的な構造、すなわち N 末端側から、細胞質領域、膜貫通領域、ステム領域、触媒領域、レクチン様ドメインを有していた。GalNAc-T5 のステム領域は他のアイソザイムと比較して特徴的に大きい。ゼブラフィッシュの GalNAc-T1 では 150 アミノ酸残基程度であるのに対し、GalNAc-T5 では 310 アミノ酸残基からなる。ステム領域は棒状の構造をとり、ゴルジ膜から離れた場所に触媒領域を位置付けて反応を進める働きがあるとされるが、これまで単離された GalNAc-T5 のステム領域が長いことの生理的な意味は不明である。我々の哺乳類の GalNAc-T5 を用いた *in vitro* の予備的な実験では、ステム領域を短くした組換え GalNAc-T5 の活性は野生型とほぼ同じである。

次に、胚発生における GalNAc-T5 の発現を定量的 PCR により求めた。*galnt5* の発現は、受精後 12 時間から 24 時間まではほぼ一定で、その後、半分程度までに発現量が低下したが、72 時間胚では約 4.5 倍にまで上昇した。ゼブラフィッシュの消化管の形態形成は、受精後 48~72 時間頃に完了する。*galnt5* の発現は消化管形成の後期において亢進している。また、*galnt5* の組織における発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。図は 72 時間胚における *galnt5* の発現を示した。口顎部に強い発現が見られたことから、*galnt5* が消化管粘性タンパク質の糖鎖付加反応に関わっている可能性が考えられた。また、骨格筋での発現も認められた。ヒトにおいては、GalNAc-T5 タン

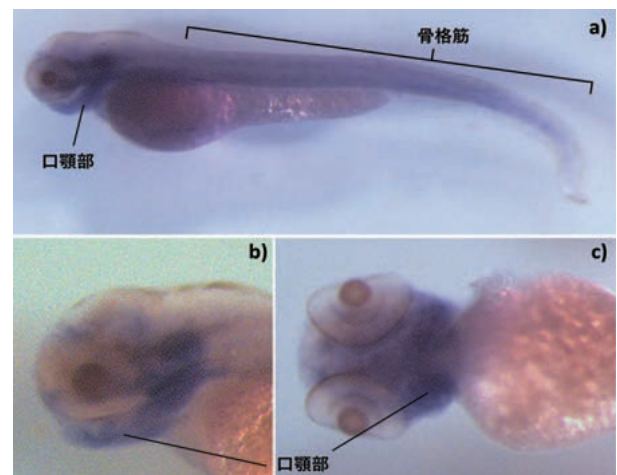


図 72 時間胚における *galnt5* の発現

a) 側面, b) 側面頭部, c) 背面頭部

バク, mRNA は消化管や肺で高いレベルで発現するが, 骨格筋での発現は低いが, マウスでは GalNAc-T5 は骨格筋で発現することから, 生物種によっては本酵素が骨格筋の糖鎖付加に関与する可能性がある.

最後に, *galnt5* の Gal/GalNAc-T モチーフをコードする exon5 を標的として, CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行った. CRISPR/Cas9 をインジェクションした 10 個体のキメラ胚より抽出したゲノム DNA を鋳型として, HMA 法によりゲノム編集の効率を解析した. その結果, すべての個体で, ゲノム編集が行われていることを見出した. 今後, キメラ胚を用いて変異体を作製していく.

### 3. Research projects and annual reports

Proteins synthesized in the cell need to be correctly folded and undergo various post-translational modifications to become functional molecules. The addition of glycans to proteins is one of the important post-translational modifications. Mucin-type glycans, which are one of the most frequently observed glycans, are often found in mucus proteins covering epithelial cells. In addition, many membrane and secretory proteins are modified by these glycans, but their functions are not well understood.

We have been investigating the roles of an O-linked sugar chain with the carbohydrate-protein linkage structure, GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser(Thr), which is called a mucin-type carbohydrate. Its biosynthesis is initiated by a group of enzymes, polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts). GalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in humans.

To elucidate the roles of mucin-type glycans in the development of zebrafish, we have been conducting extensive analyses of GalNAc-transferase functions during early development. we isolated and fully sequenced the *galnt5* gene, a novel member of the GalNAc-transferase isoenzyme, which has not been reported in zebrafish. The *galnt5* expressions in the zebrafish early embryos were analyzed by *in situ* hybridization, and we found that the embryos of 72 hpf expressed *galnt5* in the oral and maxillary regions and the skeletal muscle. We also report the preliminary results of the CRISPR/Cas9 genome editing.

### 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* **165**(3), 205-208.

I. Chandel, R. Baker, N. Nakamura, V. M. Panin, Live imaging and analysis of muscle contractions in *Drosophila* embryo. *Journal of Visualized Experiments* (2019) doi: 10.3791/59404.

C. Jinnipar, M. Carmen, L. Seunghyung, A. Kurosaka, B. Waraporn, Multiple-factor mathematical modeling of glycine-glucose browning, *Journal of Food Engineering* (2020) **273**, 109829.

### 5. 学会発表など

中村直介, 辻本優季, 中山喜明, 小西守周, 黒坂 光: 脳で強く発現するムチン型糖鎖合成酵素を2重に欠失したゼブラフィッシュ変異体の作製. 第38回日本糖質学会年会名, 名古屋市, 2019. 8. 19-21.

中村直介, 辻本優季, 中山喜明, 小西守周, 黒坂 光: ゼブラフィッシュにおける脊椎動物特異的ムチン型糖鎖合成酵素の多重欠失体作製. 第42回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2020. 12. 3-6.

### 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

研究助教は, 所属研究室における基礎特別研究, 応用特別研究などにおいて極めて重要な研究指導を行っている. 指導された学生は, セミナーや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. また研究助教は, 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. 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.

# 動物生理学研究室

Laboratory of Animal Physiology and Neurobiology

## 1. 研究概要

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、また、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、長期間のストレス負荷、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・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。ストレスによる脳神経機能低下あるいは障害については、治療薬の開発を含め、数多くの研究がおこなわれている。その病態も次第に明らかにされつつある。一方、治療薬については、その副作用も問題となることから、より副作用の少ない治療薬開発に向けた基礎的な研究が、依然として、求められている。

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行っている。

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。

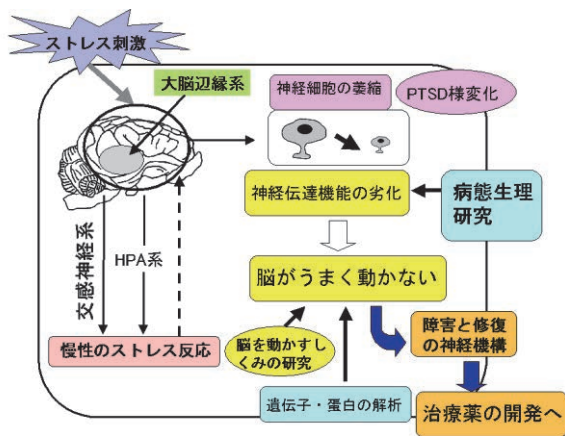


図 1. 本研究の概略

教授 齋藤 敏之

Prof. Toshiyuki Saito, DVM, Ph.D.



## 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、その調節に関与する脳内の神経活動が高まることを意味する。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、脳の活動が亢進する際には脳内の血流分配が変化し、一時的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などの一部領域で低酸素に陥る可能性が示唆された。

### 2) 脳のミクログリア動態

ラットに神経毒作用をもち、PSA-NCAM の分解を誘導するといわれているトリメチルチン投与した。トリメチルチン投与により、脳の海馬で多数の分枝をもつ Iba-1 免疫陽性細胞 (ミクログリア) が認められた他、黒質においても Iba-1 陽性細胞が観察された (図 1)。トリメチルチン投与による黒質内 PSA-NCAM の分解とミクログリア動態との関連性については今後の課題として残されている。

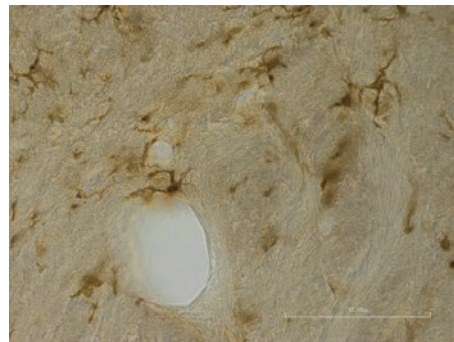


図 1. ラット脳の黒質における Iba-1 免疫陽性細胞 (DAB 発色)。

### 3) 拘束ストレスに伴う腸内細菌叢の変化と脳のミクログリア形態変化



近年、ストレス負荷によって腸内細菌叢の構成が変わること、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、血中コルチコステロン濃度は一過性に顕著に増加した。一方、腸内細菌叢の解析では、反復拘束ストレス負荷により、ラクトバチルス占める割合が若干変化した。ただ、腸内細菌叢の変化と脳内のミクログリアの変化および情動神経系の伝達物質前駆体の動態については、不明のままである。今後、幼若子ブタを用いた新たな動物モデルも視野に入れて、ストレス研究を進めていきたい。

### 3. Research projects and annual reports

#### **Background and purpose of research:**

It is well-known that stressors activate the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system. Exposure to repeated and/or intensive stressors is thought to 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. The microglia is a kind of immune cells in the brain, which is probably involved in neuro-inflammation. Thereby, it might cause malfunction of neurons due to inflammation in the brain. In our study, morphological changes in microglia are focused on, since microglia is monitoring the situation of neuronal cells and can eat the damaged neurons due to cytokines and other endogenous substances released in the brain by stressors.

#### **Research topics:**

- 1) Development of detective techniques of degenerated neurons by stress in the brain,
- 2) Stress-induced changes in oxygenation in the brain and morphological changes of microglia in the anoxic regions,
- 3) How to induce neuro-protective or neuro-damaged microglia in the brain under the stressful conditions.

#### **Annual reports:**

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

We are examining if and/or how systemic administration of a neurotoxic substance, trimethyltin (TMT) or, lipopolysaccharide (LPS) has induce morphological changes in microglia, concomitant with activation of the HPA axis. Using the antibody against Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), the immune-reactive Iba-1 positive cells (microglia) were found in the limbic system and other brain regions by administration of TMT or LPS. Furthermore, we are analyzing the relationship between degeneration of neurons and morphological changes of microglia around neurons to neuroprotective or neuro-damaged phenotype. In the brain from the repeated restraints for the short period (2 hours per day), there were the Iba-1 immuno-positive cells with few branches than those in the LPS-injected animals. Furthermore, we are now investigating localization of microglia specific makers for the neuroprotective or neuro-damaged phenotypes among microglia.

On the other hand, we are studying changes in composition of the intestinal flora from the feces. One possibility has been suggested the *Lactobacillaceae* bacterium may be affected by the repeated restraint stress to the animal.

##### **2) Use of pig for the translational brain research-another animal model for studying the brain disorders in human infants**

Pig is known to be sensitive to stressful stimuli. From the viewpoint of the 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 なし

#### 5. 学会発表など

(学会発表)

Saito, T., Tsuzuki, Y., Kajiwara C., Shibutani M., Yokoyama, K.  
Influence of repeated restraint stress in the brain microglia and gut microbiota in the rat. 第 97 回日本生理学会大会, 別府国際コンベンションセンター, 2020. 3. 17-19.

石下 洋平, 庭山 雅嗣, 齋藤 敏之, 大貫 良幸, 内山 拓, 横田 英典, 渡辺 英寿, 川合 謙介. ミニブタ皮質脳波測定による軟膜下皮質多切術の安全性の検討. 第 53 回日本てんかん学会学術集会, 神戸国際会議場, 2019.10.31-11.02.

石下 洋平, 庭山 雅嗣, 齋藤 敏之, 大貫 良幸, 内山 拓, 横田 英典, 渡辺 英寿, 川合 謙介. ミニブタを用いた ECoG と NIRS の同時測定用電極の開発. 第 78 回日本脳神経外科学会総会, 大阪国際会議場, 2019. 10.09-12.

齋藤 敏之, 都築由衣, 梶原千紗子, 横山久留実, 澁谷みのり. ラットの腸内細菌叢と脳のミクログリアに及ぼす拘束ストレスの影響. 第 162 回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場, 2019.09.10-12.

Saito, T., Nakajima W., Ishida N., Imori, T. Microglial activation caused by lipopolysaccharide and trimethyltin administration in the rat brain. The 9<sup>th</sup> FAOPS congress and the 96<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Kobe Convention Center, March 28-31, 2019.

#### 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: 京都府農林水産技術センター評議員

齋藤 敏之: 令和元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) 動物生命医科学科・学科主任



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されている。胎児期において、内臓器官も初めは左右対称にできるが、左右非対称な遺伝子発現によって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詳細に観察する。さらに、KO マウスや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 *LRI* 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酵素 *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分子 *LRI* 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分子 *LRI* の変異マウスの表現型を解析した。*LRI* 変異マウスが左右非対称性の異常を示した一方で、ホモ変異体の一部は胚性致死となった。胚性致死となる発生時期を特定するために、発生を遡って胚の形態を観察して遺伝子型を調べた。その結果、胎生 8 日目ではホモ変異体がメンデル比より有意に少なかった。胎生 7 日目では、ほぼ正常なメンデル比に沿った遺伝子型の分離比を示したが、明らかな形態異常が観察された。

胎生 6 日目では異常胚は見られず、*LRI* が胎生 7 日目以前にはたらいっていることが示唆された。

*LRI* は弾性繊維の構成成分としてはたらくと報告されている。*LRI* の胚発生における役割を解明するために、*LRI* が左右非対称に発現する 8 日胚における弾性繊維の観察を試みた。その結果、弾性繊維の主要構成成分の一つであるフィブリリンは、*LRI* が左右非対称に発現している側板中胚葉には存在せず、*LRI* の新規の役割が示唆された。

#### 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。昨年に引き続き、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、腎動脈は胎生 11.75 日目ではまだ形成されておらず、その後、胎生 12.0 日目までに形成され、腎動脈の左右非対称性は胎生 12.5 日目～12.75 日目に確立することが分かった。胎生 12.25 日目では、腎動脈の左右差は非常に小さく、個体によっては腎動脈が左右対称に位置していた。腎動脈の形成過程には個体差があり、今後は複数の系統で腎動脈の形成過程を観察することで普遍性を確認していきたい。

マウスにおいて、肝臓は 5 つの葉から成る左右非対称な分葉構造をとっている。本年度は、マウスにおける肝臓の初期形成過程を詳細に観察した。胎生 9.25 日目には、肝臓原基が左右非対称になっていた。その後、胎生 10.5 日目では明らかに 4 葉に分葉し、尾状葉は以前に観察されたよりも早期である胎生 10.75 日目に外側右葉から新規に分葉することが確認された。さらに、胎生 9.5 日目および胎生 9.75 日目の肝臓原基を切片で観察した結果、肝芽細胞の配置が左右で異なっていることが分かった。このように、マウスの肝臓原基は分葉する前の初期の段階ですでに左右非対称性を獲得していることが明らかになった。

#### 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、脳神経系と毛周期の異常の解析を行った。

*Pycr2* KO マウスと神経細胞特異的 *Pycr2* 変異マウスは、同様の神経症状を示した。異常を定量化するために、3 種類の評価試験 (Hind-limb clasping test、Ledge test、

Kyphosis)を毎週 1 回 20 週以上続け、加齢に伴って異常が重篤化すること、神経特異的 *Pycr2* KO マウスの発症は *Pycr2* KO マウスに比べてやや遅れることを明らかにした。*Pycr2-LacZ* Knock-in マウスを用いて脳における *Pycr2* の発現様式を確認した結果、*Pycr2* は大脳皮質の第 II 層や海馬のアンモン角、小脳などの神経細胞が多く集まっている領域で強く発現していることが分かった。これらの組織に注目して切片を観察した結果、*Pycr2* KO マウスと神経特異的 *Pycr2* KO マウスの小脳のプルキンエ細胞に異常があることを発見した。

また、*Pycr2* KO マウスにおいて、グリシン量が増加していることやセリンからグリシンへの変換を触媒する *Shmt2* の発現量が増加していることから、①セリン・グリシン非含有飼料で *Pycr2* KO マウスを飼育することや② *Pycr2/Shmt2* 二重変異マウスを作製することによって、神経症状が改善するかどうか検証した。結果的にどちらの方法でも症状を改善できなかったが、セリン・グリシン非含有飼料で飼育したマウスの脳内の各遊離アミノ酸を定量し、その原因について考察した。

*Pycr2* は、毛周期を制御している毛乳頭で発現している。*Pycr2* KO マウスの毛周期を調べたところ、生後 20 週齢くらいから野生型に比べて毛周期が遅延することが分かった。また、*Pycr2* KO マウスでは毛乳頭で発現している分子の発現量が異常になっていることが示唆された。

### 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 through asymmetric gene expression. 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 the morphogenesis of each organ in detail, focusing on the differences between left and right in cell migration, cell proliferation, cell shape and cell death, and analyze the role and transcriptional mechanism of the genes that are asymmetrically expressed, using several mutant and transgenic mice.

We also analyze the role of an amino acid metabolizing enzyme, *Pycr2*. The *Pycr2* KO mice showed a premature aging-like phenotype. We want to know the mechanism for premature aging by abnormal amino acid metabolism.

1) *LRI* KO mouse.

*LR1* is an extracellular matrix protein and is L-R asymmetrically expressed in the mouse embryo. The KO mice had shown L-R defects, while some of the homozygotes had been embryonic lethal. We analyzed earlier stage embryos and revealed that *LR1* functions for embryo development before embryonic day 7 (E7).

It had been reported that *LR1* is a component in elastic fiber. We tried elastic stain in E8 mouse embryos. As a result, fibrillin, which is one of the major components of elastic fiber, was not present in the lateral plate mesoderm where *LR1* is asymmetrically expressed, suggesting a novel role for *LR1*.

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

We also analyzed the mechanism of L-R asymmetric morphogenesis in the kidney and liver. In the mouse, the kidney is situated more caudally on the left side than the right. We had known that the renal arteries are initially set L-R asymmetrically, and then the kidney and the renal veins are subsequently arranged. This year we observed the midgestation mouse embryos and found out that the renal arteries are not formed before E11.75, and then is initiated by E12.0. The asymmetric location of the renal artery is established at E12.5~12.75. In E12.25 embryo, the difference between the left and right renal arteries is very small, and in some individuals the renal arteries are located symmetrically.

The mouse liver is asymmetrically lobulated. We observed the morphogenetic process in the liver. The liver primordium showed L-R asymmetry at E9.25 and was divided into 4 lobes at E10.5. The caudal lobe of the liver was budded from the right lateral lobe at E10.75. By histological observation of the embryo sections, it was shown that the hepatoblasts are L-R asymmetrically situated at E9.5~E9.75.

3) *Pycr2* KO mouse.

*Pycr2* is an enzyme for proline biosynthesis. We analyzed the defects in the brain and nervous system, and the hair cycle of the *Pycr2* mutant mice. The *Pycr2* KO mice and the neural cell-specific *Pycr2* mutant mice showed neurological symptoms. For quantification of abnormalities, we recorded three measures, hind-limb

clasping, ledge test and kyphosis. It was revealed that the symptoms become serious with aging. It was also found out that *Pycr2* is strongly expressed in layer II of the cerebral cortex, Ammon's horn of the hippocampus, the cerebellum, and other neuron-rich regions. By observing the histological sections of these tissues, we found out that Purkinje cells in the cerebellum are abnormal in the *Pycr2* KO mice and the neural cell-specific *Pycr2* mutant mice.

Moreover, in the *Pycr2* KO mice, since glycine level rose and the expression level of *Shmt2*, which catalyzes the conversion of serine to glycine, was increased, we verified whether neurological abnormalities were rescued by (1) breeding *Pycr2* KO mice on a serine/glycine-free diet or (2) generating *Pycr2/Shmt2* double mutant mice. As a result, the symptoms could not be improved by either method, but each free amino acid in the brain of the *Pycr2* KO mice fed with the serine/glycine-free diet was quantified, and the cause thereof was discussed.

*Pycr2* is expressed at hair follicle dermal papilla cells that regulate the hair cycle in mouse skin. We revealed that the hair cycle was delayed in the *Pycr2* KO mice after 20 weeks of age. It was also suggested that the gene expression level at the hair papilla is abnormal in the *Pycr2* KO mice.

#### 4. 論文, 著書など

Escande-Beillard N, Loh A, Saleem SN, Kanata K, [Hashimoto Y](#), Altunoglu U, Metoska A, Grandjean J, Ng FM, Pomp O, Baburajendran N, Wong J, Hill J, Beillard E, Cozzone P, Zaki M, Kayserili H, Hamada H, [Shiratori H](#), Reversade B. Loss of PYCR2 Causes Neurodegeneration by Increasing Cerebral Glycine Levels via SHMT2. *Neuron*. in press.

#### 5. 学会発表など

[橋本 唯](#), Beillard Nathalie, Reversade Bruno, [白鳥 秀卓](#): *Pycr2* KO マウスにおける脳神経系の異常の解析. 第42回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2020.12.6

#### 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:内臓器官が左右非対称に形態変化する機構

実験動物1級技術者資格取得のための実技練習を担当。8名が認定試験に合格した。



# 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.



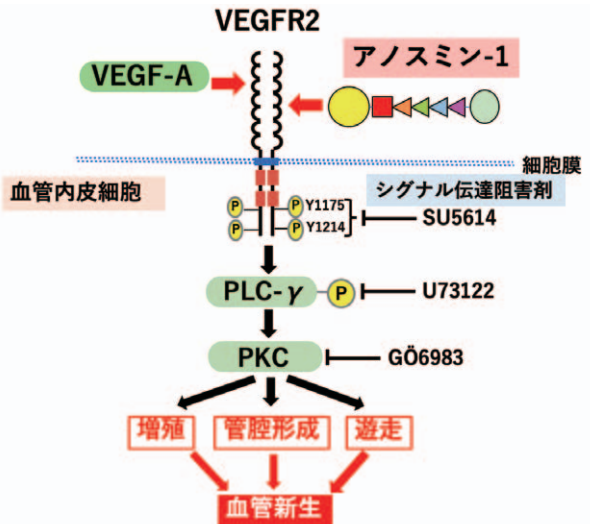
## 1. 研究概要

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標的として、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。これらの研究テーマは、がんの新薬(分子標的薬)の開発と再生医療に役立つ基礎研究となります。

## 2. 本年度の研究成果

1) 神経軸索ガイダンス分子アノスミンの中樞神経系における血管新生作用のメカニズムの解明

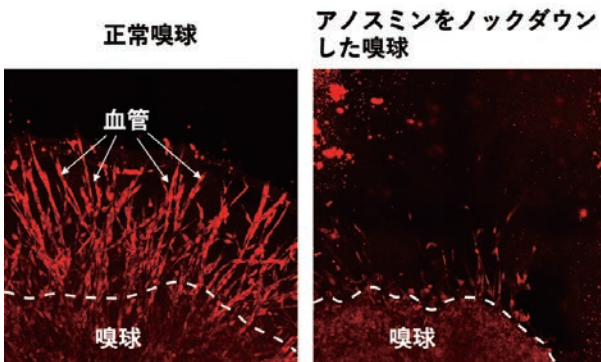
神経軸索ガイダンス分子アノスミンが、神経細胞に作用するだけでなく、血管内皮細胞にも直接作用して、脳内の血管の形成を促進することを明らかにした。本研究によってアノスミンの遺伝子異常によりアノスミンタンパク質の血管に対する作用が障害されることで、嗅球の形成不全が起こり、中枢性性線機能低下症カルマン症候群(KS)を発症する可能性を世界で初めて示した。トリ胚の嗅球を取り出して組織培養すると、アノスミンの作用によって嗅球から新しい血管が伸張したが(図下左)、siRNAによってアノスミンの発現を抑えると嗅球からの血管新生は抑制された(図下右)。研究チームはさらに、アノスミンが血管内皮細胞の表面に存在する受容体タンパク質(VEGFR2)に直接相互作用することで、細胞内のシグナル伝達経路(PLC $\gamma$ 、PKC)を活性化し、新しい血管形成を促進していることを示した(図右上)。本研究の成果は、将来、脳神経系における血管形成の促進に役立てることができる可能性があり、KS や中枢神経系の血管形



成不全が原因となる病気の治療に役立てることが期待される。

2) 線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)の異常発現とがん細胞の悪性化メカニズムの解明

大腸がん患者の腫瘍組織において線維芽細胞増殖因子受容体 3( FGFR3) の発現上昇により、がんの悪性化を促進することが報告されている。また、標準治療薬である細胞障害性抗がん剤フルオロウラシル(5-Fu)を用いた治療の長期化とともに腫瘍の薬耐性の獲得が問題になっており、薬剤耐性の獲得に線維芽細胞増殖因子(FGF)とその受容体(FGFR3)の発現上昇が関連していることが報告されている。私たちの研究室では大腸がん細胞株 Caco2 を FGFR3 に対する siRNA を処置することにより、FGFR3 の発現をノックダウンした siFGFR3 群、siRNA 処置後にレンチウイルスにより FGFR3 を過剰発現させた FGFR3 発現群を用いて Invasion Assay により浸潤能および MTT Assay により 5-Fu に対する抗がん剤耐性獲得に及ぼす FGFR3 発現の影響について検討した。Invasion Assay において、Control siRNA を処置した siC 群と比べて、siFGFR3 処置群の浸潤能は低下しており、FGFR3 発現群においては浸潤能の低下が回復したことから、FGFR3 の発現は、Caco2 の浸潤能を亢進することがわかった。MTT Assay において、siC 処置群の 5-Fu に対する IC50 値は 864.1 $\mu$ M であり、siFGFR3 処置群の IC50 値は 27.7 $\mu$ M だった



ことから、FGFR3 発現をノックダウンすることにより、5-Fu に対する抗がん作用が約 30 倍高くなった。さらに、FGFR3 発現群の IC50 値は、1000  $\mu$  M 以上だったことから、FGFR3 の発現は、5-Fu の抗がん剤耐性の獲得に働くことが示された。また、FGFR3 の細胞内シグナルについて検討した結果、RAS/MAPK 経路、PLC- $\gamma$ 1 経路、PI3K-Akt 経路のそれぞれで、FGFR3 発現による活性化がみられた。以上の結果から、大腸がん細胞における FGFR3 の発現は、浸潤能を亢進し抗がん剤の耐性獲得により、がん悪性化を促進することが示された。また、これらの作用は FGFR3 発現による下流シグナルの活性化の関与が示唆されたことから、FGFR3 は大腸がん治療薬の標的分子として有望であると考えられる。

3) 血管内皮増殖因子(VEGF)とニューロピリン(NRP)を介したがん細胞の増殖と転移メカニズムの解明

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。VEGF-A は、選択的スプライシングにより多数のアイソフォームが産生される。中でも、VEGF165 は血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を促進し、血管新生の中心的役割を果たす。VEGF 受容体は、チロシンキナーゼドメインを持つ VEGFR2 と、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 VEGF の発現が高くなり VEGFR2 の発現は低いか殆ど検出できないが、NRP1 の発現は悪性化が進むにつれて高くなる。また、VEGF と 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、非チロシンキナーゼ型受容体 NRP1 のがん細胞における細胞内シグナルタンパク質 GIPC1, Syx, RhoA を阻害することによって、前立腺がん細胞 PC3M とグリオブラストーマ U87MG の増殖と浸潤を阻害することを示した。

### 3. Research projects and annual reports

**Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis.** Anosmin-1 is a secreted glycoprotein encoded by the ANOS1 gene, and the loss of function causes Kallmann syndrome (KS), which is characterized by anosmia and hypogonadism due to olfactory bulb (OB) dysfunction. However, the physiological function of anosmin-1 remains to be elucidated. In KS, disordered angiogenesis is observed in OB, resulting in its hypoplasia. In this study, we examined the involvement of anosmin-1 in angiogenic processes. Anosmin-1 was detected on the vessel-like

structure in OB of chick embryos, and promoted the outgrowth of vascular sprouts in the OB tissue culture assay. Cell migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells were induced by treatment with anosmin-1 as well as vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, and further enhanced by treatment with both of them. We newly identified that anosmin-1 activated VEGF receptor-2 (VEGFR2) by directly binding to it, and its downstream signaling molecules, phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) and protein kinase C (PKC). These results suggest that anosmin-1 plays a key role in the angiogenesis of developing OB through the VEGFR2-PLC $\gamma$ 1-PKC axis by enhancing the VEGF function.

### 4. 論文, 著書など

Matsushima S, Shimizu A, Kondo M, Asano H, Ueno N, Nakayama H, Sato N, Komeno M, Ogita H, Kurokawa-Seo M. Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis. *Sci Rep.*, (2020) 10(1):188. doi: 10.1038/s41598-019-57040-3.

### 5. 学会発表など

M. Kurokawa-Seo, S. Matsushima, A. Shimizu, M. Kondo, H. Asano, N. Ueno, H. Nakayama, N. Sato, H. Ogita. Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis. 2019 **Gordon Research Conference & Gordon Research Seminar, Angiogenesis**, Salve Regina Univ. Newport, RI, U.S.A. 2019.8.5 (ポスター発表)

M. Kurokawa-Seo, VEGF-A/NRP1 signaling in cancer cells.

- Cell-penetrating peptides inhibit cancer cells signaling in vitro -. **Invited lecture by Professor Marsha A. Moses**, Harvard Medical School, Vascular Biology Program, Boston Children's Hospital, Dept. of Surgery, Karp Family Research Laboratories Boston, U.S.A. 2019.8.15 (口頭発表)

K. Fukumitsu, H. Yonekura, N. Ota, N. Ueno, S. Ueda, S. Nakanishi, A. Yamaguchi, M. Seo. Enhanced FGFR3IIIc expression is correlated with poor prognosis in human

esophageal cancer patients and induces acquired resistance to cancer drugs. 第 92 回日本生化学会大会、横浜市、2019.9.20

(口頭発表、ポスター発表)

瀬尾美鈴, 上田修吾. FGFR3IIIcアイソフォームの高発現は食道がん患者の予後不良と相関する。第78回日本癌学会学術総会、京都市、2019.9.26 (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庶務幹事、京都府発明等功労者表彰審査委員、日本生化学会誌企画委員、同左ことば査読委員

### 5) 受賞等 なし

### 6) その他

瀬尾美鈴: 日経ウーマノミクス・プロジェクト「女性研究者キャリアカフェ in 京都産業大学」のモデレーターを務めた。

京都産業大学, 2019.6.5

瀬尾美鈴: 日経ウーマノミクス・フォーラム「2019 シンポジウム、Be Ambitious! 夢に向かって決意の瞬間」生命科学研究科修士 2 年生 藤川咲さんのプレゼンテーション指導と京都産業大学理系3学部展示紹介。大阪市, 2019.7.17

瀬尾美鈴: 第 92 回日本生化学会大会、男女共同参画推進ランチョンワークショップ「日本の科学を考えるー新たな男女共同参画を求めて」渡辺美代子氏講演 (JST 副理事, ダイバーシティ推進室長) の企画、司会を担当。横浜市, 2019.9.20

瀬尾美鈴: 京都府発明等功労者表彰審査委員として、第 63 回京都府発明等功労者の審査を行った。京都市, 2019.3.14

国費留学生(外国人特別生)受け入れ: 2019.10.1-2020.3.31

Mr. Hasan Md. Murad, Dept of Microbiology, Noakhali Science and Technology Univ., Noakhali, Bangladesh



(上) 春学期研究発表会 2019.7.27

(下) 焼肉パーティ 2019.10.19



## 感染症学研究室

Laboratory of Infectious Disease

### 1. 研究概要

現在、世界中で鳥インフルエンザウイルスなどの新興・再興感染症の発生が多数報告されており、人を含む動物に被害をもたらしている。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。

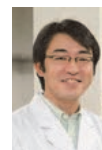
H9N2 亜型インフルエンザウイルスはマウスに対してほとんど感染性を示さない。しかし、ベトナムの野鳥から近年分離された H9N2 亜型ウイルスはマウスへの感染性を示し、マウスによる継代により高い病原性を獲得することが明らかとなった。ウイルスの遺伝子解析により、PB2 タンパク質の 627 以外の変異が、病原性に関与することが強く示唆された。

### 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

教授 高桑 弘樹

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



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 strongly suggested that mutations other than 627 in the PB2 protein are important for the increased pathogenicity in mammalian host.

### 4. 論文, 著書など

Fujimoto Y, Hikita SI, Takeda K, Ozaki K, Inoue H, Takakuwa H, Sonoda KH, Ono E. "Evaluation of the antiviral potential of the soluble forms of glycoprotein D receptors on ocular herpes caused by HSV-1 and HSV-2 infections in a transgenic mouse model", *Journal of Medical Virology* (2019) **91**, 820-828.

## 5. 学会発表など

なし

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

感染症研究国際展開戦略プログラム

課題名：ベトナムにおける感染症制御研究・開発プロジェクト

研究代表者：森田公一，取得年度：H27-31年（5年）

### 2) 知財権等

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

高桑弘樹：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

### 4) 受賞等 なし

### 5) その他 なし

# 動物分子生態学研究室

Laboratory of Animal Molecular Ecology

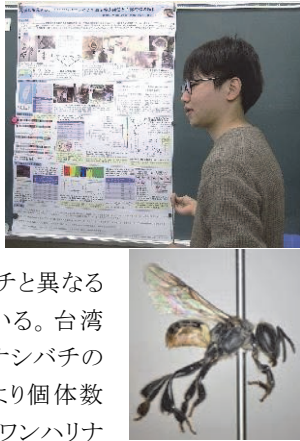
## 1. 研究概要

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

### 台湾ハリナシバチにおける高い遺伝的多様度と一妻多夫の血縁構造について(井上 諒)

ハリナシバチ(ハリナシバチ亜科)は、真社会性ハナバチ類の中で種多様性が高いグループである。働きバチは毒針を持たないため刺すことはなく、また多女王制コロニーや分蜂様式など、ミツバチやマルハナバチと異なる生態を持つことが知られている。台湾は、アジア地域におけるハリナシバチの北限であるが、森林伐採により個体数が減少している。そこで、台湾ハリナシバチ(*Lepidotrigona ventralis hoozana*)の保全に必要な繁殖構造や遺伝的多様性の情報を明らかにするために、ミトコンドリア DNA およびマイクロサテライト DNA マーカーによる解析を行った。その結果、本種には隠蔽種(外部形態により区別ができないが、生殖が隔離されている種)が存在する可能性が示唆された。さらに、NGS のデータからマイクロサテライト DNA マーカーを開発し、働きバチの遺伝子型から巣の血縁構造を推定したところ、単女王制の一妻多夫(複婚)の社会システムであることが明らかとなった。



### オオミツバチ亜属の分子系統と個体群遺伝構造の解析(今井 静香)

オオミツバチ亜属は、ミツバチ属の中で個体およびコロニーが大型化するミツバチの総称である。ヒマラヤ山脈一帯の高地に分布する系統は、先行研究で独立種のヒマラヤオオミツバチ(*A. laboriosa*)とすることが提案されている。

准教授 高橋 純一

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

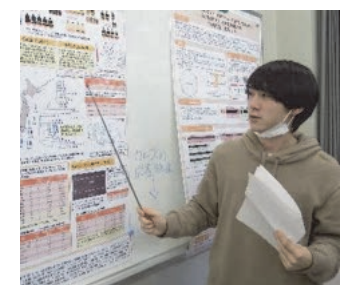


しかし本種は気候変動による植生の変化や乱獲等により、半世紀の間で営巣数が半減し、絶滅が危惧されている。そこで本研究では、ヒマラヤオオミツバチの種レベルの独立性および保全を目的に、ミトコンドリア全長配列を決定し、分子系統解析から遺伝的変異やヒマラヤオオミツバチの独立性について検証をした。分子系統解析の結果、東アジア・島嶼部グループ、ヒマラヤオオミツバチのグループ、インド・スリランカのグループ、ルソン島の4つのクレードに分かれた。ハプロタイプネットワーク解析でも、ヒマラヤオオミツバチとオオミツバチは異なるハプログループを形成した。ヒマラヤオオミツバチの遺伝距離は、他のクレードとは種内変異を超える差が確認された。ヒマラヤオオミツバチを独立種として扱うことが妥当であることを分子データにより初めて示すことができた。



### ツシマコマルハナバチの体色変異と個体群の遺伝的分化について(溝端 丞之助)

コマルハナバチ(*Bombus ardens*)は、北海道から九州(屋久島が南限)に分布し、対馬島、佐渡島などの多くの島嶼にも生息している。本種のメスの体色は通常黒色が基本であるが、特に対馬島に生息するメス個体は淡黄色の変異型であることが知られている。このような体色変異は、国内外も含めて対馬島以外では確認されていない。本研究では、対馬島を含む日本の28地域に分布するコマルハナバチを対象に、ミトコンドリア DNA の COI 遺伝子領域と、開発したマイクロサテライト DNA マーカーを使用したジェノタイプング解析から亜種分類に利用されている体色変異と遺伝的分化



の関係について検証を行った。対馬島個体群は、ハプロタイプ多様度および塩基多様度は他地域よりも低かった。また、マイクロサテライト DNA マーカーによる解析では、対馬個体群は独自のクレードに分かれること、遺伝的多様度が低いことがわかった。集団構造の階層分散分析 (AMOVA) 解析による遺伝的変異量は、個体群内 48%、個体群間 52% となり、遺伝的分化  $F_{st}$  は、対馬個体群は 76% 以上の個体群と、全体では 61% 以上の個体群間で有意な遺伝的分化が確認された。一方で、個体群間における体色変異と遺伝的距離の間に関連性は見られなかった。対馬個体群は、最終氷期後に日本列島の個体群から遺伝的に隔離され、個体群サイズの低下後に起きた色彩変異が固定された可能性が高いことが予測された。

### フィリピンに生息するミツバチの生物系統地理学的研究 (吉田 達哉)

フィリピンは、周囲にフィリピン海、南シナ海、セレベス海に囲まれ、ルソン島・ビサヤ諸島・ミンダナオ島・パラワン島などを中心に約 7,100 を越える島々から成り立ち、複雑で特異な生物相を形成している。



固有種数は、アジアで最も多く、生物多様性の高い地域である。しかし、ミツバチも含めて調査が不十分な分類群も多く、フィリピン諸島に生息する種については、分類学的位置が未確定である。



本研究では、フィリピン諸島 (ルソン島、ボホール島、セブ島、パラワン島) と、アジア各地に分布するトウヨウミツバチグループのミトコンドリア DNA の全長配列を次世代シーケンス解析により構築した。次に、これら 4 地域と、その近隣個体群である台湾、インドネシア (ジャワ島・バリ島)、マレーシア (ボルネオ島) のトウヨウミツバチ (*Apis cerana*) 個体群において、約 100 個体のミトコンドリア DNA の COXI 遺伝子の部分塩基配列を解読した。これらの結果をもとにフィリピンのトウヨウミツバチグループについて生物系統地理学的手法による種同定と個体群の成立過程について考察を行った。分子系統解析から、パラワン島の個体群は、ボルネオ島のトウヨウミツバチ個体群に由来することがわかった。ルソン島、セブ島、ボホール島の個体群は、トウヨウミツバチの祖先種クロオビミツバチ (*A. nigrocincta*) と姉妹群となり、ミンダナオ島・スラウェシ島の個体群と共通起源に由来することが分かった。遺伝的距離および系統解析から、セブ島、ボホール島の

個体群は、クロオビミツバチに分類される可能性が高いと思われる。一方、ルソン島の個体群は、他個体群との遺伝的分化が大きく、今後独立種として検証する必要性がある。ルソン島は、約 200 万年前に起きたフィリピン海プレートの沈降により、最終氷期においても他の島との地理的隔離が存在していた可能性が高いと考えられており、今回のミツバチの分布パターンもこの結果を支持することが示された。

### 3. Research projects and annual reports

#### *Reproductive interference by alien hornet Vespa velutina threatens the native populations of Vespa simillima in Japan*

The yellow-legged hornet *Vespa velutina* has become one of the major alien species in European and East Asian countries. As in its homeland, the invading *V. velutina* is reported as the major predator of honeybees and is becoming a threat to beekeeping in Europe. However, it remains unknown how *V. velutina* might affect native hornets when it invades Asia, where a large number of *Vespa* species are distributed. Thus, by analyzing the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene, we investigated whether interspecific mating occurs between *V. velutina* and Japanese native *Vespa* spp. Our results showed that the alien *V. velutina* causes reproductive interference in Japanese native hornet *Vespa simillima*. Forty-three percent of native *V. simillima* queens had the sperm of *V. velutina* males, and among the all *V. simillima* queens analyzed, 28% only had *V. velutina* sperm. We did not find evidence of *V. velutina* queens having the sperm of *V. simillima* males. These findings suggest that reproductive interference by *V. velutina* males poses a threat to the native *V. simillima* populations. A decline of *V. simillima* may also negatively affect other insects that interact with *V. simillima*.

### 4. 論文、著書など

1. Wilson T, Takahashi J, Kim I, Spichiger SE. First reports of *Vespa mandarinia* (Hymenoptera: Vespidae) in Washington State, USA and Nanaimo, Canada represent two separate introduction events. *Annals of Entomological Society of America*. inpress.
2. Inamoto T, Mizobata J(B4), Mantani Y, Yokoyama T, Hoshi N, Kitagawa H, Takahashi J. New method of injecting solution into the abdomen to overcome fixation delay of the midgut on making

- the histological specimens of honeybee worker.. inpress. DOI:10.1007/s13355-020-00688-5 *Applied Entomology and Zoology*
3. Chikano M(M2), Takahashi J. Complete mitochondrial DNA sequence of the yeast *Zygosaccharomyces siamensis* (Saccharomycetes: Saccharomycetales) from fermented honey of the *Apis cerana japonica* in Japan. *Mitochondrial DNA Part B*. inpress. /DOI:10.1080/23802359.2020.1785961
  4. Ilyasov RA, Lee MI, Takahashi J, Kwon HK, Nikolenko AG. 2020. Review A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. inpress. DOI:10.1016/j.sjbs.2020.08.001
  5. Harada R(B4), Yoshioka M(B4), Okuyama H, Kato M, Martin SJ, Takahashi J. 2020. Complete mitochondrial DNA sequence of the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Mitochondrial DNA Part B*. inpress. DOI:10.1080/23802359.2019.1711219
  6. 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*. 58:591-596. DOI: 10.1080/00218839.2019.1614735
  7. Okuyama H, Kiyoshi T, Tsubaki H, Takahashi J. 2019. A comparison of complete mitochondrial DNA sequences of *Mnais costalis* Selys, 1869 (Odonata: Calopterygidae) from three different populations (one allopatric and two sympatric). *Mitochondrial DNA Part B*. 4:3104-3105. DOI: 10.1080/23802359.2019.1667888
  8. Okuyama H, Kiyoshi T, Tsubaki H, Takahashi J. 2019. Complete mitochondrial genome sequence of the broad-winged damselfly, *Mnais pruinosa* Selys, 1853 (Odonata: Calopterygidae). *Mitochondrial DNA Part B*. 4:3101-3103. DOI: 10.1080/23802359.2019.1667887
  9. 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 similima* in Japan. *The Science of Nature*. 106:15. DOI 10.1007/s00114-019-1609-x
  10. 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*. 58:567-579. DOI: 10.1080/00218839.2019.1622320
  11. Ilyasov RA, Youn HG, Lee MI, Kim KW, Proshchalykin MY, Lelej AS, Takahashi J, Kwon HW. 2019. Phylogenetic relationships of Russian far-east *Apis cerana* with other north Asian populations. *Journal of Apicultural Science*. 63:289-314. DOI: 10.2478/jas-2019-0024
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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
  16. 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
  17. 山崎和久・高橋稜一(M2)・高橋純一. 対馬で起きているツマアカスズメバチによるキイロスズメバチへの繁殖干渉. *昆虫と自然*. 53:31-35.
  18. 奥山永・松尾祐弥(B4)・新村友理(M2)・若宮健(M2)・高橋純一. 対馬島のニホンミツバチにおける遺伝的固有性とアカリシダニの寄生率. *長崎県生物学会誌*. 84:20-23.
  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.
5. 学会発表など
1. 高橋純一・近野真央(M2)・深見理. ニホンミツバチと酵母における共生関係の可能性について. 日本応用動物昆虫学会. 2020年3月25-27日. 名古屋市.
  2. 奥山永・廣川論・森修二郎・手塚敏行・高橋純一・エゾオオマルハナバチの遺伝的構造解析とトマトハウス内における活動個体数調査. 日本応用動物昆虫学会. 2020年3月25-27日. 名古屋市.
  3. 稲元哲朗・高橋純一. チョーク病に感染したセイヨウミツバチワーカー蜂児の病理組織科学的観察. 日本応用動物昆虫学会. 2020年3月25-27日. 名古屋市.

4. 奥山永・高橋純一. アジアにミツバチは何種類いるか?. ミツバチサミット2019. 2019年12月13-15日. つくば市.
5. 近野真央 (M2)・高橋純一. 日本ミツバチのハチミツを発酵させる微生物について. ミツバチサミット2019. 2019年12月13-15日. つくば市.
6. 井上諒 (B4)・宋一鑫・高橋純一. 台湾に生息するタイワンハリナシバチの遺伝的多様性および血縁構造について. ミツバチサミット2019. 2019年12月13-15日. つくば市.
7. 溝端丞之介 (B4)・奥山永・高橋純一. 対馬のコマルハナバチの体色変異とボトルネック効果の関係について. ミツバチサミット2019. 2019年12月13-15日. つくば市.
8. 今井静香 (B4)・Jimi Rai・高橋純一. オオミツバチとヒマラヤオオミツバチの遺伝的分化について. ミツバチサミット2019. 2019年12月13-15日. つくば市.
9. 吉田達哉 (B4)・原野健一・奥山永・高橋純一. フィリピンに生息するミツバチの生物系統地理学的研究. ミツバチサミット2019. 2019年12月13-15日. つくば市.
10. 溝端丞之介 (B4)・奥山永・高橋純一. 対馬コマルハナバチの遺伝的多様性と固有性について. 対馬学フォーラム. 2019年12月8日. 対馬市.
11. 近野真央 (M2)・高橋純一. 発酵した生ハチミツに含まれる酵母の分子系統解析. 日本食品微生物学会. 2019年11月28-29日. 東京.
12. 岸本友 (M1)・奥山永・田畑諒一・伊知地稔・勝又啓史・川内智裕・中野江一郎・高橋純一. 日本産ナマズ属の種判定およびマイクロサテライトDNAマーカーの開発. 日本DNA多型学会. 2019年10月4日. 京都市.

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

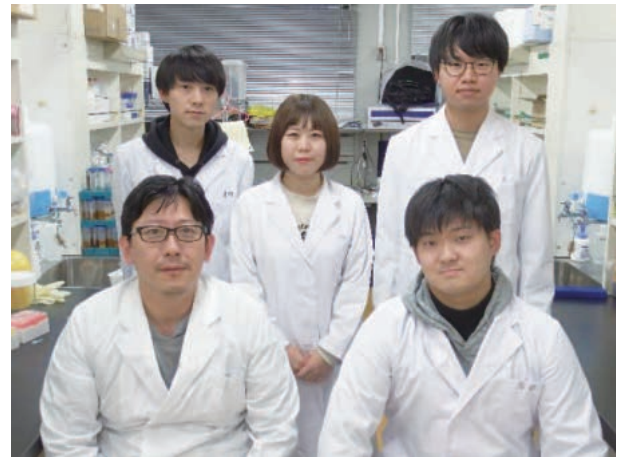
高橋純一 京都府養蜂組合: 顧問

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

### 3) 受賞等

1. 井上諒 (B4) 平成 31 年度生命資源環境学科卒業研究発表会. 優秀賞.



2019 年度卒業生

## 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 29-31 年度 (3 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 29-31 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

# 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.



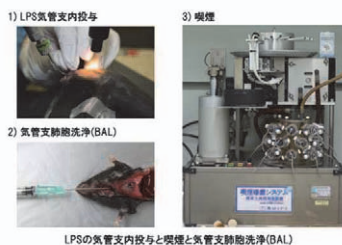
## 1. 研究概要

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



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、インフルエンザ感染への影響、スギ花粉によるアレルギー発症との関連についても研究している。

### 2) LPS、インフルエンザウイルスおよびスギ花粉の初期肺免疫応答について

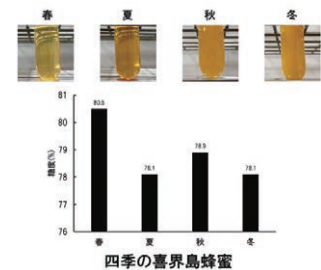
グラム陰性菌由来の内毒素である Lipopolysaccharide (LPS)は、様々な免疫活性を有し、タバコ煙や環境中に含まれており、呼吸や喫煙により肺に吸入することにより肺胞

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、またインフルエンザウイルス感染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、日本国産蜂蜜の免疫を介した抗炎症作用、また蜂蜜の四季の差について、喜界島蜂蜜を用いての研究も開始している。



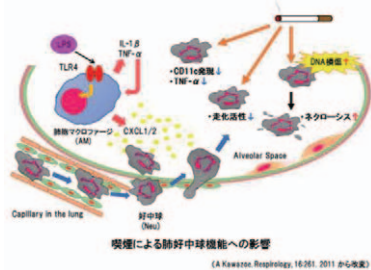
#### ②アガリクス茸

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

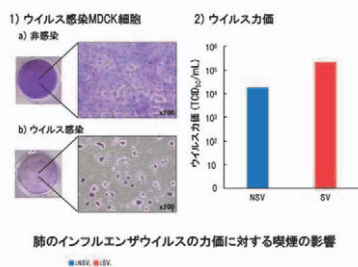
については十分に解明されていないため、そのメカニズムと有効成分について研究している。

## 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のCXCL2などのサイトカインの産生が抑制され、LPSによる好中球の肺胞腔への流入が抑制され、また喫煙が好中球の走化活性を直接抑制し、その結果好中球が肺間質に留まり肺炎を増悪させることが証明された。LPS気管支内投与により肺に誘導された好中球は喫煙によりDNA損傷が誘導されたが、アポトーシスを引き起こさず、ネクローシスを生じることが示された。



インフルエンザウイルス感染に対する喫煙の影響は、感染実験の結果から、喫煙により肺でのウイルス力価の増加が認められ、喫煙がウイルス感染を増強することが認められた。この増強には、喫煙による肺胞マクロファージのウイルス認識レセプターTLR2,4の発現減少と食食機能の減少が関与していることが認められた。



## 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 喫煙を科学する 北隆館 p1-103, ISBN978-4-8326-1007-1 C3047, 2019.

Chika Kanamori, Minoru Takeuchi. Smoking, Cryptomeria Japonica Pollen and Immunity. Precision Medicine, 2(3):287-290, 2019.

#### 5. 学会発表など

Honami Nakata, Saki Hamada, Yuki Hirano, Minoru Takeuchi. Effect of cigarette smoking on M1/M2 type Alveolar Macrophage (AM) and the restore of AM by smoking cessation. 48th Annual meeting of Japanese Society for immunology, Des.2019.

Yuki Hirano, Saki Hamada, Honami Nakata, Minoru Takeuchi. Cigarette smoke inhibit expression of CD11c surface antigen of lung neutrophils induced by LPS in mice. 48th Annual meeting of Japanese Society for immunology, Des.2019.

Saki Hamada, Yuki Hirano, Honami Nakata, Hiroki Takakuwa, Minoru Takeuchi Effect of cigarette smoke on influenza virus infection in mice. 48th Annual meeting of Japanese Society for immunology, Des.2019.

M. Takeuchi, M. Uno, Y. Hirano, S. Hamada, H. Nakata, A. Kawazoe, K.E. Pinkerton. Effect of honey with associated antioxidant on Lipopolysaccharide (LPS) induced lung inflammation in mice. 2019 EMGS annual Meeting, Washington DC, September 19-23, 2019.

M. Takeuchi, M. Uno, Y. Hirano, S. Hamada, H. Nakata, A. Kawazoe, K.E. Pinkerton. Anti-inflammatory effect of honey on pulmonary inflammation associated with neutrophil by lipopolysaccharide (LPS) in mice. FOCIS 2019, Boston, June 18-21, 2019.

Minoru Takeuchi, Chika Kanamori, Yuki Hirano, Saki Hamada, Mauna Uno, Honami Nakata, Kent E Pinkerton. Effects of cigarette smoke on the immunological mechanisms of development of pulmonary pollen allergy. ATS 2019, Dallas, May 17-22, 2019.

M. Takeuchi, M. Takasaki, N. Miwa, Y. Hirono, Y. Tanaka, K. Koike, N. Ishida, KE. Pinkerton. Secondhand tobacco smoke

induce inhibition of immune functions and DNA damage of alveolar macrophage in mice. 2019 SRNT 25th Annual Meeting, San Francisco, February 20-23, 2019.

竹内実 京都府獣医師会創立 70 周年記念交流会 招待講演 「喫煙を科学する」 令和元年 10 月 20 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



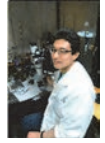
研究室同窓会(2019年9月9日)

# 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と結果、細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度が増加し、最終的に筋の収縮活性が変化する (Figure 1)。平滑筋組織の形態および機能的変化は、構成する臓器の機能異常につながり、高血圧、喘息、過敏性腸症候群などの疾患につながると考えられる。当研究室では、未解明な点が未だ多く残されている①平滑筋収縮調節メカニズムおよび②平滑筋組織の異常に伴う疾患の病態の二点について研究を行っている。

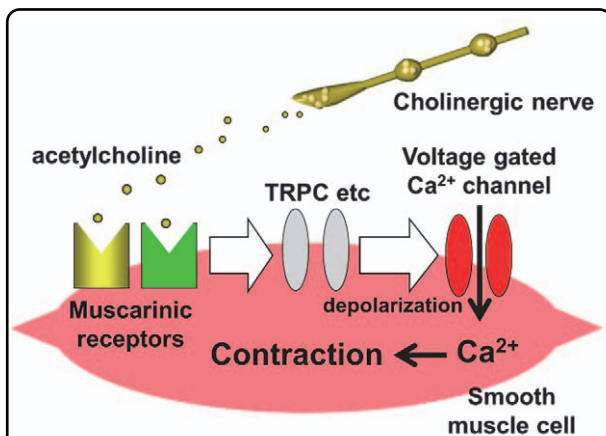


Figure 1. Regulation of smooth muscle contractility by cholinergic nerves

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

(1) マウス小腸平滑筋において、ムスカリン作動性陽イオン電流の発生には、 $M_2$  または  $M_3$  の各ムスカリン受容体サブタイプを介して起こる経路 ( $M_2$  経路,  $M_3$  経路)、および、 $M_2$  と  $M_3$  の両方のサブタイプの刺激を必要とする経路 ( $M_2/M_3$  経路) が関与している。本研究では、これら3つの経路のうち、陽イオン電流の発生において最も重要な経路である  $M_2/M_3$  経路に関連する細胞内情報伝達機構について検討した。その結果、 $M_2/M_3$  経路には  $G_{i/o}$  タイプだけでなく、 $G_{q/11}$  タイプの G 蛋白質も関連しており、PLC の活性化による  $PIP_2$  の分解が重要であることが明らかとなった。また、この経路で働く  $G_{i/o}$  と  $G_{q/11}$  蛋白質は、他の受容体刺激では活性化されず、 $M_2/M_3$  サブタイプと密接な共役関係にあることも示唆された。得られた成果は *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* に投稿して公表した。

(2) Transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) は  $Ca^{2+}$  によって活性化される陽イオンチャネルである。TRPM4 は一価の陽イオンを非選択的に透過する。本研究では、膀胱および消化管平滑筋の収縮活性調節における TRPM4 チャネルの役割について検討した。その結果、TRPM4 チャネルは膀胱および小腸平滑筋において定常的に開口しており、静止膜電位の形成に寄与していることが明らかとなった。また、TRPM4 チャネルは膀胱平滑筋のコリン作動性収縮の発生において重要な役割を果たし

ているのに対し、小腸平滑筋のコリン作動性収縮では、その寄与は小さいことも示唆された。

### 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  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) is kept very low (less than 100 nM). When cells are stimulated, the  $[Ca^{2+}]_i$  is increased, resulting in various cellular responses such as contraction, proliferation, migration, cell death and release of neurotransmitters etc.. The increase in  $[Ca^{2+}]_i$  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) In mouse ileal myocytes, muscarinic receptor-mediated cationic current ( $mI_{cat}$ ) occurs mainly through the synergism of the  $M_2$  and  $M_3$  muscarinic receptor subtypes. We studied the  $M_2/M_3$  synergistic pathway further. Our results suggest the importance of  $G_{q/11}$ /phospholipase C (PLC)-hydrolyzed phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) breakdown in  $mI_{cat}$  activation and support the idea that the  $M_2/M_3$  synergistic pathway represents a signaling

complex comprising the  $M_2$ - $G_{i/o}$  and  $M_3$ - $G_{q/11}$ -PLC systems, wherein both the G proteins are special, and are not associated with the discrete  $M_2$  or  $M_3$  receptors as well as nonmuscarinic receptors.

(2) We investigated the effects of 9-hydroxyphenanthrene (9-phenanthrol), which is a potent and selective blocker of the transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) channel, on the resting membrane potential and cholinergic contractile responses to elucidate the functional role of TRPM4 channels in the contractile activities of mouse detrusor and ileal longitudinal smooth muscles. Our results suggest that TRPM4 channels are constitutively active and are involved in setting the resting membrane potential, thereby regulating the basal tone in detrusor and ileal smooth muscles. TRPM4 channels also play a significant role in cholinergic signaling in detrusor, but not ileal, smooth muscles.

### 4. 論文, 著書など

Yasuyuki Tanahashi, Taisuke Katsurada, Noriko Inasaki, Mai Uchiyama, Takashi Sakamoto, Masayuki Yamamoto, Hayato Matsuyama, Seiichi Komori, and Toshihiro Unno: Further characterization of the synergistic activation mechanism of cationic channels by  $M_2$  and  $M_3$  muscarinic receptors in mouse intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020 ;318(3):C514-C523. doi: 10.1152/ajpcell.00277.

Firoj Alom, Hayato Matsuyama, Hiroshi Nagano, Saki Fujikawa, Yasuyuki Tanahashi, and Toshihiro Unno: Involvement of transient receptor potential melastatin 4 channels in the resting membrane potential setting and cholinergic contractile responses in mouse detrusor and ileal smooth muscles. *J. Vet. Med. Sci.*, 2019; **81(2)**: 217–228. doi: 10.1292/jvms.18-0631

Hitomi Kimura, Yu-ki Imura, Hirotaka Tomiyasu, Taiki Mihara, Noriyuki Kaji, Koichi Ohno, Toshihiro Unno, Yasuyuki Tanahashi, Tong-Rong Jan, Hirokazu Tsubone, Hiroshi Ozaki & Masatoshi Hori: Neural anti-inflammatory action mediated by two types of acetylcholine receptors in the small intestine. *Scientific Reports*, 2019; **9(1)**: 5887. doi: 10.1038/s41598-019-41698-w.

### 5. 学会発表など

Toshihiro Unno, Ntsuki Inaba, Hiroshi Nagano, Takashi Hashimoto, Satoshi Iino, Hayato Matsuyama, Shouichiro Saito, Yasuyuki Tanahashi.  $M_2$  muscarinic receptors possibly facilitate oxytocin synthesis in the mouse supraoptic nuclei. 第93回日本薬理学会年会, 横浜, 2020年3月(誌上開催) ポスター発表

松山 勇人, Froj Alom, 藤川 咲, 柵橋靖行, 海野年弘: マウスの膀胱および消化管平滑筋における静止膜電位の形成およびコリン作動性収縮の発現におけるTRPM4チャネルの関与. 第162回日本獣医学会学術集会, つくば市, 2019.9.10~12, 口頭発表

柵橋靖行, 桂田泰輔, 稲崎倫子, 内山舞, 坂本貴史, 山本正行, 松山 勇人, 小森成一, 海野年弘: マウス小腸平滑筋細胞におけるM<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>両ムスカリン受容体サブタイプを介した陽イオンチャネルの活性化機構, 第61回日本平滑筋学会総会, 名古屋市, 2019.8.1-3, 口頭発表

海野年弘, 稲葉尚志, 松山 勇人, 柵橋靖行: マウスの結直腸運動におけるM<sub>2</sub>ムスカリン受容体サブタイプの役割, 第61回日本平滑筋学会総会, 名古屋市, 2019.8.1-3, ポスター発表



研究室メンバー

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

京都産業大学・特定課題研究(準備研究支援)

課題名: 平滑筋に発現する機械受容チャネル Piezo1 の結腸運動調節における役割

研究代表者: 柵橋靖行, 取得年度: 2019年度(1年)

### 2) 学外活動

i. 柵橋靖行: 日本獣医学会評議員

ii. 柵橋靖行: 日本薬理学会学術評議員

### 3) その他

i. 担当講義科目:

① 学部: 先端生命科学演習1, フレッシュヤーズセミナー, 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

② 大学院: 器官形成・機能病態学特論, 動物生命医科学演習Ⅰ-1・2, 動物生命医科学演習Ⅱ-1・2, 生命科学コロキウム1C, 生命科学コロキウム2, 生命科学コロキウム3, 動物生命医科学特別研究Ⅰ-1・2, 動物生命医科学特別研究Ⅱ-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。2019.9.11(京都産業大学), 2019.9.12~9.13(あうる京北(京都府立ゼミナールハウス))。

iii. グローバル・サイエンス・コース ワーキンググループ委員会においてグループリーダーを務めた。

iv. 京都産業大学オープンキャンパスにてポスターブースならびに実験紹介を担当した(2019.6.9, 2019.8.3, 2019.8.4)。

v. 高校模擬出張授業: 「身近なくすりから学ぶ薬理学」をテーマにして大阪府立泉陽高等学校の高校生を対象に模擬授業を行った(2019.10.16, 京都産業大学)。

# タンパク質バイオジェネシス研究室

Laboratory of Protein Biogenesis

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

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。細胞内では、これらの因子の個々の働きが高次に連携することでひとつの生命体として組織化されている。このような生体分子の組織化を支える要素のひとつが、生体分子の合成と配置の時空間制御である。

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。また、最近、翻訳の品質管理に関する新たな研究プロジェクトも始動し、成果が得られつつある。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) フォースレポーターを用いた新生タンパク質の動的挙動の網羅的検出

枯草菌 MifM は、C 末端付近に存在するアレストモチーフを介してリボソーム成分と相互作用することで自身の翻

訳伸長をアレストする。この翻訳アレストは、アレスト配列が N 末端側から引っ張られることで解除される。このアレストモチーフを、「引っ張り力レポーター」として使い、トランスポゾンを利用して様々なタンパク質の N 末端断片と融合したライブラリを作成した。その中から、アレストが解除されるものを選択することで、翻訳の途上で引っ張り力を伴う新生鎖を網羅的に探索することを試みた。その結果、膜局在や、co-translational なフォールディング、複合体形成などが引っ張り力を伴って進行すること、また、そのような動的な過程を経て多くのタンパク質が合成されることが示唆された(論文投稿中)。同様の解析を大腸菌でも進めている。

### (2) 枯草菌新規リボソームレスキュー因子の同定と解析

終止コドンを欠いた異常 mRNA(non-stop mRNA)をリボソームが翻訳すると、翻訳終結が行われずに mRNA 上でリボソームが停滞する。この停滞リボソームをレスキューする主要な因子として tmRNA-SmpB 複合体が知られているが、今回我々は、枯草菌における第2のリボソームレスキュー因子として、BrfA を同定した。遺伝学、生化学および、Wilson 博士らとの共同研究による構造生物学的な解析から、BrfA は、翻訳終結因子 RF2 依存的に、終止コドン非依存的な翻訳終結を促進することが示された。BrfA は、グラム陽性菌の RF 依存的リボソームレスキュー因子としての初めての報告例となった(Shimokawa-Chiba et al., Nat. Commun. 2019)。

### (3) 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の阻害剤の探索

以前我々は、YidC 活性の阻害に呼応して LacZ 活性を上昇させる枯草菌レポーター株を作製した。この株を用い、東大創薬機構から提供された化合物ライブラリを対象に、YidC 依存的なタンパク質膜組込を阻害する低分子化合物のスクリーニングを進めてきた。YidC の活性が阻害されれば、このレポーター株の LacZ 活性が上昇することが期待されたが、今回のスクリーニングで、濃度依存的にレポーター活性を上昇させる化合物を複数得た。今後、これらの化合物が本当に YidC の活性を阻害しているのかどうかについて、他のアッセイ系を用いて検証を進める予定である。

## 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) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics using a transposable force reporter (*TnFR*)

The elongation arrest of MifM is force-sensitive and is canceled when the MifM nascent chain is pulled from the N-terminus. We took advantage of such a force-sensitivity to capture co-translational pulling force on nascent chains in a proteome-wide fashion. Using

transposon, we constructed a gene-fusion library, in which the N-terminal regions of proteins were fused N-terminally to the arrest sequence of MifM and then screened proteins that canceled elongation arrest. We indeed identified hundreds of proteins that canceled the elongation arrest of the force reporter, most probably reflecting their abilities to initiate the maturation and/or localization process co-translationally.

#### 2) Identification and characterization of a novel ribosome rescue factor in *B. subtilis*

Ribosome stalls on mRNA when it translate mRNA that lacks an in-frame stop codon (non-stop mRNA). Ribosome rescue factors mediate rescue of the ribosomes on the non-stop mRNA. In addition to previously-identified primary ribosome rescue factor, tmRNA-SmpB complex, we here identified BrfA as a secondary ribosome rescue factor in *B. subtilis*. We demonstrated that BrfA recruits RF2 to the stalled ribosome to facilitate a stop codon-independent translation termination on the non-stop mRNA. BrfA is the first reported example of RF-dependent ribosome rescue factor in Gram-positive bacteria.

#### 3) Screening of chemical compound that inhibits YidC

We have previously constructed a reporter strain of *B. subtilis* that exhibits an elevated level of LacZ activity in response to dysfunction of YidC. By screening chemical compounds that elevate the reporter activity, we are searching for those that inhibit the YidC pathway of membrane protein insertion. We now identified several compounds that elevate the reporter activity in a dose-dependent manner.

### **4. 論文, 著書など**

#### **原著論文**

Shimokawa-Chiba, N.\*, Müller, C.\*, Fujiwara, K., Beckert, B., Ito, K., Wilson, D. N.#, Chiba, S.# Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nat. Commun.* (2019) 10, 5397. (\*: equally contributed, #: corresponding authors)

#### **英文総説**

Ito K, Shimokawa-Chiba N, Chiba S. Sec translocon has an insertase-like function in addition to polypeptide conduction through the channel. **F1000Res.** (2019) ;8:F1000 Faculty Rev-2126.

## 日本語解説記事

千葉志信、田口英樹 (2019) 翻訳途上で機能する新生ポリペプチド鎖. 実験医学 Vol.37, No.18 (11月号), 3048-3054.

## 5. 学会発表など

Keigo Fujiwara, Yutaro Katagi, Koreaki Ito, Shinobu Chiba: Studying co-translational protein dynamics using force-sensing arrest peptides, RIBOSOME 2019 meeting, 2019. 1/6-1/10, Mérida, Mexico

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifM および SecM の翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査. 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会. 2019. 5/29-5/30. 琵琶湖ホテル

Naomi Shimokawa-Chiba, Claudia Müller, Keigo Fujiwara, Bertrand Beckert, Koreaki Ito, Daniel N. Wilson, Shinobu Chiba: A release factor-dependent ribosome rescue mechanism in Gram-positive bacteria, EMBO Conference (Protein synthesis and translational control), 2019. 9/4-9/7, Heidelberg, Germany

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: アレストペプチドによる新生鎖の動態過程の系統的調査. 令和元年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議. 2019. 9/6-9/7. 筑波

崎山歌恋、下川(千葉)直美、千葉志信: 新規翻訳アレストペプチドの変異解析. 第 92 回日本生化学会大会. 2019. 9/18-9/20, パシフィコ横浜

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: 翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査. 第 92 回日本生化学会大会. 2019. 9/18-9/20. パシフィコ横浜

Shinobu Chiba: A novel ribosome rescue mechanism in *Bacillus subtilis*. ウイルス・再生医科学研究所セミナー. 2019. 11/8. 京大・ウイルス再生研

塩田成未、千葉志信: 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC を阻害する化合物の探索. 第 42 回日本分子生物学会年会. 2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

下川(千葉)直美、Claudia Müller、藤原圭吾、Bertrand Beckert、伊藤維昭、Daniel N. Wilson、千葉志信: 枯草菌における新規リボソームレスキュー因子の同定と解析. 第 42 回日本分子生物学会年会. 2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

崎山歌恋、下川(千葉)直美、千葉志信: 細菌由来の新規翻訳アレスト因子の同定と解析. 第 42 回日本分子生物学会年会. 2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: アレストペプチドをフォースセンサーとして利用した新生鎖の動的挙動の網羅的調査. 第 42 回日本分子生物学会年会. 2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

榎祐太郎、藤原圭吾、千葉志信: 翻訳アレスト因子を利用した大腸菌新生タンパク質の動的挙動の網羅的解析. 第 42 回日本分子生物学会年会. 2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

Shinobu Chiba: Nascent polypeptide chain-mediated translation elongation arrest in bacteria. BPS2020 (64th Annual Meeting of the Biophysical Society). 2020. 2/15-2/19. San Diego, USA

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

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)

科研費補助金・若手研究

課題名: 翻訳と共役して起こる新生タンパク質の動的過程の系統的調査

研究代表者: 藤原圭吾、取得年度: H31-R2 年 (2 年)

### 2) 学外活動

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 2019 年 7 月 30 日-8 月 5 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。





# タンパク質構造生物学研究室

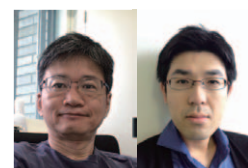
Laboratory of Protein Structural Biology

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。

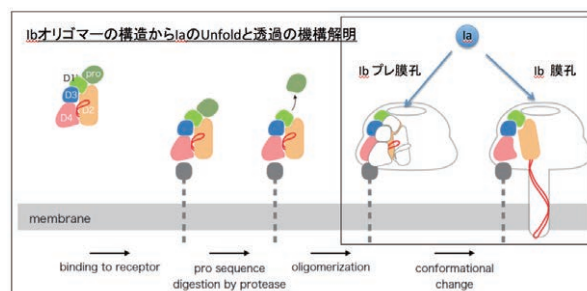
### (1) 細菌タンパク質輸送装置の構造と機構の解明:

*C. perfringens* が持つ二成分毒素はアクチンをADPリボシル化するIaとこれをエンドサイトーシスを経て細胞内へ輸送する装置Ibからなる。この数年、クライオ電子顕微鏡によりIbの構造と機能に焦点を当てた研究を進めてきた。今年度初めてIb膜孔とIa-Ib膜孔複合体の構造を明らかにした。

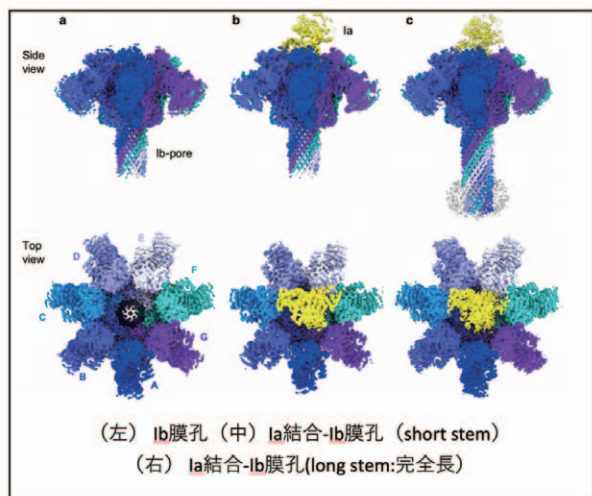
(2) ADPリボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学: 様々な病原微生物はADPリボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々なADPリボシル化毒素(酵素)とその基質複合体での結晶構造解析を進めている。

## 2. 本年度の研究成果

(1) *C. perfringens* が持つ二成分毒素はアクチンを特異的ADPリボシル化する毒素Iaとこれを細胞内へ輸送する装置Ibからなる。我々は以前より二成分毒素の研究を進めており、Ia単体および基質アクチンとの複合体の構造をX線結晶構造解析で明らかにし、構造と機能の解析を進めてきた。二成分毒素の毒性発現機構を理解するには、Ibの研究が欠かせない。しかし、膜タンパクであることから、サンプル調整と結晶化が難しかった。このためクライオ電子顕微鏡による解析を進めてきた。サンプル精製方法の改良およびグリッドのスクリーニングを進めて、高分解能のデータ収集に成功し、その解析からIb膜孔の高分解能解析に成功した。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の立体構造がほどこけて、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。以前の解析から、分解能は悪いが、Ibはプロ配列(pro)を切断すると、プレ膜孔を経由して、膜孔になることは、わかってきた。プレ膜孔から膜孔への変化は、長いベータバレルを注射針のように突き出し膜に孔をあける。この領域は疎水性のため、サンプル調整の段階で、アグリゲーションを抑える何かしらの手段が必要であった。このため我々はLMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)の濃度と精製の過程でいつ加えるかを詳細に検討した。さらにクライオ電子顕微鏡にのせるグリッド作成でも、このLMNGの濃度が高いとノイズとなることから、アグリゲーションを抑えつつ、ノイズとならない最適の濃度を探った。こうして見つかった、最適の条件を用いてサンプル調整とグリッド作成を行い、大阪大学・蛋白質研究所のTitan Kriosを用いて撮影を行い、C7対称性を用いて2.9Å分解能での構造を得た。Ib膜孔は7量体からなる。さらにIaを通過させるために、これが結合する様子を捉えたいと考え、調整したIb膜孔にIaを加えて、データを収集、C1対称性を用いた解析を行った。クラス分けの段階でベータバレルが完全長のもので、膜挿入部がまだ組み立てていない短いものを分けることができ、それぞれ解析を行い、2.9Åと2.8Å分解能での解析に成功した。この結果から、以下のことがわかってきた(1)Iaは7量体のIb膜孔の一つに結合する。(2)IaはN末端のドメインで結合し、アクチンADPリボシル化活性を持つC末端ドメインは、その上に位置する。(3)IaのN末端はこの結合により末端のαヘリックスが一部解ける。(4)このIaのN末端の先は、Ib膜孔の狭窄部位(直径6



Å)であるφクランプへと続いていた。このことからIaのIb膜孔を介しての膜透過はN末端から解けて行われると考えられる。また(5)プレ膜孔から膜孔へは、ベータバレルが完全でない、短いshort stem型が中間体として存在し、おそらく、これから完全長(long stem型)になることで膜への完全挿入がなされる。明らかになっている異なるグループに属する二成分毒素、炭素菌毒素との比較からIb膜孔の新規の特徴的な、タンパク質膜輸送機構を提唱した。これらの結果を、今年3月、Nature Structural & Molecular Biology誌へ掲載した(京都産業大学、山田(M2)、吉田、津下と大阪大学、筑波大学の共同研究)。

(2) 近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン(CPE)欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素は *Clostridium perfringens* iota-like toxin (CPILE)と命名された。CPILEはCPILE-a, CPILE-bの2つのコンポーネントからなるbinary毒素である。前述のイオタ毒素と比較しながらCPILE-b膜孔調整と構造解析を始めた。また人で腸炎を起こすディフィシル菌のCDTは二成分毒素であり、この比較研究も始めている。これらクロストリジウム属の二成分毒素の、タンパク質の輸送機構を明らかにする。この研究は阻害剤開発の基礎研究となる。

(3) ADPリボシル化の特異性: 我々はADPリボシル化毒素(酵素)とその基質タンパク質の複合体の丸ごとの構造解析を進めてきた。特にIa-アクチン複合体、C3-RhoA複合体、ScARP-グアニン複合体の研究により、ADPリボシル化はタンパク質のアミノ酸であれ、あるいはDNAの塩基であれ同じような認識機構で、基質を認識してADPリボシル化するということを明らかにした。しかしながら、人PARP(ポリADPリボシ

ル化あるいはモノADPリボシル化)の認識機構はまだよくわかっていない。この解明のため、構造解析を進めている。

### 3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complexes, 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.

#### This year's accomplishments

(1) The iota toxin produced by *Clostridium perfringens* type E, is a binary toxin comprising two independent polypeptides: Ia, an ADP-ribosyltransferase, and Ib, which is involved in binding to the cell and translocation of Ia across the cell membrane. We reported the cryo-EM structures of the translocation channel Ib-pore and its complex with Ia. The high-resolution Ib-pore structure demonstrates a similar structural framework as observed for the catalytic φ-clamp of the anthrax protective antigen pore. However, the Ia-bound Ib-pore structure showed a unique binding mode of Ia. One Ia binds to the Ib-pore, and the Ia N-terminal domain interacts with Ib via two other Ib-pore constriction sites via multiple weak interactions. Furthermore, Ib-binding induces Ia N-terminal α-helix tilting and partial unfolding, whereupon the unfolded N-terminus continues to the φ-clamp gate. This study reveals a novel mechanism of N-terminal unfolding that is crucial for protein translocation. The study was reported in *Nat Struct & Mol Biol*.

(2) Recently, outbreaks of food poisoning in Japan were reported in which *Clostridium perfringens* was strongly suspected to be the cause based on epidemiological information and fingerprinting of isolates. The isolated strains lack the typical *C. perfringens* enterotoxin (CPE) but secrete a new binary toxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPILE-a), which acts as an actin ADP-ribosyltransferase, and CPILE-b, a membrane-binding and protein-translocation component. We are trying to reveal the structure and functions of CPILE-b compared with Ib-pore.

(3) We are interested in the specificity of ADP-ribosyltransferase (ART). We have revealed the complex structures of Ia-actin, C3-RhoA and ScARP-guanine for the last ten years. From these structures, we understood they all use the ARTT-loop in common. Furthermore, we consider that this is a common substrate recognition mechanism for all ARTs, all protein/amino acid-target and DNA/base-target ARTs. However, it is still an open question of the specificity of human PARPs, which belongs to a different group of ART. Thus, we

are trying to reveal the structures of PARP in order to understand the specificity.

#### 4. 論文著書など

Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, Tsuge H. Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex. *Nat Struct & Mol Biol.* 27(3):288-296. doi:10.1038/s41594-020-0388-6. (2020) (査読有り)

#### 5. 学会発表など

Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, and Tsuge H : Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocon Ib-pore, European Workshops on Bacterial Protein Toxins - ETOX19, Davos (Switzerland), 2019.6.22-26 (口頭発表:山田)  
Monma C, Saiki D, Shimojima Y, Suzuki J, Sadamasu K, Yamada T, Tsuge H, Kamata Y: Diarrheagenic activity of each component of CPiLE as a new enterotoxin produced by *Clostridium perfringens* isolated from foodborne outbreaks, CLOSPATH 11, Leiden (Netherlands) 2019.8.19-22

山田等仁、津下英明:ウェルシュ菌2成分毒素 膜孔複合体の単粒子解析、生理研研究会 クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析～みんなのクライオ電顕～、岡崎コンファレンスセンター(愛知)、2019.11.6-26-27(口頭発表:山田)

吉田徹、津下英明: DNA を基質とする ADP リボシル基転移酵素の基質認識機構、酵素補酵素研究会、ホテルアウイーナ大阪(大阪)、2019.7.4-5

半田達也、津下英明: 病原菌由来モノ ADP リボシル基転移酵素の基質認識機構に関する研究、酵素補酵素研究会、ホテルアウイーナ大阪(大阪)、2019.7.4-5

津下英明:タンパク質膜透過チャネルの単粒子構造解析、第453回ビタミンB 研究協議会、パレスサイドホテル(京都) 2019.8.30-31

山田等仁、吉田徹、川本暁大、光岡薫、岩崎憲司、津下英明: Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocation channel Ib-pore、第57回日本生物物理学会、シーガイアコンベンションセンター(宮崎)、2019.9.24-26

#### 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A」研究代表者：津下英明、取得年度：H30-H31年(2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 代議員

##### (3) 受賞等

なし

##### (4)

Nature Research Microbiology Community 記事掲載  
Posing just before protein translocation in bacterial binary toxin  
Hideaki Tsuge

#### 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の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、研究助教の吉田徹(現在日本女子大学)を含めた複数の教員が関わって、教育と実験指導ができたことは学生に対する高い教育効果をあげた。



# 免疫糖鎖生物学研究室

Laboratory of Immunoglycobiology

## 1. 研究概要

ムチンは呼吸器、消化器、生殖器などの上皮組織表面を覆う主要成分で、多数の O-グリカンをもつ高分子の糖タンパク質である。正常な上皮細胞では、新たに合成されたムチンはアピカル側に輸送されるが、上皮細胞の悪性化による細胞極性の消失に伴い、ムチンは細胞表面全体に輸送されるようになる。がん組織微小環境は、癌細胞と免疫細胞などを含む間質細胞で構成される。結果として、癌組織微小環境では、あらたな細胞間相互作用や細胞とマトリックスの相互作用が生ずると考えられる。我々は上皮細胞に普遍的に発現している MUC1 ががん組織微小環境に存在する様々なレクチンと相互作用する可能性があると考えた。事実、ヒトがん組織標本において、MUC1 がガレクチン-3 やシグレック-9 と共局在することを免疫化学的に示した。従って、我々はレクチンの結合を起点とした MUC1 仲介性のシグナル伝達と腫瘍の悪性化について研究してきた。これらの研究過程において、MUC1 の発現亢進に伴って発現が上昇するタンパク質を DNA マイクロアレイにより検索した。その中で、Trop-2 が著しく誘導されることがわかった。Trop-2 (TACSTD2) は細胞膜糖タンパク質で、様々な上皮性癌細胞に高発現している。Trop-2 は GA733 (Gastrointestinal tumor-associated antigen) ファミリーに属し、EpCAM として知られる GA733-2 と GA733-1(Trop-2) からなる。Trop-2 は EpCAM と約 49% のホモロジーがあり、高い構造的類似性をもつ。Trop-2 の発現は膵癌、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、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 wild-type Trop-2 cDNA 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 を分離する目的で、Trop-2 を N-グリカナーゼで消化後、phostag を含

教授 中田 博

Prof. Hiroshi Nakada, Ph. D.



研究助教 山下 智子

Assist. Prof. Tomoko Yamashita, Ph. D.

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、Ser303 あるいは Ser322 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 Ser322 であることがわかった。次いで、リン酸化 Ser322 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 Ser322 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。先ず、MUC1 による Trop-2 の誘導機構の解析を試みた。ミトラマイシン A は転写因子 Sp1 の阻害剤であるが、Trop-2 の発現を抑制することがわかった。Sp1 は MUC1 にリクルートされ、さらに MUC1 へのガレクチン-3 の結合が MUC1 への Sp1 のリクルートを亢進することがわかった。これらの結果は MUC1 へのガレクチン-3 の結合が Sp1 をリクルートし、Trop-2 の発現を亢進すると考えられる。さらに、細胞の移動能に対する Trop-2 のリン酸化の効果を3つの細胞 (HCT116/WT、HCT116/S322A、HCT116/S322E) を用いて検討した。共沈反応により、Trop-2 S322A と Claudin-7 の相互作用が最も強く、Trop-2 S322E は最も弱いことがわかり、Transwell assay の結果では、HCT116/S322E 細胞が最も高い移動能を示し、HCT116/S322A が最も低い移動能をもつことがわかった。Claudin-7 mRNA のレベルはすべての細胞で同様であったが、タンパク質のレベルは HCT116/S322E 細胞で著しく減少したことから、Claudin-7 は転写後の調節を受けていることが示唆された。さらに、Claudin-7 は HCT116/S322A 細胞では、細胞の境界に存在したが、HCT116/S322E と HCT116/WT 細胞では膜上付近に分散して存在し、一部細胞質にも見られた。これらの知見は Trop-2 のリン酸化は Claudin-7 の減少や分布の異常に関連していることを示唆している。PKC 阻害剤及び PKC siRNA を用いて、Trop-2 は PKC  $\alpha$  と PKC  $\delta$  によってリン酸化されることがわかった。PKC 阻害剤及び PKC siRNA により細胞の移動能は減少した。

## 2. 本年度の研究成果

Trop-2 を介した EMT の誘導と転移

2-1 野性型及び変異型 Trop-2 を発現する HCT116 細胞における E-cadherin の発現

野性型 Trop-2 を発現するヒト大腸癌由来細胞 HCT116/WT (WT 細胞)に加えて、リン酸化をブロックするために Ser322 を Ala に換えた変異型 Trop-2 を発現する HCT116/SA (SA 細胞)及びリン酸化をミミックする目的で Glu に変換した変異型 Trop-2 を発現する HCT116/SE (SE 細胞)を作成した。SA 細胞は他の Trop-2 発現細胞より著しく低い細胞移動能を示した。事実、WT 及び SE 細胞は SA 細胞と比較して、ゆるく結合しているように見えた。これらの結果は Ser322 残基のリン酸化が細胞接着に関連した事象に含まれていることを示唆している。実際、WT 細胞の移動能は PKC 阻害剤の G66983 の処理により効果的に減少した。EMT (epithelial-mesenchymal transition) のプロセスにおいて組織化した上皮細胞が変化し、緩く結合し、散在した細胞になることが知られている。野性型及び変異型 Trop-2 を発現する HCT116 細胞について Trop-2 のリン酸化に伴うこの形態的な差異は上皮細胞と間葉系細胞間の相違に近似しているように見える。このような背景のもとに、野性型及び変異型 Trop-2 発現細胞における E-cadherin のレベルを比較した。予想どおり、E-cadherin の mRNA 及びタンパク質量は他の細胞と比較して SE 細胞で劇的に減少し、E-cadherin は翻訳レベルで下方制御されていることが示唆された。

#### 2-2 E-cadherin の発現を抑制する転写因子の発現

EMT の hallmark は E-cadherin であり、EMT は転写因子 Snail, ZEB 及び Twist によって誘導されることが知られている。従って、DNA マイクロアレイと免疫ブロッティングによって、Mock 細胞を含めた 4 種の細胞におけるこれらの転写因子の発現を調べた。Snail の mRNA とタンパク質のレベルはこれらの細胞でほぼ同等であった。ZEB1 mRNA は SE 細胞で著しく上昇した。Twist1 mRNA は WT と SE 細胞で増加していた。E-cadherin タンパク質は SE 細胞のみで低下したことから、ZEB1 が主に E-cadherin の発現を制御していることを示唆している。しかし、Trop-2 のリン酸化の下流で ZEB1 と Twist1 の翻訳を高める 2 つのルートの存在が想定された。

#### 2-3 リン酸化による Trop-2 の断片化の促進

Trop-2 の細胞内断片を検出する目的で、N 末端に FLAG タグをつけた Trop-2 にさらに C 末端に HA タグをつけた野性型 Trop-2 を導入した HCT116 細胞 (WT-HA 細胞)を作成した。同細胞のライセートを電気泳動し、免疫ブロッティング後に抗 FLAG 及び HA 抗体によって検出した、抗 FLAG 抗体により分子量 50~75kDa の 1 本のバンドが検出され、抗 HA 抗体では 50~75kDa のバンドに加えて、~40kDa、~20kDa 及び ~13kDa のバンドが検出された。後者の 3 本のバンドが断片化した Trop-2 の C 末端断

片と考えられる。さらに、核画分を調製し、同様に解析したところ、~20kDa や ~13kDa のバンドに加えて、8kDa のバンドが検出された。同バンドは細胞内で最終的に断片化されたペプチドで核内に輸送されたものと予想される。次に、Trop-2 のリン酸化が断片化に関連するか否かについて検討した。PKC による Trop-2 のリン酸化は PMA や PKC 阻害剤の G66983 の処理により確認された。すなわち、PMA 処理により Trop-2 のリン酸化が亢進し、G66983 の前処理によりコントロールレベルに減少した。次に、Trop-2 のリン酸化と断片化の関連性を検討した。細胞を PMA で処理後、細胞のライセートを調製し、経時的に ~13kDa の断片を検出したところ、Trop-2 の断片化は 6 時間でピークとなった。G66983 による処理後に同様の解析をおこなったところ、Trop-2 の断片化は減少したことから Trop-2 のリン酸化は Trop-2 の断片化を開始するかもしくは亢進することを示している。

#### 2-4 Trop-2 と $\beta$ -catenin の結合と Trop-2 のリン酸化を介した核移行の亢進

Trop-2 のリン酸化が  $\beta$ -catenin との結合に影響するかどうかを検討した。WT, SA 及び SE 細胞のライセートより Trop-2 を免疫沈降し、共沈した  $\beta$ -catenin を検出したところ、これらの細胞で同レベルの  $\beta$ -catenin が検出された。従って、Trop-2 と  $\beta$ -catenin の結合は Trop-2 のリン酸化に影響されないことがわかった。次に、Trop-2 の断片と  $\beta$ -catenin の核への蓄積を検討した。PMA 処理した細胞より核画分を調製し、抗 HA 抗体により免疫沈降した。Trop-2 の断片及び共沈した  $\beta$ -catenin は PMA 処理により増加した。PMA 処理後の細胞について、HA-tagged Trop-2 fragment と  $\beta$ -catenin の分布を免疫化学的に視覚化した。核内で共局在した Trop-2 断片と  $\beta$ -catenin のドットをカウントすると PMA 処理により増加したことから、Trop-2 のリン酸化により促進された断片化により Trop-2 の断片と結合した  $\beta$ -catenin の核内輸送が亢進したものと考えられる。

#### 2-5 $\beta$ -Catenin と TCF4 による ZEB1 の発現

核内  $\beta$ -catenin は TCF/LEF 転写因子ファミリーと複合体を形成し、ZEB1 プロモーターに結合することで ZEB1 の発現を亢進することが知られている。WT 細胞を用いて共沈実験により TCF4 と  $\beta$ -catenin が複合体を形成することを確認した。さらに、Trop-2 断片と TCF4/ $\beta$ -catenin 複合体が結合することも共沈実験で明らかとなった。ZEB1 の発現が亢進している SE 細胞を  $\beta$ -catenin の阻害剤で処理すると ZEB1 の発現は約 30%減少した。また、TCF4 と  $\beta$ -catenin の siRNA あるいはそれぞれの siRNA を用いてノックダウンするといずれのケースも約 50%の ZEB1 タンパク質が減少した。ルシフェラーゼアッセ

いによっても、同等の ZEB1 プロモーター活性が減少した。さらに、これらの因子のノックダウンにより E-cadherin の発現が増加した。

#### 2-6 STAT3 による Twist1 の発現

Twist1 mRNA の発現は Mock 及び SA 細胞と比較して WT 及び SE 細胞において亢進していることを示してきたが、この結果は Trop-2 のリン酸化の下流において Twist1 が誘導されることを示唆している。Twist1 は STAT3 の活性化によって誘導されることが知られていることから、STAT3 mRNA とタンパク質のレベルをこれらの細胞で比較したところ、同レベルであった。しかしながら、リン酸化 (705Tyr)STAT3 は Mock 及び SA 細胞と比較して、WT 及び SE 細胞で亢進していた。また、STAT3 のノックダウンにより Twist1 の発現は低下し、逆に E-cadherin の発現は亢進した。Trop-2 のリン酸化後にもどのように STAT3 がリン酸化されるかは今後の課題である。

#### 2-7 Trop-2 へのガレクチン-3 の結合とシグナル伝達

上述したように、Trop-2 のリン酸化は Trop-2 を介したシグナル伝達のキーステップであるが、Trop-2 のリン酸化を亢進する機構として 1 つは成長因子受容体を介した系を想定した。HCT116 細胞は様々な成長因子受容体を発現していることから、成長因子の受容体への結合は受容体チロシンキナーゼを活性化し、結果として PKC の活性化をもたらすことを想定した。WT 細胞を EGF、FGF、TGF- $\beta$ 、HGF あるいは IGF-1 の刺激による Trop-2 のリン酸化と断片化の変化を検討したが、成長因子の効果は認められなかった。もう 1 つの可能性は未知のリガンドによるものである。Trop-2 のエクストドメインに結合する内在性リガンドを検索したが、特異的なリガンドは検出できなかった。次に、Trop-2 は糖鎖に富む糖タンパク質であることから、ガレクチン-3 の結合を検討した。WT 細胞のライセートをガレクチン-3-セファロースとインキュベートし、結合したタンパク質を回収した。免疫ブロッティングにより Trop-2 が検出されたことから、ガレクチン-3 がリガンドの 1 つであることがわかった。細胞表面における Trop-2 とガレクチン-3 の共局在が免疫化学的に認められ、両分子が細胞表面で結合していることが示唆された。WT 細胞をガレクチン-3 で 30 分処理した後、ライセートを電気泳動し、免疫ブロッティングによりリン酸化 Trop-2 を検出した。ガレクチン-3 の結合は Trop-2 のリン酸化を亢進し、その後 2~6 時間で Trop-2 の断片化が見られた。さらに、ZEB1 の発現上昇と E-cadherin の発現低下が認められた。結果として、細胞の移動能が上昇することも確認した。

2-8 MCF-7 及び DU145 細胞における PMA またはガレクチン-3 処理による E-cadherin の発現低下

ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 及びヒト前立腺癌由来細胞 DU145 における Trop-2 の発現は免疫ブロッティングとフローサイトメトリーにより確認した。いずれの細胞も PMA 処理すると Trop-2 のリン酸化が認められ、ZEB1 の発現上昇と共に E-cadherin の発現が低下した。また、ガレクチン-3 の処理によっても E-cadherin の発現が低下した。2-9 野性型及び変異型 Trop-2 発現 HCT116 細胞の転移と PKC 阻害剤 Gö6983 による阻害

ヌードマウスに WT、SA 及び SE 細胞を腹腔もしくは皮下に移植し、肝臓や肺への転移を検討した。腹腔内投与 1 ヶ月後に肝臓及び肺を取り出し、組織の可溶化液より FLAG-tagged Trop-2 を免疫ブロッティングにより検出した。肝臓への転移は SE 細胞では 2/4、WT 細胞では 2/5 で認められた。肺への転移は SE 細胞では 3/4、WT 細胞では 4/5 で認められた。一方、SA 細胞ではいずれの場合も転移は認められなかった。皮下移植 2 ヶ月後に同様に肝臓と肺への転移を調べた。肝臓への転移は見られなかったが、肺への転移は SE 細胞では 1/5、WT 細胞では 3/5 で認められた。同様に SA 細胞では転移は見られなかったことから、Trop-2 のリン酸化が転移能の獲得につながっていることを示唆している。従って、WT 細胞の転移に対する PKC の阻害剤である Gö6983 の効果を検討した。WT 細胞を移植 (ip) 後、毎日、阻害剤 (0.25mg/mouse) を腹腔内投与した。1 ヶ月後に肝臓と肺への転移を調べた。肝臓への転移はコントロール群で 9/9、阻害剤処理群で 2/9 であった。肺への転移はコントロール群で 7/9 であったが、阻害剤処理群で 3/9 であった。PKC 阻害剤が効果的に転移を阻害することがわかった。

#### 2-10 ヒト胃癌組織における E-cadherin、リン酸化 Trop-2 及び Trop-2 の分布

ヒト癌組織 20 症例について、E-cadherin、リン酸化 Trop-2 及び Trop-2 の発現はそれぞれ 8、10 及び 10 症例で陽性であった。病的に正常組織と癌組織を含む標本において、Trop-2 は双方の組織において同様に発現していたが、E-cadherin は非癌部で発現し、癌部ではほぼ皆無であった。逆にリン酸化 Trop-2 は癌部で認められたが、非癌部では発現は認められなかった。Trop-2 のリン酸化が E-cadherin の発現低下の誘導に必須であることを示唆している。

#### 2-11 Trop-2 による EMT 誘導モデル

図 1 に Trop-2 のシグナル伝達による EMT 誘導の模式図を示す。

Trop-2 の Ser322 が PKC  $\alpha / \delta$  によってリン酸化されると Claudin-7 との相互作用が減少し、Claudin-7 の異常な分布や安定性の消失をもたらす。実際に Trop-2 にガレ

クチン-3が結合すると Trop-2 のリン酸化が亢進し、続いて Trop-2 が断片化される。Trop-2 の C 末端断片は核に移行し、 $\beta$ -catenin /TCF4 と複合体を形成し、ZEB1 の転写を高める。また、Twist1 の転写も Trop-2 のシグナル伝達の下流に想定される STAT3 のリン酸化を介して亢進する。ZEB1 及び Twist1 は E-cadherin の転写を抑制する。Trop-2 を介したこの経路は EMT とそれに続く転移を誘導する重要な役割をはたす。何故ならば、この経路は tight junction と adherence junction を同時に壊し、前癌状態から空間的に機能しうるからである。

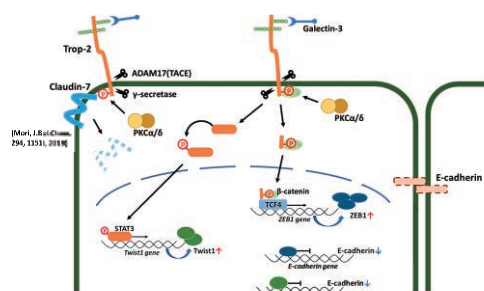


図1 Trop-2 のシグナル伝達による EMT 誘導

### 3. Research projects and annual report

#### 3-1 Tumor progression by MUC1 and its related protein

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. Trop-2 (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 GA733-2, 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 303Ser 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 322amino acid (HCT116/S322E). First, we tried to elucidate the mechanism by which Trop-2 is induced by MUC1. We found that mithramycin A, an inhibitor of specificity protein 1 (Sp1) transcription factor, inhibited the expression of Trop-2, and that Sp1 was recruited to MUC1. Furthermore, binding of galectin-3 to MUC1 elevated the recruitment

of Sp1 to MUC1. These results suggest that ligation of galectin-3 to MUC1 triggers the recruitment of Sp1, leading to upregulation of Trop-2 transcription. Furthermore, we investigated the effects of Trop-2 phosphorylation on cell motility using HCT116/WT (WT), HCT116/S322A (SA) and HCT116/S322E (SE) cells. Coimmunoprecipitation and Transwell assays indicated that Trop-2 S322A interacted with claudin-7 the strongest and a phosphomimetic variant, Trop-2 S322E, the weakest and that SE cells have the highest motility and SA cells the lowest. All cell lines had similar levels of claudin-7 mRNA, but levels of claudin-7 protein were markedly decreased in the SE cells, suggesting posttranslational control of claudin-7. Moreover, claudin-7 was clearly localized to cell-cell borders in SA cells, but was diffusely distributed on the membrane and partially localized in the cytoplasm of SE cells and WT cells. These observations suggested that Trop-2 phosphorylation plays a role in the decrease or mislocalization of Claudin-7. Using protein kinase C (PKC) inhibitors and PKC-specific siRNAs, we found that PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  are responsible for Trop-2 phosphorylation. Of note, chemical PKC inhibition and PKC $\alpha$ - and PKC $\delta$ -specific siRNAs reduced motility. 3-2 Trop-2 mediated induction of EMT and metastasis

### **1) Expression of E-cadherin in wild-type and mutated Trop-2 expressing HCT116 cells**

In addition to wild-type Trop-2 expressing cells (HCT116/WT; WT cells), we prepared mutated Trop-2 expressing cells with Ala (HCT116/S322A; SA cells) and Glu (HCT116/S322E; SE cells) instead of Ser322 to block and mimic the phosphorylation, respectively, as described previously. SA cells exhibited significantly less motility than the other Trop-2-expressing cells in vitro. Consistently, WT and SE cells appeared to be in contact more loosely compared with SA cells. These results suggest that phosphorylation of the Ser322 residue is critically involved in cell adhesion-related events. In fact, the motility of WT cells was effectively reduced by treatment with PKC inhibitor Gö6983.

It is well-known that during the process of EMT, well-organized epithelial cells change to loosely contacting and scattering cells. In wild-type and mutated Trop-2-expressing HCT116 cells, this morphologic difference associated with phosphorylation of Trop-2 seems to be similar to that between epithelial and

mesenchymal cells. Thus, we next compared the levels of E-cadherin in wild-type and mutated Trop-2-expressing HCT116 cells. Expectedly, E-cadherin mRNA and protein dramatically decreased in SE cells compared with in other cells, suggesting that expression of E-cadherin was down-modulated transcriptionally.

### **2) Expression of transcriptional factors that repress E-cadherin transcription**

It is well-known that E-cadherin is a hallmark of EMT, and that EMT is driven by Snail, ZEB and Twist transcriptional factors. Thus, we analyzed the levels of mRNA and protein of these transcriptional factors in mock, wild-type and mutated Trop-2 expressing cells by DNA microarray analyses and immunoblotting. Similar levels of Snail1 mRNA and protein were expressed in these cells. ZEB1 mRNA was markedly increased in SE cells, and TWIST1 mRNA was elevated in WT and SE cells. E-cadherin protein was decreased only in SE cells, suggesting that ZEB1 mainly regulates the expression of E-cadherin, but there may be two pathways to up-regulate the transcription of ZEB1 and Twist1 through downstream events after Trop-2 phosphorylation.

### **3) Enhanced cleavage of Trop-2 through its phosphorylation**

In order to detect the intracellular peptide, wild-type Trop-2 tagged with FLAG at the N-terminal end was further modified by adding a HA tag at the C-terminal end. Lysates of FLAG- and HA-tagged wild-type Trop-2 expressing HCT116 cells (WT-HA cells) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting and detection with anti-HA- or FLAG-tag antibodies. A broad band with a molecular mass of 50~75 kDa was detected with both antibodies, and other bands with molecular masses of ~40kDa, ~20kDa and ~13kDa were detected with anti-HA antibodies but not with anti-FLAG antibodies, indicating that the smaller three bands were C-terminal peptides produced through cleavage of Trop-2. Furthermore, a nuclear fraction was prepared from WT-HA cells and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. In addition to several fragments with molecular masses of ~20 and ~13kDa detected in whole cells, a band with a molecular mass of 8kDa was detected. This band may correspond to the intracellular fragment cleaved finally and transported to nuclei, based on the electrophoretic mobility of artificially synthesized



and phosphorylated cytoplasmic peptides of Trop-2. Next, we investigated whether or not phosphorylation of Trop-2 is relevant to its cleavage. PKC-dependent phosphorylation of Trop-2 was confirmed on the treatment of WT-HA cells with PMA and PKC inhibitor, Gö6983. Expectedly, Trop-2 phosphorylation was elevated on the treatment of the cells with PMA, and its elevated phosphorylation was reduced to the basal level on the pretreatment with PKC inhibitor, Gö6983. Next, the relationship of Trop-2 phosphorylation with Trop-2 cleavage was examined. After treatment with PMA or 4 $\alpha$ -PMA (control) for several hours, cell lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting. Cleavage of Trop-2 was chased by the detection of a ~13kDa fragment with anti-HA antibodies. Cleavage of Trop-2 was enhanced by PMA treatment, peaking at 6 h. After treatment with Gö6983 or DMSO (control), the WT-HA cells were cultured in the presence of PMA or 4 $\alpha$ -PMA for an additional 6 h, followed by detection of the Trop-2 fragment as described above. Cleavage of Trop-2 was clearly reduced on the treatment with PKC inhibitor Gö6983, indicating that Trop-2 phosphorylation initiated or enhanced its cleavage .

#### **4) Association of Trop-2 with $\beta$ -catenin and enhanced translocation of $\beta$ -catenin through Trop-2 phosphorylation**

To investigate whether or not phosphorylation of Trop-2 affects its association with  $\beta$ -catenin, Trop-2 was immunoprecipitated from lysates of wild-type and mutated Trop-2-expressing HCT116 cells, and then subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting and detection with anti- $\beta$ -catenin antibodies. Similar levels of  $\beta$ -catenin were coimmunoprecipitated with Trop-2 in these cells, suggesting that the interaction of Trop-2 with  $\beta$ -catenin is not regulated through its phosphorylation. Next, nuclear accumulation of the Trop-2 fragment and  $\beta$ -catenin was investigated using WT-HA cells. A nuclear fraction was prepared from cells treated with PMA or 4 $\alpha$ -PMA, and the Trop-2 fragment was immunoprecipitated using anti-HA antibodies. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting. In addition to the HA-tagged Trop-2 fragment, coimmunoprecipitated  $\beta$ -catenin increased on the treatment with PMA. The distributions of the HA-tagged Trop-2 fragment and  $\beta$ -catenin in WT-HA cells were observed

immunochemically after treatment with PMA or 4 $\alpha$ -PMA for 6 h. Both the HA-tagged Trop-2 fragment and  $\beta$ -catenin were accumulated in nuclei on the treatment with PMA. In the merged image,  $\beta$ -catenin colocalized with HA-tagged Trop-2 fragment in the nuclei can be observed as white dots. White dot-positive cells in the nuclei were counted, and the percentage of positive cells in total cells is shown as a histogram. PMA treatment increased the  $\beta$ -catenin colocalized with the HA-tagged Trop-2 fragment in nuclei. These results indicate that nuclear transport of the Trop-2 fragment associated with  $\beta$ -catenin was enhanced by increased cleavage due to Trop-2 phosphorylation.

#### **5) $\beta$ -catenin and TCF4-dependent expression of ZEB1**

It has been reported that nuclear  $\beta$ -catenin binds to members of the TCF/LEF transcription factor family, and  $\beta$ -catenin/TCF4 binds to the human ZEB1 promoter, triggering its transcription. Formation of the  $\beta$ -catenin/TCF4 complex was confirmed by their coimmunoprecipitation in WT cells. Association with the Trop-2 fragment with  $\beta$ -catenin and TCF4 was also confirmed by coimmunoprecipitation with anti-HA-tag antibodies in WT-HA cells. ZEB1 was highly expressed in SE cells, but not in other Trop-2 expressing cells. Thus, SE cells were treated with a  $\beta$ -catenin inhibitor (XAV939, PNU74654) for 24 h, and then the level of ZEB1 was determined by SDS-PAGE and immunoblotting of cell lysates. About 30 % of ZEB1 protein decreased on the treatment with the  $\beta$ -catenin inhibitors. The decreases of the  $\beta$ -catenin and TCF4 proteins on the treatment with each siRNA were confirmed. Knockdown of  $\beta$ -catenin and/or TCF4 caused about 50% decrease in the ZEB1 protein level. An equivalent decrease of ZEB1 promoter activity was confirmed by luciferase assay. It was also noted that expression of E-cadherin increased on knockdown of these factors.

#### **6) STAT3 dependent expression of Twist1**

We also found that the levels of Twist1 mRNA in WT and SE cells were considerably higher than those in Mock and SA cells. This finding suggests that Twist1 may be induced by downstream events through Trop-2 phosphorylation. Twist1 is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates the STAT3 oncogenic function. In this context, we analyzed the levels of STAT3 protein and mRNA in wild-type and mutated

Trop-2 expressing HCT116 cells. Although the levels of the STAT3 protein and mRNA were similar in these cells, phosphorylated (705Tyr) STAT3 was significantly elevated in WT and SE cells compared with in Mock and SA cells. In fact, knockdown of STAT3 decreased the expression of Twist1 and reciprocally enhanced the expression of E-cadherin. The mechanism by which STAT3 is phosphorylated after Trop-2 phosphorylation is currently under investigation.

#### **7) Binding of galectin-3 to Trop-2 and subsequent signaling**

As described above, phosphorylation of Trop-2 seems to be a key step for Trop-2 mediated signaling. We speculated that there are two ways to elevate the phosphorylation of Trop-2. One is growth-factor receptor-mediated phosphorylation of Trop-2. Expression of various growth factor receptors in HCT116 cells was revealed by DNA microarray analysis. Ligation of growth factors to their receptors is expected to activate receptor tyrosine kinase, resulting in activation of PKC. We examined the phosphorylation and subsequent cleavage of Trop-2 when WT cells were treated with various growth factors including EGF, FGF, TGF- $\beta$ , HGF and IGF-1. However, no growth factors exhibited a detectable effect on Trop-2 cleavage. Another possibility is that Trop-2 is phosphorylated directly on binding of extracellular unknown ligands. Although we searched for a specific endogenous protein that binds to the ectodomain of Trop-2, no specific ligand was detected. Next, we examined the binding of galectin-3 to Trop-2, because Trop-2 is a highly glycosylated membrane protein. Lysates of WT cells were incubated with galectin-3-Sepharose in the presence or absence of 50 mM lactose. Galectin-3 binding proteins were examined on SDS-PAGE and immunoblotting. FLAG-tagged Trop-2 was detected in the galectin-3 binding proteins and its binding was completely abolished by lactose, indicating specific binding of galectin-3 to Trop-2. Colocalization of Trop-2 and galectin-3 on the cell surface was clearly observed immunochemically, suggesting the binding of galectin-3 to Trop-2 on the cell surface. After incubation of WT cells with galectin-3 for 30 min, FLAG-tagged Trop-2 was immunoprecipitated from the cell lysates, and then subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting and detection of phosphorylated Trop-2 with

anti-phosphorylated Trop-2 antibodies. Binding of galectin-3 to Trop-2 elevated the phosphorylation of Trop-2. Subsequent cleavage of Trop-2 was also enhanced at 2~6 h after treatment of the cells with galectin-3. We also investigated the effect of galectin-3 on the expression of ZEB1 and E-cadherin. Expression of ZEB1 increased, and reciprocally that of E-cadherin clearly decreased at 24 h after incubation of the cells with galectin-3. Eventually, galectin-3 treated cells exhibited higher cell mobility compared with control cells.

#### **8) Downmodulation of E-cadherin expression on treatment with PMA or galectin-3 in MCF-7 cells and DU145 cells**

Trop-2 was immunoprecipitated from lysates of MCF-7 cells and DU145 cells, and then subjected to SDS-PAGE and immunoblotting, followed by detection with anti-Trop-2 antibodies. A band with a molecular mass of about 50 kDa was detected. Expression of Trop-2 in MCF-7 cells and DU145 cells was also demonstrated by flow cytometry. Lysates were prepared from MCF-7 cells and DU145 cells treated with PMA or 4 $\alpha$ -PMA, and then subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. Phosphorylated Trop-2, ZEB1, E-cadherin and  $\beta$ -actin were detected. Expression of ZEB1 was enhanced, and reciprocally expression of E-cadherin was downmodulated on the treatment with PMA. Furthermore, the effect of galectin-3 on expression of E-cadherin was also investigated. Binding of galectin-3 to Trop-2 expressed in MCF-7 and DU145 cells was investigated by using galectin-3-Sepharose as described above. Galectin-3 binding proteins were examined by SDS-PAGE and immunoblotting. Trop-2 was detected in the galectin-3 binding proteins in both cells. MCF-7 and DU145 cells were treated with galectin-3 as described above. Expression of E-cadherin was clearly downmodulated on the treatment with galectin-3.

#### **9) Metastasis of wild-type and mutated Trop-2 expressing HCT116 cells and its inhibition by PKC inhibitor Gö6983**

To evaluate the metastasis of these cells, three cell types were injected into nude mice intraperitoneally or subcutaneously.

Intraperitoneally injected cells gave rise to bloody ascites regardless of wild-type or mutated Trop-2

expressing cells, however, the appearance of nude mice was extremely different between SA and the other two cells. Livers and lungs were harvested at 4 weeks after tumor inoculation, and immunoprecipitation of FLAG-tagged Trop-2 from the tissue extracts and its detection were performed. FLAG-tagged Trop-2 was detected in tissue extracts of some nude mice bearing WT and SE cells, but not in those bearing SA cells. The occurrence of liver and lung metastasis was detectable in 2 of 5 and 4 of 5 of WT cells, respectively, and in 2 of 4 and 3 of 4 of SE cells, respectively, whereas metastasis was not detected in either liver or lung extracts of nude mice inoculated with SA cells (n=3). Subcutaneously injected cells formed tumors apparently at similar rates among these cells. At 8 weeks after subcutaneous injection, the nude mice were euthanized, and then their primary tumors, livers and lungs were harvested. The weights of primary tumors formed by WT, SE and SA cells were  $0.99\pm 0.18$ ,  $0.86\pm 0.08$  and  $1.060\pm 0.23$  g, respectively. No significant difference was detected among these primary tumors. A higher level of E-cadherin was detected by immunoblotting in SA cell-forming tumor tissues than in WT and SE cell-forming ones. Although no metastasis into the liver was observed (data not shown), FLAG-tagged Trop-2 was detected in some lungs. Lung metastasis was detectable in 3 of 5 of WT cells and 1 of 5 of SE cells. No metastasis was detected in lung of nude mice inoculated with SA (n=5) cells. In any case, no metastasis of SA cells could be detected, suggesting that phosphorylation of Trop-2 may be linked to the acquisition of metastatic potential.

Therefore, we examined the effect of PKC inhibitor Gö6983, on the metastasis of WT cells. WT cells were injected intraperitoneally into nude mice. Starting 1 day after tumor cell injection, nude mice received daily intraperitoneal injection of Gö6983 (0.25 mg/mouse). After 4 weeks, FLAG-tagged Trop-2 was detected in the liver and lung tissues as described above. Liver metastasis was observed in 9 of 9 of control mice and 2 of 9 of Gö6983-treated mice. The occurrence of lung metastasis was detectable in 7 of 9 of control mice and 3 of 9 of Gö6983-treated mice, indicating that Gö6983 inhibited the metastasis effectively.

#### **10) Distributions of E-cadherin, phosphorylated Trop-2 and Trop-2 in gastric cancer tissues**

Gastric cancer tissues (20 cases) were immunostained. Phosphorylated Trop-2, Trop-2 and E-cadherin positive tissues were found in 8, 10 and 10 cases, respectively. E-cadherin was expressed mainly at the cell membrane. Intense E-cadherin staining was observed in normal appearing tissues, whereas in cancerous tissues, the staining was reduced. Inversely, phosphorylated Trop-2 was highly expressed in cancerous tissues and adjacent normal appearing tissues were only faintly stained. Similar expression levels of Trop-2 were observed in normal and cancerous tissues, suggesting that the phosphorylation of Trop-2 is critical for inducing the down-modulation of E-cadherin.

#### **11) Schematic model of Trop-2-driving derangement of claudin-7 and E-cadherin**

Figure 1 shows a schematic model of Trop-2 mediated signaling to drive EMT.

Previously, Mori *et al.* revealed that Trop-2 was phosphorylated at Ser-322 by PKC $\alpha/\delta$ , and that phosphorylation of Trop-2 was linked to mislocalization of claudin-7 and a decrease of its stability, probably due to loss of interaction between claudin-7 and Trop-2. Actually, binding of galectin-3 induced phosphorylation of Trop-2 and subsequent cleavage of Trop-2 occurred. Its C-terminal fragment was transported to nuclei, and its complex with  $\beta$ -catenin and TCF-4 enhanced the transcription of ZEB1. Transcription of Twist1 was also enhanced by phosphorylated STAT3. STAT3 may be phosphorylated through Trop-2 mediated signaling. ZEB1 and Twist1 downmodulated the expression of E-cadherin transcriptionally. The Trop-2 mediated pathway may play a critical role in driving EMT and subsequent metastasis, because both tight and adherence junctions are deconstructed simultaneously and this cascade is spatially functional from the premalignant stage.

#### **4. 論文, 著書など**

- 1) Yamashita, T., Mori, Y., Alzaaqi, S.M., Yashiro, M., Sawada, T., Hirakawa, K., and Nakada, H. (2019) Induction of Trop-2 expression through the binding of galectin-3 to MUC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 516, 44-49
- 2) Mori, Y., Akita, K., Ojima, K., Iwamoto, S., Yamashita, T., Morii, E., and Nakada, H. (2019) Trophoblast cell surface antigen-2 (Trop-2) phosphorylation by protein

kinase C  $\alpha/\delta$  (PKC $\alpha/\delta$ ) enhances cell motility. *J Biol Chem* 294, 11513-11524

3) Inoue, T., Kohno, M., Nagahara, H., Murakami, K., Sagawa, T., Kasahara, A., Kaneshita, S., Kida, T., Fujioka, K., Wada M., Nakada, H., Hla, T., and Kawahito, Y., (2019) Uplagulation of sphingosine-1-phosphate receptor 3 on fibroblast-like synoviocytes is associated with the development of collagen-induced arthritis via increased interleukin-6. *PLOS one* 14,:e0218090

## 5. 学会発表など

- 1) 中田 博 Trop-2 を介した細胞接着と転移  
第28回日本がん転移学会:鹿児島市、2019、7.25-26
- 2) 中田 博、森勇伍、岩本駿吾、尾島和樹、山下智子、秋田薫  
第38回日本糖質学会:名古屋市、2019、8.19-21
- 3) 中田 博 MUC1を介した膜糖タンパク質 Trop-2 の誘導と Trop-2 によるがん転移促進 第92回日本生化学会:横浜市、2019、9.18-20
- 4) 中田 博 Trop-2を介した上皮-間葉系転換の促進と PKC 阻害剤による転移抑制 第78回日本癌学会:京都市、2019、9.26-28

## 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 結合分子の評価
- 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  
特願 2019-20832
- 3) 学外活動  
中田 博:徳島大学非常権講師  
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

同窓会の写真

(2019年11月16日、京都ガーデンパレスにて)



# 発生細胞生物学研究室

Laboratory for Cell and Developmental Biology

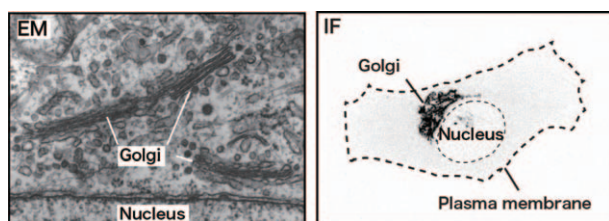
教授 中村暢宏

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)。

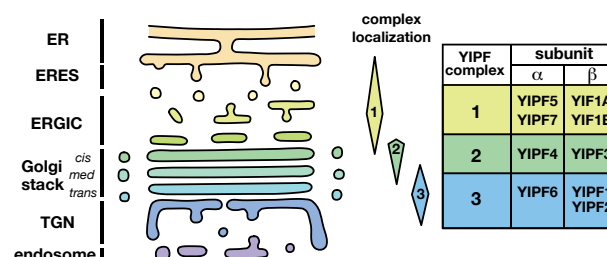
最近の研究から、ゴルジ体の構造や機能の不全がアミロイド繊維形成を誘導してアルツハイマー病や ALS (筋萎縮性側索硬化症) などの神経変性疾患を導く可能性や、ゴルジ体に局在するタンパク質群が細胞骨格や細胞極性の調

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.



**Fig. 2 Three YIPF complexes and their localization**  
2)。

ヒト YIPF タンパク質、および酵母 YIPF タンパク質 (Yip1p/Yif1p/ Yip4p/Yip5p) のアミノ酸配列を用いて NCBI データベースを網羅的に解析したところ、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 (Table 1)。また、動物界 (Metazoa) を含む Holozoa では、単細胞生物の Filasterea や Choanoflagellata 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 (Table 2)。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 F<sub>1</sub> 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、組み込み部位の特定を進めてきた。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が 2 系統得られており、一方の系統では 23 番染色体に (TgCh23.1 系統)、もう一方の系統では 25 番染色体に (TgCh25.1 系統) トランスジーンが組み込まれていることが明らかとなっていた。また、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

Table 1 Organisms having orthologues of Yip1p, Yif1p, Yip4p and Yip5p

Taxon	(Kingdom)	(Phylum)	(Class)	Species
Excavata	Euglenozoa		Kinetoplastida	<i>Bodo saltans</i>
SAR	Stramenopiles	Heterokontophyta	Phaeophyceae	<i>Ectocarpus siliculosus</i>
	Alveolates	Ciliophora	Oligohymenophora	<i>Tetrahymena thermophila</i>
	Rhizaria	Cercozoa	Phycomyxa	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
Archaeplastida	Rhodophyta		Bangiophyceae	<i>Galdieria sulphuraria</i> <i>Cyanidioschyzon merolae</i>
	Viridiplantae	Chlorophyta	Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
		Streptophyta	Bryopsida	<i>Physcomitrella patens</i>
			Acrogymnospermae	<i>Picea sitchensis</i>
Magnoliophyta	<i>Arabidopsis thaliana</i>			
Uniconta	Amebozoa	Mycetozoa	Dictyostelids	<i>Dictyostelium discoideum</i>
	Opisthokonta	Holomycota	Mucoromycota	<i>Glomus cerebriforme</i>
			Dikarya	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Table 2 Three YIPF complexes are found in holozoa

Most of holozoa have 6 homologues of YIPF except few organisms including Arthropoda

Taxon	Species	Orthologues found									
		α			β						
		1	2	3	1	2	3				
Filasterea	<i>Capsaspora owczarzakii</i>	+	+	+	+	+	+				
Choanoflagellata	<i>Salpingoeca rosetta</i>	+	+	+	+	+	+				
Porifera	<i>Amphimedon queenslandica</i>	+	+	+	+	+	+				
Cnidaria	<i>Nematostella vectensis</i>	+	+	+	+	+	+				
Placozoa	<i>Trichoplax adhaerens</i>	+	+	+	+	+	+				
Platyhelminthes	<i>Macrostomum lignano</i>	+	+	+	+	+	+				
Lophotrochozoa	Mollusca <i>Octopus bimaculoides</i>	+	+	+	+	+	+				
Ecdysozoa	Nematoda <i>Caenorhabditis elegans</i>	+	+	+	+	+	+				
	Arthropoda <i>Drosophila melanogaster</i>	+	-	+	+	-	+				
Metazoa	Eumetazoa	Bilateria	Protostomia	Deuterostomeia	Chordata	Echinodermata <i>Acanthaster planci</i>	+	+	+	+	+
	Cephalochordata <i>Branchiostoma belcheri</i>					+	+	+	+	+	
	Tunicata <i>Ciona intestinalis</i>					+	+	+	+	+	
	Chondrichthyes <i>Rhincodon typus</i>					+	-	+	+	+	
	<i>Callorhynchus milii</i>					+	+	+	+	+	
	Teleostomi <i>Danio Rerio</i>					+	+	+	+	+	
	Amphibia <i>Xenopus laevis</i>					+	+	+	+	+	
	Aves <i>Coturnix japonica</i>					+	+	+	+	+	
	<i>Mus musculus</i>					+	+	+	+	+	
	Mammalia <i>Homo sapiens</i>					+	+	+	+	+	

の 31,514,547 から 31,514,557 の部位 (GRCz11) へトランスジーンが組み込まれていることも明らかになっていた。

トランスジェニックゼブラフィッシュ 146 個体について、トランスジーン組み込み部位を PCR で解析したところ、TgCh23.1 アリルを一つだけ持つ個体が 68 (47%)、TgCh25.1 アリルを一つだけ持つ個体が 48 (33%)、TgCh23.1 アリルと TgCh25.1 アリルを一つずつ持つものが 26 個体 (18%)、TgCh25.1 アリルを二つ持つものが 4 個体 (3%) あった。一方、注目すべきことに、TgCh23.1 アリルを二つ持つ個体は見つからなかった。したがって、TgCh23.1 アリルを二つ持つ個体は致死である可能性が示唆された。対照的に TgCh25.1 アリルを二つ持つ個体が見つかったことから、トランスジーンを 2 つ持つことが致死の原因ではないと考えられた。したがって、TgCh23.1 アリルに劣勢致死効果があることが示唆された。この可能性を検証するために、木村教授・坂本助教との共同研究によって TgCh23.1 系統の全ゲノム解析を行い、トランスジーン組み込み領域の遺伝子構造の確認を行なった。その結果、TgCh23.1 アリ

ルでは、トランスジーンが 23 番染色体の 30,426,532-30,429,982 (GRCz11) に組み込まれており、この間 3,450bp が欠失していることが明らかとなった。この領域には calmodulin binding transcription activator 1a 遺伝子が存在するため、TgCh23.1 アリルを 2 つ持つ個体は、この遺伝子の発現異常によって劣勢致死となる可能性が強く示唆された。

### 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 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 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 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 "Golgipathy" 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 are supposed to function in the structural maintenance of the Golgi apparatus. Four family members were found in *Saccharomyces cerevisiae* (Yip1p, Yif1p, Yip4p, Yip5p), while nine family members (YIPF1~6, YIP1B, YIF1A, YIF1B) were found in human. A homolog of Yip1p binds a Yif1p homolog 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 the middle (*cis*-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 the protein sequence database (Table 1 and 2). Besides, two more orthologues corresponding to human YIPF3 and YIPF4, YIPF5 were identified in *Holozoa* including *Filasterea*, *Choanoflagellata*, and *Metazoa* (Table 2). No orthologues for YIPF3 or YIPF4 were identified in *Eukaryota* except *Holozoa* suggesting that the 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 homolog number played some role for the ossification of the 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 fluorescence. 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 the integration of transgene (Tg) on the 23rd and/or 25th chromosome (named TgCh23.1, TgCh25.1). This year, we screened 146 transgenic zebrafishes and found that 68 (47%)

individuals have one TgCh23.1 allele, 48 (33%) individuals have one TgCh25.1 allele, 26 (18%) individuals have one TgCh23.1 allele and TgCh25.1 allele, 4 (3%) individuals have two TgCh25.1 alleles. Strikingly, no individual has two TgCh23.1 alleles. This results strongly suggested that the TgCh23.1 allele has a recessive lethal effect. To evaluate this possibility, a whole-genome analysis was performed to confirm any loss or rearrangement of the integration site of the transgene for the TgCh23.1 allele. As a result, the transgene was found to be integrated between 30,426,532-30,429,982 of 23rd chromosome (GRCz11) revealing a deletion of 3,450 bp at the insertion site of the transgene. This region encodes calmodulin-binding transcription activator 1a suggesting the perturbation of the expression of this gene inducing the recessive lethal effect of the TgCh23.1 allele.

#### 4. 論文, 著書など (Publications)

Shaik, S., Pandey, H., Thirumalasetti, S., **Nakamura, N.** (2019).

Characteristics and Functions of the Yip1 Domain Family (YIPF), Multi-Span Transmembrane Proteins Mainly Localized to the Golgi Apparatus, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7, 130.

#### 5. 学会発表など (Meeting Reports)

**中村暢宏** (2019). ゼブラフィッシュ初期発生での GM130 の役割の解析. 一般社団法人予防薬理学研究所 キックオフシンポジウム(大阪)3月13日

#### 6. その他特記事項 (Others)

##### 1) 外部資金 (Research Grants)

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~)  
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: 6 件  
The FEBS Journal: 1 件  
Journal of Cell Science: 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

**2019 Laboratory Members:** Himani Pandey (ポスドク, 2019年3月まで), Shaheena Shaik (D2-D3, 2019年8月まで), 中川慎一郎 Shinichiro Nakagawa (B4, 2019年3月まで), 奥村美月 Mitsuki Okumura (B4, 2019年3月まで), 木下優里花 Yurika Kinoshita (B4, 2019年3月まで), 林亮太朗 Ryotaro Hayashi (B4, 2019年3月まで), 長崎貴郁 Takafumi Nagasaki (B3-B4), 杉山京平 Kyohei Sugiyama (B3, 2019年7月から), 高司時生 Tokio Takaji (B3, 2019年7月から), 寺坂太賀 Taiga Terasaka (B3, 2019年7月から)



# 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

准教授 潮田 亮

Associate Prof. Ryo Ushioda, Ph.D

研究助教 伊藤 進也

Assistant Prof. Shinya Ito, 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**」をとと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推進してきた。すなわち、

- 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
- 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
- 3) 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
- 4) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysteriin* の機能解析の4つであった。

プロジェクト4)の責任者であった森戸大介が昭和大学医学部に講師として赴任し、プロジェクト3)の責任者であった山本洋平が大阪大学歯学部助教として採用されたことから、これら2つの研究は、現在もそれぞれ昭和大学、大阪大学で継続されている。

以下、プロジェクト1)とプロジェクト2)について、この1年3か月で得られた知見について紹介する。

## 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

コラーゲン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、この観点からは各種線維化組織において、Hsp47 は治療に関する有望なターゲットタンパク質となり得る。Hsp47 の機能阻害によって、コラーゲンの異常合成を主因とする線維化疾患の治療法を確立しようとするものである。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(*J Biol Chem* 2017, 2019)。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。本研究は、研究助教的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)。さらに 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)。そのような経過から、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る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。言い方を換えれば、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准教授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。また、小胞体内腔のレドックス環境がどのように構築されるのか、その機構解明にも挑戦している。

## 2. 本年度の研究成果

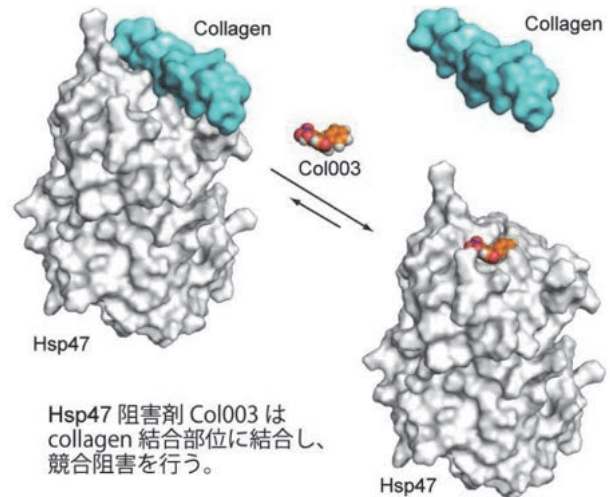
### 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

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。Hsp47 はヒートショックタンパク質(HSP)に属し、温度に依存して転写レベルで発現が変動する。通常37°Cで培養している細胞を、33°Cで培養するとコラーゲン合成に対する Hsp47 の依存度が低くなることを共同研究で、明らかにした(Fujii K et al, *Sci Rep*, 2019)。このことは、37°Cがコラーゲンにとって熱的に不安定なヒートショック条件であり、Hsp47 がコラーゲンにとって HSP として働いていることを示唆している。

近年、Hsp47 がコラーゲン以外のタンパク質にも結合し、コラーゲンの品質管理に関与することが示唆されている(Ishikawa Y et al, *PNAS*, 2016)。さらに、Hsp47 は細胞外のコラーゲンの合成を制御することで、がん細胞の転移に関与することが分かってきた(Xiong G et al. *PNAS*, 2020)。新規結合パートナーや疾患との関連を含む 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*, 2019)。

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るが、結合解離が不可逆になることから、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-コラーゲン間相互作用の検出に成功し、阻害剤の効果を評価した(Ito S et al, *J Biol Chem*, 2019)。この方法により、より有望な化合物の探索を共同で行い、その一部を発表した(Yoshida M et al, *Chem Pharm Bull*, 2020)

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(A MED)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、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*, 2019)、今後、詳細なポンプ活性化メカニズム

解明が期待される。さらにカルシウム制御として、小胞体局在のレドックス因子がカルシウムチャンネル 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、ポンプとチャンネルを 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、論文投稿準備中である。また、これらレドックス依存的な小胞体恒常性維持機構について総説にまとめ、広くコンセプトを伝えることが出来た (R.Ushioda & K.Nagata, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2019)。

(文責：潮田)

### 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 two 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. Lowering the culture temperature corrected collagen abnormalities in Hsp47 knockout cell (Fujii KK, et al, *Sci Rep.* 2019). This collaborated study suggested that Hsp47 stabilizes procollagen as heat shock protein and body temperature would be a heat shock condition to procollagen folding. Recently, we also collaboratively found Hsp47 promotes cancer metastasis by enhancing collagen-dependent cancer cell-platelet interaction. (Xiong G et al, *PNAS* 2020) and a cell-specific ablation of Hsp47 defines the collagen-producing cells in the injured heart (Khalil H, et al, *JCI Insight.* 2019). To date, 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 review (Ito S and Nagata K *J Biol Chem.* 2019).

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 (Ito S et al, *J Biol Chem.* 2019). We are searching for more promising compounds by this method. As a part of the hit compounds, We reported the structure-activity relationship study on a compound inhibiting between collagen and Hsp47 (Yoshida M, et al, *Chem Pharm Bull* 2020).

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 Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca<sup>2+</sup> concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2b. It suggests that the redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the ER (R.

Ushioda *et al.*, *PNAS* 2016). Furthermore, 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. Furthermore, we summarized our previous works as a review of the redox-dependent endoplasmic reticulum homeostatic mechanism (R.Ushioda & K.Nagata, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2019).

#### 4. 論文、著書など

Y. Yamamoto, A. Kasai, H. Omori, T. Takino, M. Sugihara, T. Umemoto, M. Hamasaki, T. Hatta, T. Natsume, R. I. Morimoto, R. Arai, S. Waguri, M. Sato, K. Sato, S. Bar-Nun, T. Yoshimori, T. Noda & **K. Nagata**: ERdj8 governs the size of autophagosomes during the formation process *J. Cell. Biol.* in press

Y. Zhang, M. Inoue, A. Tsutsumi, S. Watanabe, T. Nishizawac, **K. Nagata**, M. Kikkawa & K. Inaba: Cryo-EM structures of SERCA2b reveal the mechanism of regulation by the luminal extension tail. *Science Advance* in press

A. Kohler, M. Morgelin, J.M. Gebauer, S. Ocal, T. Imhof, M. Koch, **K. Nagata**, M. Paulsson, M. Aumailley, U. Baumann, F. Zacke & G. Sengle: New specific Hsp47 functions in collagen subfamily chaperoning. *FASEB J.* 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.* 68(3):220-226 (2020)

G. Xiong, J. Chen, G. Zhang, S. Wang, K. Kawasaki, J. Zhu, Y. Zhang, **K. Nagata**, Z. Li, BP. Zhou, R. Xu: Hsp47 promotes cancer metastasis by enhancing collagen-dependent cancer cell-platelet interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117 (7) :3748-3758 (2020)

**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.* 294(44):15962-15972 (2019)

**S. Ito** & **K. Nagata**: Roles of the endoplasmic reticulum-resident, collagen-specific molecular chaperone Hsp47 in vertebrate cells and human disease. *J Biol. Chem.* F294(6):2133-2141 (2019)

**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 1;11(5), (2019)

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<sup>2+</sup>-ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay. *Cell Rep.* 27(4):1221-1230 (2019)

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.* 218(3):949-960 (2019)

KK. Fujii, Y. Taga, T. Sakai, **S. Ito**, S. Hattori, **K. Nagata** & T. Koide: Lowering the culture temperature corrects collagen abnormalities caused by HSP47 gene knockout. *Sci Rep.* 9(1):17433. (2019)

H. Khalil, O. Kanisicak, RJ. Vagnozzi, AK. Johansen, BD. Maliken, V. Prasad, JG. Boyer, MJ. Brody, T. Schips, KK. Kilian, RN. Correll, K. Kawasaki, **K. Nagata** & JD. Molkentin: Cell-specific ablation of Hsp47 defines the collagen-producing cells in the injured heart. *JCI Insight* 4(15):e128722 (2019)

H.H. Kampinga, C. Andreasson, A. Barducci, M.E. Cheetham, D. Cyr, C. Emanuelsson, P. Genevoux, J.E. Gestwicki, P. Goloubinoff, J. Huerta-Cepas, J. Kirstein, K. Liberek, M.P. Mayer, **K. Nagata**, N.B. Nillegoda, P. Pulido, C. Ramos, P. De Los Rios, S. Rospert, R. Rosenzweig, C. Sahi, M. Taipale, B. Tomiczek, **R. Ushioda**, J.C. Young, R. Zimmermann, A. Zylicz, M. Zylicz, E.A. Craig & J. Marszalek: Function, evolution, and structure of J-domain proteins. *Cell Stress and Chaperones* 24(1):7-15 (2019)

#### 5. 学会発表など

##### 招待講演

**Kazuhiro Nagata**: Protein folding and misfolding in the Endoplasmic Reticulum. EMBO workshop "Protein quality control: From mechanisms to disease", Mallorca (Spain) 2019.04.30

永田和宏: 線維化疾患治療薬ターゲットとしての Hsp47. 第105回日本消火器病学会総会 (ワークショップ基調講演)、金沢市、2019.5.11

永田和宏: 生物物理若手の会夏の学校、神戸市、2019.08.29

**Kazuhiro Nagata**: Organizing and Closing remarks 日独米AMEDワークショップ "Dynamic Codes of Proteins and Glycans in Stress Resilience and Diseases", 東京都、2019.9.6-7

永田和宏：小胞体恒常性の維持機構  
老化メカニズムの解明・制御プロジェクト「加齢依存性タンパク質変性と老化」研究会、神戸市、2019.11.08

## 学会発表

堤智香、潮田亮、永田和宏：小胞体における亜鉛依存的なレドックスゾーンの構築. 新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」平成30年度若手の会、徳島市、2019.01.25

Kaiku Uegaki, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Nascent polypeptide can be an electron donor for ER-resident disulfide reductase ERdj5. EMBO workshop “Protein quality control: From mechanisms to disease”, Mallorca (Spain) 2019.04.28-05.03(Poster award)

Ryo Ushioda, Kaiku Uegaki and Kazuhiro Nagata : Maintenance of ER homeostasis through disulfide reductase Gordon Research Conference” 2019 Stress Proteins in Growth, Development and Disease” , Lucca (Italy), 2019.06.23-28(Flash Talk)(口頭発表)

上垣日育、潮田亮、高島成二、稲葉謙次、永田和宏：Electron donor for disulfide reductase ERdj5 in the ER. 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会、神戸市、2019.06.24-26

藤井唱平、潮田亮、山浦大地、平野愛弓、永田和宏：レドックスによる小胞体カルシウム恒常性維持機構の解明. 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会、神戸市、2019.06.24-26

潮田亮：レドックス制御に基づく小胞体恒常性維持機構. 第92回日本生化学会大会、横浜市、2019.09.20 (奨励賞受賞講演)

潮田亮：レドックスを介した小胞体恒常性維持機構 第92回日本生化学会大会シンポジウム、横浜市、2019.09.18-20(口頭)

藤井唱平、永田和宏：小胞体の酸化還元酵素によるカルシウムイオンチャネルの制御機構の解明. 第92回日本生化学会大会、横浜市、2019.09.18-20 (若手優秀発表賞)

Ryo Ushioda: Maintenance of ER homeostasis through disulfide reductase. The 1st International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine , Sendai, 2019.09(口頭)

潮田亮：ストレス応答としての小胞体レドックスシフト. 第14回小胞体ストレス研究会、岡山市、2019.09.26-27(口頭)

藤井唱平、潮田亮、永田和宏：IP3受容体のレドックス依存的なチャネル活性制御機構の解明. 第14回小胞体ストレス研究会、岡山市、2019.09.26-27(口頭)

山下龍志、潮田亮、永田和宏：小胞体ゴルジ体間におけるレドックス環境のクロストーク. 第2回オルガネラゾ

ン若手の会、2019.11.25 (若手優秀発表賞)

伊藤進也、永田和宏：細胞におけるコラーゲンとその特異的分子シャペロン Hsp47 の相互作用の解析.

第42回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06  
葛西綾乃、伊藤進也、永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の新規発現調節領域の探索. 第42回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06

Riyuji Yamashita Ryo Ushioda Kazuhiro Nagata : Redox-crosstalk between ER and Golgi apparatus. 第42回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06 (口頭)

亀井亮太、伊藤進也、永田和宏：脂肪組織における分子シャペロン Hsp47 の役割. 第42回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 A

課題名：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：膜輸送を介したオルガネラ恒常性維持と細胞機能制御、共同研究者：永田和宏 (研究代表者：遠藤斗志也)、取得年度：2019-2021年

資生堂、研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2020年

大塚製薬、研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2019年

バイエル薬品、研究代表者：永田和宏、取得年度：2018-2019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・ゾーンの解説」

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：2019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

### 3) 学外活動

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「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：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「マルチモードオートファジー：多彩な経路が織り成す自己分解系の理解」外部評価委員  
永田和宏：リアル・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：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」運営委員会委員長  
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  
永田和宏：日本医療研究開発機構(AMED) プロテオスタシス、プログラムスーパーバイザー

### 4) 受賞等

永田和宏：瑞宝中綬章受章  
潮田亮：2019年度日本生化学会 奨励賞受賞  
Kaiku Uegaki：EMBO workshop “Protein quality control: From mechanisms to disease” Poster award, 2019.04.28.05.03  
藤井唱平：第92回日本生化学会大会 若手優秀発表賞受賞、2019.09.18-20  
山下龍志：第2回オルガネラブーン若手の会 優秀発表賞受賞、2019.11.25

### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

伊藤研究助教は、Hsp47 阻害剤の発明者であり、進行中の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) で中心となって、プロジェクトを牽引している。当研究室で同定され、これまで長年研究してきた Hsp47 は肝硬変などの線維化疾患の有望な分子標的である。伊藤助教は Hsp47 を阻害する化合物を同定し、製薬会社との共同研究に発展させた。さらに AMED のプログラムに採択され、臨床応用に向け、よりよい化合物の探索を行っている。基礎研究が応用研究に展開していく事例を学生に示すことで、基礎研究の重要性と研究成果の社会への波及効果を学生に伝え、学生自身の研究に向かう姿勢により影響を与えている。さらに、製薬会社の研究員との研究のディスカッション等を教室内にもフィードバックさせており、教育効果は極めて高いものとなった。



潮田研ホームページ  
<https://ushioda-lab.com/>



# 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

「哺乳類ボルナウイルス 1 型持続感染マウスにおけるコルチコステロン投与の影響」

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、ウイルス感染後期のマウスにおける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。



5 週齢、オスの C57BL/6N マウス(SLC)に BoDV-1-CRNP5 株を  $4 \times 10^3$ FFU 脳内接種し、感染 24 日目に CORT ペレット(5mg/ペレット)あるいはプラセボペレットを皮下に埋め込んだ。48 日間の観察期間中、感染 0 日目から 4 日毎に体重測定と臨床症状の評価を行い、CORT 投与 8 日目および 24 日目に行動学的試験ならびに脳と胸腺の採材を行い、ウイルス学的、組織学的解析を行った。

CORT 投与により、感染の有無に関わらず胸腺の重量は有意に減少した。感染マウスの体重は CORT 投与の有無に関わらず減少したが、感染マウス群では CORT 投与群の方が体重が増加する傾向が認められた。ボルナ病の臨床症状は、CORT 投与の有無に関わらず感染群が有意に高くなり、CORT 投与による差は認められなかった。脳内ウイルス量は、CORT の有無や感染後日数による有意差は認められなかった。脳の組織学的解析では、投与 8 日目の感染マウス群では CORT 投与により脳炎が有意に軽減したが、24 日目では CORT 投与による差が認められなかった。また感染+CORT 投与群では、8 日目よりも 24 日目の方が脳炎は重篤であった。

以上の結果から、BoDV-1 に持続感染したマウスへの CORT 投与は病状が軽減する傾向が示された。その原因として、脳内ウイルス量ではなく脳炎の軽減が考えられた。このことから、ボルナ病発症における CORT の影響は感染時期で異なることが示唆された。

### 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- $\beta$  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. In this study, we analyzed the effect of CORT in mice during BoDV-1 persistent infection.

Male C57BL/6N mice (SLC) at 5 weeks of age were inoculated with BoDV-1-CRNP5 strain  $4 \times 10^3$ FFU intracerebrally, and CORT pellets (5mg/pellet) or placebo pellets were obtained on day 24 after infection. Implanted under the skin. During the 48-day observation period, body weight was measured, and clinical symptoms were evaluated every 4 days from infection day 0, and behavioral tests and brain and thymus collection were performed on days 8 and 24 of CORT administration, and virus And histological analysis were performed.

CORT administration significantly reduced thymus weight with and without infection. The body weight of infected mice decreased with or without CORT administration, but in the infected mouse group, the body weight tended to increase in the CORT administration group. The clinical symptoms of Borna's disease were significantly higher in the infected group regardless of the presence or absence of CORT administration, and no difference due to CORT administration was observed. The viral load in the brain was not significantly different depending on the presence or absence of CORT and the number of days after infection. Histological analysis of the brain showed that CORT administration significantly reduced encephalitis in the infected mouse group on day 8 of administration, but no difference was observed on day 24 of administration. In the infection + CORT administration group, encephalitis was more serious on the 24th day than on the 8th day.

CORT administration to mice persistently infected with BoDV-1 tended to reduce the condition. The cause was



considered to be the reduction of encephalitis, not the amount of virus in the brain. These results suggest that the effect of CORT on the onset of Borna disease differs depending on the time of infection.

#### 4. 論文, 著書など

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、(2019.2.15) pp.154-155.

#### 5. 学会発表など

西野佳以:ボルナウイルス感染におけるストレスの影響。第4回小動物ウイルス病研究会学術集会(高槻市)2019.8.25

【招待講演】

立花蓮、深田彩人、窪田裕樹、木村享史、西野佳以:Effects of pre-administration of corticosterone on Borna disease virus infection.第67回日本ウイルス学会(東京都)2019.10.29-31

深田彩人、河北尚輝、北村真穂、木戸協恵理、山田泰唯、立花蓮、窪田裕樹、齋藤敏之、西野佳以:Corticosterone induces behavioral abnormality in the mice acute infected with mammalian 1 borna virus.第67回日本ウイルス学会(東京都)2019.10.29-31

#### 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- $\beta$ 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。

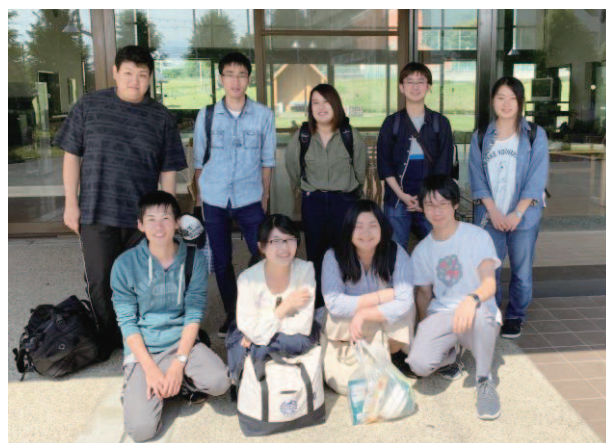
研究代表者:西野佳以、取得年度:H30-R2(3年)

##### 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
- ・獣医事審議会・専門委員
- ・日本学術振興会・特別研究員等審査会専門委員



秋合宿(2019年9月)松の浦セミナーハウスにて

# 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、リボソームの品質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リボソームによる遺伝子発現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、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と、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、リボソームの新機能の解明に挑戦している。

## 2. 本年度の研究成果

(A) 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。Znf598 の生理的役割を解明するため、当研究室で作成したゼブラフィッシュ *znf598* 変異体について、胚発生期の遺伝子発現と表現型を解析した。その結果、*znf598* 変異体では赤血球が減少しており、貧血となっていることが明らかとなった。

(B) tRNA キューオシン修飾酵素 Qtman と Qtgal 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。キューオシンにマンノースあるいはガラクトースを付加する Qtman および Qtgal 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、機能欠損と考えられる変異系統をそれぞれ確立した。

(C) 生体サンプルからリボソームを精製するためのゼブラフィッシュ系統の作成

リボソームの構成因子や修飾状態、あるいは品質を様々な発生時期や組織において生化学的に比較するために、ゼブラフィッシュ胚から簡便かつ迅速にリボソームをアフィニティ精製する方法を構築した。ゲノム編集により内在 Rpl36 の C 末端に Flag タグの挿入を行い、抗 Flag 抗体ビーズによりリボソームを精製できる系統を樹立した。

## 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 quality and its binding factors under different cellular environments.

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

(A) 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 physiological function of Znf598, we have analyzed gene expression profile and phenotype of zebrafish znf598 mutant embryos. We found that erythrocytes were reduced in znf598 mutant embryos.

#### (B) Establishment of a zebrafish mutant for tRNA modification enzyme Qtman and Qtgal

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. By using CRISPR-Cas9, we generated zebrafish mutants for Qtman and Qtgal, which attach mannose and galactose to queuosine, respectively.

#### (C) Establishment of a zebrafish strain for the purification of ribosomes

In order to biochemically analyze the components, modifications, and quality of ribosomes in various developmental stages and tissues, we have developed a simple and rapid method for affinity purification of ribosomes from zebrafish embryos. We inserted a Flag tag at the C-terminus of the endogenous Rpl36 by genome editing and established a line that allows ribosome purification by anti-Flag antibody beads.

## 4. 論文, 著書など

三嶋雄一郎: 遺伝暗号による遺伝子発現制御 **生体の科学** (医学書院) (2019) 70, 2, 162-167(総説)

## 5. 学会発表など

Y. Mishima: Codon-mediated mRNA decay in zebrafish embryos. The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, 吹田市, 2019.2.1-2

Y. Mishima, S. Kimura, S. Iwasaki: Defining codon-mediated mRNA decay and No-go decay in zebrafish embryos. EMBL meeting Protein synthesis and Translational Control, Heidelberg, 2019.9.4-7

三嶋雄一郎: 個体発生過程におけるリボソーム品質管理因子 Znf598の生理機能 東北大学大学院薬学研究科, 仙台市, 2019.11.15(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(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・挑戦的研究(萌芽)

課題名: 自由自在な遺伝子発現を実現する転写ナノチップの創成

研究代表者: 多田 限 尚史 取得年度: R1-R2年 (2年)

稲盛財団 研究助成

課題名: 遺伝暗号に隠された mRNA 安定性コードの包括的研究

研究代表者: 三嶋雄一郎 取得年度: R1-R2年 (2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

### 4) 受賞等 なし

### 5) その他 なし



研究室の様子(2019年4月)



研究室のメンバー(2019年11月)

# 植物生理学研究室

Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry

## 1. 研究概要

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

植物の大きな特徴のひとつに光合成がある。高等植物の光合成は葉緑体と呼ばれる複数の膜系からなる形態的にも複雑なオルガネラで進行し、CO<sub>2</sub>固定が行われる。植物にとって光合成は非常に重要な機能であるため、様々な制御機構を備えている。私たちはこの中でも高等植物葉緑体におけるレドックス制御機構について、その生理機能と分子メカニズムの解明を目指し、研究を行っている。

葉緑体のレドックス制御機構では、チオレドキシン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。チオレドキシン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ン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ンは、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ン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、チオレドキシン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ンファミリータンパク質が植物葉緑体内でどのように使い分けられているのか、その分子機構、生理学的意義を明らかにする。

### 2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

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

教授 本橋 健

Prof. Ken MOTOHASHI, Ph. D.



研究助教 桶川 友季

Assist. Prof. Yuki OKEGAWA, Ph. D.

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ン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、チオレドキシン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* 型チオレドキシンの生理機能

葉緑体のチオレドキシンは、光合成の際に CO<sub>2</sub> 固定を担うカルビンサイクルの酵素を活性化することが知られている。また、植物の葉緑体には非常に多くの種類のチオレドキシ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。私たちが作成した *m* 型チオレドキシを欠失した植物体では、SBPase を含む重要なカルビンサイクル酵素の活性化が効率良く行われぬ。 *in vivo* においては、カルビンサイクル酵素の活性化に、*m* 型チオレドキシが重要な役割を果たしていると考えられる。

また、*m* 型チオレドキシ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* 型チオレドキシの制御機構の關係に注目し研究を進めている。



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

## 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 クローニング法が普及している。私たちはシームレスクローニングを簡便に、かつ安価に行うために、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シームレスクローニングを行う方法を確立した。この方法は、研究室で使用している大腸菌株(JM109, DH5 $\alpha$ など)から粗抽出液を調製し、15-19 bp の相同塩基配列を付加した DNA 断片とベクターを混合し、37°C, 15 分間保温するだけで効率よくシームレス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。

また、遺伝子工学技術を用いて研究を行う際には、アガロースゲル電気泳動を用いて DNA を分析する。従来、アガロースゲル電気泳動では、DNA をエチジウムブロマイドと呼ばれる試薬で染色し、紫外線を照射することによって可視化してきた。この実験系は安価で、感度が高いことがメリットであるが、エチジウムブロマイドの毒性と、紫外線を用いることによる DNA 損傷が問題となってきた。近年は、代替 DNA 染色試薬が開発されているが、試薬ごとに検出するための光学系(励起光、検出システム)が異なり、不便であった。私たちは、市販の LED ライト、ブラックライトなどを用いて、これらの代替 DNA 染色試薬を簡便に、かつ安価に検出するシステムを開発した。また、開発したシステムは光学系の変更が容易であり、様々な DNA 染色試薬を用いた実験系で、迅速にその光学系を変更することができる柔軟性も併せ持つため、汎用性も高い。

## 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.

Moreover, we developed a highly sensitive and low-cost DNA agarose gel detection systems, using

non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents. The DNA detection system that used Midori Green Direct and Safelock Load-Green, with a cyan LED light (~490 nm), could detect DNA-fragments at the same sensitivity to that of the UV-transilluminator system combined with ethidium bromide. The cyan LED system can be also applied to SYBR Safe that is widely used as a non-toxic dye for post-DNA-staining. Another DNA-detection system excited by black light was also developed. Black light used in this system had a peak emission at 360 nm and caused less damage to DNA due to lower energy of UV rays with longer wavelength when compared to those of short UV rays.

#### 4. 論文, 著書など

Takatashi Sekiguchi, Keisuke Yoshida, Yuki Okegawa, Ken Motohashi, Ken-ichi Wakabayashi, Toru Hisabori\*: Chloroplast ATP synthase is reduced by both f-type and m-type thioredoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 148261 (2020)

Ken Motohashi\*: A simple and fast manual centrifuge to spin solutions in 96-wellPCR plates. *Methods Protoc.* 3, 41 (2020)

本橋健\*: PCRクローニングのための高効率ベクターとその利用法. *実験医学* 37, 3141-3149 (2019)

Ken Motohashi\*: Development of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis detection systems, and evaluation of non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents. *PLOS ONE* 14, e0222209 (2019)

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

#### 5. 学会発表など

関口敬俊, 吉田啓亮, 桶川友季, 本橋健, 若林憲一, 久堀徹: チオレドキシンによる葉緑体 ATP 合成酵素の還元分子機構 日本植物学会第 84 回大会, オンライン, 2020.9.19-21

天野瑠美, 桃井理沙, 小俣恵美, 中原大河, 上ノ山華織, 小嶋美紀子, 池松朱夏, 桶川友季, 坂本智昭, 榎原 均, 本橋健, 木村成介: アブラナ科 *Rorippa aquatica* にみられる葉片からの新しい個体の再生は葉片の生存能力によって支えられている 日本植物学会第 84 回大会, オンライン, 2020.9.19-21

桶川友季: Regulation mechanism of Photosystem I cyclic electron transport 日本植物学会第 84 回大会, オンライン, 2020.9.19-21

本橋健: 高感度かつ低コストな DNA アガロースゲル電気泳動検出システムの開発 第 93 回生化学会大会, オンライン, 2020.9.14-16

千田啓貴, 大井崇生, 本橋健, 桶川友季, 厚沢季美江, 金子康子, 谷口光隆: NAD-ME 型 C4 植物シコクビエの維管束鞘葉緑体における Rubisco とデンブンの対極的な偏在 日本作物学会第 249 回講演会, つくば市, 2020.3.26-27

桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナのチオレドキシン *m4* (Trx *m4*) は PGR5/PGRL1 依存の光化学系 I サイクリック電子伝達を制御する 第 61 回日本植物生理学会年会, 大阪市, 2020.3.19-21

関口敬俊, 吉田啓亮, 桶川友季, 本橋健, 若林憲一, 久堀徹: 葉緑体 ATP 合成酵素の還元機構の解明 第 61 回日本植物生理学会年会, 大阪市, 2020.3.19-21

Yuki Okegawa: Regulation of PSI cyclic electron transport by the m-type thioredoxin. RIIS International Symposium, Photosynthesis Research for the Future, Okayama, 2019.11.19-20

Yuki Okegawa, Ken Motohashi: The m-type thioredoxin regulates PSI cyclic electron transport 日米二国間セミナー, 京都市, 2019.10.1-3

本橋健: 効率の高い PCR クローニング用ベクターの開発とその応用 第 92 回日本生化学会大会, 横浜市, 2019.9.18-20

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 クロー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*型チオレドキシンは光化学系 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, 名古屋市, 2019.3.13-15

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業研究

課題名: 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)

発酵研究所 (一般研究助成)

課題名: 微生物のもつシームレスクローニング活性を利用した新規シームレス DNA クローニングシステムの開発

研究代表者: 本橋健, 取得年度: R1-2 年 (2 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: チオレドキシンによる光化学系 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: R1-2 年 (2 年)

2) 学外活動 本橋健:日本光合成学会常任幹事、および日本光合成学会年会準備委員長

3) その他 第 10 回日本光合成学会年会およびシンポジウム(2020.5.25-26, 参加者 200 名)を本学へ誘致し、大会準備委員長として、年会・シンポジウムの準備・開催を行った。

## 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命資源環境学実験Ⅱ、科学英語Ⅱを担当した。これらの各科目を教員 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・実験指導を細かな点まで行える体制となっている。



研究室集合写真(2019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F<sub>1</sub>品種の重要性が急速に増大している。たとえば20世紀後半の世界的な「緑の革命」を推進した原動力の1つは、トウモロコシにおけるF<sub>1</sub>品種の急速な普及であった。このような高い育種効果を有するF<sub>1</sub>育種においては、確実かつ効率的にF<sub>1</sub>種子を採種することが極めて重要な意味を持つ。効率的なF<sub>1</sub>採種を可能にする植物の遺伝的特性として細胞質雄性不稔性があり、実際にこの特性が多く作物のF<sub>1</sub>育種で利用されている。細胞質雄性不稔性はミトコンドリアゲノム上の遺伝子によって誘起される。その一方で、多くの場合核内にこの雄性不稔に対する稔性回復遺伝子が存在し、雄性不稔が表現型として最終的に発現するかどうかは、ミトコンドリアの遺伝子と核の稔性回復遺伝子の相互作用によって決定される。

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

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

このような研究成果を踏まえて、さらに雄性不稔-稔性回復系における遺伝子の分化と進化、細胞質置換および細胞融合による新しい雄性不稔性の実用的開発の両面で研究を進めている。

### 1) ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の分化

我々の一連の研究によって、アブラナ科作物の育種において高い実用性を持つオグラ型雄性不稔遺伝子の起源と分化が明らかにされた。一方、これに対する稔性回復遺伝子も、野生、栽培ダイコンにおいて多様に分化していることが示されている。

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

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

### 3) 細胞質置換によるダイコンとナスの雄性不稔の開発

宇都宮大学および野菜茶業研究所との共同研究で、ダイコンとアブラナ科野生種との属間雑種並びにナスとナス属野生植物との種間雑種に由来する雄性不稔系統について、雄性不稔化のメカニズムを解明した。雄性不稔個体で特異的に発現するミトコンドリア遺伝子を明らかにすることにより、雄性不稔の原因遺伝子を特定した。さらに細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子の作用機作を明らかにすることを目的に研究を開始した。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の分布

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

オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子としては、*orf138*の翻訳を抑制する*orf687*と、転写産物を修飾する*Rft*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、*Rft*が*orf687*より多くの品種に存在することは注目される。現在、各品種の実際の花粉稔性を調査している。



2) シロイヌナズナを用いた細胞融合による新しい細胞質雄性不稔の開発

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

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

BC<sub>6</sub>世代の不稔個体には、花卉を持つものと花卉が退化したものの2つのタイプが観察された。このうち、花卉が退化した雄性不稔個体を母本にして、カイランの戻し交雑によって世代を進めた。その結果、BC<sub>8</sub>世代において全個体が花卉を持たない雄性不稔性を示し、この特性が固定した。さらに戻し交雑を重ねたところ、BC<sub>9</sub>世代、BC<sub>10</sub>世代においても全個体が同様の特性を示した。この雄性不稔は、シロイヌナズナとキャベツの間で雑種化したミトコンドリアの構造が原因で発現しているものと推定される。そこで現在、BC<sub>10</sub>世代の個体を用いて、この雄性不稔を誘起するミトコンドリアゲノム内の遺伝子を詳しく調べている。

一方、体細胞雑種に由来する後代の種子稔性は、世代が進むにつれて向上した。BC<sub>8</sub>世代とカイランとの交雑によるサヤ当たりの種子形成数は、母本とした個体によって、3.8 または 5.7 であったのに対して、BC<sub>10</sub>世代を母本とした場合には、サヤ当たりの種子形成数が平均10.7と約2倍以上に増加した。

3) 細胞質置換によるダイコンとナスの雄性不稔の開発

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

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

4) その他

*Brassica* 属の作物のうち、*B. rapa* (Aゲノム種) においては、種内に種皮型の分化が存在することが知られている。この

種皮型の種内分化のメカニズムを解明するためにミズナ (A型種皮) とノザワナ (B型種皮) の交雑後代を用いて、種皮型の DNA マーカーを開発した。それとともに、種皮型に関する遺伝子が座乗する染色体を決定し、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種類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か所の一塩基置換 (SNP) が存在した。これら2作物のミトコンドリアの塩基配列情報は DDBJ に登録された (AP017996, AP017997)。この結果、2011年に示された *B. rapa* のミトコンドリアゲノムの塩基配列 (JF920285) は誤りであることが明らかになった。発見された SNP について、*B. rapa* と *B. juncea* の種内における分布を調査した結果から、*B. rapa* の栽培化は2回以上起こったこと、*B. rapa* を細胞質親とした *B. nigra* との種間交雑および *B. juncea* の栽培化も2回以上起こったことが判明した。

### 3. Research projects and annual reports

In the field of plant breeding, F<sub>1</sub> hybrids have many genetic advantages and contribute to the increase of worldwide crop production. For the efficient and stable F<sub>1</sub> hybrid production, cytoplasmic male sterility (CMS) is the most useful genetic characteristic. Besides the practical importance of the CMS, it is useful to study the interactions between nuclear genes and mitochondrial ones from scientific view points, especially for molecular and evolutionary genetics. Thus, we have been studying the CMS of various plants both in order to know the evolutionary processes and to exploit new breeding materials.

1) Ogura CMS and its fertility restoring genes.

Ogura CMS found in a Japanese radish is the most important one in Cruciferous plants, being used worldwide. We have been studying the distributions and differentiations of Ogura CMS gene, *orf138*. Whereas, we found that various wild and cultivated radishes possess fertility restoring genes for Ogura CMS. Hitherto, two fertility restoring genes were known. One is *orf687* in a Chinese variety, and another is *Rft* distributed in Japanese wild radishes. We observed that a European radish cultivar has a fertility restoring gene different from both of *orf687* and *Rft*. We examined the distribution of *orf138* and its type in F<sub>1</sub> varieties cultivated in

Japan. We also studied the differentiation of fertility restoring genes in radish.

#### 2) New male sterile plants derived from the cell fusion.

We obtained somatic hybrids showing male sterility between *Arabidopsis thaliana* and cabbage varieties (*Brassica oleracea*). Progenies of the somatic hybrids were produced by successive back-crosses with *B. oleracea*. So far, the pollen fertility was investigated in the BC<sub>6</sub> progenies. The BC<sub>6</sub> progenies were segregated into completely male sterile plants and partially fertile plants. However, all the BC<sub>6</sub> progeny plants had the identical structure of mitochondrial genome. By further back-crosses, BC<sub>8</sub> generation was fixed to be male sterile without anthers and petals. This type of sterility was also observed in all the plants of BC<sub>9</sub> and BC<sub>10</sub> generations. While, seed fertility with the back-crosses increased in the later generations.

#### 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

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 eruroides* and *Sinapis* species

Akihito Mukai, Megumi Jikuya, Mai Tsujimura, Toru Terachi and Hiroshi Yamagishi. 2019.

Plant Breeding. 138: 614-623

Mitochondrial *orf463* causing male sterility in radish is possessed by cultivars belonging to the 'Niger' group.

Hiroshi Yamagishi, Yoshiyuki Tanaka, Shiori Shiiba, Ayako Hashimoto, Asumi Fukunaga, Terachi, T. 2019.

Euphytica 215: 109.

アブラナ科植物における雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の複雑な対応関係

山岸 博. 2019.

京都産業大学先端科学技術研究所所報 18: 1-12.

総合生命科学部における理工系コーオプ教育プログラムの実践.

木村 成介, 中沢 正江, 増永 滋生, 穂崎 良典, 山岸 博. 2020.

高等教育フォーラム 10: 65-74.

### 5. 学会発表など

山岸 博, 橋本 絢子, 福永 明日美, 寺地 徹: *Brassica maurorum* および *Moricandia arvensis* における細胞質雄性不稔遺伝子の変異. 日本育種学会第136回講演会, 奈良市, 2019.9.6-7

山岸 博, 橋本 絢子, 福永 明日美, 寺地 徹: 野生種と栽培種の交雑F<sub>2</sub>における雄性不稔ダイコンとクロダイコンの出現. 日本育種学会第137回講演会, 東京都 文京区, 2020.3.28-29

山岸 博: 京都市北部の景観とスグキナ栽培. 京都産業大学 日本文化研究所月例研究会, 京都市, 2019.12.11

### 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  
科学研究費助成事業 審査委員



# 膜エネルギー代謝分野

Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism



教授 横山 謙

Prof. Ken Yokoyama, Ph.D

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、生物が運動することや、生体分子の合成、分解、輸送などに使われる。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。研究対象を、ATP 動態を司る ATP チャネルや ATP 受容体、ATP 輸送体に広げ、ATP 動態を原子レベルで明らかにすることを目的とする。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) $V_0$ 部分の構造の決定

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。今回、我々は、大阪大学にある自動撮影

装置を備えた Titan Krios (FEI)により、V-ATPase のVo部分の構造を原子分解能で決定することができた。親水性であるVi部分部分が脱離し、残されたVo部分でのプロトンの漏洩がなんらかの機構で妨げられていることが予想されていた。今回の研究成果により、プロトンの漏洩阻害が、親水的な腕部分の大きな構造変化による回転阻害によって起こることが明らかになった。このような機械的な活性調節機構をタンパク質が備えているのは驚きであり、いかに精緻で精巧な仕組みでタンパク質が生命を支えているかを改めて認識できた。この成果は、来年度には論文として発表される予定である。

2) 麻酔作用と ATP 濃度変化の関係

ミトコンドリア呼吸鎖複合体は様々な生命活動に必要とされるアデノシン三リン酸 (ATP) を合成する重要な機能を担っているが、一方で薬理的、遺伝学的に呼吸鎖複合体の活性を下げると線虫の寿命が延びるという報告がある。そこで私達は、MASC アッセイという方法を用いて 2500 種類の既存薬の中からミトコンドリアの ATP 合成に対する阻害薬の探索を行い、それらが線虫の寿命に影響を与えるかどうか調べた。その結果、哺乳細胞において 2500 種類の既存薬の中から 8 個の ATP 合成阻害剤を見つけた (図 1A)。さらに、これら 8 個の薬剤が線虫でも ATP 量を減らすことを明らかにした (図 1B)。

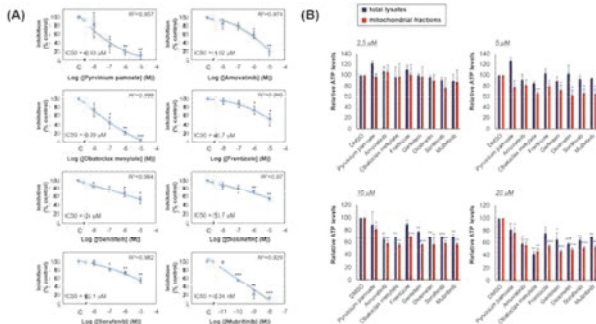


図 1 (A) 哺乳細胞における ATP 合成活性の低下と (B) 線虫における ATP 量の減少

そして、寿命測定により 8 個の ATP 合成阻害剤は線虫の寿命を延ばすことが分かった (図 2)

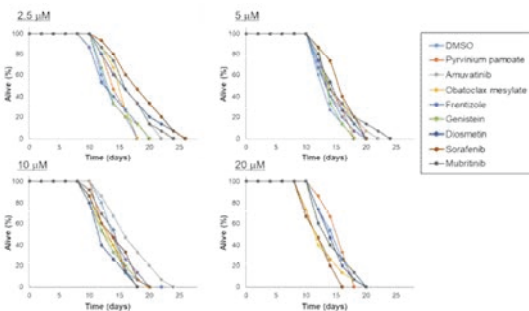


図 2 ATP 合成阻害剤は線虫の寿命を延ばす

3. Research projects and annual reports

Energy is necessary to sustain life. Bioenergetics is an important scientific field, whose aim is how life changes energy into a form that is easy to use and how it is used. ATP, the energy currency of life, is synthesized by ATP synthase, which exists in mitochondria or in bacterial plasma membranes. The produced ATP is used in variety of biological processes, such as muscle contraction, the synthesis and degradation of biomolecules. For example, the vacuolar proton ATPase (V-ATPase) uses ATP to transport ions into vesicles which are responsible for various physiological phenomena through its acidification. How molecular machines made up of tiny proteins converts the energy of ATP into transport and motion is a very interesting question and one that needs to be solved in the life sciences. To understand the mechanism of these molecular machines, we need to see its movement and shape. For this purpose, we have used single-molecule rotation observation and structural biology with cryo-electron microscopy. Our final goal is to clarify and describe how living organism transform and use energy to live.

On the other hand, the process by which life utilizes energy is likely related to aging and age-related diseases. Several enzymes involved in energy metabolism are reported to be involved in life-span altering genes, and the amount of energy intake itself determines lifespan. We have started to study the relationship between the intracellular concentration of ATP, the energy currency, and lifespan using molecular imaging techniques. The results revealed a close relationship between aging, anesthetic effects, and metabolic control and ATP levels in the individual. Thus, we are addressing the issues of aging, lifespan and disease from the perspective of bioenergetics.

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 2019

1) Structure of the Vo domain of V/A-ATPase

Single particle analysis using cryo-EM is one of the most powerful methods for protein structure determination. With the advent of direct electron detectors and the development of

analytical techniques, we can easily determine the structure of protein molecules, sometimes with near atomic resolution. In this study, we have determined the structure of the Vo part of V-ATPase at atomic resolution using Titan Krios (FEI), which is equipped with an automated imaging system at Osaka University. The hydrophilic V<sub>1</sub> part of V-ATPase has been desorbed, and the leakage of protons from the remaining Vo part of V-ATPase was expected to be somehow prevented. The results of the present study reveal that the inhibition of proton leakage is caused by a large structural change in the hydrophilic arm, which inhibits rotation. These results will be published in the next year. CryoEM structure of V type ATP synthase .

## **2) Relationship between anesthetic action and ATP concentration change**

The mitochondrial respiratory chain complex plays an important role in the synthesis of adenosine triphosphate (ATP), which is required for various biological activities, but it has been reported that pharmacologically and genetically decreasing the activity of the mitochondrial respiratory chain complex prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Therefore, we used the MASC assay to search for inhibitors of mitochondrial ATP synthesis among 2,500 existing drugs to determine whether they affect the lifespan of *C. elegans*. As a result, we found 8 inhibitors of ATP synthesis among 2500 existing drugs in mammalian cells (Figure 1A). Furthermore, we found that these eight drugs also reduced ATP levels in *C. elegans*.

### **4. 発表、著書など**

1. Nakanishi Atsuko, Kishikawa Jun-ichi, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken Cryo-EM studies of the rotary H<sup>+</sup>-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. (2019) *Biophysics and Physicobiology* 140-146

### **5. 学会発表など**

招待講演、シンポジウム等

1. 中西温子、岸川淳一、玉腰雅忠、光岡薫、横山謙 “Nanodisc に再構成した好熱菌由来 V-ATPase の単粒子解析” 生理研研究会 岡崎市 11/2019

学会発表

1. 古田綾、岸川淳一、中西温子、光岡薫、横山謙 “好熱菌 V/A-ATPase のヌクレオチドフリー構造の解析” 第 45 回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表
2. 岸川淳一、中西温子、古田綾、加藤貴之、光岡薫、横山謙 “好熱菌 V 型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイ

ン Vo の構造解析” 第 45 回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表

3. 三谷奈穂、中野敦樹、岸川淳一、横山謙 “キメラ軸を持つ V1-ATPase の 1 分子解析” 第 45 回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 ポスター発表
4. 中西温子、岸川淳一、玉腰雅忠、光岡薫、横山謙 “Single-particle analysis of lipid nanodisc-reconstituted V-ATPase from *Thermus thermophilus*” 第 57 回日本生物物理学会 宮崎市 9/2019
5. 岸川淳一、加藤 貴之、古田 綾、中西 温子、光岡 薫、横山 謙 V 型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイン Vo の単粒子解析 Single particle analysis of membrane Vo domain of V type ATP synthase 蛋白質科学会年会 6/2019 神戸ポートアイランド

## **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 特定研究助成

課題名：オルガネラと細胞間をつなぐ膜輸送を介した細胞恒常性維持機構の解明  
共同研究者：横山 謙 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

古田綾（修士 2 年生）さんが日本生体エネルギー研究会討論会で優秀発表賞を受賞

### 5) その他

科学研究費審査委員、論文査読 3 件

岸川淳一研究助教が大阪大学蛋白質研究所に助教として赴任した。

# 産業生命科学科

## 産業生命科学科

### 【研究】

産業生命科学科では、現代社会が抱える生命科学にかかわる問題を、医療・健康、食料・資源、環境・生態の3つの領域に集約し、それぞれの領域に関連した研究を進めている。具体的には、医療・健康の領域では受精・発生の分子機構、脳の神経回路の機能と役割、人獣共通感染症の原因菌やウイルスの病原性と分布、食料・資源の領域では遺伝・育種学を応用した生命資源の利用と開発、環境・生態の領域では植物の環境応答、地域社会や企業・自治体との連携による環境保全、希少動物の保全などをテーマとして掲げて研究活動を展開している。また、研究成果の実社会への発信と普及について方法論の研究を進めていることも当学科の特徴である。各教員の研究対象は、図に示すようにモデル動物、野生動物、作物、家畜、環境保全の対象となる地域社会など多岐にわたり、さらに研究の視点もミクロからマクロまで多様である。これらの教員が学科内で交流を持ちながら、個々の視野の裾野を広げて研究を推進できる環境が整っている。人類が直面する課題に対して、生命科学に基づく解決策を提示するとともに実社会への研究成果の発信と普及の実現を通じて貢献することを目指している。



## 【教育】

下表は、産業生命科学科の専任教員が担当する主な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。1年次終了時に学生は、「医療と健康コース」、「食と農コース」、「環境と社会コース」のいずれかのコースを選択し、2年次以降は選択したコースに配置された科目を中心に受講する。幅広い知識と視野を身に付けるために、選択したコース以外のコースに配置された専門科目も受講できるように配慮されている。また、生命科学と実社会とのつながりを体験するために、生命科学PBL1、2および生命科学インターンシップを開講していることは当学科のカリキュラムの特徴である。学生は3年の秋 semester の産業生命科学特別研究1から各教員の研究室へ分属し、最終年度には、産業生命科学特別研究2で本格的な卒業研究に取り組む。卒業後は、食品、製薬、バイオ関連企業、公務員、学芸員などへの就職に加えて大学院への進学も見込んでいる。

科目名	配当学年	担当教員	科目名	配当学年	担当教員
フレッシュャーズセミナー	1	学科全教員	生物の基礎	1	染谷
生物学通論A	1	前田	化学の基礎	1	前田
生物学通論B	1	野村	生物数学	1	野村
化学通論A	1	浜	産業生命科学演習1	1	染谷
化学通論B	1	佐藤	産業生命科学演習2	1	浜
生命科学概論	1	河邊、白鳥、野村	生命科学リテラシー	1	佐藤
物質生物化学	1	浜			
産業生命科学英語1	2	川上、三瓶	農学概論	2	三瓶
産業生命科学演習3	2	寺地	農業生物学	2	寺地、野村
生物学実験	2	木村、佐藤、浜	里山生態学	2	三瓶
化学実験	2	染谷、(老田)	地域環境論	2	西田
発生生物学	2	佐藤	食料資源学1	2	寺地
生命倫理	2	前田	環境生態学1	2	木村
生命医科学1	2	佐藤	微生物学	2	染谷
サイエンスコミュニケーション	2	川上	バイオイノベーション	2	川上
日常生活と生命科学	2	木村、染谷、浜、前田	食農文化・政策	2	西田
遺伝学	2	寺地	環境経済学	2	西田
創業医療ビジネス	2	川上	生命科学PBL1	2	三瓶、西田
健康・医療概論	2	川上	サイエンスキャリアプランニングセミナー	2	川上、木村、佐藤
食料資源学2	3	寺地、野村	アグリビジネス論	3	三瓶
公衆衛生学	3	前田	生命科学PBL2	3	木村、三瓶、西田
保全生物学	3	野村	生命科学インターンシップ	3	川上、西田
産業生命科学英語2	3	川上、西田	産業生命科学特別研究1	3	学科全教員
現代社会と生命科学	3	佐藤、寺地、野村	産業生命科学特別研究2	4	学科全教員



以下 総合生命科学部 令和元年度実施科目

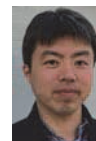
科目名	配当学年	担当教員	科目名	配当学年	担当教員
生命システム英語購読Ⅰ	2	佐藤	生命資源環境学実験・演習Ⅰ	2	寺地、野村
科学英語Ⅰ	2	染谷	動物育種学	2	野村
基礎生態学	2	木村	基礎遺伝学	2	寺地
生命システム実習Ⅰ	2	佐藤、浜	微生物学Ⅰ	2	染谷
生命システム英語購読Ⅲ	3	浜	環境応答学	3	木村
生命資源環境学実験・演習Ⅱ	3	木村	保全遺伝学	3	野村
神経生物学	3	浜	植物分子遺伝学	3	寺地
腫瘍細胞生物学	3	佐藤	微生物学・公衆衛生学実習	3	染谷、前田
基礎特別研究	3	木村、佐藤、染谷、寺地、野村、浜、前田	公衆衛生学	3	前田
応用特別研究1・2	4	木村、佐藤、染谷、寺地、野村、浜、前田			

## 生命文化学研究室

Laboratory of science communication and education

准教授 川上雅弘

Associate Prof. Masahiro Kawakami, Ph.D.



### 1. 研究概要

生命科学は、生命現象の理解を通して医療技術の向上や食物生産などに寄与するに留まらず、新たな生命観や社会的課題もうみだしている。本研究室では、生命科学の社会的文化的側面に着目し、生命科学と社会の接点で生じる現象や課題を対象に、科学コミュニケーション、科学教育、科学技術ガバナンスの観点から研究を行う。

#### (1) 生命科学の利活用に関する教育の研究

ゲノム科学の発展は、治癒困難だった病気の診断や治療法開発に留まらず、個人の遺伝子検査による病気の予見をも可能としている。このような技術が広がる社会では「自らの遺伝子を調べること」の科学的・社会的意味を学び、誤解なく利活用する能力が求められる。しかし、日本の中等教育ではDNAや遺伝子、ゲノムの概念理解を扱う一方で、ヒトの遺伝子検査やゲノム医療を学ぶ教育カリキュラムがない。そこで、ゲノム医療の教育に焦点を当て、ゲノム医療の利点だけでなく課題も含めた認識向上と利活用に関する意思決定に資する教育プログラムの開発を行う。

#### (2) 生命科学への市民参加手法の開発

生命科学研究の中でも、特に倫理的・法的・社会的課題(ELSI)の課題への対応が求められ、世代を超えた影響も考えられる、ヒトの生殖細胞を作成する研究やヒト受精卵にゲノム編集を施すような生命科学研究に焦点を当て、これらの研究進展への一般市民の認識や意見抽出、情報共有に資する対話手法の開発を行う。

### 2. 本年度の研究成果

#### (1) 生命科学の利活用に関する教育の研究

前年度までに実施していた「ゲノム医療と生命倫理」をテーマとした教員研修会に利用していた実験キット「DNA鑑定キット(リバネス)」が販売中止となったことと生命科学部に赴任したことから、本年度はこの実験キットの代替教材の開発を行った。また、京都府内の高校教員との意見交換会を開催し、前年度までの教員研修会の取組みや開発中のゲノム医療の教育プログラムに対する意見を得た。

#### (2) 次世代影響のある生命科学の対話手法の開発

計画中の意識調査及び教材開発を念頭に、科学技術と社会の良好で持続可能な関係を目指す「責任ある研

究・イノベーション」の観点からの情報収集を行った。研究者や医療者以外のステークホルダーの意見を取り入れる重要性に関する意見が得られており、調査対象の検討を進める上で有用な情報を得た。

### 3. Research projects and annual reports

Life sciences are not only contributed to improving medical technologies and food production through understanding of life phenomena, but also provide new perspectives on life and social issues. Focusing on the social aspects of life sciences, we will conduct research from the perspectives of science communication, science education, and science and technology governance, targeting on the issues between life sciences and society.

#### (1) Research on education related to genome medicine

While secondary education in Japan deals with conceptual understanding of DNA, genes, and genomes, there is no educational curriculum to learn social aspects like human genetic testing and genome medicine. Therefore, we will develop an educational program that includes awareness of the advantages and issues of genome medicine and practice of decision making when using genetic testing. This year, we developed teaching materials. In addition, we held a meeting to exchange opinions with high school teachers in Kyoto Prefecture and gained opinions about the teacher training sessions up to the previous years.

#### (2) Development of dialogue methods for life science

We will develop a dialogue method for public awareness and information sharing for basic research to produce human germ cells that need to respond to ethical, legal and social issues (ELSI). In this year, we collected information from the perspective of "responsible research and innovation". It will be useful for attitude surveys and development of teaching materials in future.

### 4. 論文、著書など

安積典子, 萩原憲二, 種田将嗣, 川上雅弘, 仲矢史雄, 秋吉博之: 小学校教員免許取得を希望する理科専門以外の学生の科学・技術への関与度、および理科の基本内容の理解度について. 大阪教育大学紀要 総合教育科学. 68, 15-30

沖野舜, 戸部晃久, 中本敦也, 山田祐太郎, 川上雅弘, 木村成介:サイエンスコミュニケーション研究会サングラスの設立と活動. *高等教育フォーラム*, **10**, 75-81

川上雅弘: バイオ系のキャリアデザイナーキャリアを重ねる中での決断ー. *生物工学*, **98(3)**, 135-138

## 5. 学会発表など

川上雅弘: 培養士ならではのコミュニケーションを探る. 第12回 JISARTラボ教育セミナー, 都市センターホテル(東京都千代田区), 2019.7.6

小林朋子, 安田有理, 平沢晃, 吉田晶子, 加納圭, 飯野均, 川上雅弘, 長神風二:ゲノム医療実用化に係る専門的知識・情報の新しい伝え方の開発と実践:ドラマ「知ること、知らないこと」普及活動を通して. 臨床遺伝2019 in Sapporo(第43回日本遺伝カウンセリング学会・第26回日本遺伝子診療学会 合同学術集会), 札幌市教育文化会館(札幌市), 2019.8.2-4

安積典子, 川上雅弘, 山内保典, 仲矢史雄, 萩原憲二, 秋吉博之, 片桐昌直, 井奥加奈, 生田享介, 岡崎純子, 川村三志夫, 神鳥和彦, 種田将嗣, 辻岡強, 任田康夫, 中田博保, 廣谷博史, 堀一繁, 向井康比己, 吉本直弘:課題探究型の教員研修における小学校若手教員の学び—ポスター発表、相互評価、アンケート回答の結果から. 日本科学教育学会第43回年会, 宇都宮大学(宇都宮市), 2019.8.23-25

川上雅弘: 理科教育にELSIをつなぐ試み. 科学コミュニケーション研究会・第63回関西支部勉強会, 京都大学(京都市), 2019.11.6

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤(C)

課題名:「個別支援×集団研修」のハイブリッド型小学校理科指導力向上プログラムの開発

研究分担者:川上雅弘, 取得年度:H29-31年(3年)

科学研究費補助金・基盤(C)

課題名:萌芽的科学技术に関する ELSI を能動的に学ぶことのできるゲーム教材の開発

研究分担者:川上雅弘, 取得年度:H29-R2年(4年)

### 2) 知財権等 なし

### 3) 学外活動

川上雅弘: 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 ゲノム医療実現推進プラットフォーム事業(ゲノム医療研究支援機能)プログラムオフィサー

川上雅弘: 文部科学省 科学技術・学術政策研究所 科学技術予測センター科学技術専門家ネットワーク・専門調査員

### 4) 受賞等 なし

### 5) その他

中川誠人, 川上雅弘: 洛北サイエンスチャレンジ 2019 ライフサイエンス特別セミナー「iPS 細胞のつくりかた」講師, 洛北高校 SSH 事業(高大連携)

川上雅弘: 京都府高等学校文化連盟 第44回全国高等学校総合文化祭自然科学部門出場推薦校選考会審査委員長



居室のある第5研究室棟(2019年4月)



赴任当日の居室(2019年4月), 記録として



制作に関わった学科紹介リーフレット, 裏面(OC等で配布)

# 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.



## 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) *Rorippa aquatica* のゲノム解析

*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ケンシングした。また、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、染色体スケールのス

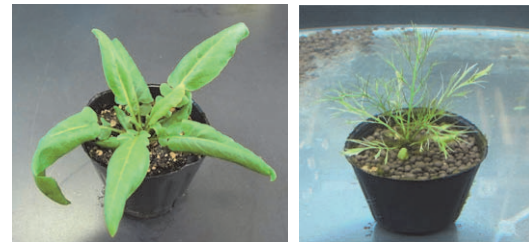


図1 *Rorippa aquatica*

左: 陸上の形態 右: 水中の形態

キャポールドの作成に成功していた。*R. aquatica* の染色体数は  $2n=30$  で、イヌガラシ属植物の多くは  $2n=16$  である。染色体間の配列比較により、*R. aquatica* は異質倍数体で、また、染色体の一部が融合していることが示された。イヌガラシ属植物の2種の雑種から *R. aquatica* が成立したと考えられる。

### (2) 水没による気孔形成の抑制機構の解析

*R. aquatica* は、水没すると葉の形態を大きく変化させるとともに、気孔の形成が抑制される。また、水没後1時間で気孔形成に重要な転写因子である *SPCH* の発現抑制が起こっていることを明らかにしていた。

水没時の光条件などを検討したところ、暗所では水没させても気孔形成は抑制されず、また、青色光のみを当てた場合も気孔形成は抑制されなかった。また、気中条件であっても赤色光を当てると気孔の形成が抑制された。以上の結果から、光質などの光条件が水没の感知に重要であることが示唆された。さまざまな条件における水没後1時間の発現応答をRNA-seq解析で調べたところ、気孔形成の抑制時に発現が変動する転写因子などを同定することができた。*SPCH* の発現制御機構に着目して、これらの因子の役割を明らかにすることで、水没による気孔形成の抑制機構が明らかにできると考えている。

### (3) 水没による葉形の制御機構の解析

*R. aquatica* は、水没や温度の変化、光環境の変化で葉の形態が大きく変化する。水没時のRNA-seq解析により、水没時にはエチレン関係の遺伝子群の発現が変動していることが明らかになった。実際、エチレンを添加すると、葉の形態が水中葉に近くなることから、エチレンが水没応答に関わっているものと考えられた。また、赤色光の照射により、葉の形態が水没葉に近くなることから、光環境も水没の感知に関わっていると示唆された。実際、気中で育ててい

る植物に赤色光を当てると、葉の形態が水中葉に近くなり、また、青色光でその効果は抑制された。以上の結果は、*R. aquatica*が光環境の変動により水没を感知していることを示唆する。

### 3. Research projects and annual reports

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

#### (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 leaf shape using wide range of plant species.

#### (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.

This year, we have performed genomic analysis of *R. aquatica* to understand the mechanism of heterophylly and regeneration. We also analyzed the mechanism of leaf shape change and suppression of stomata development upon submergence.

### 4. 論文, 著書など

Kaoru Okamoto Yoshiyama, Naoki Aoshima, Naoki Takahashi, Tomoaki Sakamoto, Kei Hiruma, Yusuke Saijo, Jun Hidema,

Masaaki Umeda, Seisuke Kimura: SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 acts as a regulator coordinating crosstalk between DNA damage response and immune response. *Plant Molecular Biology* in press

Takashi Ishida, Reira Suzuki, Satoru Nakagami, Takeshi Kuroha, Shingo Sakamoto, Miyuki T. Nakata, Ryusuke Yokoyama, Seisuke Kimura, Nobutaka Mitsuda, Kazuhiko Nishitani, Shinichiro Sawa, Root-knot nematodes modulate cell walls during root-knot formation in Arabidopsis roots. *Journal of Plant Research* in press

Masaya Yamamoto, Shuhei Uji, Tomoyuki Sugiyama, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Toshiya Endo and Shuh-ichi Nishikawa: ERdj3B-mediated quality control maintains anther development at high temperatures. *Plant Physiology* in press

Gaojie Li, Shiqi Hu, Jingjing Yang, Xuyao Zhao, Seisuke Kimura, Elizabeth A. Schultz, Hongwei Hou: Establishment of an Agrobacterium mediated transformation protocol for the detection of cytokinin in the heterophyllous plant *Hygrophila difformis* (Acanthaceae). *Plant Cell Reports* **39**: 737-750

木村成介, 中沢正江, 増永滋生, 穂崎良典, 山岸博: 総合生命科学部における理工系コーオプ教育プログラムの実践. *高等教育フォーラム* **10**: 65-74

沖野舜, 戸部晃久, 中本敦也, 山田祐太郎, 川上雅弘, 木村成介: サイエンスコミュニケーション研究会サングラスの設立と活動. *高等教育フォーラム* **10**: 75-81

中沢正江, 木村成介: 理工系研究室における卒業研究活動にかかる学習効果測定を試み, *高等教育フォーラム* **10**: 83-87

Shigeru Hanamata, Jumpei Sawada, Seijiro Ono, Kazunori Ogawa, Togo Fukunaga, Ken-Ichi Nonomura, Seisuke Kimura, Takamitsu Kurusu, Kazuyuki Kuchitsu: Impact of autophagy on gene expression and tapetal programmed cell death during pollen development in rice. *Frontiers in Plant Science* **11**: 172-1-19

Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Risa Momoi, Emi Omata, Shizuka Gunji, Yumiko Takebayashi, Mikiko Kojima, Shuka Ikematsu, Momoko Ikeuchi, Akira Iwase, Tomoaki Sakamoto, Hiroyuki Kasahara, Hitoshi Sakakibara, Ali Ferjani and Seisuke Kimura: Molecular Basis for Natural Vegetative Propagation via Regeneration in North American Lake Cress, *Rorippa aquatica* (Brassicaceae). *Plant and Cell Physiology* **61**: 353-369

Gholamreza Gohari, Asghar Mohammadi, Ali Akbari, Sima Panahirad, Mohammad Reza Dadpour, Vasileios Fotopoulos and Seisuke Kimura: Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. *Scientific Reports* **10**: 912-1-14

Seiji Takeda, Makiko Yoza, Taisuke Amano, Issei Ohshima, Tomoko Hirano, Masa H. Sato, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura: Comparative transcriptome analysis of galls from four different host plants suggests the molecular mechanism of gall development. *PLOS ONE* **14**: e0223686-1-19

Gaojie Li, Shiqi Hu, Hongwei Hou and Seisuke Kimura: Heterophylly: Phenotypic Plasticity of Leaf Shape in Aquatic and Amphibious Plants. *Plants* **8**: 420-1-13

郡司玄, 天野瑠美, 金子真也, Ferjani Ali, 木村成介: アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の再生能力に注目した栄養生

殖の教材化と授業実践. *生物教育* 60: 137-147

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* 46: 179-186

## 5. 学会発表など

アブラナ科 *Rorippa aquatica* にみられる傷害誘導性の再生メカニズムの解析、天野瑠美、桃井理沙、小俣恵美、中原大河、池松朱夏、坂本智昭、木村成介、第 61 回日本植物生理学会年会、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)、2020.3.19-21

Ab-GALFA 法を用いたヌルデの虫こぶ形成機構の解明、中山拓己、斉藤悠馬、大島一正、鈴木義人、木村成介、松浦恭和、池田陽子、武田征士、平野朋子、佐藤雅彦、第 61 回日本植物生理学会年会、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)、2020.3.19-21

水陸両生アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の水没に応答した迅速な気孔形成抑制のメカニズム、池松朱夏、馬瀬樹志、野口楓子、坂本智昭、木村成介、第 61 回日本植物生理学会年会、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)、2020.3.19-21

*Rorippa aquatica* の栄養繁殖におけるシュート再生機構の解析、小俣恵美、天野瑠美、池松朱夏、桃井理沙、坂本智昭、木村成介、第 61 回日本植物生理学会年会、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)、2020.3.19-21

シロイヌナズナのトマト斑葉細菌病菌に対する耐病性を亢進する、及びジャスモン酸の蓄積を更新する新規植物免疫活性化剤候補化合物群の作用機構の解析、中野正貴、安江啓人、舟橋汰樹、山崎逸平、斉藤優歩、北畑信隆、石賀貴子、石賀康博、安部洋、木村成介、諸橋賢吾、浅見忠男、朽津和幸、第 61 回日本植物生理学会年会、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)、2020.3.19-21

*Rorippa aquatica* 染色体レベルゲノムアセンブリと比較解析、坂本智昭、坂本卓也、松永幸大、木村成介、第 61 回日本植物生理学会年会、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)、2020.3.19-21

*Rorippa aquatica* の再生の研究、木村成介、新学術研究領域植物多能性幹細胞グループミーティング(柿本班、岩瀬班、吉田班、木村班)、大阪大学豊中キャンパス、2019.12.17

環境に応じて変身する植物:*Rorippa aquatica* の異形葉性の研究、木村成介、第 57 回植物バイオテクノロジーシンポジウム「変身する生き物、変身させる生き物」、京都産業大学(京都府)、2019.12.13 (招待講演)

水中への適応形質としての異形葉性と栄養繁殖:非モデル植物のオミクス解析、木村成介、バイオインフォマティクス教育セミナー2019、東京理科大学野田キャンパス(千葉県)、2019.12.19 (招待講演)

細胞脱落における細胞接着の動態の解析、梶田春奈、服部和泉、中井彩香、村田真智子、木村成介、川根公樹、第 42 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡県)、2019.12.3-6

Chromosome level genome assembly of palaeopolyploid plant *Rorippa aquatica*, Tomoaki Sakamoto, Takuya Sakamoto, Sachihiko Matsunaga, Seisuke Kimura, *Frontiers in plant*

environmental response research: local signaling, long-distance communication and memory for developmental plasticity, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya-shi, Aichi, Nov. 18-19, 2019

Developmental analysis of the origin of cauline leaf propagules for vegetative reproduction of *Rorippa aquatica*, Shuka Ikematsu, Ami Sasaki, Rumi Amano, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, *Frontiers in plant environmental response research: local signaling, long-distance communication and memory for developmental plasticity*, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya-shi, Aichi, Nov. 18-19, 2019

The suppression mechanism of stomatal development under submerged condition in *Rorippa aquatica*, Tatsushi Umase, Fuko Noguchi, Shuka Ikematsu, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, *Frontiers in plant environmental response research: local signaling, long-distance communication and memory for developmental plasticity*, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya-shi, Aichi, Nov. 18-19, 2019

Developmental and molecular studies on wound-induced regeneration of *Rorippa aquatica*, Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Risa Momoi, Shizuka Gunji, Yumiko Takebayashi, Shuka Ikematsu, Tomoaki Sakamoto, Hiroyuki Kasahara, Ali Ferjani, Seisuke Kimura, *Frontiers in plant environmental response research: local signaling, long-distance communication and memory for developmental plasticity*, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya-shi, Aichi, Nov. 18-19, 2019

Discovery of a novel meristematic organ on the cauline leaf for natural vegetative reproduction of *Rorippa aquatica*, Shuka Ikematsu, Ami Sasaki, Rumi Amano, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, 新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第 3 回若手の会、熱海ニューフジヤホテル(静岡県熱海市) 2019.10.28-30

Effect of environmental condition on the efficiency of vegetative propagation of *Rorippa aquatica*, 天野瑠美、小俣恵美、中原大河、池松朱夏、坂本智昭、木村成介、新学術領域研究「環境記憶統合」第 5 回若手の会、御殿場高原ホテル(静岡県御殿場市) 2019.9.25-27

Discovery of a novel meristematic organ on the cauline leaf for natural vegetative reproduction of *Rorippa aquatica*, Shuka Ikematsu, Ami Sasaki, Rumi Amano, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, 新学術領域研究「環境記憶統合」第 5 回若手の会、御殿場高原ホテル(静岡県御殿場市) 2019.9.25-27

アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の茎生葉上の新奇分裂組織を用いた栄養繁殖、池松朱夏、佐々木亜美、坂本智昭、木村成介、日本植物学会第 83 回大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2019.9.15-17

京野菜であるミズナとミブナの葉の形の解析および育種の歴史の解明、川勝弥一、坂本智昭、中山北斗、上ノ山華織、矢野健太郎、久保中央、木村成介、日本植物学会第 83 回大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2019.9.15-17

アブラナ科 *Rorippa aquatica* にみられる傷害誘導性の再生機構の解析、天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、小俣恵美、池松朱夏、坂本智昭、木村成介、日本植物学会第 83 回大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2019.9.15-17

水陸両生植物 *Rorippa aquatica* における水没に応答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 83 回大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2019.9.15-17

古倍数性アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の染色体レベルゲノムアセンブリ、坂本智昭、坂本卓也、松永幸大、木村成介、日本植物学会第 83 回大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2019.9.15-17

*Rorippa aquatica* の栄養繁殖に見られるサイトカイニン応答、小俣恵美、天野瑠美、桃井理沙、池松朱夏、榊原均、木村成介、日本植物学会第 83 回大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2019.9.15-17

アブラナ科 *Rorippa aquatica* の栄養繁殖に影響を及ぼす要因、天野瑠美、小俣恵美、中原大河、池松朱夏、坂本智昭、木村成介、日本植物形態学会第 31 回大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2019.9.14

Comprehensive transcriptome analyses of galls from four different host plants suggest common process for gall development, Seiji Takeda, Makiko Yoza, Taisuke Amano, Issei Oshima, Tomoko Hirano, Masa H. Sato, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, The 5 th Joint Symposium on “Basic and Applied Studies of Plant Natural Products for Agriculture and Human Health”, Thaksin University, Songkhla, Thailand, Sep 12, 2019

Molecular mechanism of corolla elongation in Japanese morning glory, A. Shimoki, K. Ohasi, M. Toda, T. Sakamoto, S. Kimura, T. Seiji, The 5 th Joint Symposium on “Basic and Applied Studies of Plant Natural Products for Agriculture and Human Health”, Thaksin University, Songkhla, Thailand, Sep 12, 2019

Classification of Southeast Asian mints based on DNA markers and search for genes involved in biosynthesis of aromatic compounds, Y. Fukui, M. Saito, N. Nakamura, S. Okamoto, S. Sato, T. Sakamoto, S. Kimura, Y. Nakamura, N. Kubo, The 5 th Joint Symposium on “Basic and Applied Studies of Plant Natural Products for Agriculture and Human Health”, Thaksin University, Songkhla, Thailand, Sep 12, 2019

東南アジアのミントの SSR マーカーによる系統解析と機能性香り成分ピペリテノンオキサイドの生合成に関わる遺伝子の探索、福井友梨、齊藤萌子、中村夏野、岡本繁久、佐藤修一、坂本智昭、木村成介、中村考志、久保中央、第 37 回日本植物細胞分子生物学会、京都府立大学(京都府京都市)、2019.9.7-8

理工学部初年次生を対象としたキャリア教育科目の教育的効果に関する研究、松尾智晶、木村成介、松本翔伍、日本キャリアデザイン学会第 16 回研究大会、学習院大学(東京都豊島区)、2019.9.7-8

アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の水中適応に伴う、茎生葉上の新奇分裂組織を用いた栄養繁殖、池松朱夏、佐々木亜美、坂本智昭、木村成介、日本育種学会第 136 回講演会ワークショップ「植物の生殖と環境・ストレス」、近畿大学奈良キャンパス(奈良県奈良市)、2019.9.6 (招待講演)

Defining codon-mediated mRNA decay and No-go decay in zebrafish embryos, Yuichiro Mishima, Seisuke Kimura, Shintaro Iwasaki, EMBO WORKSHOP: Protein Synthesis and Translational Control, EMBL Heidelberg (Heidelberg, Germany), Sep 4-7, 2019

生命科学教育における理工系コーオペ教育プログラムの実践、

木村成介、山岸博、穂崎良典、日本インターンシップ学会第 20 回大会、近畿大学東大阪キャンパス、2019.8.31-9.1

RNA-seq を用いたゴール形成種-非形成種間での転写産物の比較、天野泰輔、Antoine Guiguet、濱谷昭寿、坂本智昭、木村成介、大島一正、日本進化学会第 21 回大会、北海道大学(北海道札幌市)、2019.8.7-10

ROS 生成・耐病性・トランスクリプトーム解析に基づく新規植物免疫活性化化合物の作用機構の解析、中野正貴、北畑信隆、安江啓人、石賀貴子、石賀康博、木村成介、諸橋賢吾、浅見忠雄、朽津和幸、東京理科大学研究推進機構総合研究院アグリ・バイオ工学研究部門公開シンポジウム、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)、2019.7.25

遺伝子と文献から探る水菜と壬生菜の歴史、川勝弥一、坂本智昭、木村成介、東京理科大学研究推進機構総合研究院アグリ・バイオ工学研究部門公開シンポジウム、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)、2019.7.5 (招待講演)

Plant regeneration in nature: Studies on natural vegetative propagation, Seisuke Kimura, International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality, Katahira Campus, Tohoku University (Sendai, Japan), 2019.5.14 (招待講演)

Differential gene expression analysis of *Arabidopsis* seedlings reveals potential involvement of 2-phenylacetic acid in hormone crosstalk, Sam Cook, Seisuke Kimura, Hiroyuki Kasahara, The 23<sup>rd</sup> International Conference on Plant Growth Substances, University Paris-Descartes (Paris, France) June 25-29, 2019

Discovery of a novel meristematic organ on the cauline leaf for natural vegetative reproduction of *Rorippa aquatica*, Shuka Ikematsu, Ami Sasaki, Rumi Amano, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality, Katahira Campus, Tohoku University (Sendai, Japan), May 11-14, 2019

Effect of SOG1 overexpression on DNA damage response in meristematic tissue, Kaoru Okamoto Yoshiyama, Naoki Aoshima, Naoki Takahashi, Tomoaki Sakamoto, Masaaki Umeda, Seisuke Kimura, International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality, Katahira Campus, Tohoku University (Sendai, Japan), May 11-14, 2019

The relationship between phytohormone and plant regeneration in nature in North American lake cress (*Rorippa aquatica*), Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Risa Momoi, Emi Omata, Shizuka Gunji, Yumiko Takebayashi, Tomoaki Sakamoto, Hiroyuki Kasahara, Ali Ferjani, Seisuke Kimura, International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality, Katahira Campus, Tohoku University (Sendai, Japan), May 11-14, 2019

## 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)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

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

研究代表者:木村成介, 取得年度:H27-31年(5年)

- 2) 知財権等 なし
- 3) 学外活動 なし
- 4) 受賞等

研費新学術領域研究「環境記憶統合」第5回若手の会優秀発表賞

第21回日本進化学会年大会 学生ポスター賞優秀賞

- 5) その他

木村成介 International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality, Session 6 Evolutionary Genomics and Stem Cells オーガナイザー, 2019.5.11-14

木村成介 京都・土庄むすびわぎ大学科学体験イベント(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科学体験イベント)オーガナイザー, 2019.6.23

木村成介 教員免許状更新講習(選択領域)講師, 2019.7.26

木村成介 第53回植物バイオテクノロジーシンポジウム「変身する生き物、変身させる生き物」オーガナイザー, 2019.12.13

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, 2019.12.15

木村成介 京都産業大学 RI 実験施設 放射線取扱主任者科

## 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

教育研究活性化支援制度により配属されている研究助教の坂本博士は、バイオインフォマティクスが専門であり、特に次世代シーケンズ解析についてはウエットからドライの解析まで一貫して高い技術を持っている。坂本博士は、その高い技術をもとに大学院生の研究指導だけでなく、基礎特別研究や応用特別研究の指導にもあたっており、学生教育に直接貢献している。また、本年度は、1年生対象の生物学実験、2年生対象の生命資源環境学実験・演習Ⅰ、2年生対象の科学英語Ⅱ、3年生対象の生命資源環境学実験・演習Ⅱを担当した。演習や実験では一人一人の学生への対応が必要であり、また、実験科目は危険をともなう作業も多いので、研究助教のサポートが学生の教育に役に立った。



森林保全活動の様子



環境教育イベントの様子



かみがもラボの様子



卒業研究発表会の様子



# 発生情報ラボ

Laboratory of  
Cell Signaling and Development

## 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(ウロプラキシン III やマップキナーゼなど)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、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に、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、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、に主に取り組んでいる。2019 年度においては主に生命システム学科4年生3名(中川 奏、西川 幹基、森近 雄大)および同3年生3名(人見 真矢、松田 拓真、藤村 健嗣)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にも 2018 年度から本格的に着手し、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取り組んでいる。

## 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* を用いて次の進捗が得られた。

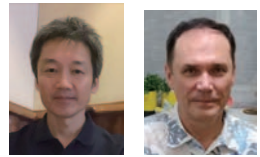
卵巣内にある未成熟卵母細胞は、その直径が一定のレベル(おおよそ 1.0~1.3 mm 以上:ステージ VI という)に達すると、ホルモン依存的な卵成熟と排卵によって成熟卵母細胞となって卵巣から離脱し、輸卵管を通過したのちに体外に放出(産卵)される。この産卵後の成熟卵母細胞をとくに未受精卵という。未受精卵は受精しないまま十数時間が経過すると、やがて自律的なメカニズムによって停止状態にあった細胞周期(第二減数分裂中

教授 佐藤 賢一

Prof. Ken-ichi Sato, Ph.D.

研究員 トクマコフアレクサンデル

Senior Investigator: Alexander Tokmakov, Ph.D.



期)を再駆動させて減数分裂を完了するとともに、カスパーゼの活性化を伴う細胞死、すなわちアポトーシスを実行する(卵アポトーシス)。このプロセスは、卵成熟と排卵のトリガーであるプロゲステロンの作用を受けた卵母細胞が 16~24 時間をかけて実行する「ゆっくりとした卵の死」である。わたしたちは今年度、新しい未受精卵の死に方、すなわち卵アポトーシスに比べて早いタイミングで、かつ短時間で実行される卵の死に方、オーヴァーアクチベーションという現象を見つけ、論文発表した(図1)。

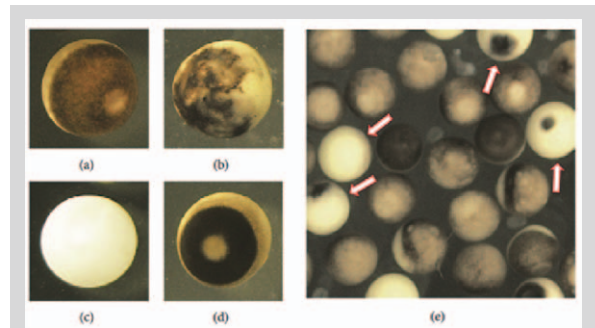


図1 成熟卵母細胞/未受精卵の形態的特徴。(a)正常な成熟卵母細胞/未受精卵、(b)アポトーシス実行中の様子、(c)オーヴァーアクチベーション実行中の様子、(d)受精による活性化(表層収縮反応)、(e)産卵直後の未受精卵にオーヴァーアクチベーション実行中の細胞が混在している様子。(Tokmakov, Awamura, Sato, 2019)

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变化)の再構成系(in vitro ovulation system)の詳細についても論文発表を行った。図2に示す通り、卵巣から摘出した未成熟卵母細胞は、卵巣組織すなわち臙胞細胞という体細胞のシート構造とその中を巡る毛細血管とに囲まれている。この状態の細胞試料に対して一定濃度と時間のコラゲナーゼ処理を施すことで、プロゲステロン依存的な排卵と成熟反応を再現することができる。この現象はツメガエルの産卵誘導に用いられるヒト絨毛性ゴナトロピン(hCG)の添加によっても再現可能である。その一方で、より長い時間のコラゲナーゼ処理により臙胞細胞シートをあらかじめ除去しておいた未成熟卵母細胞(排卵後と同等の状態にあるが未成熟のまま)に対しては、hCG は成熟反応を誘導しないことがわかった。これらのことから PG の作用点は臙胞細胞と卵母細胞の両方に、hCG の作用点は臙胞細胞にのみあることが示唆された(図2)。

### 問いを創る学び場ハテナソンの研究開発と実装試験

「学び手みずからが問いを立てる学び、問いづくりを通して学び合う場」をコンセプトにもつハテナソンが、中等教育の探究活動を推進するための新たな手法として有効であ

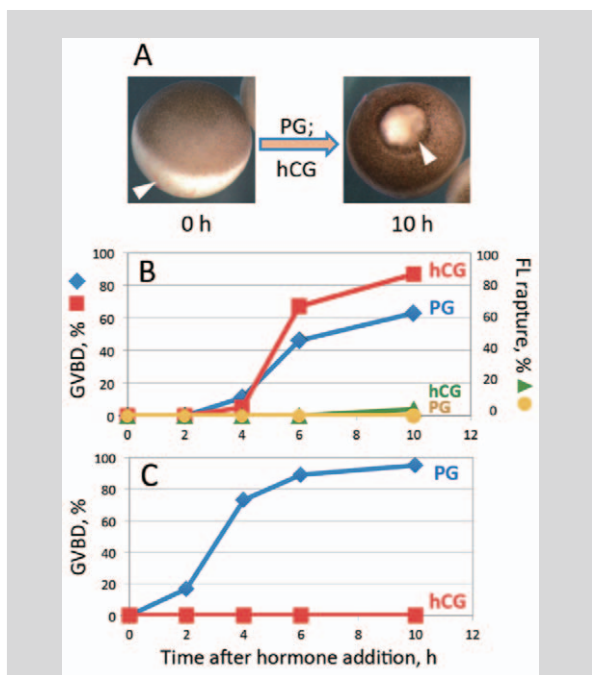


図2 卵母細胞の腫胞細胞層からの離脱 (FL rupture) および成熟 (GVBD) を試験管内で再構成することに成功した実験結果: 腫胞細胞層除去前 (A, B) あるいは同除去後 (C) のアフリカツメガエル未成熟卵母細胞に対して、プロゲステロン (PG) またはヒトゴナドトロピン (hCG) を添加し、離脱と成熟の進行を検証した。(Tokmakov, Matsumoto, Isobe, Sato, 2019)

ることを、京都府立桂高等学校の学校設定科目「桂リサーチプロジェクト (KRP)」における実践記録と検証結果をもとに高等教育フォーラム第10号で公表した。KRPでは、基本的な資質・能力を育成した上で、生徒が自ら課題を設定して探究する活動をおこなうこととしている。そこで2019年度KRPにおいては、5月に第1回ハテナソン授業を実施し、KRPの生徒 (1年生71名) と担当教員 (8名) の双方が問いづくりの具体的な手法を学習した。そして7月には新たに開発した「問いづくりシート」を用いて、第2回ハテナソン授業を実施した。これら2回の取り組みを観察ならびに記録し、その学習・教育効果について質問紙調査等をもとに検証した結果、学び手自身による問いづくりが探究活動において重要かつ有効であることを体験的に学ぶ機会として、ハテナソン授業は有効であることが明らかとなった。中等教育における探究学習へのハテナソン導入の意義、そして応用可能性と発展性を考察し、提案した。ハテナソンの研究開発とその成果は、このほかに生物教育学会、大学教育研究フォーラム、私情協教育イノベーション大会、およびハテナソン国際フォーラム2019などにおいて公表した。

### 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

時間	項目	内容	配布物など
13:00	開始、講師とテーマの紹介	(13:00~) 西山先生からの導入挨拶(予定あり) -みなさん、こんにちは。京都府立桂高等学校の先生です。 -京都府立桂高等学校の先生です。京都府立桂高等学校の先生です。 -京都府立桂高等学校の先生です。京都府立桂高等学校の先生です。	
13:02	SDGsとは? (その1) 動画+講義	-みなさんSDGs (Sustainable Development Goals) のことを、ご存知ですか? -SDGsは17の目標で構成されています。 -2030年の世界をどうにかしたいかを目標としています。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。	
13:15	問いづくり (その1) 質問の意図の表示	-これからみなさんに問いづくりをしてもらいます。 -みなさん、SDGs (Sustainable Development Goals) のことを、ご存知ですか? -SDGsは17の目標で構成されています。 -2030年の世界をどうにかしたいかを目標としています。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。	資料① 問いづくりシート
13:20	問いづくり (その2) グループづくり、ルール共有	-グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。	資料① 資料② 問いづくりシート
13:25	問いづくり (その3) 開始し	-グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。	
13:40	休み時間 (10分)		
13:50	問いづくり (その4) 問いづくりの分類と変換、そして改善	-みなさん、SDGs (Sustainable Development Goals) のことを、ご存知ですか? -SDGsは17の目標で構成されています。 -2030年の世界をどうにかしたいかを目標としています。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。	
14:00	問いづくり (その5) 3つの大事な事についての確認	-グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。	資料① 問いづくりシート
14:10	問いづくり (その6) 大事な事、振り返りの共有	-グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。	
14:15	SDGsとは? (その2) 資料読誦 質疑 質疑 質疑 グループワーク	-みなさん、SDGs (Sustainable Development Goals) のことを、ご存知ですか? -SDGsは17の目標で構成されています。 -2030年の世界をどうにかしたいかを目標としています。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。	資料② SDGsとは? 資料③ 317問の問いづくりシート
14:25	振り返り	-グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。 -グループづくり、準備が完了しました。	資料④ Q7の資料
14:30	終了	-みなさん、SDGs (Sustainable Development Goals) のことを、ご存知ですか? -SDGsは17の目標で構成されています。 -2030年の世界をどうにかしたいかを目標としています。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。 -SDGsは、SDGs (Sustainable Development Goals) の略称です。	

図3 桂高等学校第1回ハテナソン授業のタイムライン (西山と佐藤、2020)

and drug-resistance in human bladder carcinoma cells (Cancer Cell Project). In the Egg Project, we have published eight papers, in which three review articles and five original research articles are included. Our current subject of inquiry includes the mechanism of overactivation of unfertilized egg, enzymatic regulation of matrix metalloproteinase in oocytes during progesterone-induced ovulation and maturation, and biological function of membrane microdomain in oocyte that lacks expression of uroplakin III.

Hatenathon is a newly coined word. It is a combination of a word 'hatena', which means a question mark in Japanese, and a marathon. Hatathon is a concept of question-driven learning (QDL). Through hatathon, teachers develop and provide a brand-new learning environment. The core process used in hatathon is based on Question Formulation Technique (QFT) developed by Dan Rothstein and Luz Santana in the Right Question Institute. To examine whether question-driven hatathon learning is valuable to secondary education, we developed a series of the hatathon -learning classes and implemented them in the Katsura Research Project, a newly designed course program for promoting a variety of

learner's knowledge, skills and attitude in Kyoto Prefectural Senior High School. We conducted twice the hatenathon learning class, where the first-year students underwent self-questioning with the use of question formulation technique. According to the obtained output materials so far that include a questionnaire survey of the students, we suggest that a majority of students comes to realization that they could learn in-depth by questioning for themselves. Future directions of this kind of learning approach and its implementation, e.g. problems and their means of improvement, will also be discussed.

#### 4. 論文, 著書など

<原著論文など>

- Sato KI, Tokmakov AA. (2020) Toward the understanding of biology of oocyte life cycle in *Xenopus Laevis*: No oocytes left behind. *Reprod Med Biol.* 19(2):114-119. doi: 10.1002/rmb2.12314. eCollection 2020 Apr. PMID: 32273815
- Tokmakov AA, Matsumoto Y, Isobe T, Sato KI. (2019) In Vitro Reconstruction of *Xenopus* Oocyte Ovulation. *Int J Mol Sci.* 20(19):4766. doi: 10.3390/ijms20194766. PMID: 31561408
- Kurotani A, Tokmakov AA, Sato KI, Stefanov VE, Yamada Y, Sakurai T. (2019) Localization-specific distributions of protein pI in human proteome are governed by local pH and membrane charge. *BMC Mol Cell Biol.* 20(1):36. doi: 10.1186/s12860-019-0221-4. PMID: 31429701
- Tokmakov AA, Awamura M, Sato KI. (2019) Biochemical Hallmarks of Oxidative Stress-Induced Overactivation of *Xenopus* Eggs. *Biomed Res Int.* 2019:7180540. doi: 10.1155/2019/7180540. eCollection 2019. PMID: 31341903
- Tokmakov AA, Akino K, Iguchi S, Iwasaki T, Stefanov VE, Sato KI. (2019) Autophosphorylation of MAP kinase disables the MAPK pathway in apoptotic *Xenopus* eggs. *Biochem Biophys Res Commun.* 517(1):140-145. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.07.033. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31320137
- Tokmakov AA, Sato KI. (2019) Activity and intracellular localization of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase in aging *Xenopus* oocytes and eggs. *Exp Gerontol.* 119:157-167. doi: 10.1016/j.exger.2019.02.002. Epub 2019 Feb 12. PMID: 30769028
- Sato KI, Tokmakov AA. (2019) Membrane Microdomains as Platform to Study Membrane-Associated Events During Oogenesis, Meiotic Maturation, and Fertilization in *Xenopus laevis*. *Methods Mol Biol.* 1920:59-73. doi: 10.1007/978-1-4939-9009-2\_5. PMID: 30737686
- Tokmakov AA, Sato KI. (2019) Reconstitution of Intracellular Calcium Signaling in *Xenopus* Egg Extracts. *Methods Mol Biol.* 2019:1920:41-57. doi: 10.1007/978-1-4939-9009-2\_4. PMID: 30737685
- 西山 周平, 佐藤 賢一 (2020) ハテナソンによる京都府立桂高等学校の「桂リサーチプロジェクト」での問いづく

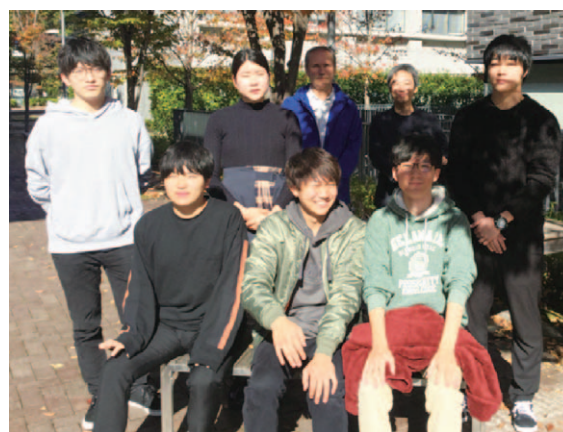
りの活性化に向けた実践. 高等教育フォーラム 10, 23-40 (2020-03-31).

<書籍など>

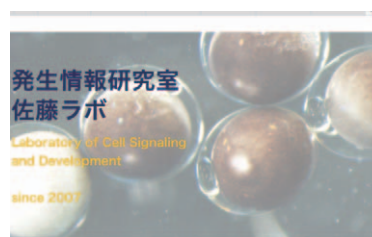
- 佐藤 賢一 (2019) はじめてのファンリテーション (編集: 鈴木 康久, 嘉村 賢州, 谷口 知弘) チャプター担当, 昭和堂
- 佐藤 賢一 (2019) 発生生物学 (編集: 塩尻 信義, 弥益 恭, 中尾 啓子) チャプター担当, 培風館

#### 5. 学会発表など

- 佐藤 賢一「高大接続をねらいとする質問駆動型生物学授業の開発と実践」生物教育学会、愛知教育大学(名古屋)、2019年1月13日(口頭発表)
- 佐藤 賢一、木村 成介、富山 雄一郎「全学共通教育科目および生命科学専門教育科目における質問駆動型授業の開発、実践、および効果測定」大学教育研究フォーラム、京都大学(京都)、2019年3月24日(口頭発表)
- 佐藤 賢一「全学共通教育科目ハテナソンセミナーの設計及び実践」2019年度私情協教育イノベーション大会(東京)、2019年9月7日(口頭発表)
- 王 戈、天野 麻穂、松尾 由美、佐藤 賢一「チームサイエンスの科学を日本で推進するにあたっての課題に関する研究(1)および(2) —SicTS×ハテナソンの設計と実践—」研究・イノベーション学会第34回年次学術大会、政策大学院大学(東京)、2019年10月27日(口頭発表)
- Alexander A. Tokmakov, Yudai Morichika, Kana Nakagawa, Ken-Ichi Sato「Intracellular events of egg overactivation」日本分子生物学会第42回年会、マリンメッセ福岡(福岡)、



15号館と16号館の間にて(2019年11月撮影)



リニューアルした研究室ホームページ

[https://peraichi.com/landing\\_pages/view/ksusatolabsince2007](https://peraichi.com/landing_pages/view/ksusatolabsince2007)

2019年12月6日(ポスター発表)

佐藤 賢一, 西川 幹基, Alexander A. Tokmakov「ツメガエル卵細胞のインビトロ排卵実験系の構築」日本分子生物学会第42回年会、マリンメッセ福岡(福岡)、2019年12月6日(ポスター発表)

## 6. その他特記事項(学内外での諸活動)

### 1) 外部資金

**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** 2019.2.4. 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。

**大学コンソーシアム京都第24回FDフォーラム(立命館大学)** 2019.3.2~3. 実行委員。

**基礎特別研究発表会** 2019.3.8. 京都産業大学総合生命科学部10研究室での合同。

**卒業研究発表会(松の浦セミナーハウス)** 2019.3.9. 京都産業大学総合生命科学部10研究室での合同。

**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)** 2019.7.30~8.5 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)** 2019.8.8. 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** 2019.1.21 高知国際中学・高等学校(高知)、1.22 阿南高等専門学校(阿南)、4.13 大妻中野高等学校(東京)、4.19 紫野高等学校(京都)、4.20 山城高等学校(京都)、5.20 桂高等学校(京都)、7.11 神奈川件総合高等学校(横浜)、7.12 洛西高等学校(京都)、7.16 洛西高等学校(京都)、7.26 江南高等学校(新潟)、8.27紫野高等学校(京都)、10.7 須磨東高等学校(神戸)、10.24 須磨友が丘高等学校(神戸)、11.20倉敷湘南高等学校(倉敷)、12.19 窪川高等学校(四万十町)、

**大学・高校等教職員研修会、ワークショップなど** 2019.1.12 ワークショップデザイン講座(大阪)、1.13 SDGsワークショップ(名古屋)、1.14 SDGsワークショップ2件(京都)、2.20 教員研修(高陽東高校)、2.3 職員研修(湯沢市役所)、2.17 SDGsワークショップ(甲府市日本青年会議所)、2.24 ワークショップデザイン講座(札幌)、2.27~28 職員研修(産業技術総合研究所)、3.13~14職員研修(産業技術総合研究所)、3.27 曹洞宗宗務所人権研修(甲府)、3.30 問いづくり研修会(広島)、4.25 SDGsワークショップ(甲府市日本青年会議所)、5.8 SDGsワークショップ(京都産業大学)、5.10 科学技術振興機構PM研修

(東京)、5.24 SDGsワークショップ(東京)、6.15 AL型授業研究会えひめ(松山)、6.21 SDGsワークショップ(東京)、6.28 SDGsワークショップ(東京)、7.11 SDGsワークショップ(横浜)、7.12 SDGsワークショップ(名古屋)、8.1 職員研修(都城市役所)、8.26 職員研修(広島県立観音高等学校)、SDGsワークショップ(広島)、8.31 特別支援学級ワークショップ(名古屋)、9.7 Active Book Dialogueワークショップ(神戸)、9.19 職員研修(倉敷湘南高等学校)、9.23 ハテナソンセミナーの設計と実践のためのワークショップ(京都)、9.26 Active Book Dialogueワークショップ(神戸)、9.30 職員研修(福山暁の星高等学校)、10.5~6 SDGsワークショップ(札幌)、10.11 職員研修(株式会社MEP)、10.13 Active Book Dialogueワークショップ(京都)、10.31 イノベーションスクール研修(産業技術総合研究所)、10.31 SDGsワークショップ(京都産業大学)、11.2 教員研修(高陽東高校)、11.8 教員研修(滋賀県総合教育センター)、11.16 ハテナソンセミナーの設計と実践のためのワークショップ(東京)、11.3 PBL実践のための基礎スキル講座(大阪)、11.5 職員研修(株式会社JTB)、12.14 ハテナソンセミナーの設計と実践のためのワークショップ(大阪)、12.19 職員研修(高知県立窪川高等学校)、12.25 大阪大学探求学習セミナー(大阪)、12.28 SDGsワークショップ(札幌)、2.1 大学コンソーシアム京都高校教員交流会(京都)、2.5 職員研修(朝日放送テレビ)、2.6 職員研修(国立民族博物館)、2.10 職員研修(広島市立舟入高等学校)、2.16 ハテナソンセミナーの設計と実践のためのワークショップ(仙台)、3.23 職員研修(米沢県立興譲館高等学校)

### 学内外におけるその他の諸活動(2019/令和1(平成31)年度)

- ・京都産業大学生命科学部 副学部長
- ・京都産業大学教育支援研究開発センター運営委員会 委員
- ・京都産業大学初年次教育センター運営委員会 委員
- ・京都産業大学共通教育機構人間科学教育運営委員会 委員
- ・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 高大連携推進室 室員
- ・日本ツメガエル研究集会第13回 世話人
- ・神戸大学パイオニアル統合研究センター共同利用・共同研究公募専門委員会 委員
- ・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
- ・一般社団法人Question Lab 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行った。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)を共同発表者とする学会ポスター発表2件や、査読付き英文学術論文の公表(2019年度においては受理・公表済みのものが8件)のかたちで顕在化している。

# 食農システム学研究室

Laboratory of Sustainable Agriculture and Food Systems

## 1. 研究概要

私たちの生活は、農作物などの食料や、工業原料、医薬品など、多様な生物資源により成立している。「生態系」「生物種」「遺伝子」といった様々なレベルでの多様性の保全が必要であり、それらの持続可能な利用のあり方の提示が求められている。また、その実現に向けては、人間活動と地域がどのように関わっているのかを理解し、有効な社会システムを検討することも大切である。

本研究室では、こうした観点から、生物資源としての食と農に注目し、社会科学的なアプローチにより、地域資源循環系の構築、生態系サービスと持続可能な供給システム、地域生産物の価値の創出といった研究に取り組んでいる。

地域資源循環については、地域の人々のつながりを踏まえた社会システムのあり方について検討している。例えば、生ゴミを堆肥化し、その堆肥を使って野菜を育て、地域で消費することで、有機性廃棄物が削減されることが期待できるが、その実現に向けては、生ごみの排出量や削減量、堆肥の成分分析などの数値的な把握だけでなく、どのような人であれば参画してくれるか、社会の受け入れ体制はどうあるべきか、といった点も踏まえて明らかにする必要がある。

また、農地や里山は、生物資源の生産の場としてだけでなく、空気や水の浄化、レクリエーションや環境教育の場など、多様な生態系サービスを供給している。生態系サービスは農村に多くみられる資源であるが、このような生態系サービスの便益は農村住民のみならず、都市住民にも幅広くもたらされており、都市と農村のあり方を検討する上で重要な視点となる。持続可能な生態系サービスの供給のためにどのような仕組みが期待されるのか、どのように都市と郊外を結びつける工夫が求められるのかについて検討するため、農地や里山の環境評価などを実施するとともに、人々の生態系サービスへの支払い意思や、どのような内容をどのように伝えることで支払い意思が変化するのか、といった影響要因の解明にも取り組んでいる。

## 2. 本年度の研究成果

本年度は、大きく、地域資源循環の構築と、生態系サービスと持続可能な供給システムについて研究を実施した。

地域資源循環については、大阪府堺市の保育園における給食生ごみや里山資源を活用した堆肥化活動を事例に、園児保護者への波及効果も含めた環境負荷削減効

准教授 三瓶由紀

Assoc. Prof. SAMPEI, Y., Ph. D.



果と資源循環の実現可能性について検討するため、1) 保育園給食残滓の堆肥化による環境負荷削減量の推計、2) 保護者の堆肥化への参画意欲の促進可能性、3) 周辺農地の分布状況からみた農地利用可能量の推計、について調査・分析を行った。

保育園給食残滓の堆肥化による環境負荷削減量の推計については、保育園スタッフに堆肥化を無理のない範囲で実施してもらい、削減可能な生ごみの量を把握した。得られた値と生徒の在籍数から、堺市の全認可保育園等にて堆肥化を行う場合に削減できる有害物質やコスト等についても推計している。

保護者の堆肥化への参画意欲の促進可能性については、保育園を通じて記入回答式紙面アンケート調査を実施し、保護者らの堆肥化への参画意欲を把握するとともに、堆肥の使用経験や、環境意識、日常生活における環境行動などが参画意欲に与える影響について分析を行った。



図 保育園での堆肥化取組の様子

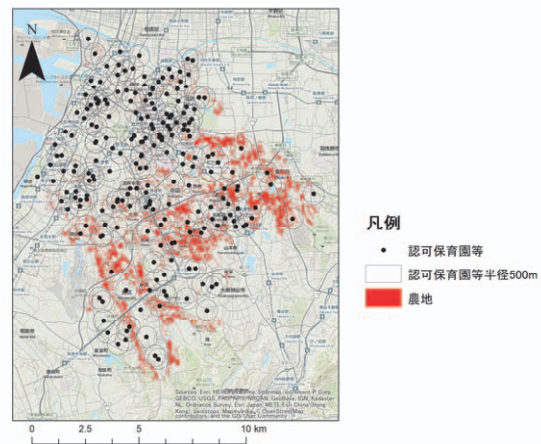


図 堺市内の保育園等と周辺農地の分布

また、堆肥受入先として想定される保育園周辺における農地の賦存量についてGIS解析を行い、堆肥受け入れ期待量を推計した。同時に、アンケート調査で得られた結果を踏まえ、保育園等を通じた保護者の参画促進が行われた場合の堆肥生成期待量を推計し、これら堆肥の生成・受入れ期待量のバランスからみた資源循環実現可能性について検討した。

これらの調査から得られた結果の一部をもとに、保育園での給食残滓の発生量と堆肥化における環境負荷削減期待量を推計し、成果として日本造園学会関西支部大会において研究発表を行っている。

一方、生態系サービスと持続可能な供給システムについては、過年度に和歌山市内の小学校にて里山に関する環境教育活動を実施している。実施後に行った保護者へのアンケート調査データに基づき、里山保全への支払い意思と、その影響要因の分析を鋭意進めている。今後も、引き続き小学校との連携を行うことで、どのような体験や情報を提供することで、住民らの支払い意思が変化するか、研究を継続していく予定である。

### 3. Research projects and annual reports

Biodiversity and ecosystem services are essential in supporting human beings in multiple ways. Japanese traditional Satoyama landscapes that originally provide an adequate ecosystem services have been threatened by rapid socio-economic changes in recent years. We need to explore the effective countermeasures to secure sustainable supply of ecosystem services, based on the interaction within and between nature and human activities.

We have been also facing inherent urban-rural land-use mixture, causing several urban environmental issues. Nevertheless, land-use mosaic in urban fringe areas is also expected to have advantages in various aspects, especially in bio-resource utilization. Among them, the composting of the garbage from feeding programs in educational facilities, such as nurseries, preschools and elementary schools, has been drawing public attention these days from the aspect of reducing environmental footprint.

Until last year, we estimated the expected reduced amount of garbage by composting using “Ikigomi-san” project method at the nursery in Sakai City, central Japan. We also conducted a questionnaire survey to clarify the possibility and incentives of children's parents to participate in composting in their houses. Then we estimated total acceptable amounts of composts in agricultural lands surrounding the nurseries in order to assess supply-demand

balance in each area with assumption of parents participations in composting.

Our results suggested that the “Ikigomi-san” project on organic waste management and urban agriculture has a feasibility of local scale organic material circulation. This scheme can contribute to further environmental load reductions and organic material recycling, thereby promoting sustainable region in the suburban area.

### 4. 論文、著書など

なし

### 5. 学会発表など

玉置隼人・三瓶由紀・原祐二：生ごみの堆肥化による処理コストと環境負荷の削減について。2019年度日本造園学会関西支部大会，和歌山市，2019.10.26-27

### 6. その他特記事項

#### 1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名：持続可能な地域実現へむけた保育所での里山保全・資源循環事業の連携効果と行政の役割

研究代表者：三瓶由紀，取得年度：H30-R3年（4年）

#### 2) 学外活動 三瓶由紀：日本造園学会査読委員

#### 5) その他 なし

### 7. 教育研究活性化支援制度の教育効果

該当なし

# 細菌学研究室

Laboratory of Bacteriology

## 1. 研究概要

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

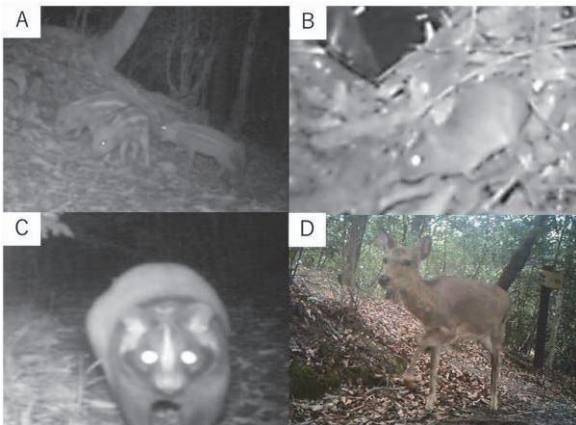


図. 調査地において撮影された野生動物。A. イノシシ B. ネズミ C. ハクビシン D. シカ

## 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、人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て実施した。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、シャーマントラップを利用した小型野生動物の捕獲調査を実施した。さらに、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ことから、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

准教授 染谷 梓

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



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。調査の結果、ハクビシンからバルトネラが分離された。解析の結果、分離されたバルトネラは、ヒトにおける病原性が報告されている *Bartonella henselae* と、これまでハクビシンから分離されたことのない *Bartonella clarridgeiae* と同定された。このバルトネラが、ハクビシンを介してヒトや伴侶動物に感染する可能性があるため、野生動物やヒトにおける病原性について詳細に解析するとともに、媒介する節足動物や、その感染環について調査し、感染経路を明らかにしていく必要がある。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。

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、日本紅斑熱の原因菌である *Rickettsia japonica* と近縁である可能性が示されたことから、リケッチアの表面抗原タンパク質の組換えタンパク質を用いた抗リケッチア抗体検出法を開発した。ハクビシン血清を用いた解析では、この検査法の有用性が確認された。

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、ストレプトマイシン耐性株において、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 etiologic agent of Japanese spotted fever is also associated with arthropod vector, mainly ticks. Therefore, the prevalence of ticks in Kyoto was investigated. Ticks were collected weekly by flagging method and rickettsial DNA was detected by PCR. The rate of rickettsial infection depended on tick species.

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

#### 4. 論文, 著書など

なし

#### 5. 学会発表など

中塚聖菜, 山形幸, 吉田彩乃, 原田真緒, 辻本絢香, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. ハムスターのトゴトウイルス感染に伴う病態発現の解析. 第54回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 高知市, 2019.5.24

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. トゴトウイルスのマウスへの馴化. 第54回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 高知市, 2019.5.24

中塚聖菜, 辻本絢香, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. ハムスターのトゴトウイルス感染に伴う病態発現の解析. 第162回日本獣医学会学術集会, つくば市, 2019.9.10-12

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. トゴトウイルスのマウスへの馴化. 第162回日本獣医学会学術集会, つくば市, 2019.9.10-12

村岡綾, 有地蘭, 仲澤伶, 前田秋彦, 染谷梓. 京都市におけるマダニのリケッチア保有率および系統学的解析. 第162回日本獣医学会学術集会, つくば市, 2019.9.12

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. マウスに馴化したトゴトウイルスはBALB/cマウスに致死性を示す. 第24回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 東京, 2019.10.23

中塚聖菜, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. CHO細胞におけるトゴトウイルス持続感染の解析. 第24回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 東京, 2019.10.23

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. マウスに馴化したトゴトウイルスはBALB/cマウスに致死的病態を示す. 第67回日本ウイルス学会, 東京, 2019.10.29-31

中塚聖菜, 好井健太郎, 染谷梓, 前田秋彦. トゴトウイルスのCHO-K1細胞における持続感染. 第67回日本ウイルス学会, 東京, 2019.10.29-31

金美来, 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バルトネラの分離. 第63回日本細菌学総会, 名古屋市, 2020.2.19

#### 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: 関西野生生物研究所および三宅獣医科大学との共同研究

##### 2) その他



研究室メンバー



# 植物分子遺伝学研究室

Laboratory of Plant Molecular Genetics

## 1. 研究概要

当研究室では、工学部生物工学科時代に遡る 30 年以上前から、「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、以前の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、これらの研究から学術的に興味ある問いが派生したことから、新たなプロジェクトとして科研費に申請し、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(令和 3 年 3 月まで延長)。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・学部生が積極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継続的に行っており、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出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

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr.



未だ組換え体が得られていない。

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、葉緑体ゲノムにある遺伝子(APX 遺伝子)を導入した際、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発見された。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がある。しかし、原因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有な材料を用いて、コムギの近縁種であるエギロプス属

植物やライムギのミトコンドリアゲノムの構成を調べている。

## 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、世代更新を行ったが、新たな組換え体を作成する研究は実施しなかった。特にコムギの場合、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。昨年度に続き、今年度も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。本年度は、これまで使用していた品種‘マイクロム’に加え、海外の研究室で組換え体作出の実績がある‘IPA6’を入手し、種子の増殖を図っている。これらの材料にパーティクルボンバードメント法で形質転換ベクターを導入する実験を行ったが、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、昨年を引き続き、この仮説を検証する実験を行なった。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

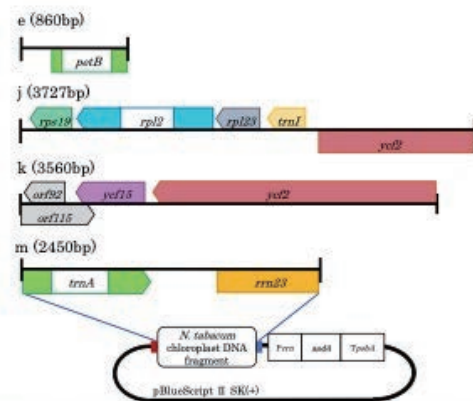
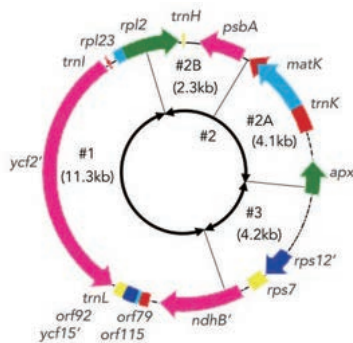


Figure. Gene map of chloroplast DNA fragment maintained in the transplastomic plants.

しいことが証明された。

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、現在も解析中であるが、最近の結果では、ヘテロプラスミックな個体の後代は、すべてオグラ型に固定したようである。

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., Kaneko, T., Sakamoto, T., Kimura, S., Shigyo, M., Yamagishi, H. and Terachi, T.: Multichromosomal structure of the onion mitochondrial genome and a transcript analysis. *Mitochondrion* **46**, 179-186 (2019).

Yamagishi, H., Tanaka, Y., Shiiba, S., Hashimoto, A., Fukunaga, A. and Terachi, T.: Mitochondrial *orf463* causing male sterility in radish is possessed by cultivars belonging to the "Niger" group. *Euphytica* **215**(6), Article number 109 (2019).

Mukai, A., Jikuya, M., Tsujimura, M., Terachi, T. and Yamagishi, H. 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*. *Plant breeding* **138**(5), 614-623 (2019).

### 5. 学会発表など

山岸博, 橋本絢子, 福永明日美, 寺地徹: *Brassica maurorum* および *Moricandia arvensis* における細胞質雄性不稔遺伝子の変異. 日本育種学会 第136回講演会, 奈良市, 2019.9.6-7

植村香織, 寺地徹: 自律複製型ベクターによる葉緑体形質転換タバコで観察された白色個体の特徴づけ. 日本育種学会 第136回講演会, 奈良市, 2019.9.6-7

馬場裕士, 中元海里, 植村香織, 寺地徹: タバコの葉緑体における自律複製型プラスミドの構築 I. 異なる葉緑体DNA断片を持つプラスミドによる形質転換体の作出. 日本育種学会 第136回講演会, 奈良市, 2019.9.6-7

中元海里, 馬場裕士, 植村香織, 寺地徹: タバコの葉緑体における自律複製型プラスミドの構築 II. 形質転換体内で自律複製しているプラスミドが持つ葉緑体 DNA 断片の特定. 日本育種学会 第136回講演会, 奈良市, 2019.9.6-7

山下健太, 辻村真衣, 寺地徹: *Aegilops mutica* 細胞質を持つ置換コムギの形態学的観察及び遺伝子発現の調査. 日本育種

学会 第136回講演会, 奈良市, 2019.9.6-7

山岸博, 橋本絢子, 福永明日美, 寺地徹: 野生種と栽培種の交雑F2における雄性不稔ダイコンとクロダイコンの出現. 日本育種学会 第137回講演会, 東京都, 2020.3.28-29(新型コロナのため講演会は中止となったが、講演要旨の発行をもって発表完了とみなされた)

馬場裕士, 中元海里, 植村香織, 寺地徹: 葉緑体へ導入したプラスミドに自律複製能を付与する葉緑体DNA断片の特徴づけ. 日本育種学会 第137回講演会(同上)

植村香織, 中元海里, 馬場裕士, 児島和志, 寺地徹: プラスミドに自律複製能を付与する葉緑体DNA断片探索の過程で得られた予期せぬ形質転換体の解析. 日本育種学会 第137回講演会(同上)

辻村真衣, 佐藤南美, 永島伊都子, 森直樹, 寺地徹: パンコムギのミトコンドリアゲノム上に散在するショートリピートを介した組換えに関する研究. 日本育種学会 第137回講演会(同上)



## 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

JST ERATO 沼田プロジェクト評価委員

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」

# 環境政策学研究室

Laboratory of Environmental policy science

## 1. 研究概要

環境政策学研究室では、自然環境に関する環境政策を主な対象として、これらの政策形成プロセスの解明と政策手法の開発に関する研究を行っている。

従来、日本の自然環境に関わる政策は、経済発展による開発や汚染に対する自然環境の保護、保全が中心であった。一方で、近年は人口減少、少子高齢化、グローバル経済の拡大、気候変動の進行により、日本社会は地域経済の停滞や災害リスクの拡大などの新たな社会課題が顕在化している。このような社会課題と自然環境の関わりをみると、森林や農地の利用促進や外来生物種の適正な管理など、自然環境の機能や資源を適切に活用するアプローチへの注目が高まっている。本研究室では、グリーンインフラ（自然の機能を活用したインフラ整備）、Eco-DRR（生態系を活用した防災減災）、自然地域循環共生圏といった自然環境の機能や資源を活用するアプローチに着目して、自然保護から生物多様性保全、グリーンインフラに至るまでの様々な政策形成プロセスを明らかにする。さらに、自然環境や生物多様性の保全とともに、自然環境の活用を推進する施策や事業を実現する政策手法を開発する。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) 自然環境分野の政策形成プロセスの分析

欧米と日本の間でグリーンインフラ(GI)の政策の比較分析をおこなっている。GIは欧米と日本ともに、自然環境の多様な機能の活用を推進する概念であるが、日本では空き地や耕作放棄地においてGIの導入が進められている。加えて、日本におけるGIは、自然の多様な機能の活用とともに、生態系の特性を踏まえた土地利用に関する議論が進んでいる点の特徴的である。特に、自然災害へのリスクへの対応として、グリーンインフラの考え方を取り入れた土地利用が検討されている。日本で議論の対象となるGIは、欧米よりも幅広い可能性がある。今後、自然環境政策やGIの展開プロセスを比較しつつ、日本における効果的な政策形成手法を検討したい。

### 2) 自然環境施策を推進する手法開発

日本における地域のGIの導入可能性の評価するため、GIに関わる自然環境、社会体制の指標を構築している。自然環境に関しては、農地の洪水時の遊水機能に関する指標の検討を進めた。また、社会体制に関しては、市民意向と行政計画に関する指標の検討を進めた。GIに関する市民意向は、市民アンケートの分析結果から、地域間の違いはあまりないことが示された。一方、GIに関する地方自治

准教授 西田 貴明

Assoc Prof. Takaaki Nishida, Ph.D.



体の計画は、地域間で大きな違いがあることが明らかにされた。今後、GIの導入可能性を包括的に評価するために、地方自治体を単位としたGIに関する様々な指標のデータベースを作成する予定である。

## 3. Research projects and annual reports

### 1) Analysis of policy formation process

We conducted a comparative analysis of green infrastructure (GI) policies between Europe and America, Japan. As a result, GI is a common concept that promotes the utilization of various ecosystem services among those regions, but in Japan, GI is being introduced in vacant land and abandoned cultivated land. In addition, GI in Japan is characterized by the fact that there are ongoing discussions on land use based on the characteristics of ecosystems as well as the utilization of various ecosystem services. In particular, land use with the idea of green infrastructure is being considered as a response to the risk of natural disasters. The discussion of GI in Japan may be wider than in the West. In the future, we would like to examine effective policy formation methods in Japan.

### 2) Development of methods to promote natural environment policy

In order to evaluate the possibility of GI in local government, we are building indicators of the natural environment and social system related to GI. Regarding the natural environment, we proceeded with the study of indicators for the water repellent function of agricultural land during floods. In addition, regarding the social system, we proceeded with the examination of indicators related to citizens' intentions and administrative plans. Citizen's intention regarding GI showed that there were not many regional differences from the result of analysis of citizen questionnaire. On the other hand, it was clarified that the plans of local governments regarding GI differ greatly among regions. In the future, in order to comprehensively evaluate the possibility of introducing GI, it is planned to create a database of various GI indicators for each local government.

## 4. 論文、著書など

Osawa T, [Nishida T](#), Oka T (2020) High tolerance land use against flood disasters: How paddy fields as previously natural

wetland inhibit the occurrence of floods. Ecological Indicators.

Osawa T, Ueno Y, Nishida T, Nishihiro J (2020) Do both habitat and species diversity provide cultural ecosystem services? A

trial using geo-tagged photos. Nature Conservation 38: 61-77.  
西田貴明 (2019) 日本のグリーンインフラのあり方 ―これまでの議論、今後の展望―, 土木学会誌, Vol.104(10), p. 10-13

西田貴明・大澤剛士・吉田丈人・宮川絵里香 (2019) ポスト2020年の生物多様性政策に向けて, 日本生態学会誌 Vol. 69 No. 1 p. 13-18.

西田貴明 (2019) 「グリーンインフラによる都市景観の創造(グリーンインフラとは)」(企画: 金沢大学地域政策研究センター、編者: 菊池直樹・上野裕介) 共著、公人の友社 P10-23.

大澤剛士・天野達也・大澤隆文・高橋康夫・櫻井玄・西田貴明・江成広斗 (2019) 生物多様性に関わる政策課題を俯瞰する legislative scan ―日本における研究と実践の隔たりの解消に向けて―. 保全生態学研究 24: 135-149.

## 5. 学会発表など

西田貴明, 第67回日本生態学会名古屋大会シンポジウム: 生態学と政策、研究と実務を繋ぐ: COP10からの10年で出来たこと、出来なかったこと: 趣旨説明、及びこれまでの取り組み(政策). 名城大学(名古屋市), 2020.3.6.

西田貴明, しが水環境ビジネス推進フォーラム研究・技術分科会「水環境ビジネスにおけるグリーンインフラ展開の可能性」グリーンインフラの基本的な考え方とビジネス展開. コラボしが21(大津市), 2019. 12. 17.

西田貴明, 大阪自然環境保全協会: SDGs市民社会ネットワーク主催 大阪湾の自然創生をめざして 今なにができるか ~ 夢洲の可能性をさぐる ~ 夢洲グリーンインフラ構想, 大阪自然史博物館(大阪市), 2019. 11.17.

西田貴明, 地球環境戦略研究機関(IGES): SDGs時代に求められる企業の自然資本・生物多様性の評価のあり方コーディネータ: SDGs, ESG, グリーンインフラ時代に求められる生物多様性の評価とは. 日比谷図書文化館(東京都千代田区), 2019.11.5.

西田貴明, 国土交通省: グリーンインフラについて一緒に考えてみませんか? ~「グリーンインフラ官民連携プラットフォーム(仮称)」設立に向けて ~ファシリテーターとして. 貸会議室プラザ八重洲北口(東京都中央区), 2019. 10. 9.

西田貴明, 日本学術会議公開シンポジウム: Future Earth時代における 地球表層システム科学と防災・減災研究, コメントと討論. 日本学術会議(東京都千代田区), 2019. 8. 7.

西田貴明, 2019年度環境経済政策学会企画集会: Eco-DRRの経済学的課題-不確実性と政策展, 諸外国と日本におけるグリーンインフラの政策的位置づけ, 福島大学(福島市), 2019.9.28.

西田貴明, 応用生態工学会第23回広島大会: 自由集会「グリーンインフラの推進に向けた現場技術者の役割」コメンテーター. 広島市(広島大学), 2019.9.27.

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

環境研究総合推進費

課題名: グリーンインフラと既存インフラの相補的役割ー防災・環境・社会経済面からの評価  
研究分担者: H30-R2(3年)

### 2) 学外活動

西田貴明: 人間文化研究機構 総合地球環境学研究所 共同研究員

西田貴明: 文部科学省科学技術・学術政策研究所科学技術予測センター 専門調査員

西田貴明: 徳島大学環境防災研究センター 客員准教授

西田貴明: 三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング株式会社 客員研究員

西田貴明: しが生物多様性取組認証制度審査会 審査員

西田貴明: 京都御苑基本計画検討委員会 検討委員

西田貴明: グリーンインフラ研究会 運営委員

西田貴明: グリーンインフラ官民連携プラットフォーム 運営委員, 企画・広報部会長

西田貴明: グリーンインフラネットワークジャパン2020 実行委員会 委員・ポスター部会長

西田貴明: 日本生態学会生態系管理専門委員会 専門委員, 幹事

西田貴明: 日本生態学会キャリア支援専門委員会 専門委員

西田貴明: 環境情報科学センター行事委員会 委員

# 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保有されている必要がある。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、開発した方法を家畜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  
外部形態の計測、DNA 解析によって昆虫集団の遺伝的多様性の評価を行っている、また、家畜の血統記録を用いた遺伝的多様性の調査を実施している。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) 盲導犬の選抜基準の構築

現在、日本では年間約 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と共分散構造分析を施し、適性試験の成績を「落ち着き」、「ハンドラーへの集中」、「ストレスコントロール」の3つの形質に集約した。

さらに、これら 3 つの形質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

### 遺伝率と遺伝相関の推定値

	落ち着き	ハンドラーへの集中	ストレスコントロール
落ち着き	0.769		
ハンドラーへの集中	0.458	0.200	
ストレスコントロール	-0.260	0.445	0.309

対角:遺伝率 対角より下:遺伝相関

### 2) マイクロサテライトマーカーを用いたノサップマルハナバチの保全遺伝学的研究

ノサップマルハナバチ(*Bombus cryptarum florilegus*)の分布は北海道東部の根室半島および野付半島に局限されている。近年、生息の縮小が報告されており、早急な保全対策を講じる必要がある。

本年度は、まず根室半島のノッカマップ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、昨年度に開発した方法を用いて、生息地内のコロニー密度を推定した。コロニー密度(1平方キロメートル当たりの巣の数)は、10以下と推定され、近親交配による繁殖能力や遺伝的多様性の低下が懸念される結果であった。

つぎに、近親交配の影響を評価するために、ノッカマップで採集された21個体の雄をマイクロサテライト解析し、2倍体雄の検出と性決定遺伝子数の推定を行った。採集された雄のうち2倍体雄が占める割合は16.3%であり、性決定遺伝子数は6.1と推定された。性決定遺伝子数の数は、これまでの報告値の中では例外的に少なく、早急な保全対策を講じる必要があると考えられた。



**ノソップマルハナバチ。国内では根室半島、野付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) 半倍数体生物における近交最大回避交配のグループ交配への拡張

2倍体生物における近交最大回避交配(MAI)の性質は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。昨年度は、半倍数体生物のMAIに関して理論的な研究を行うとともに、半倍数体生物の集団におけるMAIの下での近交係数を評価した。今年度は昨年度の成果を、複数のグループに分割されている集団において、グループ間で雄の交換を行うグループ交配に拡張し、MAIの有効性を評価した。その結果、グループ交配へのMAIの適用によって、集団全体の初期の近交係数の上昇を大きく抑制できることが明らかになった。

### 3. Research projects and annual reports

Genetic diversity retained in populations is an essential material for adaptive evolution and breeding of plants and

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

#### 1: 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 and structural equation modelling to results of the evaluation in Asia Guide dogs Breeding Network (AGBN), and extracted three major components. Quantitative genetic parameters and breeding values of the components were estimated.

#### 2: Conservation genetics of an endangered bumblebee species in Japan using microsatellite markers

*Bombus Cryptarum florilegus* is an endangered bumblebee species in Japan. The habitat is limited to two peninsular areas (Nemuro and Notsuke peninsulas) in east Hokkaido.

We collected 42 workers and 21 males in a pasture at Nemuro peninsula. Each sample was genotyped for eight microsatellite loci. Nest density was estimated from the microsatellite data of workers. Estimated nest density was less than 10, suggesting that urgent conservation managements are required for reducing the deleterious effects of inbreeding. To evaluate the effect of inbreeding, the proportion of diploid males and the number of sex alleles were estimated with the microsatellite data of males. The number of sex alleles was estimated to be 6.1, which is exceptionally small comparing to the published estimates of foreign bumblebee species.

#### 3: Application of maximum avoidance of inbreeding to group mating in haplodiploid populations

Group mating is an efficient mating system for reducing inbreeding in captive populations of endangered animal species. In this mating system, population is divided into several groups and males are exchanged among groups every generation. Extension of the maximum avoidance of inbreeding (MAI) to group mating in haplodiploid populations was numerically examined. It was shown that the application of MAI can effectively reduce the initial increase in inbreeding in haplodiploid populations.



#### 4. 論文・著書など

野村哲郎 (2020) 和牛集団の遺伝的多様性について. アグリバイオ 28:28-32.

Nomura T., Sasaki T., Taniguchi Y. (2020) Use of Wright's neighborhood size to estimate nest density in bumblebee populations from molecular genetic markers, with an application to a rare species in Japan (submitted)

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  
DOI:10.1080/00218839.2019.1614735.

#### 5. 学会発表など

野村哲郎・加茂優也・上西美緒 「盲導犬育成および繁殖犬の選抜と交配への GDbart の利用」. 第 5 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. 2020.2.6.

#### 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 育種推進委員会委員長

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

# 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、シナプスの構築機構と脳機能の発達制御機構についてシナプス間隙に視点を据え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、そのマトリックスを構築する分子とそのシナプス機能における役割について、特にコリン作動性シナプスにお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 Hig タンパク質は、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

教授 浜 千尋

Prof. Chihiro Hama, Ph. D.



シナプス間隙マトリックスを構築する分子の分布を解析し、その分子が局在する領域とアクティブゾーンやペリアクティブゾーンとの関係性を明らかにする。特に、Hig と Hasp が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。また、Hasp の間隙への局在を制御する分子を明らかにする。その上で、シナプス間隙を含めたシナプス構造の新しいモデル像を提出する。

### 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 が睡眠をより直接的に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。

また、Hig と直接的に相互作用する  $D\alpha 5$  サブユニットが nAChR の局在量を調節することが判明してきていることから、 $D\alpha 5$  が睡眠以外の脳機能においても調節因子としてはたらいっている可能性がある。そこで、 $D\alpha 5$  に視点を定めて脳機能との関連性を解析する。

## 2. 本年度の研究成果

### a) nAChR サブユニット $D\alpha 5$ は細胞外領域で Hig と相互作用し、残りの C 端側領域がエンドサイトーシスを誘導する。

Hig と相互作用する因子の同定を目的として、*hig* 変異体の表現型 (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  $D\alpha 5$  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  $D\alpha 5$  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、 $D\alpha 5$  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、 $D\alpha 5$  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  $D\alpha 5$  が特異的に *hig* 遺伝子のサブレッサー

一として機能することが明らかとなった。Hig と  $D\alpha 5$  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、 $D\alpha 5$  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、 $D\alpha 5$  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  $D\alpha 5$  の機能欠損が Hig の機能欠損をサプレッスするのだろうか。hig 変異体の脳の前シナプスでは、 $D\alpha 5$ 、 $D\alpha 6$ 、 $D\alpha 7$  のいずれの局在量も減少するが、hig と  $D\alpha 5$  二重変異体では、 $D\alpha 6$  の局在量が野生型以上になることが確認された。また、 $D\alpha 5$  変異体では、 $D\alpha 6$  と  $D\alpha 7$  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  $D\alpha 5$  の局在量が減少し、それと共に  $D\alpha 5$  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。 $D\alpha 5$ 、 $D\alpha 6$ 、 $D\alpha 7$  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、 $D\alpha 5$  と  $D\alpha 7$  の細胞外ドメインには Hig との結合能があるが  $D\alpha 6$  にはないことが判明した。さらに、 $D\alpha 5$  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。また、 $D\alpha 6$  と

$D\alpha 7$  の C 端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、 $D\alpha 5$  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、 $D\alpha 5$  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  $D\alpha 5$  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、チャンネルの構成因子として機能しながら、それぞれが個性をもち、その中で受容体の局在に関して  $D\alpha 5$  が中心的な役割を持つという重要な知見が得られた。また、Hig 非存在下では  $D\alpha 5$  が致死的に働く、あるいは Hig 存在下でも  $D\alpha 5$  の C 端側の配列が致死的に働くという結果が得られており、シナプスの異常を生む原因についての新たな知見を得ることができた。

### b) hig 変異体の睡眠パターン

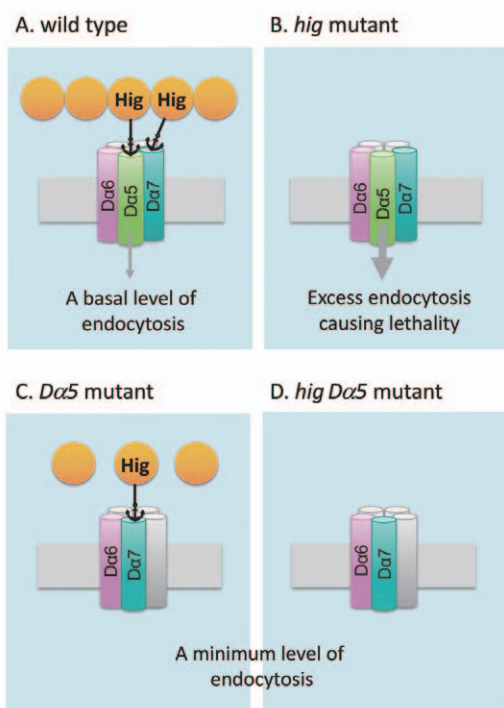
睡眠の原因としてシナプス活性の低下が挙げられる。もし、それが正しいとすると、睡眠必要性 (sleep need) に伴って生じるシナプス活性を低下させる機構と意義を理解することは睡眠の本質的な意味を理解することにつながるはずである。

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、成虫時にも Hig が存在しない状態で解析する必要がある。

そこで、蛹の時期のみで Hig を発現させるシステムを温度感受性転写抑制因子 Gal80<sup>ts</sup> を用いて構築し、実験を行なったが、成虫時における発現を抑制することができなかった。今後、発現システムの再検討と、それに加えて蛹での Hig の発現を抑制し成虫のみで発現させる実験系を構築し、hig 変異体の示す睡眠パターンと比較することを考えている。

## 3. Research projects and annual reports

**Research Project:** How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We are



studying regulatory mechanisms underlying synapse differentiation at molecular levels, and also try to understand a genetic program that globally organizes the neural 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, while they function as the component of a channel. In addition, it is notable that *Da5* becomes a lethal factor when Hig is missing, or that without the extracellular region, *Da5* is also deleterious even when Hig is present. This may provide a novel insight into how synapses become impaired in neuronal degeneration diseases.



#### 4. 論文、著書など

なし

#### 5. 学会発表など

西村勇飛、中山 実、西村 理、工樂 樹洋、曾根 雅紀、浜 千尋

ショウジョウバエ脳におけるアセチルコリン受容体のシナプス局在量はシナプス間隙タンパク質 Hig と相互作用する *Da5* サブユニットにより抑制的に調節される

第42回日本分子生物学会年会

2019年12月4日(ポスター)マリンメッセ福岡

#### 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)

# 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

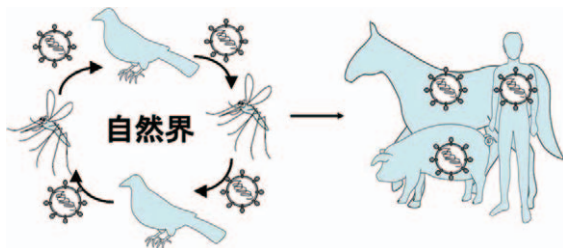


図 1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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熊本大学准教授の米島万有子さん、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、長崎大学の好井健太郎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株のウイルス中和試験法を作製した。

(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

マウスに THOV を感染させても、病原性は認められないが、一方、ハムスターでは致死経過をたどる。自然界の種を超えた感染が如何に起こるのかが問題となるため、本年度は THOV に非感染性のマウスにおいて継代することにより、THOV がマウスに適応するか否かについて検討した。20回継代後の THOV (MA-THOV P20) ではマウスに対して致死性を示した。MA-THOV P20 感染マウスの肉眼病理所見では、各種臓器において出血が認められた。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。

## 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

Infection of mice with THOV is not pathogenic, whereas hamsters have a lethal course. Since how to cause infection over animal species is one of big question in the natural world, this year, we examined whether THOV adapts to mice by passaging in mice could infect with THOV. At the results, THOV after 20 passages (MA-THOV P20) was lethal to mice. Macroscopic pathological findings of MA-THOV P20-infected mice showed bleeding in various organs like as THOV-infection in hamster. Histopathological findings

showed significant congestion, hemorrhage, necrosis, and apoptosis in the liver.

#### 4. 論文, 著書など

なし

#### 5. 学会発表など

1. 中塚聖菜, 山形幸, 吉田彩乃, 原田真緒, 辻本絢香, 好井健太朗, 染谷梓, 前田秋彦: ハムスターのトゴトウイルス感染に伴う病態発現の解析. 第 54 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2019 年 5 月 24 日 (高知)
2. 辻本絢香, 好井健太朗, 染谷梓, 前田秋彦: トゴトウイルスのマウスへの馴化. 第 54 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2019 年 5 月 24 日 (高知)
3. 中塚聖菜, 辻本絢香, 好井健太朗, 染谷梓, 前田秋彦: ハムスターのトゴトウイルス感染に伴う病態発現の解析. 第 162 回日本獣医学会学術集会. 2019 年 9 月 10-12 日 (つくば)
4. 辻本絢香, 好井健太朗, 染谷梓, 前田秋彦: トゴトウイルスのマウスへの馴化. 第 162 回日本獣医学会学術集会. 2019 年 9 月 10-12 日 (つくば)
5. 辻本絢香, 好井健太朗, 染谷梓, 前田秋彦: マウスに馴化したトゴトウイルスは BALB/c マウスに致死性病態を示す. 第 67 回日本ウイルス学会. 2019 年 10 月 29-31 日 (東京)
6. 中塚聖菜, 好井健太朗, 染谷梓, 前田秋彦: トゴトウイルスの CHO-K1 細胞における持続感染. 第 67 回日本ウイルス学会. 2019 年 10 月 29-31 日 (東京)

#### 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: マダニ由来の未知ウイルスは動物に感染するか? — トゴトウイルスの病原性の解析 —

研究代表者: 前田秋彦, 取得年度: H31(R1)–R3 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: R1 年度京都府畜産技術業績発表会  
審査委員

前田秋彦: R1 防虫講習会 講師



2019. 9 松の浦にて

## 2019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。2019年は、カリキュラムの変更により教育訓練の開催は春学期のみとなりましたが、4月3日の開催には、12名の参加者がありました。なお、2019年の臨時開催は4月10日に行われ、3名の参加者がありました。

### 動物慰霊祭

本学では、毎年、本学動物実験委員会の主催のもと動物慰霊祭が執り行われています。2019年は2月7日に、2020年には2月5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100名が出席して、教育、研究のために犠牲となった動物に供養を行いました。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



**2019年  
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
2019. 2. 21	生命システム タンパク質動態研究所	Dr. Vivek Malhotra ( CRG, Centre for Genomic Regulation / Barcelona, SPAIN)	バイオフィォーラム・タンパク質動態研究所セミナー・第 182 回 細胞生物学セミナー「Building a machine for secretion of bulky collagens from endoplasmic reticulum」(世話人: 永田 和宏)
2019. 3. 13	生命システム タンパク質動態研究所	平田 晋三 (青山学院大 学 理工学部 教授)	タンパク質動態研究所セミナー・第 183 回細胞生物学セミナー 「動物の行動変化のメカニズム」(世話人: 永田和宏)
2019. 3. 22- 3. 23	先端生命 産業生命	Luz Santana (RQI 共同代 表)、Harry Stokhof (HAN 応用科学大学 教育研究 者)、松本 美奈 (読売新 聞専門委員)、永田 和宏 (京都産業大学 総合生 命科学部 教授)	京都産業大学生命科学部開設記念 ハテナソン国際フォー ラム 2019 開催 「自らの問いをもつ学び、自らの問いから始める 学び」、「持続可能な開発目標 (SDGs) を自分ごと化し、行動計 画を立てる」
2019. 3. 15	生命システム	近藤 寿人 (京都産業大 学 総合生命科学部 教 授)	総合生命科学部 近藤 寿人 教授 退職記念講演会 (最終講義)
2019. 5. 8	先端生命 タンパク質動態研究所	中野 沙緒里 (京都産業 大学 生命科学部 博士)	タンパク質動態研究所セミナー・生物化学セミナー「オート ファゴソームの静電的成熟」(世話人: 遠藤斗志也)
2019. 5. 14	先端生命	原田 慶恵 (大阪大学 蛋白質研究所 教授)	バイオフィォーラム「1 分子イメージング顕微鏡によるタンパク 質の機能解析」(世話人: 横山謙)
2019. 5. 25- 5. 26		鹿内利治 (京都大学大学 院 理学) 他 2 名	第 10 回日本光合成学会年会およびシンポジウム 開催 (年会準 備委員長: 本橋健)
2019. 6. 12		佐藤 久夫 (京都産業大 学客員研究員)、上西憲 明 (木原生物記念財団 コーディネーター)	第 1 回サイエンスキャリアアップセミナーを開催しました!
2019. 6. 21	先端生命 タンパク質動態研究所	Prof. Michael P. Rout (米国ロックフェラー大 学)	タンパク質動態研究所セミナー・生物化学セミナー「A Hole New View: Structure-Function Mapping of the Nuclear Pore Complex」(世話人: 遠藤斗志也)
2019. 6. 26		三浦 俊英 (東北大学病 院 臨床研究推進セン ター)、山本 佳宏 (地方 独立行政法人京都市産 業技術研究所)	第 2 回サイエンスキャリアアップセミナーを開催しました!
2019. 6. 27	先端生命 タンパク質動態研究所	Prof. Jodi Nunnari (米 国カリフォルニア大学 デイヴィス校)	タンパク質動態研究所セミナー・生物化学セミナー 「Mitochondrial Behavior」(世話人: 遠藤斗志也)
2019. 7. 3		松崎 準 (メルク株式会 社)、長尾 知美 (大日本 住友製薬)、井尻 貴之 (摂南大学理工学部講 師)	第 3 回サイエンスキャリアアップセミナーを開催しました!
2019. 7. 9	先端生命	石谷 太 (大阪大学 微 生物病研究所 教授 兼 群馬大学 生体調節研 究所 教授)	バイオフィォーラム「小型魚類イメージングで明らかになる未知 の発生・老化機構」(世話人: 三嶋雄一郎)
2019. 8. 7	先端生命 タンパク質動態研究所	Dr. Niwa Rosen, Maho (University of Califo rnia, USA)	タンパク質動態研究所セミナー・第 184 回細胞生物学セミナー 「Novel Activation of ATF6, a Major Arm of the Unfolded Protein Response pathway by Specific Sphingolipids」(世 話人: 永田和宏)
2019. 11. 29	先端生命 タンパク質動態研究所	高田 啓 (Umeå Univers ity, Sweden 博士)	生命科学・タンパク質動態研究所 合同セミナー「翻訳装置を ターゲットとする抗生物質から いかにしてバクテリアは生き 残るのか?」(世話人: 千葉志信)
2019. 12. 13		木村 成介 (京都産業 大学・生命科学部 教 授) 他 3 名	第 57 回植物バイテクシンポジウム「変身する生き物、変身させ る生き物」開催 (主催: 京都産業大学生態進化発生学研究セン ター)

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
2020. 1. 8	先端生命	河合 恒 (東京都健康長寿医療センター研究所)	バイオフィオーラム「健康長寿を目指したフレイル予防・介護予防研究-お達者健診の成果から」(世話人: 加藤啓子)
2020. 1. 28	産業生命	中山 北斗 (東京大学理学系研究科助教)	生命科学セミナー「Heirloom tomato を用いた葉の形態多様性に関する研究」(世話人: 木村成介)
2020. 2. 1	先端生命	西原 祥子(創価大学 教授)、北川 裕之(神戸薬科大学 教授)、岡 昌吾(京都大学 教授)、若宮 伸隆(酪農学園大学 教授)、中田 博(京都産業大学 教授)	中田 博 教授 退職記念シンポジウム・京都産業大学生命科学部バイオフィオーラム『糖鎖の多様な生物学的機能とそのゆらぎがもたらす疾患』『ショウジョウバエの解析からわかるムチン型糖鎖の機能』(西原)「コンドロイチン硫酸鎖の機能解析に基づく疾患糖鎖生物学」(北川)「シナプス可塑性に与えるAMPA型グルタミン酸受容体とN型糖鎖」(岡)「コレクチンと補体」(若宮)「腫瘍マーカーから情報伝達分子に」(中田)

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
19.1月			対馬学フォーラム 2018 ポスター発表賞に松尾 祐弥さん(総合生命科学・4年次)が入賞しました!
1月	生命資源		第6回 生命資源環境学科 卒業研究発表会開催(2019年2月22日)
1月	生命資源	山岸 博 教授 木村 成介 教授	総合生命科学部『理工系コーオペ教育プログラム』の1期生が「コケ玉づくりワークショップ」に参加しました!
2月	生命システム タンパク質動態研究所	永田 和宏 教授 森戸 大介 研究員	もやもや病の責任遺伝子が脂肪代謝の制御因子であることを発見
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・生命科学研究科の学生12名が合格!!
2月			京都市立紫野高校との高大連携事業を行いました(生物学講座)
2月	生命資源	高橋 純一 准教授	「京都・土庄むすびわざ大学」公開講座を開催
2月	生命システム タンパク質動態研究所	永田 和宏 教授	タンパク質動態研究所の遠藤斗志也教授がゴードン研究会議のChairに選ばれました!
2月	生命資源	高橋 純一 准教授	ニホンミツバチの自己治療行動の発見および全ゲノムのドラフト解読に成功
3月			平成30年度 GSC4 年次生英語研究発表会を開催しました
3月	生命資源	河邊 昭 准教授	モデル植物のシロイヌナズナとその近縁種を用いて葉緑体のRNA編集の進化を明らかにしました
3月	生命資源	河邊 昭 准教授 吉田 貴徳 研究助教	植物の核ゲノムへ入り込んだ塩基配列のDNAメチル化修飾による制御機構が報告されました
4月	先端生命	高橋 純一 准教授	和歌山県南部町で総合生命科学部の学生らが世界農業遺産フォーラムで発表および出張オープンキャンパスを開催
4月			京都府立柱高等学校との高大連携事業に関する協定を締結
4月	産業生命	佐藤 賢一 教授	SDGs(エスディーゼーズ)をテーマとする特別授業を京都府立山城高等学校で実施しました!
4月	産業生命	佐藤 賢一 教授	「SDGs」と「ハテナソン」がコラボレーション 学生がSDGsへの理解を深めるオリジナルワークショップを開催
4月	先端生命 タンパク質動態研究所	永田 和宏 教授	ヒト由来カルシウムポンプの高分解能構造と活性制御機構を解明~細胞内カルシウム恒常性維持機構の破綻が引き起こす疾病の原因解明に光~
4月	先端生命	本橋 健 教授	PCRクローニングを効率的に行うための新しいベクターを開発しました
5月			令和元年度 総合生命科学部奨励金授与式を挙行了しました
5月	大学院	上垣 日育(生命科学 研究科・博士後期課程3年 次)	生命科学研究科 上垣 日育さんがEMBO workshopで優秀ポスター賞を受賞!
6月	先端生命	遠藤 斗志也 教授 河野 慎 研究助教	ミトコンドリアのブレ配列をもつタンパク質の内膜透過に必須の膜電位の役割を解明しました!
6月			サイエンスコミュニケーション研究会「サングラス」が小豆島で子供向け科学体験イベントを開催!
7月			環境教育イベント「フォトフレームとおし葉づくり」を開催しました!
7月		高橋 純一 准教授	学生養蜂団体『ミツバチ同好会BOON!!』が7月13日(土)にキャンパス内で採蜜活動を行います!
7月		木村 成介 教授	『理工系コーオペ教育プログラム』事後学習会及び成果報告会を開催
7月	大学院	吉良 彰人(2019年生命 科学研究科卒)	吉良 彰人さん(2019年生命科学研究科卒)が日本Cell Death学会でポスター発表最優秀賞を受賞!
7月			京都府立山城高校・京都市立紫野高校との高大連携事業を実施
7月	先端生命	加藤 啓子 教授 藤田 明子 研究助教	側頭葉てんかんモデルマウスを用いた、新規の尿中揮発性有機化合物・バイオマーカーを発見

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
7月			上賀茂小学校での少年補導キャンプに総合生命科学部・生命科学部の学生がボランティアで参加!
7月			理系分野の高大接続授業「KSUサイエンス講座」を実施
8月			さくらサイエンスプラン支援 韓国、タイ、インドネシアの大学との研究交流を実施
8月	産業生命	木村 成介 教授	中学校の理科教育における新たな生徒実験を提案
8月	先端生命	遠藤 斗志也 教授	タンパク質の細胞内輸送の校正システムを発見
9月	先端生命	本橋 健 教授	シアンLEDを使用した安全、かつ安価なDNAアガロースゲル検出システムを生命科学部の本橋 健 教授が開発
10月	先端生命	潮田 亮 准教授	生命科学部 潮田 亮 准教授が日本生化学会奨励賞を受賞!
10月	先端生命	遠藤 斗志也 教授	ミトコンドリアへのタンパク質搬入口TOM複合体の精密構造と働く仕組みを解明—英国科学誌『Nature』オンライン版に掲載
10月	大学院	藤井 唱平 (生命科学研究所 博士後期課程・3年次)	生命科学研究所 藤井 唱平さんが第 92 回日本生化学会大会 で若手優秀発表賞を受賞!
10月	産業生命	木村 成介 教授	「虫こぶ」形成に関わる遺伝子を解明
11月	先端生命	永田和宏 教授	生命科学者・歌人の功績が評価、タンパク質動態研究所所長・生命科学部 永田 和宏 教授が瑞宝中綬章を受章
11月	先端生命	板野 直樹 教授	乳がんの抗がん剤抵抗性に働く新たな機構を解明!
11月	産業生命	木村 成介教授	「切っても切っても生えてくる」 葉の断片から再生する植物を用いて栄養繁殖の仕組みを解明
11月			サイエンスコミュニケーション研究会「サングラス」のメンバーがiGEMに参加!
11月	先端生命	千葉 志信 教授	異常メッセンジャーRNA上で停滞したタンパク質合成装置リボソームを救済する 新規因子BrfAの発見とその分子機構の解明
12月	大学院	山下 龍志 (生命科学研究所・博士後期課程1年次)	生命科学研究所 山下 龍志さんが第 2 回オルガネラ・ゾーン 若手の会で優秀発表賞を受賞!
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しました!
12月			全国学生養蜂サミット 2019 で学生養蜂団体ミツバチ同好会BOOON!!と総合生命科学部の高橋研究室の学生が発表を行いました。
12月	大学院	古田 綾 (生命科学研究所 博士前期課程・2年次)	生命科学研究所 古田 綾さんが「日本生体エネルギー研究会第 45 回討論会」で最優秀口頭発表賞を受賞!
20.1月	先端生命	瀬尾 美鈴 教授	神経軸索を誘導するタンパク質アノスミンが脳血管内皮細胞に作用し、血管新生を促進することを明らかに
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 8 名が合格!!
2月	生命資源		第 7 回 生命資源環境学科 卒業研究発表会開催 (2020 年 2 月 28 日)
2月			令和元年度海外サイエンスキャンプを実施しました
3月	先端生命	加藤 啓子 教授 藤田 明子 研究助教	うつ・不安症モデルマウスにおいて、情動行動と連動する尿中代謝産物を発見—マウスの心が尿でわかる—
3月	先端生命	遠藤 斗志也 教授	オルガネラ (細胞内器官) 間のリン脂質輸送に係るヒトのタンパク質「VAT-1」の構造を決定し、その働きを解明しました。
3月	先端生命	津下 英明 教授	クライオ電子顕微鏡により明らかにした細菌毒素タンパク質の膜透過機構『Nature Structural & Molecular Biology』オンライン版に掲載
3月	産業生命	西田 貴明 准教授	もと湿地の水田が洪水の発生を抑制すること、を明らかにしました

## 学習施設

- 8 中央図書館
- 18 4号館
- 19 13号館
- 21 6号館(大教室棟)
- 25 11号館(化学学部)
- 26 5号館(経済学部・経営学部)
- 28 12号館
- 29 真理館(法学部・国際関係学部)
- 30 雄飛館
- 31 本館
- 33 10号館
- 35 1号館
- 53 サギタリウス館  
(現代社会学部・外国語学部)
- 56 天地館

## 研究・実験・学習施設

- 9 第5研究室棟
- 10 15号館(生命科学部)
- 11 14号館(情報理工学部)
- 12 温室棟
- 13 9号館
- 14 16号館
- 15 第1実験室棟
- 16 第2研究室棟
- 17 第2実験室棟
- 22 第3研究室棟
- 23 第4研究室棟
- 24 第1研究室棟
- 32 神山天文台
- 34 万有館(理学部)
- 55 第6研究室棟

## 厚生施設

- 7 神山ホール
- 20 並楽館(食堂など)
- 27 ウッドデッキ
- 38 神山研修室棟
- 39 国際交流会館
- 40 追分寮
- 41 津ノ国寮
- 43 神山寮
- 48 五常寮
- 49 賀茂川寮
- 50 葵寮

## 課外活動施設

- 1 神山コロシアム
- 2 第2課外活動棟
- 3 課外活動棟
- 51 瑞秀庵(茶室)
- 54 遠望館

## スポーツ施設

- 4 神山テニスコート
- 5 総合体育館
- 6 神山球技場
- 36 第2グラウンド
- 37 市原テニスコート
- 42 第2体育館
- 44 総合グラウンド
- 45 馬場
- 46 屋内野球練習場
- 47 野球場
- 52 ストリートバスケットコート



### 生命科学部関連校舎

名称
第1実験室棟
16号館
9号館
15号館

# Campus Map

豊かな緑に囲まれた広大なキャンパスに文系と理系の学生が集まる一拠点総合大学。  
学部の垣根を越えて、学生が共に学び、交流する、自由で活気あふれるキャンパスです。

## 京都産業大学 生命科学部 年報

### 第1号 2019年度(平成31年度/令和元年度)

発行日 2020(令和2)年11月16日

発行者 京都産業大学 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/>