

ISSN 2436-0007

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2号》

2020年度
令和2年度



【グリーンインフラ：雨水浸透型植栽帯】

一見すると普通の道路の植栽ですが、この植栽帯は車道に降った雨が植栽に流れ込み、地下に雨水を浸透貯留できるため、都市洪水対策の施設になります。

このような自然や生物の力を活かして、環境面だけでなく、防災減災や地域活性化に貢献する空間や施設をグリーンインフラと呼ばれており、

このようなグリーンインフラの機能の評価や社会導入に必要な制度等を研究しています。

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	3	
2020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	6
板野直樹	教授	11
潮田亮	准教授	14
遠藤斗志也	客員教授	17
加藤啓子	教授	21
金子貴一	教授	24
川根公樹	准教授	26
河邊昭	教授	28
黒坂光	教授(副学科主任9月まで)	31
齋藤敏之	教授	32
白鳥秀卓	教授(副学科主任10月から)	35
瀬尾美鈴	教授	38
高桑弘樹	教授	41
高橋純一	准教授	43
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	55
中村暢宏	教授	58
西野佳以	准教授	62
三嶋雄一郎	准教授	65
本橋健	教授(学科主任10月から)	67
山岸博	教授	70
横山謙	教授(学科主任9月まで)	73
産業生命科学科	産業生命科学科の教育研究活動	78
川上雅弘	准教授	82
木村成介	教授(副学科主任)	84
佐藤賢一	教授(副学部長)	87
三瓶由紀	准教授	90
染谷梓	准教授	92
寺地徹	教授(学部長)	94
西田貴明	准教授	98
野村哲郎	教授(学科主任)	100
浜千尋	教授	103
前田秋彦	教授	106
2020年	動物実験教育訓練および動物慰霊祭	108
2020年	生命科学部 研究トピックス	110

巻頭言

生命科学部長

佐藤 賢一

京都産業大学生命科学部（以下、本学部）の年報第2号（2020年度：2020年4月～2021年3月）をここにお届けする。本年報は、学部専任教員による教育研究活動、および学部や学科などによる組織的な教育研究活動の成果を年度単位で取りまとめたものである。専任教員の自己評価と相互評価、そして学内外の様々な関係者による客観的な外部評価に利活用する基礎資料とすることを念頭に、本学部の前身学部である総合生命科学部の設立以来、毎年作成並びに出版（一般公開）している。総合生命科学部年報第1号（2010年度：2020年4月～12月）の永田和宏氏（学部長・教授（当時）、現・JT生命誌研究館館長、京都産業大学名誉教授）による巻頭言には次の記載がある。

私学においては、学生に優れた教育を保障することが、大学としての最重要の課題である。しかしながら、本学部は、教育だけを行なっていて、それで教員としての義務を全うしているとは思えない。良質の教育を行うことは必要条件ではあるが、十分条件ではない、大学という場における良い教育は、研究者としても優れた教員にしかできないと、私は考えている。研究者としても優れた業績を残せるような学部でありたいというのは、学部発足にあたっての希望であり、また大学からの要請でもあった。（引用ここまで）

この記載を含む巻頭言に示された総合生命科学部の教育研究活動のスローガン「よりよい教育はよりよい研究から」は、2019年度に開設された本学部においても変わらず受け継がれている。

振り返ってみれば、2020年度（令和3年度）本学部はもとより、大学全体、さらにはこの社会と世界の全体が新型コロナウイルス COVID-19 による感染症に翻弄され続けた「コロナ禍の1年」であったと言えるであろう。京都産業大学では前年度（2019年度）春季卒業式（当初3月21・22日に予定）の全面中止を皮切りに、2020年度入学式の全面中止、春学期授業開始の延長、そして5月11日からの全面的な遠隔授業（教員と学生の、そして学生同士の直接・対面のやりとりがない、オンライン環境下でのオンデマンド型授業や

ライブ配信型授業など)による春学期授業開始といった動き、諸対応があった。そうした中で本学部では講義や演習などはもとより、実習や実験をともなう授業科目においても遠隔授業対応を余儀なくされた。そして各教員の研究活動の基盤となる研究室での学生・大学院生の活動も限りなくゼロに近い状態を維持せざるを得ない状況にあった。このように極めて限定的なものとなっていた本学部の教育研究活動は、国内における新型コロナウイルス感染症の第2波が下り坂となった9月(9月21日に秋学期開始)に研究室における学生・大学院生の活動が認められるようになったことを受けて、「ウイズコロナ」状況下にあったの正常化・適応措置をとることとなった。

そういった1年間の中にあつての生命科学部の教育研究の成果には、これまで通りのトップジャーナルをはじめとする各種学術誌における数多くの論文掲載や科学研究費など外部資金の新規獲得、学内外の様々なステークホルダーとむすびついで共同研究や教育活動、地域社会の活性化支援、企業や行政との連携などによる持続可能な開発目標

(SDGs)への貢献など、実に様々なものがある。ぜひ、このページをめくって本年報がもつ多様なコンテンツに接していただき、実感いただくことができれば幸いである。

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			飯田 英明 (6月まで)	稲葉 隆明	
		客員教授	遠藤 斗志也			松本 俊介 (7月まで) 齊藤 知加 小野 鈴花 (10月から)	鈴木 俊治 須賀 比奈子 佐藤 久夫 渡邊 康紀 丹羽 一 荒磯 裕平 松本 俊介 (8月から)	足立 織生
		教授	加藤 啓子			藤田 明子 (11月まで)	藤田 明子 (12月から) 藤村 耕治 (10月から) 山口 翔 (10月から)	渡邊 裕子
		教授	金子 貴一					
		准教授	川根 公樹			村田 真智子		
		教授	河邊 昭			吉田 初佳 (5月まで) 吉田 貴徳 (4月まで)		
		副学科主任 (9月まで) (生命システム学科 副学科主任)	教授	黒坂 光			中村 直介	
		(動物生命医科学科 学科主任)	教授	齋藤 敏之			安田 瞳美 (8月から)	
		副学科主任 (10月から)	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					
		准教授	高橋 純一			奥山 永		
		教授	竹内 実			瀬田 真由子 中野 美子 (9月から)	石田 喬裕	
		准教授	棚橋 靖行					
		教授	千葉 志信			高田 啓 (3月から)		
		教授	津下 英明			藪田 淑予	吉田 徹 菅原 佳奈子	
		教授	中村 暢宏					
		准教授	潮田 亮			石田 玉美 福田 泰子 伊藤 進也 藤原 圭吾	永田 和宏 種村 裕幸	
		准教授	西野 佳以					
		准教授	三嶋 雄一郎			若林 貴美 石橋 幸大 (2月から)		
		学科主任 (10月から) (生命資源環境学科 学科主任 兼務)	教授	本橋 健		佐藤 望 楠川 友季		
		教授	山岸 博			橋本 絢子		
		学科主任 (9月まで)	教授	横山 謙		平山 温子 池田 貴子 トクマコ アレクサンデル	岸川 淳一 平山 温子	横山 朋子
産業生命科学科		准教授	川上 雅弘					
		副学科主任 (生命資源環境学科 副学科主任)	教授	木村 成介		池松 朱夏 (9月まで) 坂本 智昭 水野 華織		
		副学部長	教授	佐藤 賢一			井尻 貴之	
		准教授	三瓶 由紀					
		准教授	染谷 梓					
		学部長	教授	寺地 徹		植村 香織 (4月まで) 永島 伊都子	塚谷 真衣 植村 香織 (5月から)	
		准教授	西田 貴明					
		学科主任	教授	野村 哲郎			花房 美緒	
		(生命システム学科 学科主任)	教授	浜 千尋				
		(動物生命医科学科 副学科主任)	教授	前田 秋彦				

生命科学部事務室スタッフ名簿

大学院生	その他
米原 由喜 (M2) 渡邊 優作 (M2)	
	竹田 弘法 (学振 PD) 篠田 沙緒里 (学振 PD) 阪上 春花 (学振 PD)
田村 聡哉 (M2) TANGSUDJAI Siriporn (D5)	
濱崎 祐也 (M1)	
梶田 春奈 (M2) 吉邨 正夢 (M2) 西藤 圭祐 (M1) 達富 一湖 (M1)	
柳田 正義 (M2)	
渡谷 みのり (M2) 横山 久留美 (M2)	
下吉 桂輔 (M2) 藤井 麻衣 (M2) 谷村 優香 (M1)	
福光 一生 (M1) ハサン エムティイー ムラト (M1)	
渡邊 佳怜 (M1)	
中田 帆浪 (M2)	
齊藤 玲香 (M2)	
崎山 歌恋 (M2) 高橋 大海 (M2)	
山田 等仁 (D1)	
藤井 唱平 (D3) 上垣 日育 (D3) 堤 智香 (D3) 葛西 綾乃 (D2) 山下 龍志 (D2) 和田 匠太 (M1)	
深田 彩人 (M2) 奥西 慧菜 (M1)	
宇賀神 希 (M2) 林田 千優 (M1)	
中野 敦樹 (M1) 佐伯 詩織 (M1)	津山 泰一 (学振 PD)
小俣 恵美 (M2)	
中元 海里 (M2) 馬場 裕士 (M1) 新原 由依 (M1)	
加茂 優也 (M2)	
西村 勇飛 (M2)	
中西 泰介 (M1) 金 美来 (M1)	

役職名等	氏名
教学センター 生命科学部事務長 (4月から)	山岡 哲也
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)	上山 慧
教学センター 契約職員 (生命科学部事務室) (4月から)	外山 智子
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)	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) (4月から)	赤坂 友理
教学センター 嘱託職員 (実験補助員) (4月から)	鷺見 友梨
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	高桑 弘樹
自己点検・評価運営委員会 (総合生命科学部・生命科学部)	中村 暢宏
自己点検・評価運営委員会 (生命科学研究科・工学研究科)	前田 秋彦
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・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 (生命科学研究科・工学研究科)	佐藤 賢一
教務委員会	佐藤 賢一
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)	加藤 啓子
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	川上 雅弘
入学試験委員会	川根 公樹
入試制度検討委員会	川根 公樹
進路・就職支援センター運営委員会	西野 佳以 金子 貴一
図書館委員会	三瓶 由紀
学術リポジトリ運営委員会	三瓶 由紀
国際交流推進委員会	中村 暢宏
情報基盤運営委員会	津下 英明
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)	津下 英明
人権センター運営委員会	西野 佳以
人権委員会	板野 直樹
窓口相談員	西野 佳以
論集編集系列委員会	津下 英明
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 千葉 志信
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、植物の生理機能解析等、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。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、板野
物質生物化学	1	黒坂			
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	潮田、加藤、齋藤、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、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、白鳥、棚橋			

抗老化医学研究室

Laboratory of Anti-Aging Medicine

教授 板野 直樹

Prof. Naoki Itano, Ph.D.



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認することである。抗老化医学研究室では、この目的のため、分子生物学、細胞生物学、生化学、そして、遺伝子工学の先端技術を駆使して、以下の研究課題に取り組んでいる。

1-1: ヒアルロン酸合成機構の解明とアンチエイジング技術への展開

関節機能の低下が原因で寝たきりになる高齢者が増えている。この要因として、関節でクッションや潤滑の役割をするヒアルロン酸の減少がある。ヒアルロン酸は、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcA)が、 β -1,3 と β -1,4 結合で交互に連結した2糖ユニットの繰り返し構造からなる高分子多糖であり、特に結合組織の細胞外マトリックス成分として広く存在している。細胞はこのマトリックスにヒアルロン酸受容体を介して接着し、細胞内情報伝達系を活性化して細胞増殖や移動の調節に働くことされる(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

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、がん幹細胞を標的とする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、ヒアルロン酸過剰産生による HBP の加速ががん幹細胞性を調節する機構の解明を目的に、乳がん細胞における HBP 下流シグナルを解析した。ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K)/Akt およびグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 β (GSK3 β) は、癌の進行に関連する複数のシグナル伝達経路を支配している。また、これらのシグナル伝達経路は、がん幹細胞の自己複製にも関連しているため、これらのシグナル分子のリン酸化状態をウェスタンブロットティング法により分析した。その結果、ヒアルロン酸欠損がん細胞は、対照細胞と比較して、Ser473 および Thr308 での Akt のリン酸化や Ser9 での GSK3 β のリン酸化が顕著に減少した。GSK3 β のリン酸化はその活性を阻害することにより、 β -カテニンのリン酸化を抑制して安定化と核移行を促進する。安定化された β -カテニンは、その後、CSC の維持と増幅に重要な上皮間葉転換 (EMT) を誘導する。ヒアルロン酸欠損がん細胞では、GSK3 β のリン酸化の減少と共に、 β -カテニンの発現が減少した。以上より、ヒアルロン酸合成と連動した HBP が PI3K/Akt-GSK3 β - β -カテニンシグナル伝達経路を介してがん幹細胞性の制御に働くことが示唆された。

3. Research projects and annual reports

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

1-2. 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).

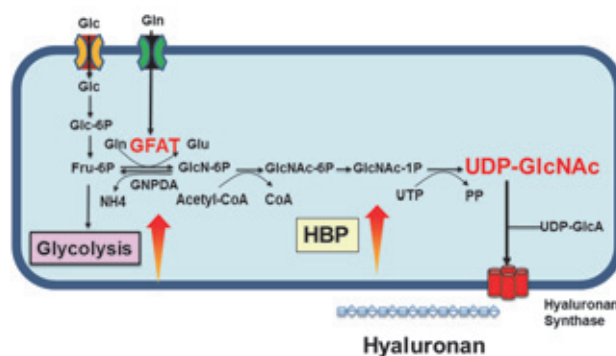


Figure 1. HA biosynthesis and HBP

In this study, we investigated downstream signals of HBP in breast cancer cells to elucidate the mechanism by which HBP flux accelerated by HA overproduction regulates cancer stemness. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) govern several signaling pathways associated with cancer progression. Since these signal pathways have also been suggested to be associated with self-renewal of CSCs, the phosphorylation state of these signal molecules was analyzed by Western blotting. The HA-deficient cancer cells displayed greatly reduced Akt phosphorylation at both Ser473 and Thr308 as well as GSK3 β phosphorylation at Ser9 as compared with control cells. The phosphorylation of GSK3 β inhibits its activity and prevents it from phosphorylating β -catenin, thus allowing the stabilization and nuclear translocation of β -catenin. The stabilized β -catenin subsequently induces the epithelial-mesenchymal transition (EMT) crucial for the maintenance and expansion of CSCs. In accordance with the reduced phosphorylation of GSK3 β , the expression of β -catenin was decreased in HA-deficient cancer cells. These results suggest that HBP flux coupled with HA biosynthesis acts on CSC regulation via the PI3K/Akt-GSK3 β - β -catenin signaling pathway.

4. 論文, 著書など

Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules* 10:1525 (2020)

5. 学会発表など

小林孝, Chatchadawalai Chokchaitaweasuk, 泉川友美, 板野直樹 ヘキソサミン代謝によるがん幹細胞性の制御: ヒアルロン酸とO-GlcNacシグナルの意義 第52回日本結合組織学会学術大会

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 2 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 2 年

水谷糖質科学振興財団 第 27 回研究助成

課題名: がん幹細胞におけるヒアルロン酸糖代謝依存的なストレス耐性機構の解明

研究代表者: 板野直樹, 取得年度: 令和 2 年

2) 知財権等 なし

3) 学外活動 板野直樹: 日本生化学会評議員
日本糖質学会評議員
日本結合組織学会評議委員
日本がん転移学会評議委員
プロテオグリカンフォーラム世話人
ISHAS (International Society for Hyaluronan Sciences) Trustee

4) 受賞等

なし

5) その他

ホームページ:

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



研究室メンバー

分子細胞生物学研究室

Laboratory of Molecular and Cellular Biology

准教授 潮田 亮

Associate Prof. Ryo Ushioda, Ph.D



1. 研究概要

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

タンパク質は正しく合成され、正しい構造をとって初めて本来の機能を発揮するが、それには種々の分子シャペロンが重要な働きをしている。また、いったん正しい機能を獲得したタンパク質も、細胞に不断にかかる種々のストレスによって変性したり、遺伝的変異によってどうしても正しい構造をとれないタンパク質も存在する。このようないわゆる不良タンパク質は、単に機能を持たないだけでなく、細胞毒性によって細胞死を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の神経変性疾患の原因ともなっている。従って、「**タンパク質を正しく合成する productive folding**」と、「**ミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための品質管理機構**」をともども研究することは、「**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、3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) 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
- 2) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
- 3) タンパク質品質管理に関わる新規システイン修飾

以下、プロジェクト 1) 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。

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环境下にあるが、この酸化的环境下において 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、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

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

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。小胞体は酸化的フォールディングの場であり、そのレドックス環境はサイトゾルと比較し、酸化的環境に維持されている。また、多くの酸化酵素が存在し、酸化的フォールディングを触媒している (図 1-①)。この酸化的環境で、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 は小胞体でミスフォールドした分解基質のジスルフィド結合を自身の還元活性で切断し、小胞体からサイトゾルへの排出を促進し、タンパク質品質管理において重要な役割を果たしていることを見出した (図 1-②、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出し、ポンプとチャネルを ERdj5 の還元活性を介して、reciprocal にかつ合目的的に制御するという、極めて巧妙な制御機構を明らかにしつつある (図 1-③)。

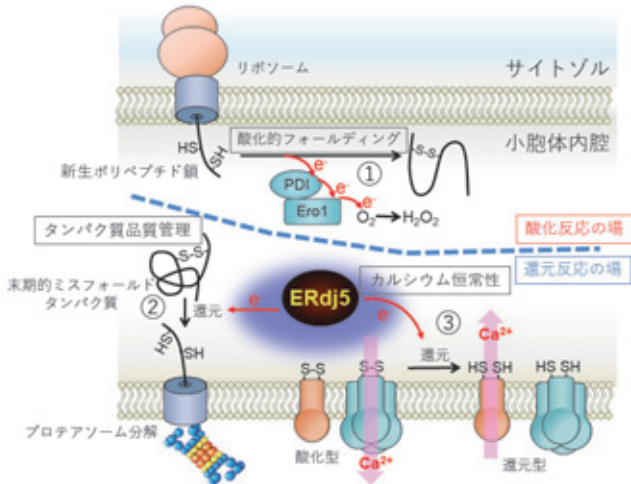


図 1. 小胞体は酸化反応を中心とした酸化反応の場として考えられてきた。潮田らは小胞体内腔の還元反応の重要性を明らかにしてきた。

今回、さらに ERdj5 の重要性を明らかにするため、ERdj5 ノックダウン/ノックアウトをした線虫、CRISPR/Cas9 を用いて樹立した ERdj5 欠損 HeLa 細胞、または MEF 細胞を用いて、ERdj5 欠損による細胞内異常を観察した。線虫では、これまで知られていた筋肉以外の腸などの細胞でミトコンドリアの断裂が観察された。このミトコンドリアの断裂は、哺乳類細胞 HeLa 細胞、MEF 細胞でも再現された。小胞体局在タンパク質 ERdj5 の欠損が、なぜミトコンドリアの形態に影響を及ぼすのかを調べた。今回、ERdj5 機能不全がサイトゾルのカルシウムイオン濃度が恒常的に上昇することを突き止めた。ERdj5 欠損細胞では、カルシウムイオン濃度依存的に活性化する Drp1 が活性化しており、Drp1 の GTPase 活性依存的にミトコンドリアのくびり切りが起こることを見出した。ERdj5 欠損によるミトコンドリア異常断裂はミトコンドリア機能の低下を引き起こし、細胞内での ROS を上昇させた。このことにより、細胞のアポトーシスを惹起させ、この細胞死は神経変性疾患などの疾患を悪化させる可能性も示唆される。また、線虫の ERdj5 欠損は線虫の寿命を低下させることも明らかにした。これらの知見は ERdj5 の制御に関し、その重要性を再認識する結果

となった (*Submitted*)。さらに、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。

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:

Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and Ca²⁺ flux. We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in the endoplasmic reticulum (ER). ERdj5 forms the supramolecular complex with EDEM and BiP, and activates the degradation of proteins misfolded in the ER by cleaving the disulfide bonds of misfolded proteins and facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by the ubiquitin-proteasome system, which is called as ERAD (R. Ushioda *et al.*, *Science* 2008; M. Hagiwara *et al.* *Mol. Cell* 2011; R. Ushioda *et al.* *Mol. Biol. Cell* 2013).

We found that ERdj5 cleaves the disulfide bond of SERCA2b, a Ca²⁺ pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2b. It suggests that the redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca²⁺ homeostasis in the ER (R. Ushioda *et al.*, *PNAS* 2016). Furthermore, Inaba group (Tohoku Univ.) and we elucidated the structure of SERCA2b (Inoue *et al.* *Cell Rep.* 2019). This information may help to understand the activation mechanism of SERCA2b pump through ERdj5. On the other hand, we have revealed the mechanism of the electron transfer to ERdj5 from the nascent chain. Furthermore, we summarized our previous works as a review of the redox-dependent endoplasmic reticulum homeostatic mechanism.

Here, we focused on the control of the Ca²⁺ pump and channel by the redox regulation in the ER. Here, we obtained the structural information of SERCA2b for understanding how ERdj5 promotes the influx of Ca²⁺ by SERCA2b. Then, we found that the reductase ERdj5 affects the Ca²⁺ release activity of the IP3R. Additionally, we found that ERdj5 deficiency causes mitochondrial fragmentation due to Ca²⁺ homeostatic disruption. It was clarified that redox regulation by ERdj5 is involved in the uptake and release of calcium ions in the ER.

4. 論文、著書など

潮田亮:レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明～還元反応の場としての小胞体～, 生化学192(4), 536-546(2020)

5. 学会発表など

潮田亮:還元反応の場としての小胞体, 第1回レドックスR&D委員会サテライトシンポジウム, オンライン, 2021.03.04-05(招待講演)

堤智香, 潮田亮, 永田和宏:小胞体レドックス環境を構築するグルタチオン輸送機構の解明, 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.06.09-11

Ryo Ushioda: Redox signal for maintenance of ER homeostasis. 第93回日本生化学会大会シンポジウム, オンライン, 2020.09.14-16

和田匠太, 永田和宏, 潮田亮:ERdj5を介した小胞体ストレスセンサー制御機構の解明, 第27回次世代医工学研究会, オンライン, 2020.12.07

堤智香, 潮田亮, 永田和宏:小胞体レドックスはどのように構築されるのか, 第3回オルガネラゾーン若手の会, オンライン, 2020.12.2

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究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

研究分担者:潮田亮, 取得年度:2020-2021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:潮田亮(研究代表者:遠藤斗志也)

取得年度:2020-2021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開発分担機関代表者:潮田亮, 取得年度:2020年

資生堂

課題名:ジメチルピラゾリルジメチルピリミジン塩酸塩によるチロシナーゼタンパク分解のメカニズム解明に関する研究
研究代表者:潮田亮, 取得年度:2020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:2020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

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名:TMX4を中心とする小胞体膜近傍での還元ネットワークの解明

研究代表者:堤智香, 取得年度:2018-2020年

2) 学外活動

(1) 潮田亮:文部科学省 科学技術・学術政策研究所 専門調査委員

(2) 潮田亮:小胞体ストレス研究会 世話人

(3) 潮田亮:京都第二赤十字看護専門学校 非常勤講師

(4) 潮田亮:新学術領域「オルガネラゾーン」班友

3) アウトリーチ活動

(1) 潮田亮:日本・青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」に参加

(2) 潮田亮:日本学術振興会「ひらめき★ときめきサイエンス」採択

(3) 潮田亮:兵庫県立鳴尾高等学校 模擬授業「生命を「カタチ」作るもの」



潮田研ホームページ

<https://ushioda-lab.com/>



生物化学研究室

Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤 斗志也

Prof. Toshiya Endo, Ph. D.



1. 研究概要

真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じてミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアは *de novo* には作られず、既存のミトコンドリアを拡大、分裂、分配することで増える。ミトコンドリアを拡大するためには、ミトコンドリアを構成する 1000 種類を越えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生成や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、オルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

2. 本年度の研究成果

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

1000 種におよぶほとんどのミトコンドリアタンパク質はミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体によりミトコンドリア内に取り込まれ、その後外膜、膜間部、内膜、マトリクスといったミトコンドリア内の区画に仕分けられる。外膜には小分子の輸送を担うポリンをはじめとするいくつかの β バ

レル型膜タンパク質が存在する。 β バレル型膜タンパク質は TOM 複合体を介して外膜を通過した後、膜間部側から外膜のトランスロケータ SAM 複合体により、 β バレル構造をつくりつつ外膜に挿入される。SAM 複合体は Sam35, Sam37, そして β バレル型膜タンパク質の Sam50 と Mdm10 から構成されるが、Mdm10 は常に SAM 複合体に組み込まれているのではなく、SAM 複合体と ERMES 複合体 (ER とミトコンドリアのコンタクトをつくる複合体) との間をダイナミックに往き来することが示唆されていた。私たちは、SAM 複合体が β バレル型膜タンパク質を外膜に組み込む仕組みを解明するために、出芽酵母由来の Mdm10 を含む SAM 複合体と含まない SAM 複合体のクライオ EM 構造を分解能 2.8-3.2Å で決定した (Takeda et al. *Nature* 2021)。

Mdm10 を含まない SAM 複合体構造では、Sam50 が 2 量体を形成しており ((Sam50)₂-Sam35-Sam37)、各 Sam50 は β バレルが完全に閉じない「ラテラル開口型」であった (この複合体を SAM^{dimer} 複合体と呼ぶ)。Sam50 どうしの相互作用はほとんどなく (界面には脂質がはさみこまれていた)、Sam35 と Sam37 が互いに相互作用しつつ、Sam50 の 2 量体にサイトゾル側から結合することで、Sam50 を SAM 複合体に固定していた。一方、これまでの生化学的解析と低分解能の EM 解析からは、SAM 複合体の構造として Sam50 : Sam35 : Sam37 = 1 : 1 : 1 の化学量論で構成されるヘテロ 3 量体構造 (SAM^{core} 複合体と呼ぶ) が示唆されており、ミセル中のヘテロ 3 量体のクライオ EM 構造も最近報告された。そこで、His タグおよび HA タグをそれぞれ付加した 2 種類の Sam50 を、内在性 Sam50 を欠失した酵母株に導入し、His タグによるアフィニティ精製を行った。その結果、His-Sam50 とともに HA-Sam50 が精製されたことから、SAM^{dimer} 複合体がミトコンドリア上に確かに存在していることが示された。さらにネイティブ PAGE による複合体サイズの解析や架橋実験により、出芽酵母のミトコンドリア上には SAM^{core} 複合体と SAM^{dimer} 複合体がともに存在することが明らかとなった。それではなぜミトコンドリア上に SAM^{core} 複合体と SAM^{dimer} 複合体が存在するのか。基質の β バレル型膜タンパク質前駆体は、 β バレル構造を形成

する β ストランドのうち最も C 端側のストランド中の「 β シグナル」が SAM 複合体に認識されることが知られている。そこで His タグを付加した基質 Tom40 の β シグナルを樹脂に固定化し、どちらの SAM 複合体が結合するかを調べた。その結果、基質 Tom40 の β シグナルは SAM^{dimer} 複合体に結合することがわかった。すなわち、SAM^{dimer} 複合体は基質の Tom40 を受け入れる前段階の分子種であることがわかった。

現在の私たちのモデルでは、基質 Tom40 の β シグナルが SAM^{dimer} 複合体に認識されると、Tom40 は一方の Sam50 分子と入れ替わる形で SAM 複合体に結合し、一過的に Sam50-Tom40-Sam35-Sam37 という中間体複合体をつくる。この複合体中で、Tom40 の β バレル構造が形成されると考えられる。 β バレル構造が完成すると Tom40 は SAM 複合体から解離する必要があるが、私たちの以前の生化学的解析から、もう一つの β バレル型膜タンパク質の Mdm10 が Tom40 と入れ替わることで、完成型 Tom40 を SAM 複合体から追い出すことが示唆されていた。実際、今回決定された Mdm10 を含む SAM 複合体 (SAM^{Mdm10} 複合体) では、SAM^{dimer} 複合体中の一方の Sam50 分子が Mdm10 に入れ替わっており、Mdm10 のバレル構造内に Sam37 の長いヘリックス構造が入り込むことで、Mdm10 が SAM 複合体につなぎ止められていた。この後、Mdm10 がもう一つの Sam50 分子と入れ替わることで SAM^{dimer} 複合体が再生成され、反応サイクルが完結すると考えられる。

3. Research projects and annual reports

Eukaryotic cells are highly compartmentalized into membrane-bounded organelles with distinct functions. Mitochondria are essential organelles that fulfill central functions in cellular energetics, metabolism and signaling. We are studying the molecular mechanisms of biogenesis and quality control of mitochondria and other organelles from the viewpoint of protein and lipid trafficking. Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and are transported to mitochondria by dedicated import systems. The outer membrane contains several β -barrel membrane proteins, including porins, which are responsible for the transport of small molecules. β -barrel membrane proteins move through the outer membrane via the TOM complex and are inserted into the outer membrane from the intermembrane-space side by the translocator SAM complex, forming a

β -barrel structure. The SAM complex is composed of Sam35, Sam37, and the β -barrel membrane proteins Sam50 and Mdm10, yet Mdm10 is not always incorporated into the SAM complex, but it dynamically moves back and forth between the SAM complex and the ERMES complex (an inter-organelle tethering complex between the ER and mitochondria). To elucidate the mechanism by which the SAM complex incorporates β -barrel membrane proteins into the outer membrane, we determined the cryo-EM structures of the yeast SAM complexes with and without Mdm10 at a resolution of 2.8-3.2Å.

In the structure of the SAM complex without Mdm10, Sam50 formed a dimer ((Sam50)₂-Sam35-Sam37), and each Sam50 was "laterally open" with the β -barrel not completely closed (this complex is called the SAM^{dimer} complex). Sam35 and Sam37 interacted with each other and bound to the dimer of Sam50 from the cytosolic side, thereby anchoring Sam50 to the SAM complex. On the other hand, biochemical and low-resolution EM analyses have suggested a heterotrimeric structure (called the SAM^{core} complex) consisting of Sam50 : Sam35 : Sam37 = 1 : 1 : 1 stoichiometry as the structure of the SAM complex, and the cryo-EM structure of the heterotrimer in micelles was also recently reported. We thus introduced two types of Sam50, one with a His-tag and the other with an HA-tag, into a yeast strain lacking endogenous Sam50, and performed affinity purification using the His-tag resin. The results showed that HA-Sam50 was purified together with His-Sam50, indicating that the SAM^{dimer} complex does indeed exist on mitochondria. Furthermore, analysis of the apparent complex size by native PAGE and cross-linking experiments showed that both the SAM^{core} and SAM^{dimer} complexes are present on yeast mitochondria. Then, an arising question is why the SAM^{core} and SAM^{dimer} complexes exist on mitochondria. It is known that the SAM complex recognizes the " β -signal" in the C-terminal β -strand of the β -barrel part of the substrate precursor. Therefore, we immobilized the β -signal of the His-tagged substrate Tom40 on the resin and examined which SAM complex binds to it. We found that the β -signal of substrate Tom40 binds to the SAM^{dimer} complex. In other words, the SAM^{dimer} complex was a species that accommodates the substrate Tom40.

In our current model, when the β -signal of the substrate Tom40 is recognized by the SAM^{dimer} complex, Tom40 binds to the SAM complex in a manner that replaces one of the Sam50 molecules, transiently forming the Sam50-Tom40-Sam35-Sam37 intermediate complex. Once formation of the β -barrel structure becomes complete, Tom40 needs to dissociate from the SAM complex, but our previous biochemical analyses suggested that Mdm10, another β -barrel membrane protein, could replace Tom40 and drive the mature Tom40 out of the SAM complex. Indeed, in the cryo-EM structure of the SAM complex containing Mdm10 determined in the present study (the SAM^{Mdm10} complex), one of the Sam50 molecules in the SAM^{dimer} complex was replaced by Mdm10, and the long helical structure of Sam37 was inserted into the barrel structure of Mdm10, thereby tethering Mdm10 to the SAM complex. After this, Mdm10 was replaced by another Sam50 molecule, and the SAM^{dimer} complex was re-generated to complete the reaction cycle.

4. 論文, 著書など(2020.4~2021.3)

H. Takeda, A. Tsutsumi, T. Nishizawa, C. Lindau, J.V. Busto, L.-S. Wenz, L. Ellenrieder, K. Imai, S.P. Straub, W. Mossmann, J. Qiu, Y. Yamamori, K. Tomii, J. Suzuki, T. Murata, S. Ogasawara, O. Nureki, T. Becker, N. Pfanner, N. Wiedemann, M. Kikkawa, and T. Endo, Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by β -barrel switching. *Nature* 590 (7844), 163-169 (2021)

Y. Araiso, K. Imai, and T. Endo (Review), Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate. *FEBS J.* online published on Dec 10, 2020

H. Shiino, S. Furuta, R. Kojima, K. Kimura, T. Endo, and Y. Tamura, Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA. *FEBS J.* 288, 3285-3299 (2021) (Online published on Dec 7, 2020)

T. Tamura, A. Fujisawa, M. Tsuchiya, Y. Shen, K. Nagao, S. Kawano, Y. Tamura, and T. Endo, Umeda M, Hamachi I, Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells. *Nat Chem Biol.* 16 (12), 1361-1367 (2020) (online published on Sep 21, 2020).

Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo (Review), Lipid homeostasis in mitochondria. *Biol. Chem.* 401, 821-833 (online published on April 22, 2020)

5. 学会発表など(2020.4~2021.3)

Toshiya Endo: Pathways, machineries and mechanisms of mitochondrial protein and lipid transport (招待講演) DBB Zoom Seminar (hosted by Stockholm University), Online 2020.6.1

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質合成輸送阻害剤の単離 (ポスター発表) 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 黒川量雄, 中野明彦, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間結合因子ERMES複合体クラスターの解離がERストレス軽減に寄与する(ポスター発表) 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

松崎淳平, 田代晋也, 新田莉彩子, 尾野雅哉, 吉丸哲郎, 片桐豊雅, 遠藤斗志也, 田村康: Split-APEX2-GFP を用いたヒトミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイト局在タンパク質の同定(ポスター発表), 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

Haruka Sakaue, Jiyao Song, Toshiya Endo: Requirement of the TOM complex for mitochondrial outer membrane protein biogenesis in vivo (ポスター発表) 第20回日本蛋白質科学会年会, オンライン, 2020.7.7-9

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質合成酵素及び輸送因子阻害剤の探索(口頭発表), 第93回日本生化学会大会, オンライン, 2020.9.14-16

木村啓介, 河合文啓, 平田邦生, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康: Firmicutes bacterium由来のCDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明(ポスター発表), 第43回日本分子生物学会年会 オンライン 2020.12.2-4

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間リン脂質輸送阻害剤の(ポスター発表), 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020.12.2-4

木村啓介, 河合文啓, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康: Firmicutes bacterium由来のCDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明(口頭発表), 第28回山形分子生物学セミナー, オンライン, 2020.12.3

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(A)

課題名:ミトコンドリアの生合成と機能維持を担うタンパク質交通システムの解明

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:2020-2022 年度 (3年)→ 中止

科学研究費補助金・基盤研究(S)

課題名:ミトコンドリアの生合成と機能維持を担うタンパク質交通システムの分子基盤

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:2020-2024 年度 (5年)

科学研究費補助金・新学術領域研究

課題名:Msp1 によるオルガネラ間コンタクトを介したタンパク質交通の校正

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:2020-2021 年度 (3年)→ 中止

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名:細胞内タンパク質の多重局在とその制御機構の解明

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:2020-2024 年度 (5年)

AMED・CREST

課題名:タンパク質の交通が制御するミトコンドリアプロテオスタシスの構造生物学研究

研究代表者:遠藤斗志也, 取得年度:2020-2024 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:2018-2020 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:2018-2021 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:2019-2021 年度 (3年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名:ミトコンドリア膜間部タンパク質の外膜透過における分子機構の解明

研究代表者:阪上春花, 取得年度:2020-2022 年度 (3年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

遠藤斗志也:日本学術会議連携会員

遠藤斗志也: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

竹田弘法:【You Tube ライブ配信「おうちでラボツアー ミトコンドリアの仕組みを探れ」

<https://www.miraikan.jst.go.jp/events/202010241602.html> 実施日時: 2020.10.24

場所: 日本科学未来館遠藤プロジェクト研究室よりライブ配信

遠藤斗志也:【You Tube ライブ配信「トークセッション:研究者に聞く, そんなに化学は面白いの?」

<https://www.miraikan.jst.go.jp/events/202010251603.html>

実施日時: 2020.10.25

篠田沙緒里:【Youtube ライブ配信:第1回 細胞生物若手の会オンライン交流会~すべてはここから始まった】

<https://www.youtube.com/watch?v=TKG7HX6aJFQ&feature=youtu.be>

実施日時: 2020.9.25

4) 受賞等 なし

5) その他 なし



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



1. 研究概要

「神経の可塑的变化」とは、持続的な刺激により、神経回路をつなぐ神経突起（軸索や樹状突起）の分岐や肥大、さらには新たな接続が生じることで、神経伝達物質の質及び量に変化する。またグリア細胞の活性化等も知られている。しかしながら、いまだ分子レベルの裏付けに基づくメカニズムの全容を知るための研究課題は山積であり、現在の研究レベルはスタート地点から少し前に進んだ状況である。我々は、海馬扁桃体を中心とする情動記憶がどのように生じるのかを中心に、辺縁系における神経可塑性の獲得過程を知ることが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 ST3Gal14』が側頭葉てんかんの原因分子であることを見つけた。それは、ST3Gal14を欠失したマウスが、扁桃体（情動中枢）へのてんかん誘導刺激に応答しない、てんかんを発症しないマウスであることを証明したことによる。加えて、てんかん発症に ST3Gal14-成長ホルモン-Arcをつなぐ

シグナル系の制御が関与することを調べるため、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、てんかん発症が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。

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。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*, 2020）。

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、ST3Gal14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、代謝負荷が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、マウスと一部高齢者における、てんかん～うつ疾患に関わる代謝マップの充実に取り組んだ。人とマウスの尿と血液から、てんかんやうつ発症が、体内の代謝変化や腸内細菌の生育に影響することがわかった。その結果、尿中の最終代謝産物を、メンタルヘルス評価系のバイオマーカーとして特定することができた。精神疾患と代謝を結ぶことで、尿によるメンタルヘルス評価系システムの基盤を構築することができた。

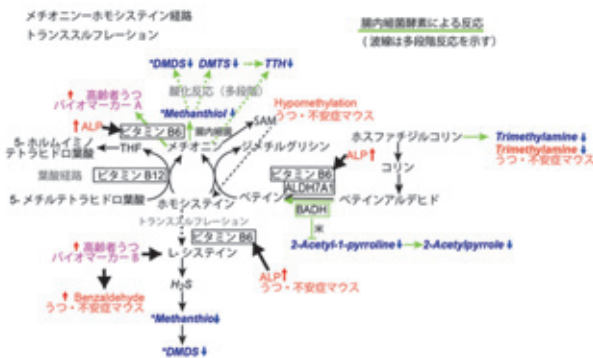


表. てんかんモデルマウス, うつ不安症マウス, 高齢者うつの方の尿の解析からわかってきた, 体内バイオマーカーの代謝経路

3. Research projects and annual reports

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

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

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

Amygdala-kindling model mice are analogous to secondarily generalized complex partial seizures and a model of temporal lobe epilepsy in humans, showing abnormal neural plasticity. Using kindled mice, we have

found two molecules responsible for epileptogenesis, a growth hormone and a sialyltransferase.

First, we found that the expression of growth hormone was up-regulated along neural circuits during the epileptogenesis. The administration of the hormone into the hippocampus markedly enhanced the progression of kindling. Furthermore, the infusion tests of growth hormone and the receptor antagonist demonstrated that the expression level of *Arc* mRNA was strongly correlated with locomotor activity level and that the correlation was completely discriminable among vehicle-, growth hormone-, and the receptor antagonist-groups. In this year, 13 urinary volatile organic compounds (VOCs) exhibited differential abundance between epileptic and control mice, and the corresponding areas under the receiver operating characteristic (ROC) curve were greater than 0.8. TLE induced by amygdala stimulation could affect both endogenous metabolites and the gut flora.

Second, we previously demonstrated that the sialyltransferase ST3Gal4 was upregulated within the neural circuits during epileptogenesis, in contrast, recently that kindling stimulation failed to evoke epileptic seizures in ST3Gal4-deficient mice. On the other hand, the deficient mice showed anxiety, depression, REM sleep disorders.

Third, 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*, 2020).

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

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>

5. 学会発表など

1. Siriporn Tangsudjai, 藤田明子, 奥野貴也, 織田美伽, 加藤啓子 シアル酸転移酵素ST3Gal IV欠損が引き起こす代謝負荷と精神疾患共存症 第39回日本糖質学会年会 2020

2. 藤田明子, Siriporn Tangsudjai, 奥野貴也, 織田美伽, 加藤啓子 St3gal4欠損マウスにおける血漿脂質代謝解析とヒト GWAS形質の検証 第39回日本糖質学会年会 2020

6. その他特記事項

1) 科学研究費: 基盤研究(C)

課題名: 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 研究代表者, 取得年度: R2-4年(3年)

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) その他

令和2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 オンライン交流「最先端基礎生命科学の食品科学への応用」 主担当 (令和2年2月11日~25日)

ホームページ <http://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/ls/kato-keiko.html>



(2021年10月15日)

ゲノム生物学研究室

Laboratory of Genomics

教授 金子 貴一

Prof. Takakazu Kaneko, ph.D.



1. 研究概要

植物の体内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くみの解明を目標に研究を進める。

- (1) 根粒共生系の成立に関与する因子の解明
- (2) 根粒菌ゲノム進化と保存性 DNA 因子多様化についての研究
- (3) 植物の異形葉性誘導と共生細菌叢構成の関連についての研究

2. 本年度の研究成果

- (1) 根粒から分離された 110 系統株がゲノム情報を基に 2 つのグループに分類されるので、110 系統グループ 2 の菌株のダイズ接種を USDA110 と比較した結果、乾燥重量が減少し、窒素固定活性が複数の株で有意に低いことを示した。さらに、グループ 2 の菌株すべてに欠失している多糖合成関連遺伝子の変異株を用いたダイズ接種試験では、乾燥重量の減少が認められた。
- (2) *B. elkanii* の共生特性を決定している遺伝的要因の候補として、共生アイランド (SI) 同様にゲノムへ挿入されているダイズ根粒菌共通ゲノミックアイランド (GI) を見つけた。その GI 内にコードされている遺伝子構成を調べると、SI の fix 遺伝子群 (11 遺伝子) のホモログが GI に存在していた。fix 遺伝子産物の一致率は 80% 程度であった。
- (3) ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA94、ミヤコグサエンドファイト *Rhizobium* sp.KAW12、イネエンド

ファイト *Herbaspirillum* sp.B501、*Azospirillum* sp.B510 を、それぞれ *Rorippa aquatica* に接種栽培し、葉の形態観察、地上部と根の微生物叢比較を行った。接種では、葉の形に大きな変化は認められなかった。16S メタゲノム解析では、最頻出現 OTU は OTU12 (*Rhizobium*) であり、各データの 33~78% の間で変動した。現在のところ、接種による微生物叢変動と異形葉性の相関を示す結果は得られていない。

マメ科植物と根粒菌の共生関係の成立では、Nod ファクターを植物の受容体が感知して、根粒形成を引き起こす。しかし、ある種の根粒菌は、エフェクタータンパク質を宿主細胞に送り込み、マメ科植物の根粒形成シグナルを乗っ取ってしまう。根粒菌のエフェクター Bel2-5 は、植物病原菌 *Xanthomonas campestris* の XopD エフェクターに類似しており、ダイズ nfr 変異体に窒素固定根粒を誘導できる。Bel2-5 は、サイトカニン関連遺伝子の発現を誘導し、エチレン関連遺伝子や防御関連遺伝子を抑制する。Nod ファクター認識能を失い根粒形成できないダイズ変異体に Bel2-5 を発現させると、根粒形成能力を示した。

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) Since 110-cluster strains isolated from soybean nodules are classified into two groups based on genomic information, soybean inoculation of with Group 2 strains belonging to the 110-cluster strains was compared with the USDA110 inoculation showed a decrease in dry weight and significantly lower nitrogen-fixing activity in several strains. Furthermore, the soybean inoculation test using mutant strains of polysaccharide synthesis related genes, which are absent in all Group 2 strains, showed a decrease in dry weight.

(2) The genomic island (GI) common to soybean rhizobia, which is inserted into the genome as well as the symbiotic island (SI), was found as a candidate genetic factor determining the symbiotic characteristics of *B. elkanii*. When the genes encoded in the GI were examined, homologs to the SI *fix* gene cluster were found in the GI, and their identities% of the *fix* gene products were close to 80%.

(3) *B.elkanii* USDA94, *Rhizobium* sp. KAW12, *Herbaspirillum* sp. B501 and *Azospirillum* sp. B510 were inoculated on *Rorippa aquatica*, respectively. After growing plants, the leaf morphology was observed and the microbiome was compared for the shoots and roots, respectively. In the 16S metagenomic analysis, the most frequent OTU was OTU12, which varied between 33% and 78% of each data set.

In the establishment of a legume-rhizobium symbiosis, the Nod factor is sensed by the plant's receptors, causing nodulation. However, certain rhizobium species deliver effector proteins into host cells that hijack the legume nodulation signal. The rhizobial effector Bel2-5 is similar to the XopD effector of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* and can induce nitrogen-fixing nodule in the soybean *nfr* mutant. Bel2-5 induces expression of cytokinin-related genes and represses ethylene-related genes and defense-related genes. When Bel2-5 was expressed in a soybean mutant that had lost Nod factor recognition and was unable to form nodule, it showed the ability to form nodule.

4. 論文, 著書など

Ratu,S.T.N., Teulet,A., Miwa,H., Masuda,S., Nguyen,H.P., Yasuda,M., Sato,S.,Kaneko,T., Hayashi,M., Giraud,E.,

Okazaki,S.: Rhizobia use a pathogenic-like effector to hijack leguminous nodulation signalling. *SCIENTIFIC REPORTS*, 2021. 11, Article number: 2034.

5. 学会発表など

なし

6. その他特記事項

なし

細胞死研究室

Laboratory of Cell Death

1. 研究概要

本研究は、接着細胞の細胞終焉様式である細胞脱落の機構を明らかにし、得られる知見をもとに、細胞脱落の異常が関連すると考えられる、癌、炎症等の疾患の理解を新たな側面からもたらすことを目的とする。

外界に接し、細胞が生涯を通じてターンオーバーを行う上皮組織では、寿命を迎えた細胞、癌細胞、感染細胞、細胞競合で敗者となった細胞など、夥しい数の不要な細胞及び有害な細胞が組織から失われる。上皮細胞の終焉は、細胞脱落と呼ばれる組織からの剥離である(図1)。脱落する細胞は、隣接細胞が細胞境界に形成するアクチン・ミオシンからなるリングが収縮することで押し出されて組織から剥離し除かれることが知られている。またこの時、脱落細胞が占めていたスペースは隣接細胞によってシールされ組織の恒常性の破綻は防がれる。すなわち細胞脱落は、脱落細胞と隣接細胞との相互協調作用によって、組織の恒常性を維持しながら不要な細胞を組織から除く、細胞社会のコンテキストで実行される重要な細胞の振る舞いであるが、その機構については多くが不明である。

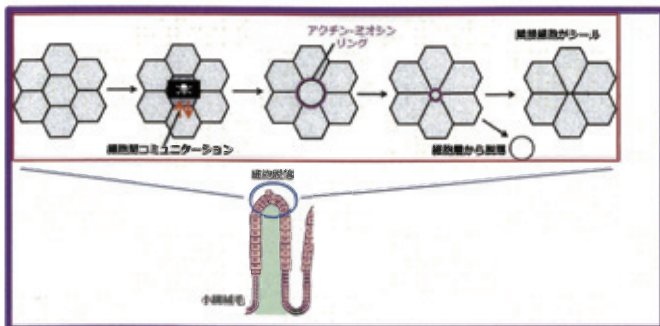


図1. 隣接細胞との相互協調作用によって実行される、社会的細胞終焉と位置付けられる「細胞脱落」

私たちは、細胞脱落の実行機構について解析を進め、細胞脱落の実行機構の解析の中で、脱落する細胞は、『脱落を実行しながらその側面を脱落する方向と反対側で断片化し、この断片を隣接する上皮細胞が食食する』種を越えて保存された現象を見出した。現在、これに着目し、この断片化の機構とこれが細胞脱落の実行に果たす役割を明らかにするとともに、この知見を活用し、細胞脱落の破綻が組織や個体にどのような異常や疾患をもたらすかを明らかにする研究を遂行している。

2. 本年度の研究成果

准教授 川根公樹

Associate Prof. Kohki KAWANE, Ph. D.



本年度は、脱落細胞の断片化は細胞外小胞の産生・放出であるのか、及び断片化を司る分子機構はどのようなものかを明らかにするため研究を行った。哺乳類培養細胞及びショウジョウバエの生体上皮を用い、遺伝子ノックダウンとライブイメージング解析を組み合わせて研究を行った結果、この断片化が、リン脂質ホスファチジルセリンの細胞膜外層への露出によってひきおこされる細胞外小胞の形成と放出であることも示した。さらに、小胞形成は、細胞外小胞の一つ、microvesicle 形成に働くことが知られる Arfファミリータンパク質の作用によっておこることもわかった(図2)。これらの知見は、上皮細胞がその終焉においてどのように細胞層から離脱するかの新規の仕組みを明らかにするとともに、想像されていなかった細胞外小胞の新たな生理的意義を示した。

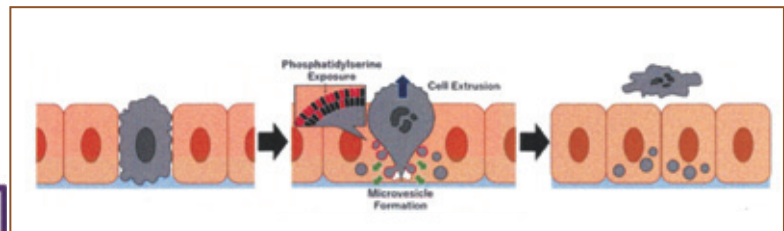


図2. 脱落細胞における局所的細胞断片化が脱落の実行を駆動する この断片化は、ホスファチジルセリンの露出が誘導する細胞外小胞の形成であることもわかった。

この知見により、私達は、念願であった細胞脱落の実行阻害が可能になった。これを用いて、これまで実証ができていなかった、細胞脱落の異常が上皮バリアの破綻や炎症に繋がる仮説を検証する研究を開始した(図3)。

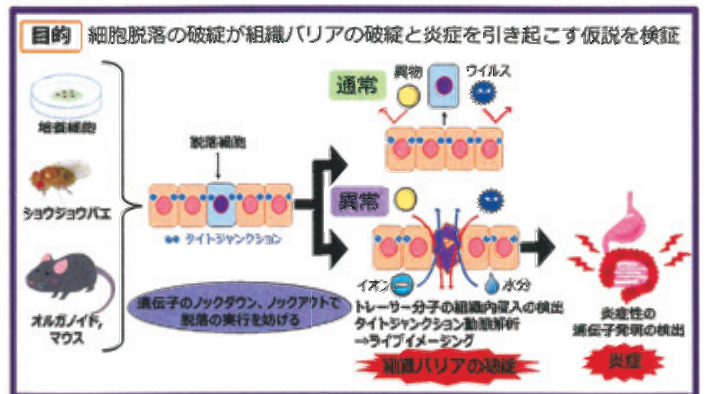


図3. 細胞脱落の異常と疾患の関連性の検証が可能になった。

3. Research projects and annual reports

The end of cellular life of epithelial cells is cell extrusion from epithelium. We aimed to reveal the molecular mechanism of cell extrusion and found a novel conserved process, that is extracellular vesicle formation in extruding cells. We further showed the mechanism of vesicle formation as well as its critical role for the prompt execution of cell extrusion. In summary, we characterized a novel mechanism of cell extrusion, the first compelling and conserved one to our knowledge.

4. 論文, 著書など

Akihito Kira, Machiko Murata, Keisuke Saito, Ichiko Tatsutomi, Izumi Hattori, Haruna Kajita, Naoko Muraki, Yukako Oda, Saya Satoh, Yuta Tsukamoto, Seisuke Kimura, Hiroki Kato, Kohki Kawane: Extracellular vesicle formation mediated by local phosphatidylserine exposure promotes efficient cell extrusion. Research Square (preprint). 2021, DOI: 10.21203/rs.3.rs-257262/v1

5. 学会発表など

1. 達富 一湖, 吉良 彰人, 服部和泉, 村田 真智子, 木村成介, 川根 公樹: 「細胞脱落における細胞外小胞の形成」(ポスター), 第43回日本分子生物学会年会, 2020年12月, オンライン
2. 西藤 圭祐, 吉良 彰人, 村田 真智子, 村木 直子, 小田裕香子, 佐藤 沙耶, 塚本 雄太, 加藤 博己, 川根 公樹: 「細胞脱落におけるホスファチジルセリンの露出」(ポスター), 第43回日本分子生物学会年会, 2020年12月, オンライン
3. 梶田 春奈, 服部 和泉, 中井 彩香, 村田 真智子, 川根 公樹: 「細胞脱落における接着結合の動態の解析」(ポスター), 第43回日本分子生物学会年会, 2020年12月, オンライン
4. 川根 公樹: 「細胞脱落におけるホスファチジルセリン露出の役割」(招待講演), 第1回細胞死コロキウム, 2020年11月, オンライン

6. その他特記事項

- 1) 外部資金 該当なし
- 2) 知財権等 該当なし
- 3) 学外活動
日本生化学会「生化学」誌 企画協力委員
- 4) 受賞等 該当なし

5) その他 なし



個性弾ける、光を放ち始めた原石たち

集団遺伝学研究室

Laboratory of Population Genetics

教授 河邊昭

Prof. KAWABE, Akira.



1. 研究概要

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

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

本研究分野では具体的に次の3点について研究を進めている。

1) 動原体領域の進化機構

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

2) 転移因子の進化パターンの解析

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

3) エピジェネティックな制御機構の進化に与える影響の解明

エピジェネティックな制御機構により遺伝子発現やクロマチン構造の変化が起こることが知られている。エピジェネティックな制御は配列の違いによらず表現形に差異をもたらすことが可能であるが、クロマチン構造の変化により進化パターンに影響を与えると思われる。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。複二倍体種を利用してどちらかのゲノムに特異的なトランスポゾンファミリーが複二倍体化後にゲノムを越えて移動していることを指標に転移可能なグループの候補を探索している。いくつかの転移能を持つ可能性のあるコピーを特定し、実際に転移するかどうかの解析を進める予定である。

またシロイヌナズナ属で動原体領域特異的な挿入様式がみられるトランスポゾンファミリーについて、シロイヌナズナの複数個体のゲノム解析から新たなグループを見出し、そのグループの転移様式の解析をおこなっている。また、シロイヌナズナでは転移可能なコピーは見られないグループに関しても祖先型の状態を再現することで転移様式を調査する予定である。

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。RNA エディティングに関わる PPR 遺伝子の機能喪失型変異の探索によりシロイヌナズナ系統間での RNA エディティングの多様性とその原因を解析した。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。

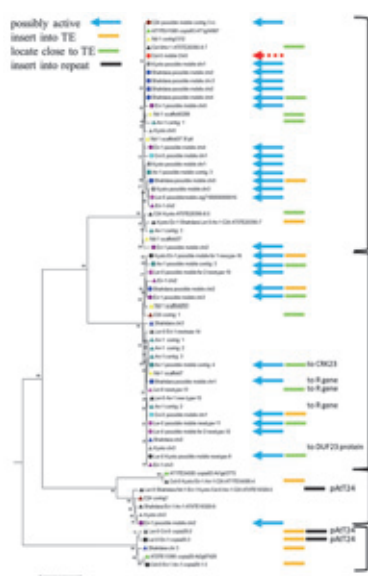


図. シロイヌナズナ複数系統のゲノムから得られた動原体特異的挿入を示すトランスポゾンファミリーの系統樹 (矢印は転移可能と思われるコピー)

3. Research projects and annual reports

We focused on the maintenance mechanisms of DNA variation in Plant species. We are interested in the following four topics.

1) Evolutionary process of Centromere regions

Centromere is an important area for accurate chromosome segregation but is also one of the fastest evolving regions in the genome. By using Arabidopsis relatives, we are analyzing evolutionary pattern of centromeric sequences. We found novel repeat from *Turritis glabra* with no homology to previously known centromeric repeat from any species. *T. galbra* also has

very complicated repeat structure with chromosome specificities.

2) Patterns of Transposable Element Evolution

Genomic organization of transposable elements were analysed in Brassicaceae species. Intergenomic transpositions were detected in several families of transposons in allopolyploid species suggesting expansion of transposon copies and also influences of genome shock during polyploidization process. We search for candidate groups of transposon families that are specific to one of the genomes and can be transferred across the genome after diploidization. We plan to identify several potentially transposable copies and analyze whether or not they are actually transposable.

In addition, we have identified a new group of Arabidopsis transposon family members that show a centromere region-specific insertion pattern, and we are analyzing the transposition pattern of this group through genome analysis of multiple *Arabidopsis thaliana* strains. We are also investigating the transposition mode of a group for which no transferable copies are found in Arabidopsis by recreating the ancestral state.

3) RNA editing evolution among Brassicaceae species

We determined complete chloroplast genomes of several Brassicaceae species to analyse RNA editing in chloroplast genome. We analysed RNA editing in chloroplasts of several species of Brassicaceae, and have searched for loss-of-function mutations in PPR genes involved in RNA editing to analyze the diversity of RNA editing among Arabidopsis lines and its causes. In addition, we are planning to elucidate the evolutionary pattern of RNA editing in the entire Brassicaceae family.

4. 論文, 著書など

Le NT, Harukawa Y, Miura S, Boer D, Kawabe A, Saze H.:

Epigenetic regulation of spurious transcription initiation in Arabidopsis. Nat Commun. 2020 Jun 26;11(1):3224.

5. 学会発表など

オルガネラゲノムの RNA エディティングに関わる PPR 遺伝子のシロイヌナズナ野生集団での機能喪失型変異の探索: 河邊昭,

西田早希, 降旗初佳, 第 92 回日本遺伝学会(オンライン・熊本), 2020 年 9 月 16 日(口頭発表予定、要旨掲載により代替)

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

研究室ゼミ風景 (オンラインによる研究経過報告会の様子)



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 α 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、神経分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞における GalNAc-T の機能について解析した。

2. 本年度の研究成果

本年度は、マウス胚性腫瘍細胞である P19 細胞を使って、GalNAc-T アイソザイムの欠失変異株作製の準備を進めた。神経特異的に発現する GalNAc-T9 と GalNAc-T17 を標的とし、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により変異体を作製するための実験に着手した。また、P19 細胞を用いて

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



研究室で開発した効率の良い神経分化方法を用いて、神経分化の実験を行った。

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 α 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 neural differentiation, we have been conducting extensive analyses of brain-specific GalNAc-transferases. We isolated and fully sequenced the *galnt9* and *galnt17* genes, and generated sgRNAs for each gene to generate mutant P19 cell line. P19 is an embryonic carcinoma cell line that can differentiate into neural cells when stimulated with retinoic acid. We are generating *galnt9* and *galnt17* mutant cell lines to examine their roles during the neural differentiation.

4. 論文、著書など

なし

5. 学会発表など

中村直介, 黒坂 光: ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 遺伝子の発現解析. 第39回日本糖質学会年会名, 鹿児島, 2020. 10. 27-29.

6. その他特記事項

1) 学外活動

日本生化学会評議員, 日本薬学会関西支部委員

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、脳内の血流や酸素環境の変化、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。

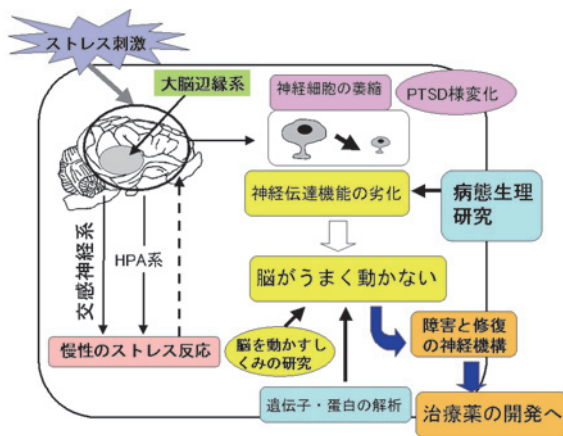


図 1. 本研究の概略

教授 齋藤 敏之

Prof. Toshiyuki Saito, DVM, Ph.D.



2. 本年度の研究成果

1) 脳の情動神経系とミクログリアの動態

神経毒の1つであるトリメチルチン(TMT)をラットの腹腔内に投与し、黒質における、ミクログリアの形態変化とドーパミン神経系の組織学的変化を観察した。TMT 投与後、10 日経過した時点では、Iba-1 免疫陽性細胞は、突起が短くなり、細胞体がやや膨らむ変化を示した。一方、その領域では、TH 免疫陽性神経線維が疎になっていた(図1)。この領域では、(1)ミクログリアが炎症を起こし、ドーパミン神経に障害を与えた、(2)TMT の投与により傷害を受けたドーパミン神経をミクログリアが貪食した、いずれかの可能性が考えられる。ただ、今回観察されたミクログリアの形態変化が、修復性に变化したことを反映しているか、傷害型に変化したことを反映しているか、については不明である。CD 抗原に対する免疫染色などの追加の実験が必要である。

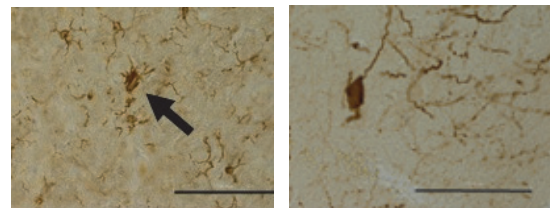


図1. TMT を投与したラット脳の黒質における免疫染色像(例). 左に Iba-1 免疫陽性細胞、右に TH 免疫陽性神経像を示した。いずれも DAB 試薬により発色させた。スケールバーは 100 μm を表す。

2) 血流・血圧変動と脳のミクログリア動態

慢性的なストレス刺激は体に持続的な緊張状態をもたらす、長期にわたる交感神経系の活動上昇を引き起こす。このような自律神経系の変化は、高血圧症の主因の1つである。一般的に、高血圧かどうかは末梢の動脈圧を測定することで判断されるが、高血圧に伴う脳の血流量変化については、客観的なデータに乏しいのが現状である。それは、脳の血管内圧や脳の血流量変化を定量的に測定することに技術的な難しさがあることが大きな要因である。そこで、脳

の局所の状態を捉えるために、部位ごとのミクログリアの動態の違いについて、解析を続けている。実際、大脳皮質の表面でベンガルローズと緑色レーザー光を用いて人為的に局所的な血流を遮断すると、その近傍にある Iba-1 陽性細胞の形態に大きな変化が認められた(図2)。今後、このようなミクログリアが組織修復性か、傷害性かを見極めるとともに、脳局所の状態変化を総合的に把握するためのデータ収集に活用していきたいと考えている。

また、同様の手法に改良を加えて、ストレス感受性の高いブタを用いた新たな動物モデルも視野に入れながら、ストレスと脳の炎症についての研究を進めていきたい。

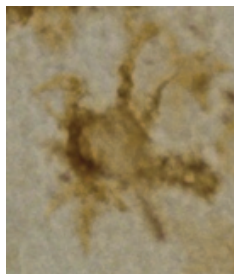


図2. 実験的脳虚血部位周辺における Iba-1 免疫陽性細胞の染色像(例). DAB 試薬を用いた発色像.

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 the 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 the local blood flow and oxygenation in the brain and morphological changes of microglia,
- 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) has induce morphological changes in microglia. Using the antibody against Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), the immune-reactive Iba-1 positive cells (microglia) in the substantia nigra were found, some of which became round-shaped, by administration of TMT. Furthermore, we are analyzing the relationship between degeneration of neurons and morphological changes of microglia. In the region of the substantia nigra, the number of the tyrosine-hydroxylase (TH) immune-positive neurons largely decreased in the TMT-injected rat. These findings suggest that TMT administration causes neuro-inflammation, leading to the morphological change in microglia as well as degradation of the TH-positive neurons in the substantia nigra region. However, questions still remain about the relation between cause and effect observed in this study.

2) Study on the morphological and functional changes of microglia under the condition of hypoxia or ischemia.

Activity of the cells in the brain are supported by adequate supply of the oxygen and nutrients (mainly glucose), that are carried along the blood flow. However, it

is unknown how microglia, the immune cells in the brain, reacts to changes in the local cerebral blood. As neurons and other cells in the brain are damaged in hypoxia, ischemia, microglia probably reacts to these pathological phenomena. In our study, the experimental thrombosis using Bengal rose and green laser light caused clearly morphological change of the Iba-1 immuno-positive cells (microglia) to be round-shaped in the cerebral cortex. These findings can provide an information between some relation between morphological and functional changes of microglia and the spatial differences in oxygenation level in the brain if by combing visualization of inflammatory or restorable makers (CD markers) on the microglia.

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

Pig is an animal to be sensitive to stressful conditions. 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., Hishiki, M., Shibutani, M., Yokoyama, K. Influence of trimethyltin on neurons and microglia in the midbrain of rat. The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Osaka, 2020. 0729-0801, 1P-252 (on-line).

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：自治医科大学医学部・客員研究員

齋藤敏之：日本生理学会評議員

齋藤敏之：日本獣医学会評議委員

齋藤敏之：日本生理学会認定生理学エドゥケーター

齋藤敏之：京都府農林水産技術センター評議委員

齋藤敏之：令和2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) 動物実験委員会・委員長

(2) 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、細胞形態・細胞移動・細胞増殖・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り、*LRI* 変異マウスは左右非対称性の異常を示す。一方で、一部の *LRI* ホモ変異マウス胚は左右軸形成より発生の早い時期において異常になっており、この点についても研究を進める。

また、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、毛周期異常など)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、これらの症状のメカニズムを明らかにする。

2. 本年度の研究成果

1) 細胞外マトリックス分子 *LR1* の変異マウスの解析

LRI 変異マウスが左右非対称性の異常を示した一方で、*LRI* ホモ変異マウス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 7 日目ではホモ変異体がメンデル比より有意に少なく、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、*LR1* が胎生 6 日目以前にはたらいっていることが示唆された。また、*LRI* が胎生 7 日目の将来の頭部領域で発現していることもわかった。

2) 腎臓と肝臓の左右非対称性の確立機構の解析

腎臓、腎静脈、腎動脈は、いずれも左右非対称に形成される。その中でも腎動脈の左右非対称性が初めに確立され、続いて左右対称にできた腎臓と腎静脈が左右非対称に位置変化することを明らかにしてきた。昨年度に引き続き、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。普遍性を確認するために2種類のマウス系統で腎動脈の形成過程を観察した結果、腎動脈の左右非対称性は胎生 12.25 日～12.5 日目に確立することが分かった。

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。昨年度に引き続き、マウスにおける肝臓の初期形成過程を詳細に観察した結果、胎生 9.25 日目の 23～24 体節期から肝臓原基が明らかな左右非対称性を示すことがわかった。さらに肝臓原基が左右非対称に形態変化する要因を探索したところ、肝臓原基の細胞増殖に左右差があることを発見した。

3) プロリン合成酵素 *Pycr2* の変異マウスの解析

Pycr2 変異マウスにおける、脳神経系、毛周期、血糖値調節の異常について解析を行った。

昨年度、神経症状を示す *Pycr2* KO マウスと神経細胞特異的 *Pycr2* 変異マウスの組織学的な解析を行った結果、小脳のプルキンエ細胞の一部が欠落していることを発見した。今年度は、このプルキンエ細胞の欠落の原因を探索した。*Pycr2* はプルキンエ細胞で発現しており、加齢に伴い8週齢以降にこの欠落が生じることがわかった。小脳においてミクログリアが減少していること、また活性型と見られるミクログリアも観察され、これらミクログリアの異常がプルキンエ細胞の欠落や神経症状の原因となっている可能性が考えられた。

昨年度までの研究により、20 週齢以降の *Pycr2* KO マウスの毛周期が野生型に比べて遅延していることがわかった。今年度は、*Pycr2* KO マウスにおける毛周期遅延の原因を解明するために、マウス皮膚における遊離アミノ酸量と毛周期に必須の遺伝子の発現量を解析した。その結果、成長期移行促進にはたらく *Fgf7* や休止期の維持にはたらく *Bmp2* の発現が *Pycr2* KO マウスにおいて異常になっていることがわかった。また、*Pycr2* によって合成されるプロリンやヒドロキシプロリンの量が、野生型より

も少ない *Pycr2* KO マウス個体がいることもわかった。組織学的な解析から、*Pycr2* KO マウスにおける毛包の数が、野生型よりも多くなっていることを発見した。

Pycr2 KO マウスは、血糖値の異常も示した。血糖値異常の原因を探索したところ、*Pycr2* が血糖調節に関わる膵臓のランゲルハンス島や視床下部で発現していることがわかった。さらに、ランゲルハンス島において Insulin 量が減少している *Pycr2* KO マウス個体がいることもわかった。

3. Research projects and annual reports

Several visceral organs are left-right (L-R) asymmetrically located in vertebrates. In embryonic development, the visceral organs are L-R symmetrically initiated, and then their shape is asymmetrically changed 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 shape, cell migration, cell proliferation, and cell death, and analyze the role and transcriptional mechanism of the genes that are asymmetrically expressed, using several mutant and transgenic mice.

LR1 is an extracellular matrix protein and is L-R asymmetrically expressed in the mouse embryo. The *LR1* mutant mice had shown L-R defects, while some of the homozygotes had been early embryonic lethal.

We also analyze the role of an amino acid metabolizing enzyme, *Pycr2*. The *Pycr2* KO mice showed premature aging-like phenotypes. We want to clarify the mechanism of the symptoms in the *Pycr2* KO mice using several mutant and transgenic mice.

1) *LR1* mutant mouse.

LR1 mutant mice had shown L-R defects, while some of the homozygotes had been embryonic lethal. We analyzed earlier-stage embryos and found out that *LR1* is expressed in the future head region and that LR1 functions for embryo development before embryonic day 6 (E6).

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

We have been studying 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 embryos using two mouse strains and found out that the asymmetric location of the renal artery is established universally at E12.25~12.5.

The mouse liver is asymmetrically lobulated. We observed the morphogenetic process in the liver. The liver primordium showed clear morphological L-R asymmetry from 23~24 somite stages, E9.25. Moreover, we found out that there is a difference in cell proliferation between the left and right sides of the liver primordium.

3) *Pycr2* KO mouse.

Pycr2 is an enzyme for proline biosynthesis. We have been analyzing the defects in the brain and nervous system, the hair cycle, and the blood glucose regulation of the *Pycr2* mutant mice.

The *Pycr2* KO mice and the neural cell-specific *Pycr2* mutant mice showed neurological symptoms. We found out that some of the Purkinje cells in the cerebellum were abnormal in these *Pycr2* mutant mice after the age of 8 weeks. In the cerebellum of these mutant mice, the microglia were a few and activated microglia appeared.

In the *Pycr2* KO mice, the hair cycle had been delayed after the age of 20 weeks. This year, we measured the expression level of several genes regulating hair cycle, and free amino acid level. In the *Pycr2* KO mice, the expression of *Fgf7* and *Bmp2* was abnormal and the level of proline and hydroxyproline was decreased. We also found out that the number of hair follicles in the *Pycr2* mutants increased more than in wild-type mice.

Pycr2 KO mice showed abnormal blood glucose levels. *Pycr2* is expressed in islets of Langerhans in the pancreas and the hypothalamus that regulate blood glucose. The insulin level in the islets of Langerhans was decreased in some of *Pycr2* KO mice.

4. 論文, 著書など

Ide T, Twan WK, Lu H, Ikawa Y, Lim LX, Henninger N, Nishimura H, Takaoka K, Narasimhan V, Yan X, [Shiratori H](#), Roy S, Hamada H. CFAP53 regulates mammalian cilia-type motility patterns through differential localization and recruitment of axonemal dynein components. *PLoS Genet.* 2020 Dec 21; 16(12):e1009232.

Dougherty GW, Mizuno K, Nöthe-Menchen T, Ikawa Y, Boldt K, Ta-Shma A, Aprea I, Minegishi K, Pang YP, Pennekamp P, Loges NT, Raidt J, Hjej R, Wallmeier J, Mussaffi H, Perles Z, Elpeleg O, Rabert F, [Shiratori H](#), Letteboer SJ, Horn N, Young S, Strünker T, Stumme F, Werner C, Olbrich H, Takaoka K, Ide T, Twan WK, Biebach L, Große-Onnebrink J, Klinkenbusch JA, Praveen K, Bracht DC, Höben IM, Junger K, Gützlaff J, Cindrić S, Aviram M, Kaiser T, Memari Y, Dzeja PP, Dworniczak B, Ueffing M, Roepman R, Bartscherer K, Katsanis N, Davis EE, Amirav I, Hamada H, Omran H. CFAP45 deficiency causes situs abnormalities and asthenospermia by disrupting an axonemal adenine nucleotide homeostasis module. *Nat Commun.* 2020 Nov 2; 11(1):5520.

Mizuno K, Shiozawa K, Katoh TA, Minegishi K, Ide T, Ikawa Y, Nishimura H, Takaoka K, Itabashi T, Iwane AH, Nakai J, [Shiratori H](#), Hamada H. Role of Ca²⁺ transients at the node of the mouse embryo in breaking of left-right symmetry. *Sci Adv.* 2020 Jul 22; 6(30):eaba1195.

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.* 2020 Jul 8; 107(1):82-94.e6.

5. 学会発表など

なし

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名: 左右非対称な内蔵器官の形態変化のしくみとその役割

研究代表者, 取得年度: R2-4年(3年)



血管と神経生物学研究室

Laboratory of Vascular and Neuronal Biology

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) Anosmin-1 はゴナドトロピン放出ホルモン産生(GnRH)神経細胞に発現する FGFR1 を活性化し遊走を促進する

先天性疾患 Kallmann 症候群は、嗅球形成不全を伴う中枢性性腺機能低下症の病態を持つ。嗅球の形成不全は、嗅上皮から終脳への嗅球神経軸索伸長が正常に誘導されないことに起因すると考えられている。Kallmann 症候群の原因遺伝子 *ANOS1 (KAL-1)* がコードするタンパク質 Anosmin-1 は、分子量約 100kDa の細胞外マトリックスタンパク質であり神経細胞の軸索ガイダンス分子として働く。また、線維芽細胞増殖因子受容体 1(FGFR1)と線維芽細胞増殖因子 8(FGF8)の変異は、それぞれ常染色体優性遺伝で不完全浸透性の Kallmann 症候群を引き起こす。そこで、本研究において Anosmin-1 とその変異体が神経細胞であるマウスゴナドトロピン放出ホルモン産生(GnRH)神経(GN11)細胞に対し生理活性を有しているかどうかを検証し、神経細胞における Anosmin-1 の受容体の同定とシグナルの解析を行った。その結果、Human Wild Type (WT) Anosmin-1 は GN11 細胞の遊走を促進した。しかし、Kallmann 症候群患者由来の Anosmin-1 変異体(C163R、Q131H、C134G)、chick Anosmin-1WT、では遊走が促進しなかった。そこで、GN11 細胞に発現する Anosmin-1 の受容体を検証するため、血管内皮増殖因子受容体 2(VEGFR2)の遺伝子発現を RT-PCR により解析したところ、発現が検出されなかったが、FGFR1 の発現が確認された。FGFR-1 のリガンドである FGF2 で刺激したところ GN11 細胞の遊走は促進されなかったが、FGF8 では遊走を促進した。次に、Anosmin-1 Human WT により FGFR1 が活性化されているかどうかを Western Blotting により検証したところ、Anosmin-1 WT により FGFR-1 のチロシンリン酸化が起

教授

Prof. Misuzu Seo, Ph. D.

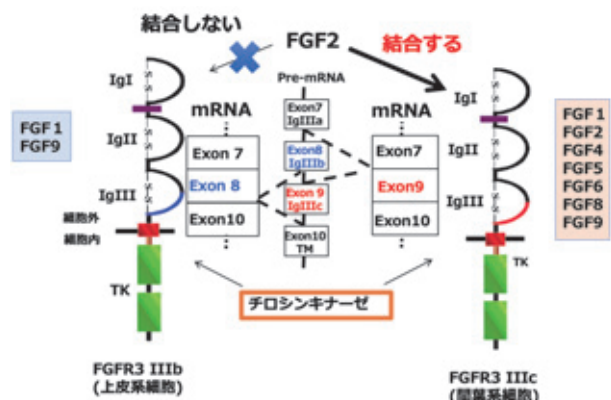


っていた。以上の結果より、発生過程において、Anosmin-1 の変異体では GnRH 神経細胞の遊走を促進することができず、嗅上皮から脳内への侵入とその後の脳内の移動により最終的に視床下部に定着し成熟することができないことが示唆された。

2) 大腸がんが発現する線維芽細胞増殖因子受容体 3IIIc(FGFR3IIIc)は抗がん剤耐性を獲得させる

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 3IIIc(FGFR3IIIc) 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(FGFR3IIIc)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

図 1 線維芽細胞増殖因子受容体 3(FGFR3)と選択的スプライシング



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 FGFR3IIIc を過剰発現させた FGFR3IIIc 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 FGFR3IIIc 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 μ M であり、siFGFR3 処置群の IC50 値は 27.7 μ 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 μ 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、FGFR3IIIc の細胞内シグナルについて検討した結果、RAS/MAPK 経路、PLC- γ 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)/ニューロピリン(NRP)シグナルは RhoA と Cdc42 を活性化しがん細胞の浸潤能を促進する

血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)は、多くの悪性腫瘍および間質細胞において、腫瘍微小環境(TME)における血管新生を増強することにより、がん細胞の増殖、生存、及び転移を促進している。ニューロピリン 1(NRP1)はセマフォリンおよび VEGF-A の非チロシンキナーゼ受容体であり、血管内皮細胞に発現し VEGFR2 の補助受容体として働き血管新生を促進する。NRP1 は悪性腫瘍において高発現し、血管系の形成だけでなく腫瘍形成のシグナル伝達に重要な役割を果たしている。VEGF-A と NRP1 の発現が高いと腫瘍の進行や予後不良と相関していることが報告されている。本研究で、悪性腫瘍に発現する NRP1 が VEGF-A のシグナルを伝達し、がん細胞の浸潤を促進する RhoA 及び Cdc42 を活性化しがん悪性に重要な役割を果たすことを明らかにした。VEGF-A/NRP1 シグナルでは、NRP1 の細胞内領域に足場タンパク質 GIPC1 が結合し、次に GIPC1 に Rho GEF タンパク質 Syx が結合する。GIPC1 と Syx の相互作用を阻害する Syx の C 末端側 8 個のアミノ酸配列を含む HIV-TAT ペプチドを用いて、ヒト扁平上皮がん細胞 DJM1 を処理すると浸潤能が抑制された。

細胞内では、浸潤方向に細胞を移動させるために、細胞運動を亢進する Rho GTPase ファミリーである RhoA、Rac1、Cdc42 が、活性な GTP 結合状態と不活性な GDP 結合状態の間を循環することで、細胞内骨格アクチンフィラメントを制御する分子スイッチとして機能している。本研究において、Pull-down assay により RhoA と Cdc42 が、VEGF-A/NRP1 シグナルによって、活性化されることを示した。トリプルネガティブ乳がん(TNBC)細胞 MDA-MB-231 において siRNA の導入により NRP1 または、GIPC1、Syx、RhoA の発現を抑制すると浸潤能が抑制された。さらに、siRNA 導入により、VEGF-A と NRP1 の発現を抑制した後、

Cdc42 GAP タンパク質 ARHGAP17 の発現が増加しており、VEGF-A と NRP1 と GIPC1 の発現を抑制すると、GTP-Cdc42 の発現が抑制されることから、VEGF-A/NRP1/GIPC1 シグナルにより、Cdc42 が恒常的に活性化されていることを示した。以上より、VEGF-A/NRP1 シグナルが DJM1 細胞と MDA-MB-231 細胞の浸潤を促進することを示した。下流シグナル伝達分子 GIPC/Syx/RhoA および GIPC1/ARHGAP17/Cdc42 は、がんの転移を阻害する有望な分子標的となりうる。

3. Research projects and annual reports

Targeting VEGF-A/Neuropilin-1 signaling in Cancer cells.

Background: Cancer invasiveness is one of the most important processes of cancer progression. Cancer cells express high levels of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and its receptor neuropilin-1(NRP1). NRP-1 is a 130kDa transmembrane protein that has been identified as a novel VEGF-A receptor. The function of NRP1 is as co-receptor of VEGFR2, enhancing VEGF-A binding to its receptor and promote downstream signaling. However NRP1/GIPC1 or GIPC1/Syx interaction have a role in cancer cells has been unclear. We investigated a novel signal transduction pathway of VEGF-A/NRP1 that induced cancer cell progression by forming a GIPC/Syx complex that activated RhoA and degraded p27.

Method: siRNA, Invasion assay, DC (detergent compatible) protein assay, SDS-PAGE, Western blotting.
Results and Discussion: Vascular endothelial growth factor (VEGF) mediated signaling occurs in tumor cells and this signaling contributes to key aspects of tumorigenesis. Neuropilins are crucial for mediating the effects of VEGF on tumor cells. NRP1 binding to VEGF-A induced the interaction between GIPC1 and Syx. PC3M (prostate cancer) and U87MG (brain tumor) cells secreted VEGF-A activated RhoA via NRP1 to upregulate the tumorigenic

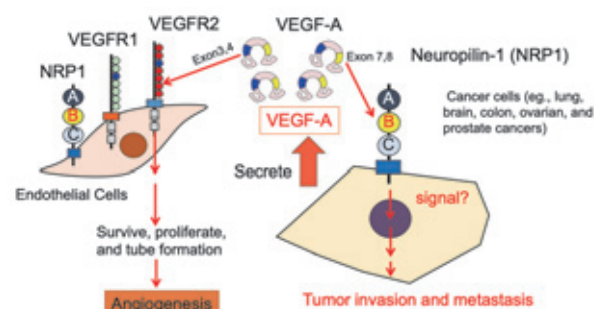


Fig. 1 VEGF-A secreted by cancer cells stimulate their invasion and metastasis.

activity in an autocrine manner and supported the VEGF-A/NRP1 signaling pathway in cancer cells. GIPC1 formed complex with Syx that led to the activation of RhoA. NRP1/GIPC1 or GIPC1/Syx interaction occurs in VEGF-A/NRP1 signaling pathway. The RNA interference of GIPC1 or Syx reduced active RhoA. The siRNAs treatment of VEGF-A or NRP1 suppressed PC3M and U87MG cancer cells expression. Knockdown of endogenous VEGF-A/NRP1 or GIPC/Syx expression inhibit VEGF-A/NRP1 signaling pathway in vitro. Autocrine VEGF-A signaling is crucial for cancer initiation and NRP1 is necessary for this VEGF-A/NRP1 signaling. Targeting VEGF-A/NRP1 signaling provides to develop new cancer therapeutic drugs

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

福光一生, 米倉寛人, 松本寛加, 三浦琴美, 上野信洋, 上田修吾, 瀬尾美鈴. FGFR3 発現による大腸癌悪性化メカニズム解明. 第93回日本生化学会大会、Web開催、2020.9.15

(ポスター発表)

Md.M. Hasan, S. Nakanishi, A. Yamaguchi, M. Wake, N. Ueno, M. Kurokawa-Seo: Inhibition of VEGF-A/NRP1 signaling pathway that promotes cancer cells progression by RNA interference. 第93回日本生化学会大会、Web開催、2020.9.15

(ポスター発表)

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤(C)

課題名: 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

2) 知財権等 なし

3) 学外活動 瀬尾美鈴: 日本生化学会評議員、日本生化学会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

4) 受賞等 なし

5) その他

瀬尾美鈴: 第93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「性差を超えて: 女性研究者のライフサイクロを踏まえたエンパワーメント」宇野賀津子氏講演(ルイ・パス

ソウール医学研究センター, インターフェロン・生体防御研究室室長)の企画、および司会を担当。Web開催、2020.9.18
瀬尾美鈴: 京都府発明等功労者表彰審査委員として、第64回京都府発明等功労者の審査を行った。京都市、2020.3.11

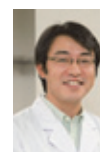


感染症学研究室

Laboratory of Infectious Disease

教授 高桑 弘樹

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



1. 研究概要

現在、世界中で鳥インフルエンザウイルスなどの新興・再興感染症の発生が多数報告されており、人を含む動物に被害をもたらしている。H5 亜型鳥インフルエンザは、アジアを中心に世界的に流行を繰り返している。感染症の原因である病原体の生態を解明し、コントロールすることは重要な課題である。

- 1) 鳥インフルエンザウイルスなどの病原体の自然界での存続と進化および伝播機構を解明する。
- 2) 宿主と病原体の相互作用を解析し、病原体の宿主域を決定する因子、病原性の発現機構の解明を行う。
- 3) 感染症の診断、予防と治療法の開発を行い、動物とヒトの感染症を予防・制圧する。

2. 本年度の研究成果

H5 亜型の高病原性鳥インフルエンザの常在国であるベトナムにおいて、生息および飛来する各種野鳥間で維持されている鳥インフルエンザウイルスの浸淫調査を継続している。高病原性の H5 亜型の鳥インフルエンザウイルスが野鳥から分離され、ベトナム国内および近隣諸国への鳥インフルエンザウイルスの伝播に野鳥が重要な役割を果たしていると考えられた。

この冬、北海道から鹿児島県まで全国各地の農場で 50 件以上の発生事例が起こり、1 千万羽近い鶏が殺処分され、発生件数および規模ともに、過去最大のものとなった。渡りによって飛来した野鳥によって日本国内にウイルスが持ち込まれ、農場に広がったと考えられる。我々は継続的に国内に飛来する野鳥の鳥インフルエンザウイルスの保有状況について調査を行っている。本年度、山陰地方の糞便調査により、今シーズン日本国内で発生した高病原性鳥インフルエンザと同じ亜型の H5N8 亜型ウイルス 4 株を含む鳥インフルエンザウイルス 12 株を分離した。山陰地方は農場での高病原性鳥インフルエンザの発生がなかったが、野鳥の間には高病原性ウイルスが拡散していた事が示された。次年度以降も国内での高病原性鳥インフルエンザの発生する可能性が高く、今後とも野鳥のウイルスを継続して監視する必要がある。

3. Research projects and annual reports

Currently, outbreaks of highly pathogenic avian influenza and other emerging and re-emerging diseases

have caused serious economical and social disturbances worldwide. Highly pathogenic avian influenza H5 virus has spread across worldwide, and outbreaks are now endemic in several countries. To control these infections is the most important. Our research is focused on:

- 1: *The evolution and spread mechanism of pathogens such as avian influenza virus in nature.*
- 2: *Studies on the host range determinant in pathogens, mechanisms of pathogenesis and immune response of the hosts through in vivo and in vitro analyses of the host-parasite interactions.*
- 3: *Development of strategies for the prevention and control of the infections.*

Due to concerns that wild birds could possibly spread subtype H5 viruses, surveillance was conducted to monitor the types of avian influenza viruses circulating among the wild birds migrating to or inhabiting in Vietnam and Japan. The highly pathogenic avian influenza H5 viruses were isolated from wild birds in Vietnam. Wild birds are considered to play a role in the introduction and dissemination of avian influenza virus in Vietnam and neighboring countries.

H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) were detected nationwide from Hokkaido to Kagoshima prefecture in this winter. Outbreaks of HPAIV have been confirmed on more than 50 farms, about 10 million birds culled, the highest number of a single season. It can be surmised that migratory birds brought the viruses into Japan and wild birds or animals spread them onto the farms. We surveyed AIVs in wild waterfowl in this winter in the San-in district. Twelve strains of AIV, including 4 strains of H5N8 HPAIV, were isolated. It supports that HPAIV had spread among wild birds in this area, even though there was no outbreak in farms. It is important to monitor the prevalence of AIV among wild birds to prevent the emergence of new epidemics.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

なし

6. その他特記事項

1) 外部資金

2) 知財権等

特許 6838965 「死体収納袋、死体収納袋用の支持装置、及び
死体処理方法」

3) 学外活動

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

マルハナバチに内部寄生するタマセンチュウの宿主選択と寄生率について(浅沼 結音)

ハマルハナバチは、受粉能力が優れているため自然界において重要な花粉媒介者である。また、ミツバチと異なり花蜜を分泌しないナス科植物にも訪花することから施設栽培作物での使用が増加している。マルハナバチを安定的に農業利用するためには、増殖時の問題となる天敵類の解明が重要な課題の1つである。マルハナバチの天敵として内部寄生性のマルハナバチタマセンチュウ(*Sphaerularia bombi*)が知られている。タマセンチュウは、

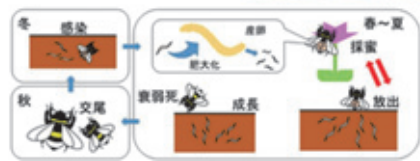


写真 1. マルハナバチタマセンチュウとその生活史

土壌で越冬中の女王バチに寄生し、その体内で性成熟し、産卵を行う。寄生された女王バチは、行動変化を起こし、春から夏に体内で孵化したタマセンチュウの幼体を土壌中に放出する行為を繰り返し、営巣することなく死亡する。国内では、15種のマルハナバチのうち3種のマルハナバチでの寄生が確認されている。本研究では、日本産マルハナバチ属におけるタマセンチュウの宿主を解明するために、8種の在来種と1種の外来種のマルハナバチ女王バチを捕獲・解剖した。そのうち寄生が確認されたマルハナバチ(エゾオオマルハナバチ、セイヨウオオマルハナバチ、コマルハナバチ、アカマルハナバチ)の寄生率は、それぞれ0.3%、10.6%、14.2%、16.7%であった。今回エゾオオマル

准教授 高橋 純一

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



ハナバチでは初めてタマセンチュウの寄生を確認した。寄生率は、アカマルハナバチが最も高く、16.7%であった。解剖の結果、タマセンチュウ非寄生の種はコマルハナバチ(エゾコマルハナバチ亜種、ツシマコマルハナバチ亜種)、ノサップマルハナバチ、ニセハイイロマルハナバチ、シュレンクマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エゾナガマルハナバチであった。被寄生女王バチが、外部形態の変化から判別できるかどうか調べるために、セイヨウオオマルハナバチとアカマルハナバチ、コマルハナバチの腹部と頭部の幅を測定した。その結果、被寄生個体の腹部幅には変化は見られなかった。マルハナバチタマセンチュウに宿主選択性があるのか調べるために、マルハナバチタマセンチュウからDNAを抽出し、NGS解析により18SrDNAの全長配列を解読し、PCRプライマーを設計した。次にこのプライマーを用いて、解剖により摘出した個体についてサイクルシーケンス法により18rDNAの部分配列を決定した。分子系統解析により、マルハナバチタマセンチュウとマルハナバチの間でのホストレートを形成しているか考察した。

ハチミツに含まれる酵母(*Zygosaccaromyces siamensis*)の遺伝的変異について(田村 直也)

ニホンミツバチのハチミツは、しばしば発酵することが知られている。発酵したハチミツは、柑橘類やアルコールのような香りが強くなり、甘みが抑えられてスッキリした後味になる。先行研究によるメタゲノム解析では、発酵したハチミツ中の真菌相のうち、99%以上が酵母 *Z. siamensis* であることが判明している。本研究では、*Z. siamensis* がニホンミツバチのハチミツの発酵に関与しているという仮説のもと、ハチミツの発酵状態と *Z. siamensis* の遺伝的変異に関する解析を行った。本州、四国および対馬島(長崎県)の12地域における25巣のニホンミツバチから得られたハチミツを用いた。発酵していないハチミツは、滅菌水を加えて一週間 30°C

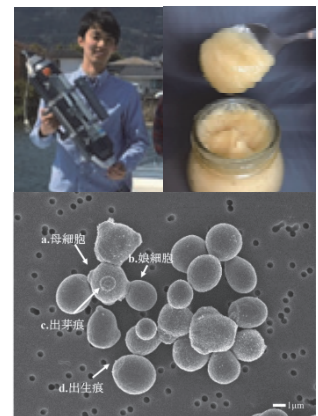


写真 2. 発酵したハチミツとその原因となる酵母

で保温し、発酵を促進させた。発酵処理後、気泡が生じたサンプル(発酵したサンプル)と気泡が生じないサンプル(発酵しなかったサンプル)が存在した。発酵したハチミツを寒天培地に添付し、微生物を 25° C で培養した。培養後、寒天培地には乳白色の酵母様のコロニーが確認された。これらの寒天培地に生じた酵母様コロニーから DNA を抽出し、真菌の DNA バーコーディング領域である核 DNA の ITS 領域を PCR により増幅し、サイクルシーケンス法により塩基配列を解読した。得られた配列のうち、*Z. siamensis* と同定された塩基配列は、データベース上に登録されていた他の *Zygosaccaromyces* 属の配列とともに MEGA X を用いて最尤法で分子系統解析を行った。その結果から、地域またはハチミツの発酵状態の違いと *Z. siamensis* の遺伝的変異の関係について考察する。

絶滅危惧種タガメの遺伝的多様性について(中迫 樹生 稀)

タガメ(*Kirkaldyia deyrolli*)は、日本とアジア大陸(ロシア沿海州、朝鮮半島、中国、ベトナム)に生息している水生昆虫である。国内では、1980 年以降、水田の減少や



写真 3. 熊本産のタガメ成虫

農薬散布、外来生物による捕食、野外照明の増加によって野生の個体数が減少しており、絶滅が確認されている都道府県もある。環境省により 2020 年に国内希少野生動物種に指定され、商取引が禁止されている。タガメの保全には生息地や生活史、遺伝的多様性といった情報が必要である。そこで、タガメの保全に必要な産地判別と個体群の遺伝的多様性を明らかにするために、DNA マーカーの開発とそれによる解析を行った。過去に生息記録のある兵庫県と熊本県、西表島(沖縄県)で調査を行った。兵庫県佐用郡と熊本県球磨群では、タガメの生息を確認することができた。一方、西表島では絶滅が危惧されているコガタガムシやオキナワスジゲンゴロウなど大型の水生昆虫は捕獲されたが、タガメを確認することはできなかった。兵庫県と熊本県で採集したタガメを使用して、フェノール・クロロホルム法により、高分子 DNA の抽出を行い、次世代シーケンサーによりミトコンドリア DNA の全長配列を決定した。全長配列から産地判別に利用できるスニップサイト(一塩基多型領域)を特定し、産地判別の PCR プライマーの開発を試みた。ミトコンドリア DNA の 3 遺伝子領域

(Cytb、COI、ND4)にスニップサイトが確認された。そこから開発した 3 種類の PCR プライマーは、国産と海外産個体の識別が可能であることがわかった。これらのプライマーは、国産タガメの違法な商取引の DNA 鑑定に利用できることが期待される。さらに、ミトコンドリア DNA の COI 遺伝子の部分配列をもとに国内のタガメの遺伝距離を推定したところ 0.00289 となり、他国と比較して極めて低い結果となったが、ハプロタイプは地域間で異なっていた。以上の結果から、日本のタガメには地域間の遺伝的固有性は存在するが、遺伝的多様性は低いことがわかった。こ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

First Reports of Vespa mandarinia (Hymenoptera: Vespidae) in North America Represent Two Separate Maternal Lineages in Washington State, United States, and British Columbia, Canada

In September 2019, destruction of a Vespa mandarinia Smith 1852 nest was reported for the first time in North America in Nanaimo, British Columbia, Canada. In December 2019, the Washington State Department of Agriculture also confirmed the first detection of an adult specimen of V. mandarinia in the United States, in Whatcom County, Washington. Vespa mandarinia is the largest hornet species and is a known predator of several insects, including the European honey bee (Apis mellifera) (Hymenoptera: Apidae) (Linnaeus, 1758). The establishment of V. mandarinia in North America poses a serious threat to apiculture, and this species is considered an actionable quarantine pest. Here we report details of the first detection of this species in the United States and use genetic sequence data obtained from five specimens across the globe to estimate differences in origin of the Canadian and U.S. detections. The full mitochondrial genomes of four V. mandarinia specimens representing different geographic locations were sequenced and compared with an existing reference genome. A maximum likelihood tree using 13 protein-coding regions from mitochondrial DNA suggests that the Canada and U.S. specimens are from two separate maternal lineages. A large-scale survey is currently underway to assess the level of Asian giant hornet establishment in both countries and to determine the future direction of eradication efforts.

4. 論文, 著書など

1. Lu SS, Takahashi J, Yeh WH, Lu ML, Huang JY, Lin YJ, Sung IH. Evidence for Range Expansion and Origins of an Invasive Hornet *Vespa bicolor* (Hymenoptera, Vespidae) in Taiwan, with Notes on Its Natural Status. inpress. Doi:10.3390/insects12040320
2. Jeong JS, Kim MJ, Park JS, Lee KH, Jo YH, Takahashi J, Choi YS, Kim I. Tracing the invasion characteristics of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae), in Korea using newly detected variable mitochondrial DNA sequences. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. inpress. Doi:10.1016/j.aspen.2021.03.004
3. 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*. 113:468-472
4. 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*
5. Nakasako J(B4), Okuyama H, Ohba S, Takahashi J. Complete mitochondrial DNA sequence of the giant water bug *Kirkaldyia deyrolli* (Hemiptera: Belostomatidae). *Mitochondrial DNA Part B*. 5:3721-3722. DOI:10.1080/23802359.2020.1833774.
6. Yamasaki K, Sayama K, Oishi T(B4), Nakahama K(M2), Yoshioka M(B4), Okuyama H, Takahashi J. Complete mitochondrial DNA sequence of the paper wasp *Polistes riparius* (Hymenoptera: Vespidae). *Mitochondrial DNA Part B*. 5:3195-3196. DOI: 10.1080/23802359.2020.1810155.
7. 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*. 5:2645-2647. DOI:10.1080/23802359.2020.1785961
8. 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. 27: 3615-3621. DOI:10.1016/j.sjbs.2020.08.001
9. 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*. 5:635-636. DOI:10.1080/23802359.2019.1711219

10. 高橋純一. 2020. カナダおよびアメリカに侵入したオオスズメバチ. *昆虫と自然*. 55:8-10.
11. 山崎和久・高橋稜一(M2)・高橋純一. 2020. 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.
12. 高橋純一. 2020. 写真でみるミツバチの感染症(1) 日本で飼養されているミツバチと疾病について. *臨床獣医*. 7月号.
13. 高橋純一. 2020. 写真でみるミツバチの感染症(2) アメリカ腐蛆病. *臨床獣医*. 9月号.
14. 高橋純一. 2020. 写真でみるミツバチの感染症(3) バロア病. *臨床獣医*. 11月号.

5. 学会発表など

1. 高橋純一. 2021年2月9日. 対馬グローバル大学. 対馬市.
2. 高橋純一. 世界農業遺産オンラインカフェ「梅の栽培と蜜蜂の関係」. 和歌山大学南紀熊野サテライト主催、まちキャンパスプロジェクト共催. 2021年3月19日. 和歌山市.

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) 学外活動
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 近畿有害生物研究会:顧問
- 3) 受賞等
 1. 田村直也(B4) 令和元年度生命資源環境学科卒業研究発表会. 優秀賞.
 2. 中迫樹生樹(B4) 令和元年度生命資源環境学科卒業研究発表会. 優秀賞.



2020 年度卒業生

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喫煙中止後の回復機構について

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

スギ花粉によりアレルギーが発症することが知られている。日本スギ花粉(Cryptomeria japonica pollen : Cjp)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、スギ花粉による肺の初期免疫応答反応に対する電子タバコの影響について、タバコ葉抽出液(Water Soluble Tobacco Extract)を用いて研究をしている。

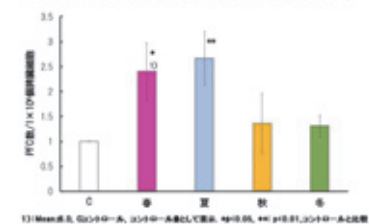
3) 天然成分の免疫作用とその応用について

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。



四季の違いによる喜界島蜂蜜の抗体産生機能への影響



② アガリクス茸

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

2. 本年度の研究成果

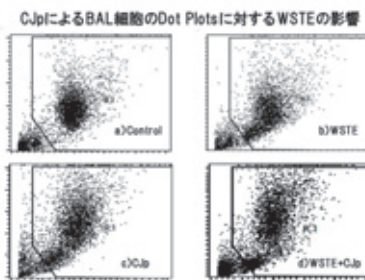
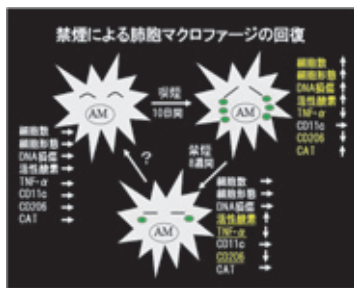
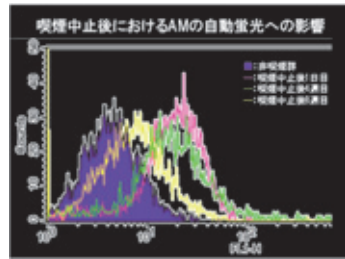
自動喫煙装置を用いて、マウスに一定量、一定期間、均一にタバコ煙を喫煙させた後、喫煙中止後1、7、30、60日

目に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その回復機構について調べた。

喫煙中止後60日で肺胞マクロファージの細胞数、形態の回復は認められたが、細胞内に取り込まれたタバコ煙粒子は残存し、残存した粒子が刺激となって活性酸素産生が増強された状態が継続し、活性酸素過剰が肺胞マクロファージの免疫機能を抑制し、形態的には回復されるが機能的には回復されず、肺胞マクロファージの機能的な回復機構には活性酸素の関与が示唆された。

電子タバコの成分であるタバコ葉抽出液

(WSTE)を気管支内投与により肺胞マクロファージの内部構造の複雑化、緻密化が認められ、好中球の出現が認められた。スギ花粉(CJp)による肺胞マクロファージのアレルギー発症の促進に関与するサイトカインの発現をタバコ葉抽出液が増強することが示された。また、蜂蜜による抗体産生機能の増強が春と夏蜂蜜で認められ、四季による差が認められた。



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 suppression in 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. Honey is used as traditional medicine for cold, skin inflammation and burn wound but not only health care. Jungle honey enhanced antibody production through the increase of CD19 positive cells and proliferation of spleen cells by augmentation of IL-1 β and IL-6 mRNA expressions. Japanese honey also enhanced IL-1 β mRNA expressions in AM and antibody production.

(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 of neutrophils and macrophages in mice.

4. 論文, 著書など

中田帆浪、瀬田真由子、森下瑠璃子、斎藤元樹、小畑雄飛、久野令、野瀬雅仁、竹内実 タバコ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 アレルギーの臨床 41 : 52-55, 2021.

竹内実 蜜蜂と蜂蜜の秘密を探る！ 北隆館 p1-81、ISBN978-4-8326-1009-5 C3047, 2021.

Kengo Kobayashi, Yuriko Hirono, Honami Nakata, Kent E. Pinkerton and Minoru Takeuchi. Cigarette Smoke Exposure Inhibits Early Phase Of Antibody Production Through Inhibition Of Immune Functions In Alveolar Macrophage. Current Respiratory Medicine Reviews 16:193-200, 2020.

竹内実 魔法のハチミツ マキノ出版 p14-17, ISBN978-4-8376-6644-8, 2020.

瀬田真由子、中田帆浪、野崎勉、石原健夫、竹内実 四季の喜界島蜂蜜による免疫作用について アレルギーの臨床 40 : 63-67, 2020.

Kengo KOBAYASHI, Yuriko HIRONO, Honami NAKATA, Mayuko MIYAGAWA, Kent. E. PINKERTON and Minoru TAKEUCHI. Cigarette smoke exposure inhibit antibody production via inhibition of alveolar macrophage. Journal of Translational Science, 7:1-7, 2020.

金森千香、野瀬雅仁、竹内実 喫煙とスギ花粉の肺胞マクロファージへの影響とアレルギー発症 アレルギーの臨床 40(9):54-58,2020.

竹内実 蜂蜜によるモルモットの好中球機能への影響 アレルギーの臨床 40(5):75-78,2020.

5. 学会発表など

中田帆浪、瀬田真由子、稲賀すみれ、竹内実 喫煙中止後における肺胞マクロファージの免疫機能の回復について 第41回日本臨床薬理学会学術総会、福岡、12月3日～5日、2020年。
瀬田真由子、中田帆浪、野崎勉、石原健夫、竹内実 喜界島蜂蜜の免疫機能への影響 第41回日本臨床薬理学会学術総会、福岡、12月3日～5日、2020年。

Minoru Takeuchi, Honami Nakata, Kent E Pinkerton. Effect Of Cigarette Smoking And Honey Inhalation On Lung Inflammation.

Nov 12-16, 2020, Virtual.

Minoru Takeuchi, Honami Nakata, K E. Pinkerton. Analysis of effect of honey and cigarette smoke on lung inflammation by using flow cytometry. 2020 ICCS, Sep. 22-26, 2020, Virtual.

Minoru Takeuchi, Honami Nakata and Kent E Pinkerton. Effect of Honey and Cigarette Smoke on Lung Inflammation by Lipopolysaccharide (LPS). FOCIS 2020, Jun,23-26, 2020. Virtual.

Honami Nakata, Saki Hamada, Yuki Hirano, Kent E Pinkerton, Minoru Takeuchi. Effect of cigarette smoking on M1/M2 type Alveolar Macrophage (AM) and the restoration of AM by smoking cessation. ATS 2020, May, 2020. Virtual.

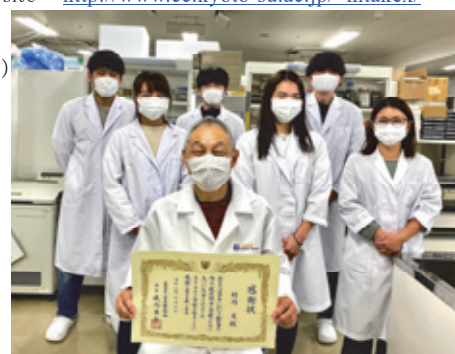
Minoru Takeuchi, Honami Nakata and Kent E Pinkerton. Effect of Cigarette Smoking and Honey on Lipopolysaccharide (LPS)-induced Lung Inflammation. 2020 SRNT 26th annual meeting, Mar.11-14, New Orleans, 2020.

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：電子タバコ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：2020年-2023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) 受賞
日本獣医師会会長賞 2020年10月
- 4) その他

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

研究室員：
中田帆浪(院)
小畑雄飛
斎藤元樹
久野令
森下瑠璃子
研究補助員：
瀬田真由子



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。平滑筋の収縮は細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が増加することにより起こり、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、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結果、 $[Ca^{2+}]_i$ が変化し、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。

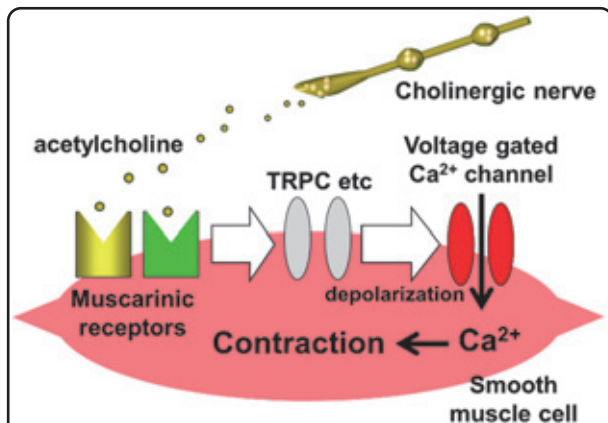


Figure 1. Regulation of smooth muscle contractility by cholinergic nerves

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、 $[Ca^{2+}]_i$ 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) 消化管平滑筋には、機械刺激により開口する陽イオンチャネルの存在が古くから知られている。この陽イオンチャネルは腸内容物による筋の伸展を感知し、平滑筋の収縮活性を高めると考えられてきた。しかし、同チャネルの分子実体は特定されておらず、腸管運動調節における生理的役割については不明である。本研究は、機械刺激受容チャネルとして新しく同定された Piezo1 チャネルの大腸運動調節における役割を明らかにすることを目的としている。本年度は、マウス結腸における Piezo1 チャネルの発現について、Piezo1 に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学染色法により検討を行った。また、マウス結腸平滑筋において Piezo1 チャネル作動薬である Yoda1 および同チャネル阻害薬である G_sMTx-4 の収縮活性に対する効果についてそれぞれ検討した。その結果、結腸に発現する Piezo1 チャネルが平滑筋収縮を促進性に制御する可能性が示唆された。

(2) 小腸平滑筋の収縮は、コリン作動性神経から放出されるアセチルコリン (ACh) とその受容体であるムスカリン受容体により興奮性に調節されている。ムスカリン受容体には $M_1 \sim M_5$ までの 5 つのサブタイプが同定されており、そのうち、小腸平滑筋には M_2 と M_3 の二つのサブタイプが存在している。これらのムスカリン受容体が刺激されると、細胞内 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} が細胞質内へと放出されるとともに、非選択的陽イオンチャネルが開口することにより細胞膜が脱

分極する。この膜の脱分極により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開口し、同チャンネルを介して細胞質内へ Ca^{2+} が流入する。これらの Ca^{2+} 動員機構により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加する結果、平滑筋は収縮する。しかしながら、ムスカリン作動性収縮における各ムスカリン受容体サブタイプの役割ならびにその細胞内情報伝達機構は必ずしも明らかになっていない。その理由として、各サブタイプに対する選択的なりガンドが限られていることや複数のサブタイプが同じ細胞応答に関与していることなどが挙げられる。この課題を解決する手段として、各ムスカリン受容体サブタイプの遺伝子欠損マウスを用いた研究が国内外を問わず行われてきた。本年度は、それらの知見をまとめ、総説として公表した。

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 blood vessel tone, gastrointestinal and genitourinary tract motility, and airway resistance. Smooth muscle contractility is regulated by intracellular Ca^{2+} , which is affected by various neurotransmitters and hormones that act on its receptors, leading to change in activities of ion channels (Figure 1). Structural and functional changes in the smooth muscle can lead to disorders such as hypertension, asthma, and irritable bowel syndrome. Our laboratory focuses on understanding 1) the mechanisms that regulate smooth muscle contractility, and 2) pathophysiology of diseases associated with smooth muscle abnormality.

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

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

Annual Reports:

(1) The contractility of smooth muscle changes in response to mechanical stretching caused by luminal contents in the gastrointestinal tract. Mechanical stimulation is sensed by mechanosensitive ion channels. Mechanosensitive cationic channels are expressed on the gastrointestinal smooth muscle cells and may contribute to contractions in response to muscle stretch. However, the molecular identity of the cationic channels remains unclear. In this study, we aimed to elucidate the roles of Piezo1 channels, which have been identified as a new class of mechanosensitive nonselective cationic channels, on the regulation of gastrointestinal motility. This year, we performed immunohistochemical staining using an antibody against Piezo1 to examine the expression of Piezo1 in murine colon. We also investigated the effects of Yoda1, a Piezo1 selective activator, and GsMTx-4, a Piezo1 inhibitor, on contractile activity in murine colonic smooth muscles. Our results suggest that Piezo1 channels are involved in the contraction of smooth muscles in murine colon.

(2) It is well known that the motility of gastrointestinal tract is regulated by acetylcholine (ACh) released from cholinergic nerves, which act on the muscarinic receptors (mAChR). The receptors have been classified into five subtypes including M_1 , M_2 , M_3 , M_4 and M_5 . In gastrointestinal smooth muscles, two subtypes of muscarinic receptor, M_2 and M_3 , are found with no measurable quantities of other subtypes. Stimulation of M_2 and M_3 receptors by ACh increases in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$, resulting in the smooth muscle contractions. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ results from Ca^{2+} release from internal stores and Ca^{2+} entry into the cell through L-type voltage-gated Ca^{2+} channels achieved by depolarization due to activation of non-selective cationic channels. A lack of ligands with a high degree of receptor subtype selectivity and the frequent contribution of multiple receptor subtypes to responses in the same cell type have hampered studies on the signal transduction mechanisms and functions of individual mAChR subtypes. Therefore, novel strategies such as genetic manipulation are required to elucidate both the contributions of specific mAChR subtypes to smooth muscle function and the underlying molecular mechanisms. In this year, we reviewed recent studies on muscarinic function in gastrointestinal smooth muscle using mAChR subtype-knockout mice.

4. 論文, 著書など

Yasuyuki Tanahashi, Seiichi Komori, Hayato Matsuyama, Takio Kitazawa, and Toshihiro Unno: Functions of Muscarinic Receptor Subtypes in Gastrointestinal Smooth Muscle: A Review of Studies with Receptor-Knockout Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; **22**(2):926. doi: 10.3390/ijms22020926.

5. 学会発表など

該当なし

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名:平滑筋に発現する機械刺激受容チャネルPiezo1の大腸運動調節における役割

研究代表者:柵橋靖行, 取得年度:R2-4年度(3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
- iii. 柵橋靖行:薬理学エデュケーター(公益社団法人日本薬理学会認定)

3) その他

i. 担当講義科目:

- ① 共通教育科目:病気とくすり入門
- ② 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, 解剖生理学実習, 基礎特別研究, 応用特別研究1・2
- ③ 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. 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。

iii. 高校出張授業:「動物のお医者さん生命科学研究の道へ」をテーマにして大阪府立池田高等学校の高校生を対象に授業を行った(2020.10.8, 池田高等学校)。



研究室メンバー

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

Prof. Shinobu Chiba, 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。この性質を利用して、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。伊藤維昭元京産大教授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。

2. 本年度の研究成果

(1) タンパク質ダイナミク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。この引っ張り力感受性に基づいた「タンパク質ダイナミクスレポーター」を構築した。さらに、それをトランスポゾンに導入した Transposable protein-dynamics reporter (TnDR) を構築し、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

製した。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 (Fujiwara et al., Cell Rep. 2020)。この TnDR と次世代 DNA シーケンス技術を組み合わせることで網羅性を大きく向上させた、第二世代の TnDR (TnDR-seq) の開発も進めている。

(2) 新規翻訳アレスト因子の同定と解析

真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子のうち3つ (SecM, MifM, VemP) は、タンパク質局在化装置をコードする遺伝子の上位にコードされている。今回、400種類以上の真正細菌ゲノムを網羅的に探索し、タンパク質局在化装置遺伝子の上位にコードされている翻訳アレスト因子を、さらに3つ見出し、それぞれ、ApcA, ApdA, ApdP と命名した。ApcA, ApdA は放線菌に由来し、ApdP は根粒菌に由来する。大腸菌、枯草菌の翻訳系を用いた遺伝学、生化学的解析から、これらはいずれも翻訳アレストを引き起こすこと、また、その翻訳アレストは、ある特定のコード1カ所で起こることもそれぞれ示された。網羅的な変異解析を行い、それぞれのアレスト因子による翻訳アレストに重要な配列を同定した。興味深いことに、細菌の進化の過程でそれぞれ独立に生じたと思われるこれらのアレスト因子が、互いに類似のアミノ酸配列 (RAPG もしくは RAPP) に依存するかたちで翻訳アレストを起こすことも見出された (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021)。

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 protein-dynamics reporter (TnDR)

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 protein-dynamics reporter, most probably reflecting their abilities to initiate the maturation and/or localization process co-translationally (Fujiwara et al., 2020. *Cell Rep.*). We are also developing a second generation of TnDR or TnDR-seq, which greatly improves coverage by combining

the current version of TnDR with the next-generation DNA sequencing technology.

2) Identification and characterization of novel translation arrest factors

Three of the translation arrest factors previously found in eubacteria (SecM, MifM, and VemP) are encoded upstream of genes encoding components of the protein localization machinery. Using this and other information, we comprehensively searched more than 400 eubacterial genomes and found three more translation arrest factors encoded upstream of genes for the protein localization machinery, and named ApcA, ApdA, and ApdP, respectively. ApcA and ApdA are encoded by actinobacteria genome, whereas ApdP is encoded by α -proteobacterial genome. Genetic and biochemical analyses using the *E. coli* and *B. subtilis* translation systems showed that they all arrest translation elongation at a specific codon. Comprehensive mutational analysis allowed us to identify the sequences that are crucial for translational arrest. Interestingly, these arrest factors, which likely have occurred independently during bacterial evolution, were also found to cause translational arrest in a manner depending on amino acid sequences (RAPG or RAPP) that are similar to each other (Sakiyama et al., *Nucleic Acids Res.* 2021).

4. 論文, 著書など

原著論文

Fujiwara, K., Katagi, Y., Ito, K. and Chiba, S. (2020) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics in *Bacillus subtilis* using TnDR, a transposable protein-dynamics reporter. *Cell Rep.* 33, 108250.
doi: 10.1016/j.celrep.2020.108250.

Sakiyama K, Shimokawa-Chiba N, Fujiwara K, Chiba S. (2021) Search for translation arrest peptides encoded upstream of genes for components of protein localization pathways. *Nucleic Acids Res.* 49, 1550-1566.
doi: 10.1093/nar/gkab024.

5. 学会発表など

Shinobu Chiba: Proteome-wide detection of nascent chain dynamics. Nascent Chains 2020 (4th Annual Conference on Protein Folding on the Ribosome). 2021/ 12/11-12. Zoom Webinar (国際会議・招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

科研費補助金・学術変革領域研究 (A) 計画研究

課題名: 機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構

研究代表者: 千葉志信、取得年度: R2-R6 年 (5 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) アウトリーチ活動

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・京産大生命科学部教授) に協力 2020 年
2 月 18 日-20 日

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



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、特に感染症因子と宿主であるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治療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。

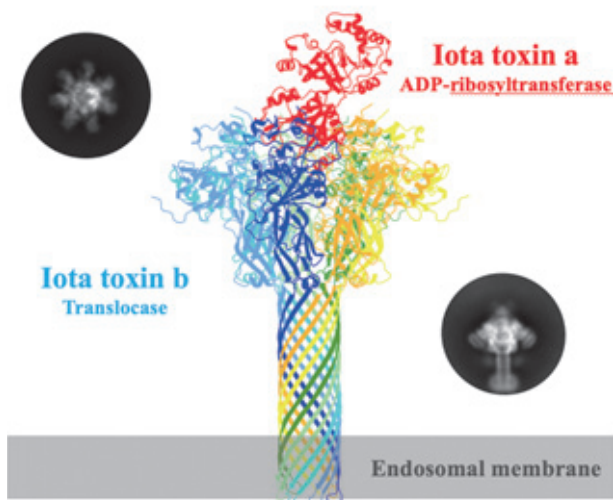
(2) ADP リボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学: 様々な病原微生物は ADP リボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、宿主のタンパク質を修飾し、宿主のシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な ADP リボシル化毒素(酵素)とその基質複合体での結晶構造解析を進めている。

2. 本年度の研究成果

(1) *C. perfringens* が持つ二成分毒素イオタ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。2020 年、Ib 膜孔の解析をクライオ電子顕微鏡で進め、その構造を、C7 対称性を用いて 2.9 Å 分解能で得た。Ib 膜孔は 7 量体からなる。さらに Ia の結合の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と、膜挿入部がまだ組み立てられ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、2.9 Å と 2.8 Å 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、2020 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)。

Iota toxin complex from *Clostridium perfringens*



ほぼこれと同時に、ディフィシル菌の二成分毒素 CDT の構造が海外のグループにより報告された。ディフィシル菌は抗生物質耐性菌の感染が問題とされ、2つの毒素(TcdA, TcdB)の他にイオタ毒素と類似の二成分毒素を持ち、この二成分毒素が重症化に関わっているかが注目されている。2つのグループが、この毒素の構造を独立に発表した。面白いのは、この2つともにダブルヘプタマーの構造であることである。イオタ毒素は 7 量体であるが、CDTb はこれが、2つ合わさったダブルヘプタマーの 14 量体構造をとる。この構造だと、膜に孔を開けることができない、また CDTa の膜透過にも支障があると考えられる。現在、CDT でも生理的な 7 量体

の構造があるのではないと考え、その構造決定を進めている。また CDTa 結合した CDTb 膜孔の構造もわかっておらず、これを明らかにするためにサンプルの調整と電子顕微鏡でのデータ測定と解析を進めている。

(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2成分毒素である。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。特に CPiLE-b のクランプ最狭部位はイオタおよび CDT と異なっており、毒性発現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、毒性発現機構を明らかにする。また、これらの透過阻害剤にも注目して研究をすすめている。

(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事を明らかにした。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*.

Two other groups reported binary toxin CDTb-pore from *C. difficile* structures, recently. These structures are all double-heptamer, thus, the physiological heptamer structure have not been reported. We would like to reveal the physiological pore structure of CDTb and the CDTa-bound CDTb-pore.

(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 studying the difference of the pore in CPiLE-b compared with Ib-pore and CDTb-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(2020.4~2021.3)

Tsuge H. A myelin sheath protein forming its lattice.

J. Biol. Chem. 295(26):8706-8707.

doi: 10.1074/jbc.H120.014273. (2020) (査読有り)

Yoshida T, Tsuge H. Common Mechanism for Target Specificity of Protein- and DNA-Targeting ADP-Ribosyltransferases

Toxins (Basel). 2021 13(1):40. doi: 10.3390 (査読有り)

Yamada T, Tsuge H.

Preparation of *Clostridium perfringens* binary iota-toxin pore complex for structural analysis using cryo-EM

Methods Enzymol. 2021;649:125-148.

doi:10.1016/bs.mie.2021.01.032. (査読有り)

5. 学会発表など

津下英明 “二成分毒素膜孔複合体の単粒子解析” 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会紙上開催、2020.5.25-27 (招待講演)

津下英明 “二成分毒素複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析：ADP リボシル化毒素の細胞内輸送機構の解明” 第460回ビタミンB研究委員会 (愛知)、2020.8.29

津下英明 “見えてきたタンパク質膜透過機構、クロストリジウム二成分毒素複合体の単粒子解析から” 第46回生体エネルギー研究会、長土塀青少年交流センター (金沢)、2020.12.10 (招待講演)

6. その他特記事項

(1) 外部資金

なし

(2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

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



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。

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) 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。

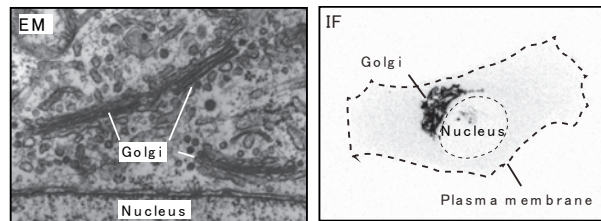


Fig. 1 The structure of the Golgi apparatus. (Left) Stacked cisternal structure. (Right) Ribbon like structure near the nucleus.

2. 本年度の研究成果

(1) 遺伝子破壊による GM130 の機能解析

GM130 はゴルジ体のシス層表面に局在するタンパク質であり、輸送小胞とゴルジ体の繋留と融合、ゴルジ体の層板構造維持に重要な役割を果たしていると考えられている。以前に GM130 欠損 CHO 細胞が温度感受性となり 39.5°C ではゴルジ体が分散し、ゴルジ体を経由した小胞輸送経路が停止して致死となることが報告されていた。一方最近、ヒト遺伝病の研究や GM130 遺伝子破壊マウスの解析から、GM130 欠損は細胞レベルでは致死ではないが、神経系の異常や精子形成異常を示すことが報告された。これらのケースでは、GM130 遺伝子のフレームシフトにより、N 末端 300~400 アミノ酸残基の発現が残存している可能性がある。一方、先の GM130 欠損 CHO 細胞では GM130 欠損の原因変異が特定されていないため、GM130 欠損は致死ではなく、GM130 欠損以外の原因で温度感受性致死となっていた可能性が示唆された。そこで CRISPR/Cas9 法を用いて培養細胞レベルで GM130 遺伝子破壊を行い、この可能性を検証することを試みた。Ann Ranらによって開発されたプラスミドと薬剤選択を用いる CRISPR/Cas9 法により HEK293 細胞と HeLa 細胞で GM130 遺伝子破壊を行った。その結果、GM130 陰性細胞の生成を確認することができたが、これらの細胞のほとんどがアポトーシスにより死滅することが明らかとなった。このことから、GM130 が細胞の生存に必須の役割を果たしていることが示唆された。

(2) 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, *Saccaromyces 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 (Shaik, et al., *Frontiers Cell Dev. Biol.* 7, 130, 2019)。ヒト YIPF は, 3種の独立した複合体 1~3 を形成し, それぞれゴルジ体上流 (ERGIC), 中流 (cis-Golgi), 下流 (medial-, trans-Golgi, TGN) に分かれて局在している (Fig. 2)。

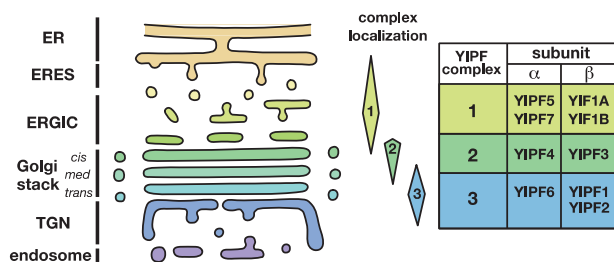


Fig. 2 Three YIPF complexes and their localization

YIPF の機能解析の端緒として, 常法によりコーディング領域のみを用い, プラスミドベクターにて培養細胞での一過性発現実験を行ったところ, YIPFα1A, YIPFα3, YIPFα1B については発現が顕著に低く, 過剰発現による機能解析を行うことができなかった。過去の実験結果を精査したところ, 興味深いことに, これらの発現量が低いファミリーメンバーが共通して長鎖の 3'UTR を持つことを発見した (Table 1)。このことから, 長鎖 3'UTR が, これらの YIPF タンパク質の発現を促進する可能性が考えられた。

Table 1 Protein expression level and mRNA size of YIPF family proteins

New Name	Old Name	RefSeq cDNA (bp)	Northan blotting (bp)	Expression
YIPFα1A	YIPF5	3300	4000	+
YIPFα1B	YIPF7	1000	ND	ND
YIPFα2	YIPF4	1400	2300	+++
YIPFα3	YIPF6	4000	7500	+
YIPFβ1A	YIF1A	1000	2400	+++
YIPFβ1B	YIF1B	2200	6000	+
YIPFβ2	YIPF3	1500	2000	+++
YIPFβ3A	YIPF1	1700	2400	+++
YIPFβ3B	YIPF2	2200	2400	+++

この可能性を検証するため, YIPFα1A について, コーデ

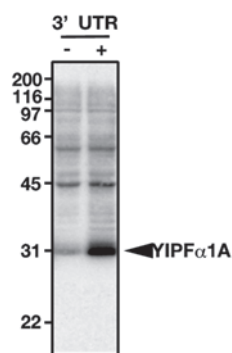


Fig. 3 Addition of 3' UTR increased the protein expression of YIPFα1A

ィング領域に 3'UTR を付加し, HEK293 細胞に一過性に発現させて, その影響を解析した。その結果, 3'UTR を付加するとコーディング領域のみと比べて発現量が有意に高くなること

が明らかとなった (Fig. 3)。この結果から, 長鎖 3'UTR をもつ YIPFα1A は自身の 3'UTR を介して mRNA やタンパク質を安定化させることにより発現量を増加させている可能性が示唆された。

(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ところ, F₁ 世代メスに卵殻の直径が 70% 程度縮小した卵を産卵する個体を見出した。この小型卵殻表現型を示す卵では, 正常型に比べて強い GFP 蛍光が観察された。トランスジーン産物は GlcNAcTI 活性を保持していると考えられるため, 小型卵殻表現型がゴルジ体での GlcNAcTI 活性上昇によって起こる可能性が示唆された。GlcNAcTI 活性上昇とそれに伴う小型卵殻表現型は, (1) 高発現を導く染色体部位への組み込み, あるいは (2) 複数の GlcNAcTI-GFP の組み込みによって起こる可能性が考えられる。これらの可能性を明らかにするため, 組み込み部位の特定を進めてきた。昨年までに, 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, また, それぞれのアリルのヘテロ接合体は小型卵殻表現型を示さないことが明らかとなっていた。また, TgCh23.1 系統では, トランスジーンが 23 番染色体に組み込まれており, この間 3,450bp が欠失していた。一方, TgCh25.1 系統では, 25 番染色体へ組み込まれていたが, ゲノムの欠失は見られなかった。TgCh23.1 アリルを二つ持つ個体が見つからなかったことから, TgCh23.1 アリルのホモ接合体は致死である可能性が示唆された。一方, TgCh25.1 アリルのホモ接合体と TgCh23.1 アリルと TgCh25.1 アリルを一つずつ持つ個体が見つかったことから, 複数の GlcNAcTI-GFP の組み込みによって起こる可能性が強く示唆された。

本年度は, この可能性を検証するために, TgCh25.1 アリルと野生型のヘテロ接合体を掛け合わせて, TgCh25.1 ホモ接合体を作成し, ホモ接合体が小型卵殻表現型を示すかどうか解析を行なった。その結果, Fig. 3 に示すように, 野生型由来の受精卵に比べて, ホモ接合体由来の卵殻の直径は有意に縮小していた (中央値: 野生型=1.15mm, ホモ接合体=1.03mm, Kruskal-Wallis 検定 P<0.01)。ヘテロ接合体由来の卵殻でも, ばらつきが大きい有意な縮小が確認された (ヘテロ接合体=1.07mm, P<0.01)。以上の結果から, 小型卵殻表現系は, 複数の GlcNAcTI-GFP

の染色体への組み込み, 発現によって引き起こされると結論された。

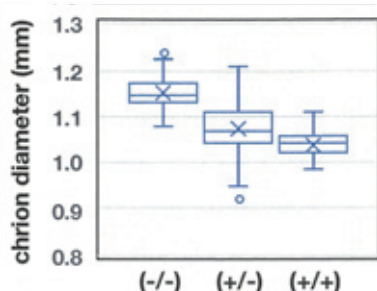


Fig. 4 Decrease of chorion size by the expression of GlcNacTI-GFP

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 vertebrates (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 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 "Golgiopathy" and the research in these subjects became important to understand the pathology and find new targets to treat these diseases.

(1) Functional analysis of GM130 by gene knockout

GM130 is a peripheral membrane protein localized on the surface of the cis-Golgi cisternae. It has an important role in the docking and fusion of transport vesicles to the Golgi cisternae and also for the maintenance of the structure of the Golgi apparatus. It was reported that the loss of GM130 in CHO cells renders the cells to be temperature sensitive and lethal at 39.5°C because of the inhibition of the vesicular transport through the Golgi apparatus concomitant with the disassembly of the Golgi apparatus. On the other hand, recent reports of human genetic disease and knockout mouse studies revealed that the organisms missing normal GM130 are viable while they have multiple lesions, i.e., neuronal disorders and abnormal spermatogenesis. In these cases, frameshift mutations of GM130 caused premature termination of GM130 at 300~400 amino acid residues from the N-terminus. On the other hand, the cause of GM130 loss has not been elucidated in the above-mentioned study of CHO cells. Therefore, the loss of GM130 may not cause temperature sensitivity and lethality. Here, we tried to evaluate this possibility by producing GM130 knockout cells by a CRISPR/Cas9 system developed by Ann Ran et al. The results of the trials revealed that the GM130 knockout cells can be produced but apoptosis was induced in those cells leading to cell death. From these results, it was strongly suggested that GM130 has an essential role in cell survival.

(2) The analysis of the function of YIPF proteins

YIPF proteins are a family of multi-span transmembrane proteins localizing in the Golgi apparatus. They are predicted to be target proteins for GM130 and GRASP65 and are proposed to function in the maintenance of the Golgi structure. There are four family members in *Saccharomyces cerevisiae* (Yip1p, Yif1p, Yip4p, Yip5p), and nine family members (YIPF1~6, YIP1B, YIF1A, YIF1B) in human. A homolog of Yip1p binds a Yif1p homolog forming a paired complex. There are three distinct complexes (1~3) in human cells. Complex 1 localizes in the early Golgi (ERGIC), complex 2 localizes in the middle (cis-Golgi) and complex 3 localizes in the late Golgi

(medial-, trans-Golgi, TGN) (Fig. 2).

YIPF α 1A, YIPF α 3, YIPF α 1 did not express well in cultured cells when transient transfection was performed using a plasmid vector containing only their coding region. After careful examination of our previous results, it was found that these low expression family members have extremely long 3' UTR sequences (Table I). These results suggested a possibility that the 3' UTR sequences support the expression of these YIPF proteins.

To evaluate this possibility, the 3'UTR was appended to the coding sequence of YIPF α 1A expression construct, and the expression of the proteins was compared. As a result, the protein expression was significantly enhanced with the addition of 3' UTR (Fig. 3). It was suggested that the long 3' UTR of YIPF α 1 induce protein expression by stabilizing the mRNA or the protein.

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

We have found that 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 25th chromosomes (named TgCh23.1, TgCh25.1). TgCh23.1 has a deletion of 3,450 bp at the insertion site of the transgene. There was no large deletion for TgCh25.1. The homozygous of the TgCh23.1 was not found indicating the lethality of the homozygous embryo. On the other hand, homozygous individuals of TgCh25.1 allele and individuals with one TgCh23.1 allele and TgCh25.1 allele were grown to maturity. These results strongly suggested that the multiple existences of GlcNAcTI-GFP transgene and resulting in higher expression of GlcNAcTI-GFP caused the small chorion phenotype.

To evaluate this possibility, TgCh25.1 heterozygous individuals were crossed to produce TgCh25.1 homozygous individuals. These were grown up to maturity, genotype checked, and mated produce fertilized embryos. As shown in Fig. 4, the chorion size was significantly smaller for TgCh25.1 homozygous compared with wild type (medial diameter: -/- = 1.15mm, +/- = 1.03mm, Kruskal-Wallis

test: $P < 0.01$) . TgCh25.1 heterozygous also showed significant smaller chorion size (+/- = 1.07mm, $P < 0.01$). Therefore, it was concluded that the small chorion phenotype was caused by the multiple integrations of GlcNAcTI-GFP transgene and the expression of the protein.

4. 論文, 著書など (Publications)

該当なし

5. 学会発表など (Meeting Reports)

該当なし

6. その他特記事項 (Others)

1) 外部資金 (Research Grants) : 該当なし

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: 3 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

2020 Laboratory Members: 長崎貴郁 Takafumi Nagasaki (B4), 杉山京平 Kyohei Sugiyama (B4), 高司時生 Tokio Takaji (B4), 寺坂太賀 Taiga Terasaka (B4), 戸田万理 Mari Toda (B3), 河村駿吾 Shungo Kawamura (B3), 川口晴香 Haruka Kawaguchi (B3)

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

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino,

DVM, Ph.D



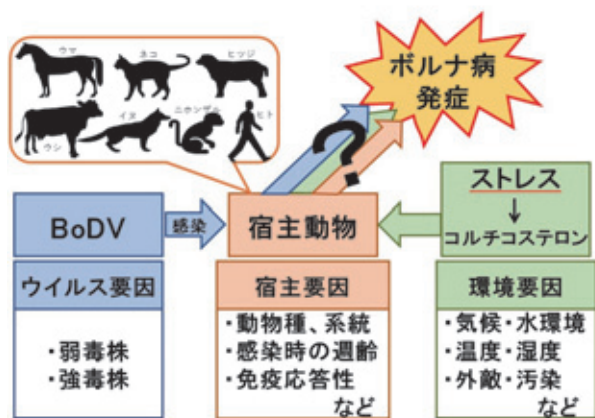
症が人獣共通感染症であり、ヒトでは重篤な脳障害を起こす可能性があることが示された。私達は、BoDV の持続感染性と病原性を多角的に解析する目的で、ラットやマウス等の感染モデル動物における病態の解析(運動障害と行動学的異常)、神経細胞、グリア細胞などの初代培養細胞における病原性の解析、および野外の動物における感染症疫学調査を中心に研究を行っている。

2. 本年度の研究成果

「哺乳類ボルナウイルス 1 型感染マウスにおける感染前の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、ウイルス感染前のマウスにおける副腎皮質ホルモン投与が及ぼす影響を解析することを目的にした。

4 週齢、オスの C57BL/6N マウス(SLC)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。その 8 日後に BoDV-1-CRNP5 株を 4×10^3 FFU 脳内接種し、CORT 処置 40 日目(感染 32 日目)までの 40 日間の観察期間中、4 日毎に体重測定と臨床症状の評価を行った。また、CORT 処置 24 日目および 40 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。

その結果、CORT 処置 24 日目では CORT 処置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。しかし、CORT 処置 40 日目では、CORT 処置の影響は消失し、感染により胸腺重量が有意に減少した。感染マウスの体重は CORT 投与により一過性に増加したが、その後減少し CORT 処置 40 日目には差が認められなくなった。ボルナ病の目視による臨床症状は、CORT 投与による差は認められなかった。しかしながら、行動学的試験では、CORT 処置 40 日目において、実施した 12 テストのうち 4 テストで CORT 投与群における行動学的異常の悪化が認められた。脳内ウイルス量は、CORT 処置により処置 24 日目よりも 40 日目の方が有意に上昇した。CORT 投与の有無によるウイルス量の差は認められなかった。脳の組織学的解析では、CORT 処置 40 日目ではウイルス抗原は CORT 処置の有無にかかわらず脳の広範囲で認められ、脳炎の程度も同程度であった。しかし、脳を 10 領域に分割して脳炎の程度を比較したところ、CORT 投与 40 日目の大脳皮質では CORT 処置により脳炎の程度が重度化した。

以上の結果から、あらかじめ CORT 処置されたマウスにおける BoDV-1 感染病態は、CORT 処置により一過性に病態は軽減したが、後に悪化することが示された。CORT 処置による胸腺の抑制効果が消失することにより、大脳皮質の脳炎が急激に悪化したことが原因と考えられた。これらのことから、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- β family in CNS and viral pathogenesis, and 3) mechanism of changes in virus genome with adaptation to host.

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

Four-week-old, male C57BL/6N mice (SLC) were subcutaneously implanted with CORT pellets (5 mg/pellet) or placebo pellets. Eight days later, the BoDV-1-CRNP5 strain was inoculated intracerebroventricularly with 4×10^3 FFU, and the mice were weighed and evaluated for clinical signs every 4 days during the 40-day observation period until day 40 of CORT treatment (32 dpi). Behavioral studies and brain and thymus samples were collected for virological and histological analysis on days 24 and 40 of CORT treatment.

The results showed that on day 24 of CORT administration, the weight of thymus was significantly decreased by CORT administration with or without infection. However, on day 40 of CORT administration, the effect of CORT administration disappeared and the thymus weight was significantly decreased by infection. The weight of infected mice transiently increased with

CORT administration, but then decreased and no difference was observed on day 40 of CORT administration. No difference in the visual clinical manifestations of Borna disease was observed with CORT administration. However, in behavioral tests, worsening of behavioral abnormalities in the CORT-treated group was observed in 4 of 12 tests conducted on day 40 of CORT administration. There was no difference in viral load between the CORT-treated and non-CORT-treated animals. Histological analysis of the brain showed that viral antigens were found in a wide area of the brain with or without CORT administration on day 40, and the degree of encephalitis was similar. However, when the brain was divided into 10 regions and the degree of encephalitis was compared, the degree of encephalitis in the cerebral cortex on day 40 of CORT administration was more severe.

These results indicate that the pathogenesis of BoDV-1 infection in pre-CORT-treated mice was transiently alleviated by CORT administration, but later worsened, possibly due to the rapid worsening of encephalitis in the cerebral cortex caused by the loss of the inhibitory effect of CORT administration on the thymus. These results suggest that the effect of CORT on the development of Borna disease varies with the time of treatment.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

西野佳以 “ボルナウイルス感染症におけるストレスの影響” 鳥取大学農学部 令和2年度新興再興感染症学シンポジウム、2020.12.11 (オンライン) 【招待講演】

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

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

研究代表者: 西野佳以、取得年度: H30-R2(3年)

2) 学会活動

- ・日本ボルナウイルス研究会、副会長
- ・日本獣医学会、評議委員

3) その他

- ・京都動物愛護センター運営委員会、委員
- ・京都動物愛護推進計画検討委員会、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



卒業式の日(2021年3月)

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 ユビキチンリガーゼである Znf598 が必要である。当研究室では、Znf598 の生理的役割を解明するためにゼブラフィッシュ *znf598* 変異体を作成し、*znf598* 変異体では赤血球が減少していることを見出している。本年度は、*znf598* 変異体の分子レベルでの異常を解析するために、翻訳異常によって引き起こされるリボソームの衝突を解

析するための新規手法の開発を行った。理化学研究所岩崎信太郎博士らとの共同研究により、衝突した 2 つのリボソームに由来する約 60 塩基の mRNA 配列を次世代シーケンズにより解析する Disome Seq を開発し、ゼブラフィッシュ初期胚においてリボソームの衝突が起こっている部位を網羅的に明らかにした。

(B) ゼブラフィッシュ胚発生過程におけるリボソーム修飾状態の解析

当研究室では、リボソームの構成因子や修飾状態、品質を様々な発生時期において生化学的に比較するために、内在 *rpl36* 遺伝子座に精製用の Flag タグ配列を挿入した系統を樹立している。この系統を用い、様々な発生時期のゼブラフィッシュ胚からリボソームをアフィニティ生成し、その修飾状態の変化を解析した。その結果、リボソームのユビキチン化修飾量が受精直後から発生が進むにつれて増加していくことが明らかになった。さらにこのユビキチン化修飾が、リボソーム小サブユニットの構成タンパク質に導入されていること、Znf598 によって機能導入されていることを見出した。

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. We have generated a zebrafish znf598 mutant strain and found that erythrocytes were reduced in znf598 mutant embryos. To understand molecular abnormalities underlying this phenotype, we developed a novel method to analyze ribosome collisions caused by aberrant translation. In collaboration with Dr. Shintaro Iwasaki at RIKEN, we developed Disome Seq, which analyzes mRNA sequences of approximately 60 bases derived from the two colliding ribosomes by next-generation sequencing. We revealed the sites of ribosome collision in early zebrafish embryos on transcriptome using this method.

(B) Analysis of ribosome modifications during zebrafish embryogenesis

In order to biochemically analyze the components, modifications, and quality of ribosomes at various developmental stages, we have established a zebrafish strain containing a Flag insertion at the endogenous rpl36 locus. Using this strain, we affinity-purified ribosomes from zebrafish embryos at various developmental stages and analyzed the changes in the modifications. We found that the amount of ubiquitination on the ribosome increased from fertilization to the later developmental stages. Furthermore, we found that the ubiquitination was introduced to the ribosomal proteins in the small subunit by Znf598.

4. 論文, 著書など

P. Han, Y. Shichino, T. Schneider-Poetsch, M. Mito, S. Hashimoto, T. Udagawa, K. Kohno, M. Tanaka, **Y. Mishima**, T. Inada, S. Iwasaki S: Genome-wide survey of ribosome collision. *Cell Reports* (2020) **31**, 107610

M. Mito, **Y. Mishima**, S. Iwasaki: Protocol for Disome Profiling to Survey Ribosome Collision in Humans and Zebrafish. *STAR Protocols* (2020) **1**, 100168

三嶋雄一郎ほか: *動物の辞典* (朝倉書店) (2020), 146-151

5. 学会発表など

三嶋雄一郎: ゼブラフィッシュ発生過程におけるリボソーム品質管理機構の役割 第43回 日本分子生物学会年会, オンライン, 2020.12.2-4

宇賀神希、**三嶋雄一郎**: ゼブラフィッシュ胚からのリボソーム精製手法の確立 第43回 日本分子生物学会年会, オンライン, 2020.12.2-4

6. その他特記事項

1) 外部資金

日本医療開発研究機構・革新的先端研究開発事業 PRIME
課題名: 母性リボソームの品質管理不全による貧血発症機序の解明

研究代表者: **三嶋雄一郎**, 取得年度: R2-R5 年 (4 年)

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: 多田隈 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)

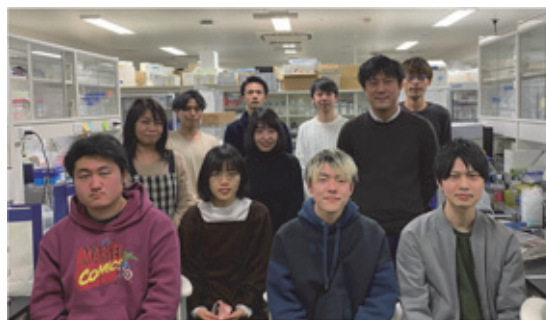
2) 知財権等 なし

3) 学外活動

三嶋雄一郎: 日本 RNA 学会 会計監査
同会 年会プログラム委員

4) 受賞等 なし

5) その他 なし



研究室のメンバー(2021年3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、CO₂固定が行われる。植物にとって光合成は非常に重要な機能であるため、様々な制御機構を備えている。私たちはこの中でも陸上植物葉緑体におけるレドックス制御機構について、その生理機能と分子メカニズムの解明を目指し、研究を行っている。

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

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

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

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

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

教授 本橋 健

Prof. Ken MOTOHASHI, Ph. D.



シタンパク質が局在することを示し、これがチラコイド内腔で機能していることも明らかにした。還元力の蓄積のないチラコイド内腔で、チオレドキシシのような酸化還元タンパク質が機能するためには還元力の供給が必要である。チラコイド内腔で必要となる還元力をストロマから伝達する分子メカニズム、およびその生理学的な意義を明らかにする。

2. 本年度の研究成果

1) *l*型チオレドキシシと光合成循環的電子伝達の機能相関

陸上植物葉緑体には、複数のグループに分類されるチオレドキシシが存在している。このうち、古くから知られている *l*型チオレドキシシと循環的電子伝達経路の因子である PGR5 との二重欠失株の解析を行った。*l*型チオレドキシシ欠失変異体、および PGR5 欠失変異体では成長阻害は見られなかった。しかし、それらの二重変異体では大きな成長遅延が観察された(図1)。*l*型チオレドキシシと光合成循環的電子伝達経路が協調することが、迅速な光合成誘導に重要であることが明らかとなった。

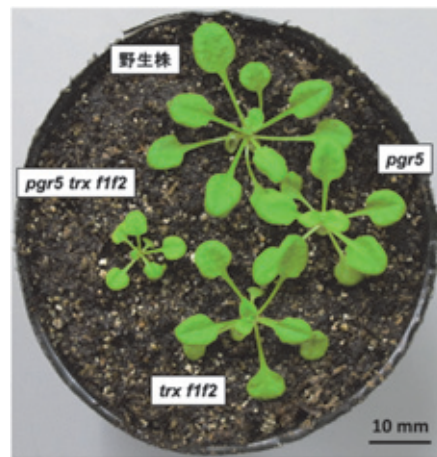


図1 シロイヌナズナ変異体の生育(*pgr5 trx fl2*)

2) *m*型チオレドキシシによる光合成循環的電子伝達経路の新たな制御機構の発見

*m*型チオレドキシシは、葉緑体内で光合成関連の反応を酸化還元状態により制御しており、その欠損株では植物の成長が遅延することがわかっていた。今回、この成長遅延の原因のひとつとして、光合成循環的電子伝達の *m*型チオレドキシシによる制御が関与していることを明らかにした。本研究では、*m*型チオレドキシシが光合成

循環的電子伝達経路の PGRL1 タンパク質とジスルフィド結合複合体を形成し、*m* 型チオレドキシンの直接的に制御していることを明らかにした。



図2 葉緑体における光合成反応とチオレドキシンのによる光合成循環的電子伝達経路の制御

3) 分子生物学に用いる新規技術開発

この数年研究を進めている生化学・分子生物学における新技術開発について、本年度は以下の成果を挙げた。ひとつめは、96 穴 PCR プレート内の溶液をスピンドアウンするためのマニュアル遠心機の作成である。もうひとつは、2019 年度に発表した高感度 DNA アガロースゲル電気泳動撮影装置について日本語総説を執筆し、その普及に努めた。

3. Research projects and annual reports

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

Plants have photosynthetic ability to convert carbon dioxide into organic compounds, especially sugars, as a unique feature. The photosynthesis in higher plants occurs in chloroplasts which are comprised of multilayered membranes, and pushes forward carbon dioxide fixation. Chloroplasts have various regulation mechanisms of photosynthesis that is an important function for plants. Particularly, we focus on redox regulation in modulation system of higher plant chloroplast, and have major two research projects as follows:

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

Thioredoxins regulate the activity of chloroplast enzymes by reducing disulfide bonds in a light-dependent manner. Previous *in vitro* studies indicated that *f*-type thioredoxins are the most efficient redox regulators; however, *f*-type thioredoxin mutants did not show any obvious phenotypes. We analyzed functional correlation of *f*-type thioredoxin and other

photosynthetic factors. Light activation of thiol enzymes by the thioredoxin systems and cyclic electron transport by the PGR-dependent pathway contribute substantially to regulation of photosynthesis. To further study regulatory mechanisms that contribute to efficiency during the induction of photosynthesis, we analyzed the contributions of PSI donor- and acceptor-side regulation in the *trx flf2* mutant background. Acceptor-side limitations in the *pgr5 trx flf2* mutant suppressed photosynthesis initiation, suggesting that PGR5 is required for efficient photosynthesis induction.

We also analyzed the *m*-type thioredoxin mutants and found that the PGR5/PGRL1-dependent photosystem I cyclic electron transport pathway was regulated by *m*-type thioredoxins. Genetic and phenotypic characterization of multiple mutants indicated the physiological interaction between Trx *m* and the PGR5/PGRL1-dependent pathway *in vivo*. Using purified Trx proteins and ruptured chloroplasts, *in vitro*, we showed that the reduced form of Trx *m* specifically decreased the PGR5/PGRL1-dependent plastoquinone reduction. In planta, Trx *m4* directly interacted with PGRL1 via a disulfide complex formation. Furthermore, the Trx *m4*-PGRL1 complex was transiently dissociated during the induction of photosynthesis. We propose that Trx *m* directly regulates the PGR5/PGRL1-dependent pathway by complex formation with PGRL1.

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

A simple and fast manual centrifuge was developed to spin down solutions in 96-well PCR plates. A commercially available salad spinner was utilized for this purpose. Acceleration and deceleration of the centrifuge were faster than those of a conventional electric centrifuge using 96-well PCR plates. Solutions in a 96-well PCR plate settled quickly after centrifuging for only 3 sec. This lightweight centrifuge can be stored under the work bench or on a shelf and can be put on the bench only when required, whereas the electric centrifuge is immobile due to its weight and the requirement of electric cables. This simple centrifuge is inexpensive, requires minimal effort for making, and can be used anywhere.

4. 論文, 著書など

Ryota Murai, Yuki Okegawa, Nozomi Sato and Ken Motohashi*:

Evaluation of CBSX proteins as regulators of the chloroplast thioredoxin system. *Front. Plant Sci.* 12, 530376 (2021)

Mai Duy Luu Trinh, Daichi Miyazaki, Sumire Ono, Jiro Nomata, Masaru Kono, Hiroyuki Mino, Tatsuya Niwa, Yuki Okegawa, Ken Motohashi, Hideki Taguchi, Toru Hisabori and Shinji Masuda*: The evolutionary conserved iron-sulfur protein TCR controls P700oxidation in photosystem I. *iScience* 24, 102059 (2021)

本橋健*: 安全で安価なDNAアガロースゲル電気泳動検出システム. *実験医学* 39, 97-103 (2021)

Yuki Okegawa, Ken Motohashi*: M-type thioredoxins regulate the PGR5/PGRL1-dependent pathway by forming a disulfide-linked complex with PGRL1. *Plant Cell* 32, 3866-3883 (2020)

Yuki Okegawa*, Leonardo Basso, Toshiharu Shikanai and Ken Motohashi: Cyclic electron transport around PSI contributes to photosynthetic induction with thioredoxin *f*. *Plant Physiol.* 184, 1921-1302 (2020)

Rumi Amano, Risa Momoi, Emi Omata, Taiga Nakahara, Kaori Kaminoyama, Mikiko Kojima, Yumiko Takebayashi, Shuka Ikematsu, Yuki Okegawa, Tomoaki Sakamoto, Hiroyuki Kasahara, Hitoshi Sakakibara, Ken Motohashi and Seisuke Kimura*: Molecular and biochemical differences in leaf explant and the implication for regeneration ability in *Rorippa aquatica* (Brassicaceae). *Plants* 9, 1372 (2020)

Takatoshi 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-well PCR plates. *Methods Protoc.* 3, 41 (2020)

5. 学会発表など

桶川友季, 本橋健: チオレドキシニンによる多様な葉緑体機能の酸化還元制御 第 10 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, オンライン, 2021.5.28-29

村井亮太, 桶川友季, 佐藤望, 本橋健: チオレドキシニンシステム制御因子としての CBSX の評価 第 62 回植物生理学会年会, オンライン, 2021.3.14-16

桶川友季, 本橋健: *m*型チオレドキシンは PGRL1 と複合体を形成することによって PGR5/PGRL1 依存のサイクリック電子伝達を制御する 第 62 回植物生理学会年会, オンライン, 2021.3.14-16

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

6. その他特記事項

1) 外部資金

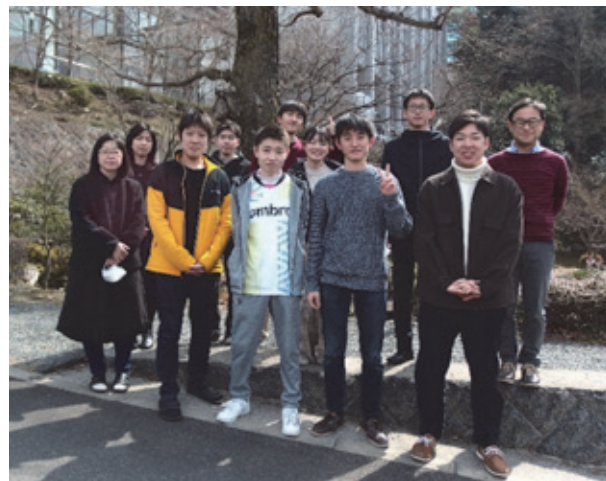
発酵研究所(一般研究助成)

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)

2) 学外活動 本橋健: 日本光合成学会常任幹事

3) その他

桶川友季研究員が岡山大学資源植物科学研究所に助教として赴任した。



研究室集合写真 (2021年3月)

植物育種学研究室

Laboratory of Plant Breeding

教授 山岸 博

Prof. Hiroshi Yamagishi, Dr. Agr



1. 研究概要

植物の育種においては、近年、高い生産性と均一性を具備したF₁品種の重要性が急速に増大している。たとえば20世紀後半の世界的な「緑の革命」を推進した原動力の1つは、トウモロコシにおけるF₁品種の急速な普及であった。このような高い育種効果を有するF₁育種においては、確実かつ効率的にF₁種子を採種することが極めて重要な意味を持つ。効率的なF₁採種を可能にする植物の遺伝的特性として細胞質雄性不稔性があり、実際にこの特性が多くの作物のF₁育種で利用されている。細胞質雄性不稔性はミトコンドリアゲノム上の遺伝子によって誘起される。その一方で、多くの場合核内にこの雄性不稔に対する稔性回復遺伝子が存在し、雄性不稔が表現型として最終的に発現するかどうかは、ミトコンドリアの遺伝子と核の稔性回復遺伝子の相互作用によって決定される。

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

このような視点から、我々は世界の栽培・野生ダイコンについて、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子とそれに対する核の稔性回復遺伝子の分布と遺伝的変異を調査してきた。その結果、今日までに世界の栽培ダイコンがいくつかの野生ダイコンから多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出し、タイプの異なる雄性不稔系統を2系統得た。これらを用いてキャベツ類の実用的な雄性不稔系統の開発を進めるとともに、雄性不稔のメカニズムを明らかにしようとした。

3) 細胞質置換によるダイコンとナスの雄性不稔の開発

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

2. 本年度の研究成果

1) ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の分布

現在我国において、ダイコンの実際栽培に用いられているF₁品種について、オグラ型雄性不稔遺伝子の有無とそのタイプならびに稔性回復遺伝子の分布を調査した。オグラ型雄性不稔遺伝子(*orf138*)については、*orf138*を持つ品種が多数見出され、とりわけAタイプの*orf138*を持つものが大部分を占めた。このことは、今日の我が国のダイコン育種においては、特定の雄性不稔細胞質に依拠したF₁育種が主流となっていることを示す。その一方で、一部の品種に我国の栽培・野生ダイコンでは見出されていなかったHタイプの*orf138*が存在することが明らかになった。

オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子としては、*orf138*の翻訳を抑制する*orf687*と、転写産物を修飾する*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 BC₆ 世代に達した。この世代における各個体の花粉稔性、ミトコンドリアゲノムの構造ならびにミトコンドリア遺伝子の発現を詳しく調べた。

BC₆ 世代では系統内で可稔個体と不稔個体の分離が観察された。その一方で、これらの個体はいずれも同一のミトコンドリアゲノムの構造を有しており、体細胞雑種に生じたミトコンドリアゲノムの組換えは安定して後代に伝達されていた。このため BC₆ 世代における花粉稔性の分離は未知の稔性回復遺伝子が関与した結果であると推定された。

BC₆ 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、BC₈ 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、BC₉ 世代、BC₁₀ 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、BC₁₀ 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。BC₈ 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、BC₁₀ 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。また、今までの研究でナスの雄性不稔の原因遺伝子と考えられているミトコンドリアの *orf218* について、Mito-TALEN 法を用いて、原因遺伝子であることを証明する研究に着手した。

4) ダイコンの DCGMS 型雄性不稔遺伝子 (*orf463*) の分布と機能

前述のとおり、アブラナ科作物の育種ではオグラ型 CMS が広く用いられている。しかし、ヨーロッパ、中国、韓国等我が国以外のダイコンには、この CMS に対する稔性回復遺伝子を持つ品種が多く存在する。このためこれらの国ではオグラ型 CMS の実用化は難しい。そこで韓国のグループは、オグラ型とは異なる雄性不稔細胞質を世界中のダイコンで探索し、その結果 DCGMS 型雄性不稔を見出した。さらに、この細胞質の全ミトコンドリアゲノムの塩基配列の解析から、DCGMS 型雄性不稔の原因遺伝子が *orf463* であると同定した。

我々がダイコンの数品種のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した結果から、‘クロダイコン’と呼ばれる一群の栽培品種に、この *orf463* が集中的に存在することが見出された (Yamagishi et al. 2019)。さらに、実際にこれらの‘クロダイコン’の品種の後代に雄性不稔個体が出現することを確めた。一方、*orf463* はダイコン属野生種の *Raphanus raphanistrum* の 1 系統 (RS-5) にも存在することが観察されたが、この系統の *orf463* は、‘クロダイコン’のそれと比較して、9 か所の塩基置換を有していた。

そこで本年度は、‘RS-5’の細胞質が実際に雄性不稔を誘起するかどうかを、交雑実験によって確かめた。‘RS-5’を母本として、オグラ型 CMS の維持系統である‘打木源助’を交雑して F₂ を得たところ、F₂ 集団の中に雄性不稔個体が出現した。また、この集団の中には、同一個体内で個々の花によって、可稔のものと不稔のものの両方が観察される、不安定な雄性不稔個体が含まれていた。さらに F₂ 集団中に、根の表面が黒色になる‘クロダイコン’の特性を示す個体が観察された。これらのことから、‘RS-5’は DCGMS 型雄性不稔を誘起する *orf463* を有すること、および‘クロダイコン’と呼ばれる一群の栽培品種は、*orf463* を持つ野生ダイコンから起源したことが示された。

3. Research projects and annual reports

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

1) Ogura CMS and its fertility restoring genes.

Ogura CMS found in a Japanese radish is the most important one in Cruciferous plants, being used worldwide. We have been studying the distributions and differentiations of Ogura CMS gene, *orf138*. Whereas, we found that various wild and cultivated radishes possess fertility restoring genes for Ogura CMS. Hitherto, two fertility restoring genes were known. One is *orf687* in a Chinese variety, and another is *Rft* distributed in Japanese wild radishes. We observed that a European radish cultivar has a fertility restoring gene different from both of *orf687* and *Rft*. We examined the distribution of *orf138* and its type in F₁ varieties cultivated in Japan. We also studied the differentiation of fertility restoring genes in radish.

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

We obtained somatic hybrids showing male sterility between *Arabidopsis thaliana* and cabbage varieties (*Brassica oleracea*). Progenies of the somatic hybrids were produced by successive back-crosses with *B. oleracea*. So far, the pollen fertility was investigated in the BC₆ progenies. The BC₆ progenies were segregated into completely male sterile plants and partially fertile plants. However, all the BC₆ progeny plants had the identical structure of mitochondrial genome. By further back-crosses, BC₈ generation was fixed to be male sterile without anthers and petals. This type of sterility was also observed in all the plants of BC₉ and BC₁₀ 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

Yamagishi, H., Hashimoto, A., Fukunaga, A. and Terachi, T. Appearance of male sterile and black radishes in the progeny of cross

between *Raphanus raphanistrum* and *Raphanus sativus*. *Breeding Science* 70: 637-641. 2020

Yamagishi, H., Jikuya, M., Okushiro, K., Hashimoto, A., Fukunaga, A., Takenaka, M. and Terachi, T. A single nucleotide substitution in the coding region of Ogura male sterile gene, *orf138*, determines effectiveness of a fertility restorer gene, *Rfo*, in radish. *Molecular Genetics and Genomics* (In press). 2021

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種とその後代の特性

山岸 博. 2020.

京都産業大学先端科学技術研究所所報 19: 1-10.

総合生命科学部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, 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, 軸屋 恵, 奥城 佳奈子, 橋本 絢子, 福永 明日美, 竹中瑞樹, 寺地 徹「オグラ型雄性不稔の回復遺伝子がコードするORF687は、*orf138*mRNAのコード領域に結合して翻訳を妨げる」日本育種学会第138回講演会, 2020.10.10(オンライン開催)

山岸 博, 橋本 絢子, 中村 天音, 森田 佳奈, 寺地 徹「ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔遺伝子(*orf138*)における塩基置換と稔性回復遺伝子の効果」日本育種学会第139回講演会 2021.3.20(オンライン開催)

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

2) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(c)

Brassica 属作物におけるUの三角形の現代的再構築
研究代表者: 山岸 博(2019年~2021年)



膜エネルギー代謝分野

Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism



教授 横山 謙
Prof. Ken Yokoyama, Ph.D

1. 研究概要

生命の維持にはエネルギーが必要であり、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/A-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、真核生物の V-ATPase の先祖と考えられるバクテリア由来の V-ATPase (V/A-ATPase)

を研究材料として用い、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、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。また、ATP 合成酵素 F_0F_1 についても、構造解析を進めており、ATP の合成・分解と回転という運動間のエネルギー変換機構の解明を目指している。

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/A-ATPase の動的構造解析

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一つである。

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。しかし、その真価は、働いている最中のタンパク質を瞬間凍結した構造を決定できる点にある。多くの結晶構造が、結晶化条件に縛られ、阻害剤で安定化した構造になっている。一方、クライオ電顕による単粒子解析では、基質存在下でのタンパク質の姿をスナップショットのように捉えることが可能である。今回、大阪大学の電顕サイトで V-ATPase の凍結グリッドを作成し、東京大学にある電顕サイトおよび大阪大学タンパク質研究所の電顕サイトに凍結グリッドを持ち込み撮影し、そのデータを本学で解析した。溶液条件を変えたクライオグリッドから合計 5 万枚以上の電子顕微鏡画像を撮影し、それぞれの溶液条件での構造を解析した。もっとも分解能のよいものは、フーリエシリアル相関 0.143 で分解能 2.6 Å であり、ヌクレオチド結合部位にある ATP の立体配置をはっきりと特定することができた。

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。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。これらの研究成果を BBA bioenergetics に掲載した。さらに、これらの標的が呼吸鎖複合体 I であることが MASC アッセイから示唆された。また、複数の抗がん剤も複合体 I の活性を阻害することが示唆された。現在、呼吸鎖複合体 I の阻害と麻酔作用、抗癌作用との関連、および阻害機構の構造基盤の解明に向けた生化学実験を行っている。

3) ATP 動態に関わるタンパク質の発現・精製系の構築

今年度は、ATP チャネルタンパク質の発現系構築を試みた。この研究は、学振 PD である津山泰一氏が中心とな行われた。GFP を N 末端に融合させた ATP チャネルタンパク質の遺伝子を発現ベクターに組み込み、HEK293 フリースタイルにトランスフェクションした。トランスフェクション用の試薬、投入する DNA 量、トランスフェクション後の培養時間を検討した結果、細胞の蛍光が観察され、導入した遺伝子からの発現が確認さ

れた。細胞を破碎し、タグ精製したところ、SDS-PAGE でメジャーバンドにみえる程度まで精製度をあげることができた。負染色による電顕画像からは、目的のタンパク質と思われる複合体構造が観察された。クライオグリッド作成には、十分と言えない収量なので、培養細胞や発現ベクターを検討して、さらに発現・精製量を増やす。良好なクライオグリッドができれば、構造解析に入る。

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 2020

1) Snapshot analysis 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 V1 part of V-ATPase at atomic resolution using Titan Krios (FEI), which is equipped with an automated imaging system at Osaka University.

A total of more than 50,000 electron microscopy images were obtained from the cryo-grid under different solution conditions, and the structures under each solution condition were determined. The best-resolved image showed atomic resolution structures at ~ 2.6 Å. The structure of ATP in the nucleotide binding site could be clearly identified.

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 pharmacological and genetic studies have shown that reducing the activity of the respiratory chain complex increases the lifespan of *C. elegans*. Therefore, we used the MASC assay to search for inhibitors of mitochondrial ATP synthesis among 2500 existing drugs, and examined whether they affect the lifespan of *C. elegans*. As a result, we found 8 inhibitors of ATP synthesis from among 2500 existing drugs in mammalian cells. By measuring lifespan, they found that the eight ATP synthesis inhibitors increased the lifespan of *C. elegans*. These research results were published in *BBA bioenergetics*. Furthermore, MASC assay suggested that these targets are respiratory chain complex I. It was also suggested that several anticancer drugs also inhibit the activity of complex I. We currently carry out a couple of biochemical experiments to elucidate the relationship between inhibition of respiratory chain complex I and anesthetic and anticancer effects, as well as the structural basis of the inhibition mechanism.

3) Construction of an expression and purification system for proteins involved in ATP dynamics

This year, we attempted to construct an expression system for ATP channel proteins. The gene of ATP channel protein fused

with GFP at the N-terminus was incorporated into the expression vector and transfected into HEK293 freestyle. After examining the reagents for transfection, the amount of DNA input, and the incubation time after transfection, the fluorescence of the cells was observed, confirming the expression from the introduced gene. The expressed proteins were partially purified through introduced tag into the proteins, and it appeared as a major band in SDS-PAGE. The negative stained electron microscopy images showed the complex structure of the target protein. Since the yield is not sufficient for the preparation of cryo-grids, we will try to increase the amount of expression and purification. Once we have a good cryo-grid, we will start structural analysis using CryoEM.

4. 発表、著書など

1. **Mechanical inhibition of isolated V_o from V/A-ATPase for proton conductance.** Kishikawa J, Nakanishi A, Furuta A, Tamakoshi M, Mitsuoka K, and *Yokoyama K. (2020) *Elife* e56862
2. **Identification of chemical compounds as an inhibitor of mitochondrial ATP synthesis, leading to an increased stress resistance and an extended lifespan in *C. elegans*.** Ikeda T, Kishikawa J, Hayashida Y, Fujikawa M, Yokoyama K. (2020) *Biocim Biophys Acta Bioenerg* 2020 Nov 1;1861(11):148281.

5. 学会発表など

学会発表

1. 佐伯詩織、中西温子、横山謙 “結核菌 FoF1 の発現・精製系の構築” 第46回日本生体エネルギー研究会討論会 金沢市 12/2020 ポスター発表
2. 中野敦樹、佐伯詩織、中西温子、岸川淳一、横山謙 “好熱菌 V 型 ATP 合成酵素の ATP 加水分解待ち構造の解析” 第46回日本生体エネルギー研究会討論会 金沢市 12/2020 口頭発表

6. その他特記事項

- 1) 外部資金
 1. 科学研究補助金 基盤研究 B
課題名：クライオ電子顕微鏡による V 型 ATPase の回転機構の解明 研究代表者：横山 謙 取得年度 R2-R4 (3年)
2. 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

中野敦樹（修士1年生）さんが次世代若手共同研究 拠点卓越学生研究員に選出された。

5) その他

科学研究費審査委員

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、高橋
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
創薬医療ビジネス	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

生命文化化学研究室

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、ゲノム医療や再生医療に焦点を当て、各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) 日本再生医療学会総会ジュニアセッションの教育効果について

日本再生医療学会総会のジュニアセッションの企画運営を、2018年より茨城大学の石原研二教授と共同で担当している。今年度は、これまでに参加した中学生や高校生を対象に行った質問紙調査の結果から本ジュニアセッションの教育効果について解析した。このジュニアセッションでは、参加者(中学・高校生)に事前に「幹細胞／再生医療研究+○○○○=□□□□の実現」という課題を与え、学会当日は、各チームで討論してきた○○○○と□□□□に対する回答を発表し、参加者や学会員と意見交換をするという企画である。この企画では、特

に実験結果や自分たちの考えの実現可能性を示すことを求めるのではなく、幹細胞研究の延長線上で、将来どんな研究に取り組みたいか、自分たちが解決したい課題は何かということ、中学生や高校生に自由に考えてもらい、チームで意見をまとめて学会員の前でプレゼンテーションすることを求める内容である。

質問紙調査の結果から、本ジュニアセッションでは、参加した生徒が再生医療の知識的側面を学ぶだけではなく、コミュニケーション力、表現力や協調性などを学ぶ機会となったことが示唆された。これらは次期学習指導要領で整理されている①知識及び技能、②思考力、判断力、表現力等、③学びに向かう力、人間性等、といった子供たちが身につける育成を目指す資質・能力にも重なる。

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) Analysis of educational effects of junior sessions at the Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine

Since 2018, we have been in charge of planning and managing junior sessions for junior/high school students at the Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine. This year, we analyzed the educational effects of these junior sessions from the questionnaire survey on these participants. From this result, it was suggested that the participants had an opportunity not only to learn the knowledge of regenerative medicine but also to learn communication ability, expressiveness, and cooperation.

4. 論文・著書など

なし

5. 学会発表など

川上雅弘, 石原研治: 日本再生医療学会総会ジュニアセッションでの主体的・対話的で深い学びをめざす試み. 日本科学教育学会第44回年会, オンライン, 2020.8.25-27

安積典子, 川上雅弘, 山内保典, 仲矢史雄, 萩原憲二, 秋吉博之, 生田享介, 岡崎純子, 種田将嗣, 辻岡強, 中田博保, 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—受講者はどこで間違えるのか? 日本科学教育学会第44回年会, オンライン, 2020.8.25-27

川上雅弘, 鈴木一史, 石原研治: 日本再生医療学会総会「中高生のためのセッション」の狙い. 第20回日本再生医療学会総会, オンライン, 2021.3.11-13



2021年3月の居室(5K108), 記録として

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-R2年(4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)

科学研究費補助金・基盤(C)

課題名: 理科を専攻しない学生の文脈を重視した、小学校教員養成のための理科教科書の開発

研究分担者: 川上雅弘, 取得年度: R2-4年(3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: 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 感染症研究開発 ELSI プログラム プログラムオフィサー

石原研治, 川上雅弘, 鈴木一史: 第20回日本再生医療学会総会 中高生のためのセッション 企画・担当

4) 受賞等 なし

5) その他

川上雅弘: 2020年度大庄市民大学(第2回)「iPS細胞とはなにか? ~再生医療の未来を考える~」講師, 大庄南生涯学習プラザ, 2020.9.17

川上雅弘: 生命科学部 生命科学セミナー「生命科学と社会をむすぶ科学コミュニケーション」, 学内オンライン, 2020.10.30

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

R. aquatica の水没応答機構を明らかにするために、水没時のRNA-seq解析を行ったところ、葉の形態形成に関わる遺伝子群に加えて、植物ホルモンのエチレン関係の遺伝子群の発現が変動していた。実際、エチレンを添加すると、葉の形態が水中葉に近くなった。そこで、エチレンで処理した気中葉のRNA-seq解析を行ったところ、葉の形態形成



図1 *Rorippa aquatica*

左: 陸上の形態 右: 水中の形態

に関わる遺伝子群の発現が変動した。以上のことから、エチレンの蓄積が水没応答に関わっているものと考えられた。水没時には光環境が変化するため、光質が葉の形態に与える影響を調べたところ、*R. aquatica* では青色光の照射により水中葉の形成が抑制されることがわかった。実際、以上の結果から、エチレン応答や青色光受容に関わる経路が葉の形態形成を制御していることが明らかとなった。

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*, which naturally undergoes vegetative propagation via regeneration from leaf fragments.

This year we performed RNA-seq analysis upon submergence to clarify the mechanism of submergence response of *R. aquatica*. The results showed that the expression of a group of genes related to the phytohormone ethylene are changed in addition to a group of genes involved in leaf morphogenesis. When ethylene was applied to shoot apex of *R. aquatica*, the leaf shape became closer to that of submerged leaves. The results of RNA-seq analysis of ethylene-treated aerial leaves showed that the expression of a group of genes related to leaf morphogenesis was altered. These results suggest that ethylene accumulation is involved in the submergence response. Since the light environment changes during submergence, next we examined the effect of light quality on leaf morphology and found that blue light irradiation suppressed the formation of submerged leaves in *R. aquatica*. These results indicate that pathways involved in ethylene response and blue light reception regulate leaf morphogenesis in *R. aquatica*.

4. 論文, 著書など

Ayaka Shimoki, Satoru Tsugawa, Keiichiro Ohashi, Masahito Toda, Akiteru Maeno, Tomoaki Sakamoto, [Seisuke Kimura](#), Takashi Nobusawa, Mika Nagao, Eiji Nitasaka, Taku Demura, Kiyotaka Okada, Seiji Takeda: Reduction in organ-organ friction is critical for corolla elongation in morning glory. *Communications Biology* 4: 285 (2021)

木村成介、渡邊拓巳、小名木陽子、高橋さおり、種村剛: 多様な視点からトランスサイエンスについて考えるサイエンスイベントの設計と実践:「どちらにしようかな? : 未来のお肉から考えるトランスサイエンス」の事例報告. *科学技術コミュニケーション* 28:11-27 (2020)

坂本智昭、木村成介、*Rorippa aquatica*染色体レベルゲノムアセンブリデータベースの構築: *京都産業大学総合学術研究所報* 15: 1-10 (2020)

木村成介、金子貴一、本橋健、河邊昭、生態進化発生学研究センター活動報告: *京都産業大学総合学術研究所報* 15: 217-232 (2020)

Rumi Amano, Risa Momoi, Emi Omata, Taiga Nakahara, Kaori Kaminoyama, Mikiko Kojima, Yumiko Takebayashi, Shuka Ikematsu, Yuki Okegawa, Tomoaki Sakamoto, Hiroyuki Kasahara, Hitoshi Sakakibara, Ken Motohashi, [Seisuke Kimura](#): Molecular and biochemical differences in leaf explants and the implication for regeneration ability in *Rorippa aquatica* (Brassicaceae) *Plants* 9: 1371 (2020)

天野瑠美、木村成介:「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. *自動車技術* 74:110-111 (2020)

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* 103:321-340 (2020)

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* 133:419-428 (2020)

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 (2020)

Tomoko Hirano, [Seisuke Kimura](#), Tomoaki Sakamoto, Ayaka Okamoto, Takumi Nakayama, Takakazu Matsuura, Yoko Ikeda, Seiji Takeda, Yoshihito Suzuki, Issei Ohshima, Masa H. Sato: Reprograming of the developmental program of *Rhus javanica* during initial stage of gall induction by *Schlechtendalia chinensis*. *Frontiers in Plant Science* 11: 471-1-13 (2020)

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* 182: 1979-1990 (2020)

5. 学会発表など

SOG1 homologues regulate DNA-damage response in *Physcomitrella patens*, Ayako Sakamoto, Tomoaki Sakamoto, Yuichiro Yokota, Mika Teranishi, Seisuke Kimura, 第62回日本植物生理学会年会、オンライン、島根大学松江キャンパス(島根松江市)、2021.3.14-16

ゼニゴケにおける DNA 損傷機構、愿山(岡本) 郁、坂本智昭、
木村成介、日出間純、第 62 回日本植物生理学会年会、オン
ライン、島根大学松江キャンパス(島根松江市)、
2021.3.14-16

イネの花粉成熟・タペート細胞のプログラム細胞死におけるオ
ートファジー・ROS 生成酵素 Rboh の役割、小川和准、澤田
隼平、福永任吾、花俣繁、橋本研志、小野聖二郎、野々村
賢一、木村成介、来須孝光、朽津和幸、第 62 回日本植物
生理学会年会、オンライン、島根大学松江キャンパス(島根
松江市)、2021.3.14-16

Insect gall formation requires switching from source to sink
organs, Seiji Takeda, Makiko Yoza, Taisuke Amano,
Issei Ohshima, Tomoko Hiarno, Masa H. Sato, Tomoaki
Sakamoto, and Seisuke Kimura, The 1st International
Conference on Sustainable Agriculture and Aquaculture,
Prince of Songkla University, Thailand, 2021.1.11-12

細胞脱落における細胞外小胞の形成、達富 一湖、吉良 彰
人、服部 和泉、村田 真智子、木村成介、川根 公樹、
第 43 回日本分子生物学会、オンライン、2020.12.2-4

Theoretical model for leaf-shape variation in heterophyllous
lake cress, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J. Suematsu,
Seisuke Kimura, 発生生物学会 online trila meeting 2020,
オンライン、2020.9.24-25

イネの花粉成熟・種子登熟におけるオートファジーの役割とそ
の制御機構、小川和准、福永任吾、澤田隼平、瀬良ゆり、
花俣繁、小野聖二郎、野々村賢一、木村成介、橋本研志、
来須孝光、朽津和幸、日本植物学会第 84 回大会、オンラ
イン、2020.9.19-21

全ゲノム比較による *Rorippa aquatica* の倍数性起源解析、坂本
智昭、木村成介、日本植物学会第 84 回大会、オンライン、
2020.9.19-21

アブラナ科水陸両生植物 *Rorippa aquatica* の光による水没認
識と気孔形成抑制のメカニズム、池松朱夏、馬瀬樹志、中
山壯大、坂本智昭、木村成介、日本植物学会第 84 回大会、
オンライン、2020.9.19-21

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、天野瑠
美、桃井理沙、小俣恵美、中原大河、上ノ山華織、小島美
紀子、池松朱夏、桶川友季、坂本智昭、榊原均、本橋健、
木村成介、日本植物学会第 84 回大会、オンライン、
2020.9.19-21

6. その他特記事項

- 1) 外部資金 なし
- 2) 知財権等

【発明の名称】植物幹細胞誘導作用及び植物病虫害抵抗性
誘導作用を有するペプチド

【発明者】平野朋子、佐藤雅彦、大島一正、木村成介

【出願番号】2020-156361

- 3) 学外活動

Editorial Board Member, Journal of Plant Research

- 4) 受賞等 なし
- 5) その他

木村成介 京都産業大学 RI 実験施設 放射線取扱主任者



嵯峨野での生き物調査の様子



卒業研究発表会の様子



卒業式の様子

発生情報ラボ

Laboratory of Cell Signaling and Development

1. 研究概要

わたしたち発生情報ラボの大きな目標は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵細胞ライフサイクルの全貌解明である。ここでいう卵細胞ライフサイクルには、卵細胞形成 (oogenesis)、卵成熟と排卵 (oocyte maturation and ovulation)、受精と発生の活性化 (fertilization and activation of development)、アポトーシスあるいはオーヴァーアクチベーションによる卵細胞の死 (egg apoptosis or overactivation) といった諸現象が含まれる。これら卵細胞ライフサイクルの諸現象の全貌解明に取り組むにあたっての1番のキーワードは、Src (サーク) 遺伝子である。Src 遺伝子はラウス肉腫ウイルス (Rous Sarcoma Virus) がもつ発がん遺伝子として発見され、その後、ニワ

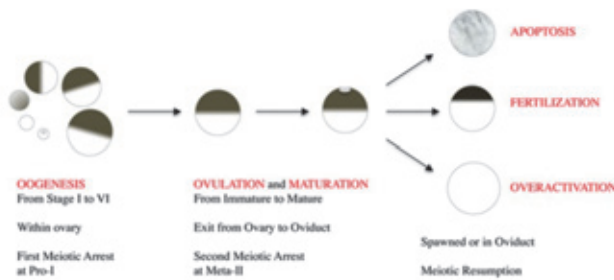


図1：アフリカツメガエル卵細胞ライフサイクルの概要

トリやマウス、そしてカエルやヒトなどの脊椎動物をはじめとする事実上全ての多細胞生物 (動物) のゲノムにも存在することが明らかとなった。このことから Src 遺伝子に関する研究には大きく2つの方向性があり、1つはその発がん機構に関する研究という方向性、もう1つはその正常細胞における機能に関する研究という方向性である。わたしたちはこれまでに、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵細胞内に存在する Src 遺伝子産物 (すなわち Src タンパク質: チロシン特異的タンパク質リン酸化酵素) が、受精時に速やかに活性化し、発生の活性化 (egg activation) に必須不可欠な細胞内カルシウム

教授 佐藤 賢一

Prof. Ken-ichi SATO, Ph. D.

助教 トクマコフ アレクサンデル

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

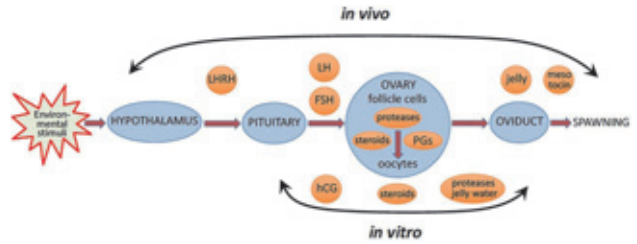
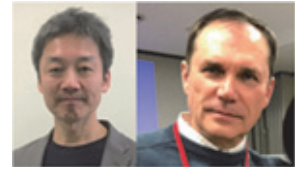


図2：アフリカツメガエル卵細胞の in vivo および in vitro における成熟と排卵の概要

濃度の一時的上昇のトリガーとしてはたらくことを見出した。さらに、卵細胞膜に存在する1回膜貫通型タンパク質ウロプラキシン III (UPIII) が精子受容体として機能し、受精に伴う細胞内 Src 活性化のトリガーとしてはたらくことを見出した。この UPIII-Src システムが受精およびそれ以外の卵細胞ライフサイクル諸現象においてどのような働きをもつのか、ということのリサーチクエストの1つに掲げ、研究活動を行なっている。

2. 本年度の研究成果

アフリカツメガエル卵が成熟し受精可能な状態になると (未受精卵あるいは成熟卵母細胞という)、アポトーシスによる細胞死が実行可能となることがわかっている。すなわち、未受精卵に精子を与えずに12時間以上放置すると細胞内のタンパク質分解酵素カスパーゼ 3/7 が活性化し、やがて細胞表面の色素分布の変化 (細胞内カルシウム濃度の病理学的な上昇)、細胞内 ATP やタンパク質の減少 (エネルギー代謝系の破綻)、さらには細胞全体の容量増加 (細胞膜恒常性の破綻) といった生化学的・細胞学的な死の兆候を3~4日かかりでたどる。本年度、この未受精卵アポトーシスの実行に伴い ATP が細胞外に漏出していることを見出し、先に述べた細胞内 ATP 減少の1機構である可能性が示唆された。さらにこの現象に関与する可能性がある分子として ATP 特異的チャネルであるパネキシン 1 (PANX1) に注目した解析を行い、同分子が未成熟卵母細胞 (卵巣内にある卵母細胞) の細胞膜に存在することをショ糖密度

勾配超遠心分離法と免疫ブロットリング法によって見出すことができた。現在、この卵母細胞 PANX1 が卵成熟と受精、あるいはアポトーシスの過程でどのような動態（発現量とタンパク質の状態：カスパーゼによる切断の有無）を示すのか、PANX1 阻害剤として知られている carbenoxolone の未受精卵アポトーシスへの影響などについて検証している。

3. Research projects and annual reports

The main goal of our laboratory is to elucidate the entire life cycle of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) egg. The oocyte life cycle includes oogenesis, oocyte maturation and ovulation, fertilization and activation of development, death of the oocyte (apoptosis or over-activation), and ovulation. These phenomena include oocyte maturation and ovulation, fertilization and activation of development, and oocyte death (egg apoptosis or over-activation).

One of the most important key words in understanding all of these phenomena of the egg cell life cycle is the Src gene. The Src gene was first discovered as an oncogene in the Rous Sarcoma Virus, and was later found to be present in the genomes of virtually all multicellular organisms (animals), including chickens, mice, frogs, humans, and other vertebrates. Therefore, there are two major directions for research on the Src gene: one is to study its carcinogenic mechanism, and the other is to study its function in normal cells.

We have shown that the Src gene product (i.e., Src protein: a tyrosine-specific protein kinase) in *Xenopus laevis* oocytes is rapidly activated at fertilization and acts as a trigger for a temporary increase in intracellular calcium concentration, which is essential for egg activation. Furthermore, we found that uroplakin III (UPIII), a single transmembrane protein present in the egg cell membrane, functions as a sperm receptor and triggers intracellular Src activation upon fertilization. Our research question is how the UPIII-Src system functions in fertilization and other phenomena of the egg cell life cycle.

When the African clawed frog egg is mature and ready for fertilization (unfertilized egg or mature oocyte), cell death by apoptosis becomes feasible. In other words, if unfertilized eggs are left without sperm for more than about 12 hours, the intracellular proteolytic enzyme caspase 3/7 is activated, which eventually leads to

changes in the distribution of pigment on the cell surface (pathological increase in intracellular calcium concentration), a decrease in intracellular ATP and protein (disruption of the energy metabolism system), and even an increase in the capacity of the entire cell (disruption of cell membrane homeostasis). In this year, we found that ATP leaks out of the cell as unfertilized eggs undergo apoptosis, suggesting that this may be one of the mechanisms of intracellular ATP reduction described above. Furthermore, we focused on the ATP-specific channel pannexin 1 (PANX1) as a molecule that may be involved in this phenomenon, and found that PANX1 is present in the plasma membrane of immature oocytes (oocytes in the ovary) by sucrose density gradient ultracentrifugation and immunoblotting. We are now examining the dynamics (expression level and protein state: presence or absence of cleavage by caspases) of PANX1 in oocytes during egg maturation, fertilization, and apoptosis, and the effect of carbenoxolone, a known PANX1 inhibitor, on unfertilized egg apoptosis.

4. 論文, 著書など

- A.A. Tokmakov, V.E. Stefanov, K. Sato (2020) Dissection of the ovulatory process using ex vivo approaches. *Front Cell Dev Biol.* Dec 9;8:605379. doi: 10.3389/fcell.2020.605379. eCollection 2020. PMID: 33363163 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33363163/>
- K. Sato, A.A. Tokmakov (2020) Towards the understanding of biology of oocyte life cycle in *Xenopus laevis*: no oocytes left behind. *Reprod Med Biol.* Jan 20;19(2):114-119. doi: 10.1002/rmb2.12314. eCollection 2020 Apr. PMID: 32273815 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32273815/>
- 佐藤 賢一、白藤 康成 (2020) 学習到達度ルーブリック自己評価と成績評価の分析および考察：生命科学部初年次必修2科目におけるケーススタディ. 高等教育フォーラム 11, 27-41. https://ksu.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=10577&item_no=1&page_id=13&block_id=21

佐藤 賢一 (2021) サマースクールで超学際的手法と戦略的な問いづくりを学ぶ. 近藤 康久、大西 秀之 <編> 環境問題を解く ひらかれた協働研究のすすめ (かもがわ出版、分担執筆) 152-165. .

5. 学会発表など

佐藤 賢一 (2020) 主体的な学びを支援する問いづくり.
学研・進学情報8月号 (インタビュー記事)

佐藤 賢一 (2021) 全学共通初年次科目ハテナソンセ
ミナーの設計、運営および学習成果. 京都大学 大学
教育研究フォーラム (口頭発表)

<http://www.highedu.kyoto-u.ac.jp/forum/kanri/forum/pdf/20210402044442.pdf>

6. その他特記事項

1) 外部資金 該当なし

2) 知財権等 該当なし

3) 学外活動 佐藤 賢一: Associate editor

(Frontiers in Cell and Developmental Biology)

<https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/sections/molecular-and-cellular-reproduction#editorial-board>、公益財団法人大学基準協会

大学評価委員会 幹事、公益財団法人大学コンソー
シアム京大連携推進室 室員、神戸大学バイオソ
シナル総合研究センター共同利用・共同研究公募専
門委員会 委員、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

4) 受賞等 該当なし

5) その他

中学・高校授業: 箕面市立第二中学校、京都府立西
城陽高等学校、愛知県立岡崎西高等学校、広島市立
舟入高等学校、鳥取県立八頭高等学校、神奈川県立
神奈川総合高等学校。

教員研修: 広島市立舟入高等学校、大学コンソーシ
アム京都 高校教員交流会 (計2回)、鳥取県立八頭
高等学校、滋賀県総合教育センター、広島県立高陽
東高等学校 (計2回)、大学コンソーシアム京都 高
大連携フォーラム分科会。

企業研修: SDGs を自分ごと化し、企業戦略策定につ
なぐ (計5回)、GPSS ホールディングス株式会社セミ
ナー。

一般向けワークショップ: オンライン GW ハテナソン、オ
ンライン 夏の朝イチ ハテナソン、「13 歳からのアート
思考」を読み、対話する 週末の夜な夜なハテナソン、

ハテナソン・ファシリテータ養成講座 (計3回)、夜な夜
なハテナソン (4回)。

研究室ホームページ:

https://peraichi.com/landing_pages/view/ksusatolabsincc2007

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ゴミ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、について昨年度に引き続き分析を行った。

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、既往研究より、海外における給食残滓の活用事例を収集し、その中で堆肥化がどのような位置を占めており、どのような課題を有しているかについて整理を行った。

保護者の堆肥化への参画意欲の促進可能性については、昨年度実施した保育園における記入回答式紙面アンケート調査をもとに因子分析を実施する中で、保護者らの堆肥化への参画意欲を規定する要因が、日常生活における環境行動などから想定されるグループによって異なる可能性があることを明らかにした。



図 小学生を対象にした環境教育ツアー実施の様子

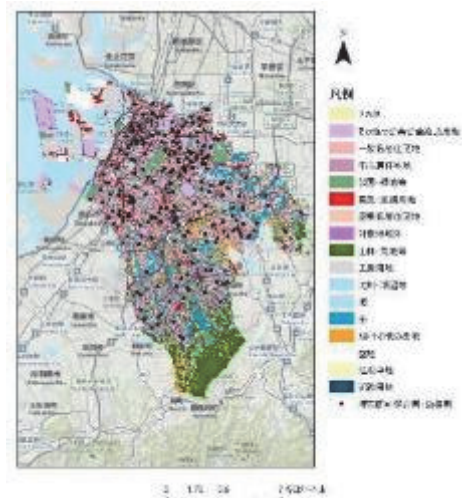


図 堺市内の土地利用と保育園等の分布

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の GIS 解析では、保育園における幼児数や、給食の実施状況、現地での調理実施の有無など把握し、ともすると過大評価になりがちな削減期待量について、より現実的な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。

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、文部科学省のタイプ分けによる「地域貢献タイプ」の地方大学において、大学敷地内の里山を事例に、地域の自然環境と生物多様性をテーマとした特別授業・フィールドツアーの企画・運営を実践してきた。そのプロセスから、今後、地方大学が求められる地域連携の一方策としての、大学敷地を活用したフィールド体験による環境教育活動の可能性と配慮すべき内容について整理した。今後も、引き続き小学校との連携を行い、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 showed that the amount of food loss and oversupply discharged from nursery school meals was much higher than that of plate waste. Plate waste reduction was acceptable to nursery staffs, due to its other educational goals, such as food education. However, they were not able to reduce food loss without disturbing childcare, thereby difficult to maintain their motivation. Although the composting activity of food waste as environmental education in nursery schools could contribute to the reduction of composting of plate waste, it was expected that the effect on resource recycling would be limited. Measures against food loss and oversupply are also important, but these should be solved not only by environmental education activities or the efforts of nursery schools and children themselves, but also by institutional measures for supports.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

三瓶由紀・原祐二: 地方大学における敷地を活用した環境教育による地域貢献の可能性. 2020年度日本造園学会関西支部大会, 淡路市, 2020.10.24-25

大場悠暉、山本祐吾、吉田登、原祐二、三瓶由紀: 保全優先度の高い棚田を選定するモデルの構築と事例分析. 2020年度日本造園学会関西支部大会, 淡路市, 2020.10.24-25

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名: 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。

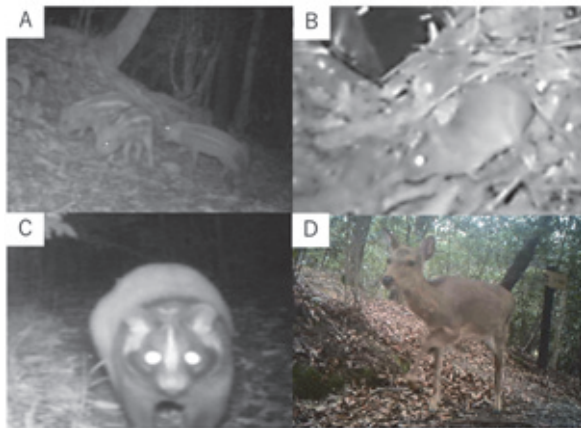


図. 調査地において撮影された野生動物。A. イノシシ B. ネズミ C. ハクビシン D. シカ

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、ヒトと動物の双方に寄生することから、さまざまな人獣共通感染症の病原体を媒介する可能性がある。国内においては、マダニ媒介性の *Rickettsia japonica* による日本紅斑熱の発生の増加が危惧されている。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を実施した。コロナ禍の影響により、学生の参加が制限された時期などがあり、採取したマダニの解析や撮影された野生動物の解析は、実施できなかった。また、シャーマントラップを利用した小

准教授 染谷 梓

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



型野生動物の捕獲調査も実施できなかった。

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。当研究室では、近年生息数の増加が問題となっているハクビシンからバルトネラを分離した。バルトネラはネコひっかき病などの人獣共通感染症を引き起こす細菌で、ノミなどの媒介によりヒトに感染する。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。今年度は、これらの分離株について、塩基配列解析を実施した。その結果、ハクビシンから分離されたバルトネラは、ヒトやネコから分離されたバルトネラと高い相同性を示すことが明らかとなった。したがって、ハクビシンが保有しているバルトネラが、ヒトや伴侶動物に感染する可能性が示唆された。ハクビシンが保有するバルトネラの、野生動物やヒトにおける病原性については未知であるため、今後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。

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。そこで当研究室では、食肉検査を実施する現場における薬剤耐性菌の現状を把握するため、食肉検査場の環境中から大腸菌を分離し、薬剤感受性の調査を継続して実施している。分離した薬剤耐性菌の耐性が他の大腸菌に伝播することが明らかとなったため、今年度は、耐性の伝播に関与するプラスミドのレプリコンタイピングを実施した。

3. Research projects and annual reports

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

Arthropods can transmit zoonotic pathogens such as spotted fever group rickettsiae. *Rickettsia japonica*, the etiological agent of Japanese spotted fever is also associated with arthropod vector, mainly ticks. Therefore, the prevalence of ticks in Kyoto was investigated. Ticks

were collected weekly by flagging method and rickettsial DNA was detected by PCR. The rate of rickettsial infection depended on tick species.

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

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

なし

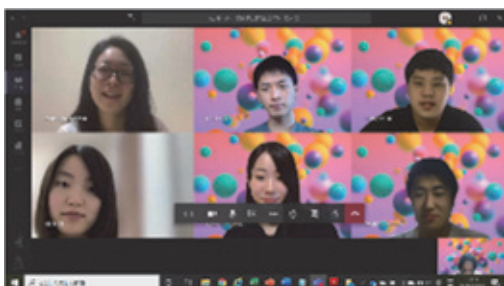
6. その他特記事項

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



研究室のミーティングもオンラインでした



農牧場研修

植物分子遺伝学研究室

Laboratory of Plant Molecular Genetics

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr.



1. 研究概要

当研究室では、工学部生物工学科時代に遡る 30 年以上前から、「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(現、植物科学研究センター)に引き継いだものであるが、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がある。特に上記2)のプロジェクトの課題は、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月までコロナで延長)。また、ここからさらに派生した課題も科研費基盤(B)(令和2年4月~令和6年3月)に採択され、現在、大学院生・学部生が精力的に実験を行っている。

個々のプロジェクトの内容を紹介すると、1)では植物オルガネラゲノムの改変によって人類に有用な植物を育成することを長期的な目標としている。そのため細胞質置換、細胞融合及び葉緑体の遺伝子組換え等の技術を駆使して、作物に新たな付加価値を与えることを目指している。とりわけ葉緑体の遺伝子組換えに関する技術開発は継続的に実施しており、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成しようとしている。これらのうちレタスでは組換え体を複数獲得した実績があるものの、

パンコムギとトマトでは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) を導入した実験で偶然得られた「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現象が発見された。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、ミニサークルの断片以外にも、導入プラスミドに自律複製性能を付与するもの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。雄性不稔は多くの高等植物に見出されている機能を持った花粉が形成されない現象で、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知見を得ようと考えている。加えて4)では、ダイコンを材料に雄性不稔と稔性回復システムの分子機構を包括的に研究している。前述のように、雄性不稔の原因遺伝子(ダイコンでは *orf138*)はミトコンドリアゲノムに存在するが、その働きを抑える稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) は核ゲノムに存在する。雄性不稔と稔性回復は、植物におけるミトコンドリアと核の相互作用のモデルとして古くから研究されており、当研究室でも日本各地のハマダイコンを材料に、ミトコンドリアゲノムの変異を調査するとともに、既知及び未知 *Rf* 遺伝子について、遺伝学及び分子生物学の両面から実験を進めてきた。なお、5)のプロジェクトでは、細胞質置換コムギという希少な材料を用いて、コムギの近縁種であ

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 *Aegilops mutica* 細胞質を持つパンコムギのミトコンドリアゲノムの解析を進めている。

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

Yamagishi, H., Hashimoto, A., Fukunaga, A. and Terachi, T.: Appearance of male sterile and black radishes in the progeny of cross between *Raphanus raphanistrum* and *Raphanus sativus*. *Breeding Sci.* **70**(5), 637-641 (2020).

5. 学会発表など

- 山岸博, 軸屋恵, 奥城佳奈子, 橋本絢子, 福永明日美, 竹中瑞樹, 寺地徹: オグラ型雄性不稔の回復遺伝子がコードする *ORF687*は、*orf138*mRNAのコード領域に結合して翻訳を妨げる. 日本育種学会 第138回講演会, オンライン, 2020.10.10-11
- 中元海里, 馬場裕士, 植村香織, 寺地徹: 葉緑体DNA断片を用いた自律複製型の葉緑体形質転換ベクターの構築. 日本育種学会 第138回講演会, オンライン, 2020.10.10-11
- 辻村真衣, 佐野峯遥香, 寺地徹: 易変異性を示すタバコを用いたド・フリースによる突然変異説の再考. 日本育種学会 第138回講演会, オンライン, 2020.10.10-11
- 新原由依, 辻村真衣, 山岸博, 寺地徹: 花器形態に異常を示すシロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代のミトコンドリア解析. 日本育種学会 第138回講演会, オンライン, 2020.10.10-11
- 山岸博, 橋本絢子, 中村天音, 森田佳奈, 寺地徹: ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔遺伝子(*orf138*)における塩基置換と稔性回復遺伝子の効果. 日本育種学会 第139回講演会, オンライン, 2021.3.20-21

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-R1年（4年）

科学研究費助成事業・基盤研究(B)

課題名： *psbA* 欠失変異体の相補を利用したマーカーフリーな葉

緑体の遺伝子組換え植物の作出

研究代表者：寺地徹，取得年度：R2-5年（4年）

科学研究費助成事業・基盤研究(S)

課題名：植物ミトコンドリアゲノム育種の基盤創出

研究分担者：寺地徹，取得年度：R2-6年（5年）

2) その他

科学技術振興機構(JST)創発的研究支援事業外部専門家書類
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

神戸大学農学部外部評価委員

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、自然環境に関わる政策を主な対象として、環境価値の活用に向けたアプローチに注目し、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)、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、政策形成プロセスや、政策展開に必要な制度や仕組みを明らかにするとともに、政策実施による効果の評価手法の開発を行う。これらの調査研究の実施においては、自然環境の活用により、防災減災、経済振興等の様々な社会課題の解決に向けた実践的な取り組みにできる限り参画させて頂きながら、さまざまな政策現場に実際に貢献できる成果を目指したい。

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評価

欧米と日本におけるグリーンインフラ(GI)に関する政策動向を調査している。GIは、欧米と日本、自然環境の多様な機能の活用を推進する概念として導入が進められている。一方、GIの導入の契機は、欧州は経済振興、米国は雨水管理、日本は東日本大震災の復興であり、地域によって異なっている。近年、日本では、洪水の発生頻度が高まる中で、雨水管理としてのGIに注目が集まっており、日本におけるGIの捉え方は拡大している。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手法を検討する。

2) 自然環境施策の導入にむけた評価手法の開発

日本における地域のGIの導入可能性の評価するため、GIに関わる自然環境と社会体制に関する指標を構築し、包括的な評価手法の開発を進めている。自然環境に関しては、洪水時の遊水機能、生物多様性保全に関する指標

准教授 西田 貴明

Assoc Prof. Takaaki Nishida, Ph.D.



を構築した。また、社会体制に関しては、アンケート調査による市民意向と行政計画を捉える指標を構築した。今後、GIの導入可能性を包括的に評価するために、地方自治体を対象としたGIに関する指標の開発をさらに進めたい。

3. Research projects and annual reports

1) Analysis of policy formation processes

We researched trends of green infrastructure (GI) policies in Europe, America, and Japan. The results of our study show that GI is a common political concept that promotes the use of various ecosystem services within those countries. However, the apparent motivations for the introduction of GI differs among the three regions. For example, in Europe the focus is on economic promotion, while in the United States GI policies are developed around rainwater management. In Japan, reconstruction from the Great East Japan Earthquake is the basis for developing GI policy. In addition, GI in Japan is characterized by the fact that there are ongoing discussions on land use based on the characteristics of ecosystems and the use of various ecosystem services. In recent years, the frequency of floods has increased in Japan and GI policies as a means of stormwater management have been attracting attention. Therefore, the scope of GI policies in Japan is expanding. In future, we suggest examining effective GI policy formation methods in Japan.

2) Evaluation of possibilities for GI policy introduction

To evaluate the possibility of introducing GI policies in local government, we developed natural environmental and social system indicators related to GI. We constructed indicators of water management and biodiversity conservation of agricultural lands during floods and as a natural environmental index. In addition, we established a social system index based upon completion of a questionnaire that captures citizens' GI-related intentions and administrative plans. In a future study, we intend to further develop GI indicators for local government to comprehensively evaluate the possibility of introducing GI policies.

4. 論文, 著書など

- Takashi Osawa, Takaaki Nishida, Takashi Oka: Paddy fields located in water storage zones could take over the wetland plant community. Scientific Reports 10:14806. (2020)
- Takashi Osawa, Utsuke Ueno, Takaaki Nishida, Jun Nishihiro: Do both habitat and species diversity provide cultural ecosystem services? A trial using geo-tagged photos. Nature Conservation 38: 61-77. (2020)
- Takashi Osawa, Takaaki Nishida, Takashi Oka: High tolerance land use against flood disasters: How paddy fields as previously natural wetland inhibit the occurrence of floods. Ecological Indicators 144: 106306. (2020)
- 西田貴明 (2020) 自然の脅威に向き合うグリーンインフラ, 高速道路と自動車 第63巻 第6号 pp.20
- 西田貴明 (2020) グリーンインフラに期待される経済効果, 高速道路と自動車 第63巻 第5号 pp.20.
- 西田貴明 (2020) グリーンインフラとは、環境の保全から活用への転換点, 高速道路と自動車 第63巻 第4号 pp.20.
- 西田貴明 (2020) 第3章 (3) グリーンインフラの推進に向けた経済的基盤, 小笠原奨悟・幸福智・高橋菜・中尾健良・西田貴明・長谷川啓一・池田正・吉原哲・渡邊敬史・長野紀章・瀧健太郎・西廣淳・吉田丈人: グリーンインフラ技術レポート、総合地球環境学研究所、pp.14-15 (2020)
- 西田貴明・遠香尚史 (2020) 自然環境分野における社会的インパクト評価, インパクト評価と社会イノベーション, 第一法規, PP.96 - 120.
- 西田貴明 (2020) プロローグ, 実践版! グリーンインフラ, 日経BP社, PP. 13.
- 西田貴明 (2020) 現状と課題, 実践版! グリーンインフラ, 日経BP社, PP. 89-100.

5. 学会発表など

- 西田貴明, グリーンインフラによる社会課題の解決, 土木学会研究討論会: グリーンとグレーの対話と相互理解, その先のハイブリッドインフラに向けて, 2020年9月7日
- 西田貴明, 日本におけるグリーンインフラの捉え方: グリーンインフラネットワークジャパン全国大会, 2020年11月7日
- 西田貴明, 趣旨説明、及びこれまでの取り組み (政策): これまでの生態学会における産官学連携の10年と今後の展開, 日本生態学会岡山大会 (オンライン), 2021年3月19日
- 西田貴明, グリーンインフラ官民連携プラットフォーム 企画広報部会活動報告: 国土交通省, グリーンインフラ官民連携プラットフォーム 第1回シンポジウム (オンライン), 2020年7月6日

- 西田貴明, グリーンインフラによる社会課題の解決: SCI-Japan ウェビナーシリーズ, スマートシティインスティテュート, 2020年8月4日
- 西田貴明, グリーンインフラによる社会課題の解決へ, 国連大学, SDGsカフェ#13 (オンライン) 市民全員が庭師になろう!, 2020年9月8日
- 西田貴明, グリーンインフラとは: 日本経済新聞社, 日経地方創生フォーラム (東京都 日経ホール), 2020年10月5日
- 西田貴明, 土地利用情報とアンケート調査によるグリーンインフラの全国的な評価, 北海道大学, 環境研究総合推進費公開成果発表会 (札幌市 札幌エルプラザ), 2020年12月14日
- 西田貴明, 里山再生を支える国の動き・制度・政策とその活用: 京都市都市緑化協会「宝が池連続学習会 2020」 (宝ヶ池公園), 2021年2月21日

6. その他特記事項

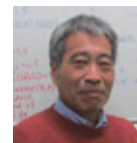
- 1) 外部資金
環境研究総合推進費
課題名: グリーンインフラと既存インフラの相補的役割 - 防災・環境・社会経済面からの評価
研究分担者: H30-R4 (4年)
- 2) 学外活動
西田貴明: 人間文化研究機構 総合地球環境学研究所 共同研究員
西田貴明: 文部科学省科学技術・学術政策研究所科学技術予測センター 専門調査員
西田貴明: 徳島大学環境防災研究センター 客員准教授
西田貴明: 三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング株式会社 客員研究員
西田貴明: 日本生態学会生態系管理専門委員会 専門委員, 幹事
西田貴明: 日本生態学会キャリア支援専門委員会 専門委員
西田貴明: 環境情報科学センター行事委員会 委員
西田貴明: ブルーカーボン研究会 委員
西田貴明: 滋賀県 しが生物多様性取組認証制度審査会 審査委員
西田貴明: とくしま生物多様性活動認証機構 運営委員会委員
西田貴明: 国土交通省 グリーンインフラ官民連携プラットフォーム 運営委員会 委員/企画・広報部会長
西田貴明: グリーンインフラ研究会 運営委員
西田貴明: グリーンインフラネットワークジャパン運営委員会 委員/ポスター部会長
西田貴明: 一般社団法人加太・友ヶ島環境戦略研究会 理事

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 人を超えていると言われる。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。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

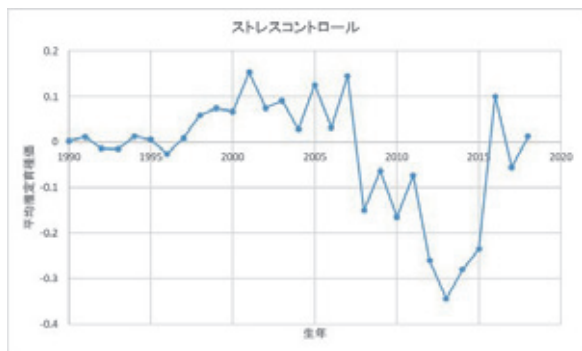
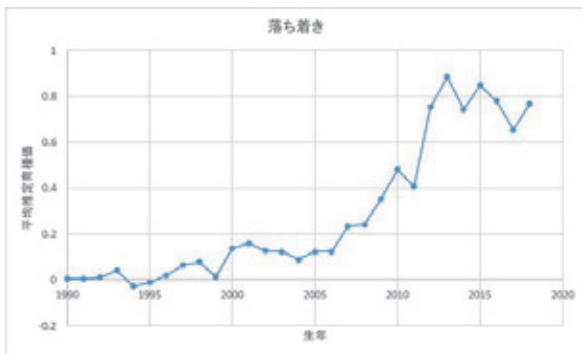
遺伝率と遺伝相関の推定値

	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

また、3つの形質の改良の経緯を明らかにするために、遺伝的トレンドを推定した。その結果、「落ち着き」は順調に改良されてきたが、この形質と負の遺伝相関を持つ「ストレスコントロール」には改良の停滞が認められた。

3つの形質を同時に改良するための方法として、相対希望改良量に基づく選抜指数式を作成し、その有効性を試算したところ、1世代(約3.5年)で盲導犬の合格率を10%近く向上できる可能性が示された。



「落ち着き」と「ストレスコントロール」の遺伝的トレンド



ノサップマルハナバチ。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。

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

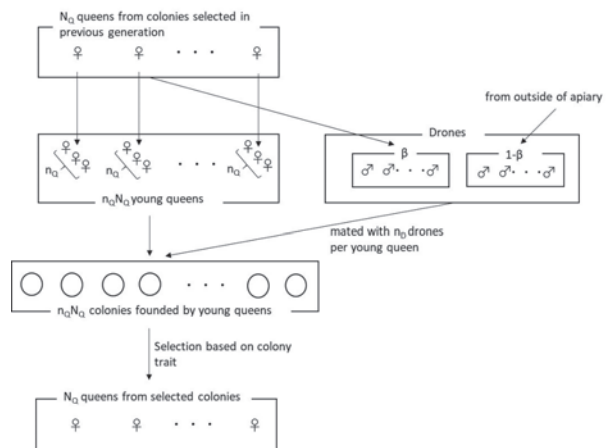
ノサップマルハナバチ(*Bombus cryptarum florilegus*)の分布は北海道東部の根室半島および野付半島に局限されている。近年、生息地の縮小が報告されており、早急な保全対策を講じる必要がある。

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、昨年度に引き続いて、生息地内のコロニー密度の推定を行った。推定方法としては、推定の誤差が大きい生息地の面積を直接に推定しないでコロニー密度が計算できる方法を開発した。得られたコロニー密度の推定値(1平方キロメートル当たりの巣の数)は、約15であり、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。

3) 不完全な繁殖隔離下でのミツバチの小集団における近交度と選抜反応

繁殖隔離が不完全なミツバチの小集団における選抜反応と近交係数を予測する理論を開発した。得られた理論を用いて、国内の養蜂家が保有する蜂群規模を想定した選抜計画に適用して育種の効率を評価した。数値計算の結果、繁殖隔離が不完全であっても雄の90%以上が隔離できれば、顕著な遺伝的改良量が得られることが示された。また、養蜂場外からの雄の流入は、近交係数の上昇を抑える上で有効であることも示された。



想定したミツバチの選抜計画

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 a purpose of selective breeding, the evaluation items should be condensed into a small number of selection criteria. We applied factor 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. Using the obtained genetic parameters, selection index to simultaneously improve the three major traits was constructed.

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 15/(km²), 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: *Inbreeding and selection response in a small population of honeybee under incomplete reproductive isolation*

Assuming a small population of honeybee with incomplete reproductive isolation, we developed theories to predict response to selection and inbreeding coefficient. The theories were applied to a selection program with a scale applicable to beekeepers in Japan. Numerical computation showed that even under an incomplete reproductive isolation, a remarkable genetic gain could be achieved if more than 90% of drones can be isolated. It was also shown that a small amount of introgression of drones from outside populations would effectively suppress the increase of inbreeding coefficient.

4. 論文・著書など

野村哲郎・木村 澄・荒川愛作(2021) ハチ類の育種—最近の研究動向— 昆虫と自然, Vol.56, No.7, 28-31.

Nomura T., Sasaki T., Taniguchi Y. (2021) A molecular genetic method for estimating best density without explicit definition of habitat area. *Journal of Insect Conservation* 25:695-706.

野村哲郎・木村 澄・荒川愛作(2021) 不完全な繁殖隔離下でのミツバチの小集団における近交度と選抜反応. 日本畜産学会報(投稿中)

5. 学会発表など

なし.

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、脳が機能するときにはたらく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、脳全体の機能発達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。

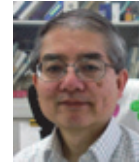
a) Hig タンパク質によるアセチルコリン受容体の局在制御機構

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) コリン作動性シナプス間隙に存在するタンパク質の睡眠への関与

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。さらに、コリン作動性シナプスに存在する他のタンパク質の睡眠における役割を解析する。

2. 本年度の研究成果

a) CG42613 タンパク質のシナプス構築における役割

ショウジョウバエ中枢神経系におけるコリン作動性シナプスのシナプス間隙には、共に分泌性のタンパク質である Hig と Hasp が存在している。Hig のシナプス間隙への局在には Hasp と nAChR サブユニット $D\alpha 5$ と $D\alpha 7$ が必要であり、その中でも Hasp が欠損すると Hig はシナプス間隙にほとんど検出できなくなる。ところが、Hig が欠損しても Hasp の局在には影響がない。したがって、Hasp の局在化機構には、今までに同定されていないタンパク質が関わっていることになる。Hasp と免疫沈降実験により共沈降したタンパク質の分画をショットガン法により質量分析したところ (名古屋大学、貝淵研究室との共同研究)、CG42613 および Neurexin-1 という膜タンパク質が同定された。現在、CG42613 について解析を進めており (図参照)、このタンパク質をコードする遺伝子の欠失変異の分離に成功している。この変異体は、ホモ接合で生存しているが、動きがやや遅く、後述するように、睡眠パターンに異常が観察される。また、このタンパク質に対するポリクローナル抗体を作成して免疫染色を行なったとこ

ろ、ショウショウバエの脳のシナプス領域を特異的に染色することを確認している。この抗体を使ってCG42613の欠失変異を染色すると、そのシグナルは完全に消失することから、分離した欠失変異はタンパク質を全く作らない変異であることが判明した。この結果は、脳の全抽出物に対するウエスタンブロットングにおいても確認された。この変異体におけるHaspのシナプス局在量を調べると、減少するという結果が得られているが、現在のところ正確な定量的結果は得られていない。

CG42613タンパク質は、ニューロンだけでなくグリアで発現しているという報告があり、どの細胞での発現がHaspの局在化を制御しているのか明らかにしていく必要がある。また、シナプスにおける局在部位を、Hig、Haspなどとの相対的關係において超解像顕微鏡を用いて今後調べていく予定である。

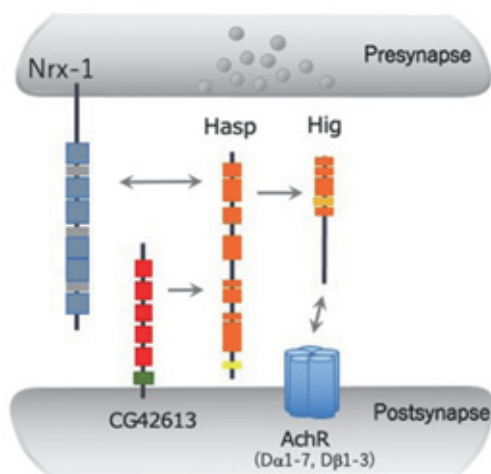
b) CG42613変異体の睡眠パターン

CG42613タンパク質と睡眠との関係を明らかにするため、CG42613変異体を用いて睡眠パターンを調べたところ、1日2回の明暗間の変わり目における活動性の増加が著しく低下していた。この減少がどのような機構(光への応答性、日周期の影響、睡眠必要性)の欠損によって生じているのか今後明らかにすべき課題である。また、CG42613の睡眠への関与がニューロンとグリアのいずれで行われているのか明らかにしていく。

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

コリン作動性シナプスのシナプス間隙



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 general model does not incorporate synaptic cleft into the architecture as an integral part of synapse.

Annual reports:

Identification of CG42613 as a cholinergic synaptic protein that regulates the localization of Hasp and sleep

To identify a synaptic protein that are required for the localization of Hasp at synaptic clefts, we immunoprecipitated brain extracts with anti-Hasp antibody and analyzed the precipitants by mass spectrometry. Two membrane proteins, CG42613 and Neurexin-1 were found among the proteins that emerged through the experiments. CG42613 is a membrane protein containing multiple CUB domains (see Figure), and reported to be expressed in both neurons and astroglia. In the null mutants of the gene that we generated by imprecise excision of transposon, Hasp is decreased in the synaptic regions, indicating a role for CG42613 in Hasp localization. As we have successfully obtained anti-CG42613 antibody, it is now possible to reveal precise relative location of Hig, Hasp and CG42613 within a synaptic cleft using an ultrahigh resolution microscope.

The CG42613 mutants exhibit abnormal sleep pattern. During transition period from light-on to -off and light-off to -on, wild-type flies move well, but the mutant flies show less locomotor activity. It will be interesting to determine which of mechanisms (light response, circadian rhythm, or sleep need) is involved in the abnormal behavior.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

Synaptic levels of acetylcholine receptors are controlled by the internalizing subunit D α 5 and synaptic cleft protein Hig in the *Drosophila* brain

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

The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. July 29 to August 1, 2020 (On-line presentation)

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

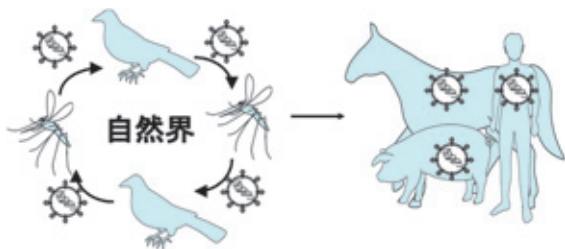


図1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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、京都市内でマダニを採取し、古典的な形態学的鑑別法に従って種の同定を行った。さらに、マダニが保有する病原微生物(フラビウイルスやリケッチア、トゴトウイルス等)を特異的に検出するPCRあるいはRT-PCR法を用いて、その検出を試みた。また、2013年に私たちの研究室において分離したトゴトウイルス(THOV) HI-Kamigamo 25株のウイルス中和試験法を用いて、京都市に生息する野生動物におけるTHOV中和抗体価を測定したところ、ハクビシンやアライグマがTHOV中和抗体価を保有していることが明らかとなった。

- (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の経過をたどる。自然界の種を超えた感染が如何に起こるのかを検討する目的で、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ている。本年度は、20回継代後のTHOV(MA-THOV P20)をクローン化し、マウスにおける病原性を確認したところ致死性であった。MA-THOV P20クローン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。

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. The THOV neutralizing antibody titer was measured in wild animals living in Kyoto City, it became clear that the palm civet and the raccoon possess the THOV neutralizing antibody titer.

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 a virus-neutralization test for HI-Kamigamo 25 strain of Thogoto virus (THOV), which we isolated in Kyoto City, 2013.

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. In this year, we examined whether THOV adapts to mice by passaging in mice could infect with THOV. We isolated THOV after 20 passages (MA-THOV P20) clones. Cloned viruses were lethal to mice as similar to MA-THOV P20. Macroscopic pathological findings of MA-THOV P20 clones-infected mice showed bleeding in various organs.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

なし

6. その他特記事項

1) 外部資金

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: R2 京都府畜産技術業績発表会 審査委員

前田秋彦: R2 防虫講習会 講師



2020 神戸大学農場研修

2020 年度 動物実験教育訓練および動物慰霊祭

動物実験教育訓練

本学では毎年、定期的に春、秋学期の年 2 回、本学動物実験委員会主催のもとで、動物実験のための教育訓練を実施しています。この教育訓練では、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。定期的な開催に加えて適宜、臨時の教育訓練が実施されています。2020 年度は、新型コロナウイルス感染症の影響により、秋学期のみのオンライン実施となりましたが、9 月 9 日の教育訓練には、141 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。2020 年度は 2 月 9 日に心光院村橋邦彦住職に来て頂き、密集を防ぐ為、参列者を制限し、説法と読経はオンライン中継にて行いました。参列者は 52 名、オンライン視聴者は 39 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



**2020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
2020. 8. 5	先端生命	白鳥 秀卓 (京都産業大学生命科学部 教授)	Teamsによるオンライン会議で、生命科学セミナーが開催されました! (8月5日)
2020. 10. 7	先端生命	三嶋 雄一郎 (京都産業大学生命科学部 准教授) 遠藤 斗志也 (京都産業大学生命科学部 客員教授)	Teamsによるオンライン会議で、生命科学セミナーが開催されました! (10月7日)
2020. 10. 30	産業生命	川上 雅弘 (京都産業大学生命科学部 准教授) 西田 貴明 (京都産業大学生命科学部 准教授)	生命科学部 生命科学セミナー開催 (10月30日)
2020. 11. 25	先端生命 生命システム	千葉 志信 (京都産業大学生命科学部 教授) 潮田 亮 (京都産業大学生命科学部 准教授)	生命科学部 生命科学セミナーを開催 (11月25日) します!
2020. 12. 19	生命システム	永田 和宏 (京都産業大学総合生命科学部 名誉教授) 大隅 良典 (東京工業大学 名誉教授) 田中 啓二 (東京都医学総合研究所 理事長) 夏目 徹 (産業技術総合研究所 首席研究員)	永田 和宏 名誉教授の最終講義「おもしろさを択び続け40年」が開催されました。
2020. 12. 23	先端生命 産業生命 生命システム	三瓶 由紀 (京都産業大学生命科学部 准教授) 川根 公樹 (京都産業大学生命科学部 准教授)	生命科学部 生命科学セミナーを開催 (12月23日) します!
2021. 2. 27	先端生命 生命資源環境 動物生命医科	竹内 実 (京都産業大学生命科学部 教授) 山岸 博 (京都産業大学生命科学部 教授)	竹内 実 教授・山岸 博 教授ご退職記念講演会(最終講義)を開催しました

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
5月	先端生命	三嶋 雄一郎 准教授	生命科学部 三嶋 雄一郎 准教授と理化学研究所などの研究グループが、細胞の中でリボソームが交通渋滞を起こす要因を明らかにしました
5月	先端生命	高橋 純一 准教授	生命科学部 高橋 純一 准教授が分担執筆した事典「衛生動物の事典」が出版されました。
5月	産業生命	木村 成介 教授 坂本 智昭 研究員	昆虫は、植物の花と実を作る仕組みをハイジャックし「虫こぶ」を作っていることを解明
6月	大学院		生命科学部 大学院説明会をオンラインで開催しました！
7月	先端生命	横山 謙 教授 岸川 淳一 客員研究員 平山 温子 客員研究員 古田 綾 (2020年生命科学部研究科卒)	液胞型のプロトンポンプタンパク質 (V-ATPase) の機械的な活性調節機構を解明
8月	先端生命	横山 謙 教授 池田 貴子 研究員 岸川 淳一 客員研究員 林田 優希 (生命科学部研究科)	ミトコンドリアでのATP合成を阻害することで寿命を延ばす化合物を発見
9月	先端生命	本橋 健 教授 桶川 友季 研究員	植物の光合成誘導に働く重要な制御メカニズムを、シロイヌナズナ変異体を用いて明らかにしました。
10月			サイエンスコミュニケーション研究会「サングラス」が上賀茂小学校の児童に「科学の森」を配布しました！
10月	先端生命	本橋 健 教授 桶川 友季 研究員	光合成のオンオフを切り替えるチオレドキシンの光合成調節における新たな役割を解明
10月	先端生命	千葉 志信 教授 藤原 圭吾 研究員 櫻 祐太郎 (2020年生命科学部研究科卒) 伊藤 維昭 氏	合成途上の新生タンパク質が見せる動的な挙動を網羅的に検出する手法の開発と解析
1月			「英語プレゼンテーション・ワークショップ」を開催しました (Monthly GSC10月・11月)
11月			総合生命科学部『理工系コーポ教育プログラム』参加の学生が生き物調査 (自然観察会) に協力しました
11月	先端生命	竹内 実 教授	生命科学部 竹内 実 教授が日本獣医師会会長表彰を受賞！
1月		遠藤 斗志也 教授 竹田 弘法 (学振PD) 鈴木 純子 研究補助員	ミトコンドリアにバレル (円筒) 型膜タンパク質を組み込む仕組みを解明 — 英国科学誌Nature (オンライン版) に掲載
1月			「英語プレゼンテーション・ワークショップ」を開催しました (Monthly GSC10月・11月)
2月	大学院	千葉 志信 教授 崎山 歌恋 (生命科学部研究科・博士前期課程2年次) 千葉 直美 研究員 藤原 圭吾 研究員	生命科学部研究科の崎山 歌恋さん (修士2年) ら、千葉 志信 教授の研究グループが、翻訳一時停止因子を新たに3つ発見しました！
2月	産業生命	寺地 徹 教授 植村 香織 客員研究員	生命科学部の寺地徹教授と植村香織客員研究員が分担翻訳した教科書「エッセンシャル遺伝学・ゲノム科学」が出版されました。
2月	大学院	本橋 健 教授 村井 亮太 (2017年生命科学部研究科卒) 桶川 友季 研究員 佐藤 望 研究補助員	生命科学部研究科の村井 亮太さんと生命科学部 本橋 健 教授らのグループが、光合成機能調節に関与すると考えられるCBSXの機能を再評価
2月	生命資源環境		生命資源環境学科の卒業研究発表会を開催しました。
3月	産業生命	木村 成介 教授 坂本 智昭 研究員	アサガオの花びら (花冠) がまっすぐに伸びる力学的な仕組みを解明しました
3月			春のオープンキャンパス : 理系3学部個別相談を追加開催!!!
3月			オンライン交流「最先端基礎生命科学の食品科学への応用」
3月			ご卒業されるみなさまへ【総合生命科学部・生命科学部研究科】

キャンパスマップ



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

京都産業大学 生命科学部 年報

第2号 2020 (令和2年)

発行日 2021 (令和3) 年9月3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/>