


京都産業大学生命科学部 年報

Annual Report of the Faculty of Life Sciences
Kyoto Sangyo University

The genetic code determines mRNA stability

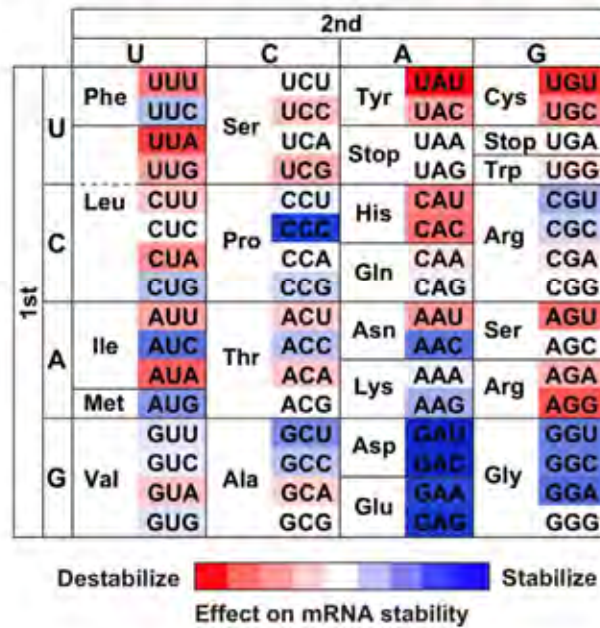
		2nd							
		U	C	A	G				
1st	U	Phe	UUU	UCU	Tyr	UAU	Cys	UGU	
			UUC	UCC		UAC		UGC	
			UUA	Ser	UCA	Stop	UAA	Stop	UGA
			UUG	UCG		UAG		Trp	UGG
	C	Leu	CUU	CCU	His	CAU		CGU	
			CUC	Pro	CCC	CAC	Arg	CGC	
			CUA	CCA	Gln	CAA		CGA	
			CUG	CCG		CAG		CGG	
	A	Ile	AUU	ACU	Asn	AAU	Ser	AGU	
			AUC	ACC		AAC		AGC	
			AUA	ACA	Lys	AAA	Arg	AGA	
		Met	AUG	ACG		AAG		AGG	
G	Val	GUU	GCU	Asp	GAU		GGU		
		GUC	GCC		GAC	Gly	GGC		
		GUA	GCA	Glu	GAA		GGA		
		GUG	GCG		GAG		GGG		

Destabilize  Stabilize
Effect on mRNA stability

《第3号》

2021年度
令和3年度

The genetic code determines mRNA stability



【コドンが mRNA の安定性に及ぼす影響の定量解析】

遺伝暗号であるコドンは、リボソームと tRNA によって解読され、アミノ酸の並びへと変換されます。近年、タンパク質の読み枠を構成するコドンの組成が、mRNA の安定性にも影響を与えていることが明らかとなりました。しかしその効果を定量的に解析することは困難でした。

コドンが mRNA の安定性に与える影響を定量化できる PACE という実験手法を開発しました。ゼブラフィッシュの初期胚において PACE による解析を行い、リボソームがコドンを読み解く際の速度が mRNA の安定性に影響を与えることを明らかにしました。

(三嶋、石橋、木村ら：The EMBO Journal 2022 e109256)

目次

巻頭言	1	
教員研究室一覧・事務室スタッフ名簿・全学委員会等名簿	2	
2021年活動記録		
先端生命科学科	先端生命科学科の教育研究活動	5
	板野直樹 教授	10
	潮田亮 准教授	13
	遠藤斗志也 客員教授	16
	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	30
	齋藤敏之 教授	31
	白鳥秀卓 教授 (副学科主任)	34
	瀬尾美鈴 教授	37
	高桑弘樹 教授	40
	高橋純一 准教授	42
	棚橋靖行 准教授	45
	千葉志信 教授	48
	津下英明 教授 (副学部長)	51
	中村暢宏 教授	54
	西野佳以 准教授	58
	三嶋雄一郎 准教授	61
	本橋健 教授 (学科主任)	63
	横山謙 教授	66
産業生命科学科	産業生命科学科の教育研究活動	71
	川上雅弘 准教授	75
	木村成介 教授	77
	佐藤賢一 教授 (学部長)	80
	三瓶由紀 准教授	83
	染谷梓 准教授	85
	寺地徹 教授	87
	西田貴明 准教授	91
	野村哲郎 教授 (学科主任)	93
	浜千尋 教授 (副学科主任)	96
	前田秋彦 教授	99
2021年	動物実験教育訓練および動物慰霊祭	101
2021年	生命科学部 研究トピックス	103

巻頭言

生命科学部長

津下 英明

京都産業大学・生命科学部は2019年、総合生命科学部から改組を経て、3年目の年となります。ここに生命科学部・年報第3号（2021年度：2021年4月～2022年3月）をお届けします。生命科学部は先端生命科学科と産業生命科学科の2学科からなり、どちらも特徴的な教育研究を掲げています。先端生命科学科は最先端の生命科学の研究を進め、これを牽引できるような人材を育成することを目的に教育研究活動を進めています。また、産業生命科学科は生命科学 x 社会科学の考えを基本に、ユニークな教育研究活動を進めています。本学部の前身学部である総合生命科学部では初代の学部長として、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）が勤められていました。そ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」でありましたが、この精神は現在の生命科学部においても変わらず受け継がれています。

2021年度（令和3年度）を振り返ってみると、2020年に始まった新型コロナウイルスCOVID-19による感染症の2年目の年になります。「ウィズコロナ」ーコロナとの共存を考える新しい社会の中での、様々な教育と研究の取り組みは、今も続いています。また研究の発表の場である学会もオンライン化が進み、新たな様式に戸惑いながらも、教員、学生共に活発な研究活動を行ってきました。

こ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、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ります。ぜひ、ページをめくっていただき本学がもつ多様でかつユニークな教育と研究に接していただき、実感していただければ幸いです。

生命科学部教員研究室一覧

学科	役職	職名	氏名	スタッフ等名簿					
				講師	研究助教	研究員・研究補助員	客員研究員	嘱託・契約職員	
先端生命科学科		教授	板野 直樹					平岡 夏実	
		客員教授	遠藤 斗志也			草野 清輔 平嶋 孝志 張 春明 小野 鈴花 安達 智子 齊藤 知加 中村 京子 邱 淑君	竹田 弘法 佐藤 久夫 松本 俊介 荒磯 裕平 須賀 比奈子 丹羽 一 渡邊 康紀	足立 織生 伊藤 君枝	
		教授	加藤 啓子					藤村 耕治 山口 翔 藤田 明子	渡邊 裕子
		教授	金子 貴一						
		准教授	川根 公樹			中嶋 晶子			
		教授	河邊 昭			西村 香里(5月から10月まで)			
		教授	黒坂 光					中村 直介	
		教授	齋藤 敏之					安田 瞳美	
		副学科主任	教授	白鳥 秀卓					
		教授	瀬尾 美鈴					清水 昭男 上野 信洋	
		教授	高桑 弘樹					仲井 まなみ	
		准教授	高橋 純一			奥山 永			
		准教授	棚橋 靖行						
		教授	千葉 志信			藤原 圭吾 高田 啓 村田 真智子 石川 香奈子			
		副学部長	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			福田 泰子		永田 和宏 種村 裕幸 石田 玉美	
		准教授	西野 佳以			竹谷 香南		田島 朋子	
		准教授	三嶋 雄一郎			石橋 幸大 若林 貴美			
		学科主任	教授	本橋 健			佐藤 望	桶川 友季	
	教授	横山 謙						横山 朋子	
産業生命科学科		准教授	川上 雅弘						
		教授	木村 成介			坂本 智昭 水野(上ノ山)華織			
		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					野波 正浩 祐尾 慧以	
		教授	寺地 徹			永島(峰野)伊都子 香西 満梨奈		塚谷 真衣 植村 香織 中元 海里	
		准教授	西田 貴明						
		学科主任	教授	野村 哲郎				花房 美緒	
		副学科主任	教授	浜 千尋					
	教授	前田 秋彦					川崎 成人 佐藤 健介		

大学院生	その他
岩本 駿吾(D1) 寺西 由紀子(M1)	
小西 雄大(M1)	篠田 沙緒里(学振 PD) 阪上 春花(学振 PD)
楠 達也(M1) 田中 朋也(M1) 田村 聡哉(M2)	
濱崎 祐也(M2)	
インテラ サティシュ クマール(D1) 吉良 彰人(D1) 西藤 圭祐(M2) 達富 一湖(M2) 上川 瑠か(M1)	
河本 凌(M1)	
谷村 優香(M2) 福本 有咲(M1) 松浦 沙耶(M1)	
福光 一生(M2) ハサン エムティエー ムラト(M2)	
渡邊 佳怜(M2)	
桐島 沙也佳(M1)	
山田 等仁(D2) 友田 駿(M1) 内田 悠斗(M1)	
高司 時生(M1)	
上垣 日育(D3) 藤井 唱平(D3) 堤 智香(D3) 葛西 綾乃(D3) 山下 龍志(D3) 和田 匠太(M2) 杉澤 亜美(M1)	
奥西 慧菜(M2) 秋山 聡一郎(M1)	
宇賀神 希(D1) 林田 千優(M2) 飯田 颯(M1) 入江 徹(M1)	
中野 敦樹(M2) 佐伯 詩織(M2)	津山 泰一(学振 PD)
馬場 裕士(M2) 新原 由依(M2) 須佐見 朝日(M1) 庄司 穂弘(M1)	
北市 三和(M1)	
中西 泰介(M2) 金 美来(M2)	

生命科学部事務室スタッフ名簿

役職名等	氏名
教学センター 生命科学部事務長	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)(5月末まで)	木津 夏月美
教学センター 課員(生命科学部事務室)(6月から)	西田 実里
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)	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 契約職員(生命科学部事務室)	高山 真優
教学センター 嘱託職員(GSC 担当)	田淵 裕梨
教学センター 嘱託職員(化学物質等管理業務担当)(11月末まで)	倉満 晶子
教学センター 嘱託職員(化学物質等管理業務担当)(12月から)	川原 瑞穂
教学センター 嘱託職員(日本科学未来館・実験室事務補助)	伊藤 君枝
教学センター 特定職員(RI 管理業務担当)	碓山 菜々子
教学センター 特定専門員	森見 友貴
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)	赤坂 友理
教学センター 嘱託職員(実験補助員)	鷺見 友梨
教学センター 嘱託職員(実験補助員)	市川 美和
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	高橋 純一
省エネルギー推進委員会	寺地 徹
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	河邊 昭
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)	津下 英明
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)	津下 英明
教務委員会	津下 英明
障害学生支援委員会	染谷 梓
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)	中村 暢宏
学生寮教育スタッフ	川根 公樹
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	高桑 弘樹 金子 貴一
図書館委員会	前田 秋彦
学術リポジトリ運営委員会	齋藤 敏之
国際交流推進委員会	板野 直樹
情報基盤運営委員会	高桑 弘樹
ネットワークセキュリティ所属管理責任者(ネットワークセキュリティ委員会)	高桑 弘樹
人権センター運営委員会	三瓶 由紀
人権委員会	板野 直樹
窓口相談員	三瓶 由紀
論集編集系列委員会	瀬尾 美鈴
社会連携推進委員会	浜千 尋
初年次教育センター運営委員会	津下 英明
人間科学教育カリキュラム部会	津下 英明
教職課程教育センター運営委員会	三嶋 雄一郎 千葉 志信
教育支援研究開発センター運営委員会	津下 英明
GSC ワーキンググループ	川上 雅弘

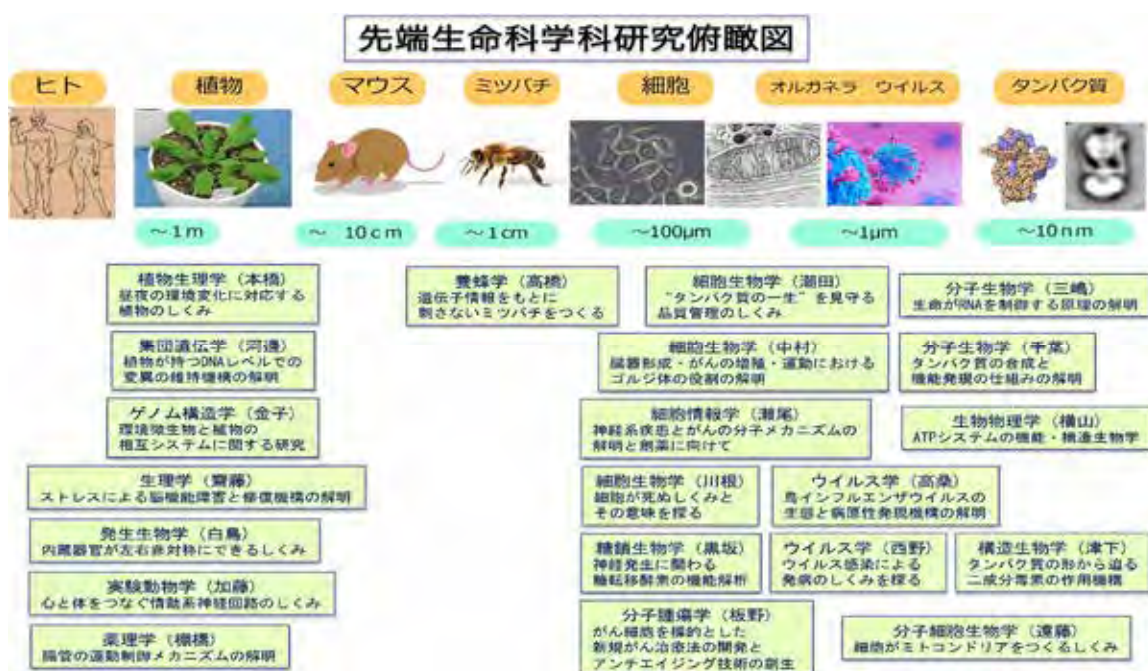
先端生命科学科

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。さらに2年次には、代謝生物化学、分子生物学、細胞生物学などの生命科学の基盤となる科目および対応する演習科目を配置し、その後に専門性のより高い科目として生命医科学1, 2、微生物学、タンパク質科学等を履修できるようになっている。また、初年次秋学期から化学実験、2年次春学期には生物学実験が開講され、化学・生物学の基本について、実習を通して学ぶとともに、基本的な実験手法を身につける。2年次からは「生命医科学コース」、「食料資源学コース」、「環境生態学コース」のいずれかのコースを選択し、選択したコースに配置された科目を中心に受講する。幅広い知識と視野を身につけるために、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年の秋セメスターの先端生命科学特別研究1あるいは生命科学プロジェクト研究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あるいは生命科学プロジェクト研究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
フレッシュヤーズセミナー	1	学科全教員	化学の基礎	1	黒坂
生物学通論A	1	川根	生物の基礎	1	千葉
生物学通論B	1	高橋	化学実験	1	潮田、遠藤、津下、中村、西野、本橋
化学通論A	1	横山	先端生命科学演習1	1	潮田、棚橋
化学通論B	1	津下	先端生命科学演習2	1	川根、横山
生命科学概論	1	河邊、白鳥	先端生命科学演習3	1	板野、高桑
物質生物化学	1	黒坂	英語サマーキャンプ1	1	三嶋
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、本橋
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、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確立することである。抗老化医学研究室では、この目的のため、分子生物学、細胞生物学、生化学、そして、遺伝子工学の先端技術を駆使して、以下の研究課題に取り組んでいる。

1-1: ヒアルロン酸合成機構の解明とアンチエイジング技術への展開

関節機能の低下が原因で寝たきりになる高齢者が増えている。この要因として、関節でクッションや潤滑の役割をするヒアルロン酸の減少がある。ヒアルロン酸は、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcA)が、 β -1,3 と β -1,4 結合で交互に連結した2糖ユニットの繰り返し構造からなる高分子多糖であり、特に結合組織の細胞外マトリックス成分として広く存在している。細胞はこのマトリックスにヒアルロン酸受容体を介して接着し、細胞内情報伝達系を活性化して細胞増殖や移動の調節に働くことされる(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、がん細胞からがん幹細胞への転換が高率に起こることを明らかにしてきた。また、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糖代謝について検討し、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)。このことは、ヒアルロン酸の過剰な産生が、糖供与体である細胞内UDP-*N*-アセチルグルコサミンとUDP-グルクロン酸を多量に消費することで、細胞内糖代謝に影響を及ぼしていることを示唆している。

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、ヒアルロン酸産生によって変化する細胞内糖ヌクレオチドや糖鎖構造について、HPLC分析や質量分析による解析を行った。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、対照乳がん細胞に比べて、*N*-型糖鎖修飾において重要な糖ヌクレオチドが減少していることが明らかとなった。また、糖ヌクレオチドの減少に伴って、*N*-型糖鎖のうちハイマンノース型、ハイブリッド型、そしてコンプレックス型糖鎖の組成が変化していることが明らかとなった。また、パウチマンノース型糖鎖については、その合成増加が認められた。

以上の結果から、ヒアルロン酸の過剰産生が、糖供与体である糖ヌクレオチドの代謝に影響を及ぼして、*N*-型糖鎖修飾を変化させることが示唆された。今後は、*N*-型糖鎖修飾の変化が、がん幹細胞性の制御に働く可能性について明らかにする予定である。

3. Research projects and annual reports

1-1. Elucidation of the Biosynthetic Process of Hyaluronan and its Application to Anti-aging Technologies
There are an increasing number of bedridden elderly people in Japan with a loss of joint function due to conditions like osteoarthritis. Hyaluronan (HA) acts as a cushion and lubricant in articulating joints. It is an integral component

of the synovial fluid between joints, but becomes reduced by age and thereby causes functional disorders. HA is a high molecular-mass polysaccharide found in the extracellular matrix, especially of that of connective tissues, and is composed of repeating disaccharide units in which *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucuronic acid (GlcUA) are linked together by alternating 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. Annual reports

Our previous studies have demonstrated that the conversion of cancer cells to cancer stem cells occurred at a high rate in a breast cancer mouse model with a high HA production ability. We further investigated glucose (Glc) metabolism in HA-overproducing cancer cells by stable

isotope and mass spectrometry, and found that the metabolic flux of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) is significantly accelerated (Fig. 1). This suggests that excessive HA production affects intracellular glucose metabolism by consuming large amounts of the sugar donors, UDP-*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and UDP-glucuronic acid.

In this study, we analyzed the intracellular sugar nucleotides and glycan structures to elucidate the mechanism by which the acceleration of HBP by HA overproduction modulates cancer stemness. HPLC analysis revealed that the donor substrates for *N*-glycosylation were decreased in HA-overproducing breast cancer cells compared to control cancer cells. Mass spectrometry further demonstrated alterations of *N*-glycosylation in HA-overproducing breast cancer cells. With the decrease of sugar nucleotides, the composition of high mannose-type, hybrid-type, and complex-type *N*-glycans was changed. In addition, HA overproduction resulted in an increased synthesis of pauci-mannose-type *N*-glycans.

These results suggest that HA overproduction alters *N*-glycosylation by affecting the metabolism of sugar nucleotides. In the future, we plan to elucidate the possibility that changes in *N*-glycosylation may play a role in regulating cancer stemness.

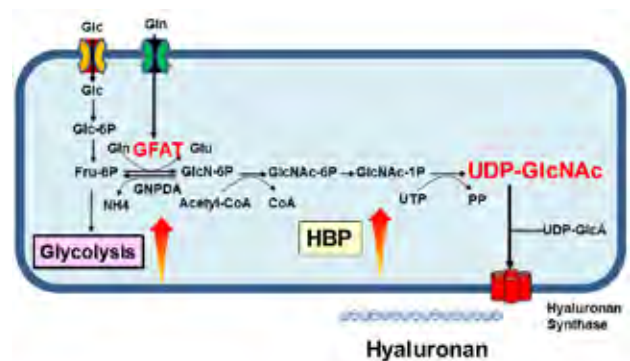


Figure 1. HA biosynthesis and HBP

4. 論文, 著書など

Takeuchi Y, Kimura N, Murayama T, Machida Y, Iejima D, Nishimura T, Terashima M, Wang Y, Li M, Sakamoto R, Yamamoto M, Itano N, Inoue Y, Ito M, Yoshida N, Inoue JI, Akashi K, Saya H, Fujita K, Kuroda M, Kitabayashi I, Voon D, Suzuki T, Tojo A, Gotoh N. The membrane-linked adaptor FRS2 β fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**: e2103658118 (2021)

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:ヘキサ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-令和3年(4年)

令和3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サ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3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

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**」をとっても研究することは、「**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環境下にあるが、この酸化的環境においてERdj5が還元活性を発揮するためには、何らかの方法によって還元力を得なければならない。言い方を換えれば、電子はどのようにしてERdj5に伝達されるのか、小胞体はどのようにしてサイトゾルから電子を得ているのか、が避けて通れない大きな問題となる。これは小胞体というオルガネラに残された細胞生物学上の最大の謎の一つでもある。本、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。小胞体は酸化的環境下であり、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、酸化環境を触媒している(図1-①)。この酸化環境で、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しており、ポンプとチャネルを ERdj5 の還元活性を介して、reciprocal にかつ合目的的に制御するという、極めて巧妙な制御機構を明らかにしつつある (図 1-③)。

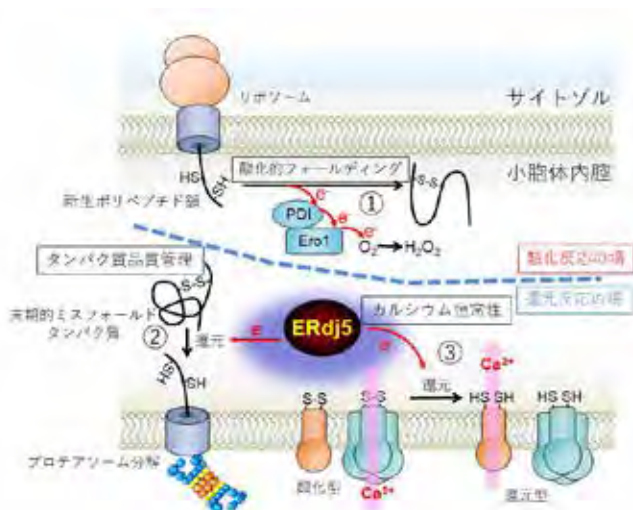


図 1. 小胞体は酸化のフォールディングを中心とした酸化反応の場として考えられてきた。潮田らは小胞体内腔の還元反応の重要性を明らかにしてきた。

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。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 (R. Yamashita et al., *Sci. Rep.* 2021)。また、第一三共との共同研究で、CHO 細胞における抗体 (IgG) 産生について、Hspa5 プロモーターを利用した発現系を構築した。Hspa5 プロモーターを削ることで、これまでの発現系と比較しておよそ 2 倍の産生量を実現した (H. Tanemura et al., *Sci. Rep.* in press)。

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. Then, we found that cytosolic calcium ions were constantly elevated in ERdj5-deficient cells. We also found that Drp1 is activated in a Ca²⁺-dependent manner, and that the activated Drp1 ruptures mitochondria (R. Yamashita et al., *Sci. Rep.* 2021).

4. 論文、著書など

Riyuji Yamashita, Shohei Fujii, Ryo Ushioda* and Kazuhiro Nagata*: Ca²⁺ imbalance caused by ERdj5 deletion affects mitochondrial fragmentation, *Sci. Rep.* 11, Article number: 20772 (2021)

Hiroki Tanemura, Kenji Masuda, Takeshi Okumura, Eri Takagi, Daisuke Kajihara, Koichi Nonaka, Ryo Ushioda*: Development of a stable antibody production system utilizing an Hspa5 promoter in CHO cells, *Sci. Rep.* in press

藤井唱平, 潮田亮: タンパク質品質管理を支える小胞体レドックス環境と電子伝達、生化学93(5)、651-659 (2021)

5. 学会発表など

潮田亮: タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割、学術変革A「硫黄生物学」第1回領域会議、オンライン、2022.3.19-20

和田匠太、永田和宏、潮田亮: レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーの感知機構の解明、超異分野学会 東京大会2022、東京都、2022.3.4-5

堤智香、田原諒佑、永田和宏、潮田亮: 小胞体レドックス環境を構築するグルタチオン供給機構の解明、第44回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

潮田亮、上垣日育、山下龍志、永田和宏: ストレス応答としての小胞体レドックスシフトと恒常性維持、第44回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

XIAOHAN CAI、伊藤翔悟、野井健太郎、井上道雄、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次: Mechanisms of ER-associated degradation pathway mediated by the cooperation of ERdj5 and BiP、第44回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

潮田亮: ストレス応答としての小胞体レドックスシフト、第94回日本生化学会大会、オンライン、2021.11.3-5

Ryo Ushioda: Maintenance of Endoplasmic Reticulum Homeostasis through Redox Regulation, Paris Redox 2021, オンライン、2021.10.13-15 (招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

AMED-CREST

課題名: プロテオスタシスにおけるタンパク質構造形成機構の包括的解明

研究分担者: 潮田亮、取得年度: 2021-2026 年

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名: タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割

研究代表者: 潮田亮、取得年度: 2021-2025 年

科学研究費補助金・基盤研究 A

課題名: 小胞体における活性酸素除去に関わる新たな分子機構の解明

研究分担者: 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

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ン-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: 2021 年

科研費再挑戦支援プログラム

課題名: 小胞体レドックス環境の起源を紐解く

研究代表者: 潮田亮、取得年度: 2021 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」実施

(3) 潮田亮: 京都府立峰山高等学校 模擬授業「生命とは何かを追及する研究者」



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合成や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、オルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

2. 本年度の研究成果

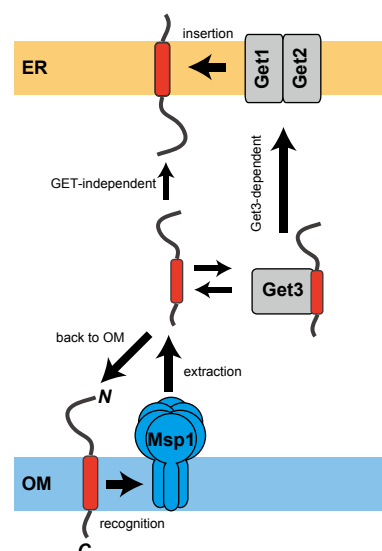
ミトコンドリアに誤配送された膜タンパク質の配送やり直しの分子機構

私たちは、タンパク質の配送にはやり直し（校正）機構が存在すること、すなわちミトコンドリア外膜の AAA-ATP アーゼの Msp1 が、ミトコンドリア外膜に誤配送された膜タンパク質を検出して引き抜き、ER 膜に送り込んで分解するか配送をやり直すかが決まることを見出した。本研究では、Msp1 による

配送校正の基質の範囲は何か、他のオルガネラでも校正が起こるのかどうか、オルガネラでの基質タンパク質の移動にオルガネラ間コンタクト部位やシャペロンなどの因子は関与するか、という問いに答えることで、校正の全体像を明らかにすることをめざしている。さらに、他の細胞内局在の校正因子や他に多重局在例の検索、解析への展開も視野にしている。

これまでに、Msp1 によってミトコンドリア外膜から引き抜かれた誤配送テイルアンカー（TA）タンパク質が ER に移動することを、蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察で検証することに成功した。すなわち、ペルオキシソームからミトコンドリアに誤配送されるモデル基質 Pex15 Δ 30 にケイ光タンパク質を融合させた mNG-Pex15 Δ 30 を 薬剤 (β -estradiol) 誘導的に一時的に発現させ、その分解を Doa10 欠損により抑制した。次に、Pex15 Δ 30 の発現をオフにし、同時に Msp1 の発現をガラクトース誘導型プロモータ等でオンにしたときの基質の移動を、蛍光顕微鏡でモニターし、いったんミトコンドリアに誤配送された Pex15 Δ 30 がミトコンドリアから ER に移動することを説得力ある形で示すことができた (Matsumoto, Ono *et al.*, *JCB* accepted, 2022)。

次に Msp1 によって引き抜かれた誤配送 TA タンパク質が、Msp1 以外のどのような因子に依存して ER に移行するかを検討した。新規合成された ER 行きの TA タンパク質はサイトゾルの TA タンパク質専用のシャペロン Get3 とその



Msp1 により引き抜かれた TA タンパク質の ER への配送

わせて GET システムと呼ぶ) によって ER への配送が行われる。そこでミトコンドリアに誤配送された Pex15 Δ 30 もこれら GET システムに依存して ER に移行するかどうかを *get3* Δ 株, *get1* Δ *get2* Δ 株を使って調べた。その結果, Msp1 によって引き抜かれた Pex15 Δ 30 のミトコンドリアから ER への移行は GET システムに依存することが明らかになった。しかし Msp1 を過剰発現すると, *get3* Δ 株, *get1* Δ *get2* Δ 株でも Pex15 Δ 30 の一部は ER に移行するので, 効率は低いが, GET システムに依存しないでミトコンドリアから ER に移行する経路があることがわかる (Matsumoto, Ono *et al.*, *JCB* online published, 2022)。この経路がミトコンドリア-ER コンタクトを介するのかが, は興味深い問題であるが, 今後の検討課題である。

ミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体による β -バレル構造形成の分子機構

ミトコンドリア外膜には小分子やタンパク質の通り道を提供するポリンや Tom40 などバレル型構造の膜タンパク質 (β バレル型膜タンパク質) が存在し、ミトコンドリアの機能に必須である。SAM 複合体はこれらのタンパク質の β バレル構造形成と外膜への組み込みを担うトランスロケータである。私たちは、SAM 複合体の、構成サブユニット (タンパク質) が異なる二つの複合体について、高分解能立体構造を決定することに成功した (Takeda *et al.*, *Nature* 2021)。そして、SAM 複合体がそのサブユニット (Sam50 と Mdm10) と基質の β バレルタンパク質を入れ替えながら、基質のバレル構造形成を促し、外膜に組み込む新規の仕組み (β バレルスイッチモデル) を明らかにした。今回 SAM 複合体と基質 (Tom40) の複合体 (β バレル形成中間体) のクライオ EM 構造を決定した (投稿準備中)。構造から示唆された SAM 複合体による基質タンパク質の β バレル構造形成のメカニズムは、細菌の BAM 複合体によるメカニズムとは全く異なるものであり、そのようなメカニズムが進化的にどのように獲得されたか、などきわめて興味深い。

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.

We previously found that the cell has a mechanism to achieve proofreading or correction of the delivery of mistargeted tail-anchored (TA) proteins. Msp1, an AAA-ATPase in the mitochondrial outer membrane, detects and extracts TA membrane proteins mistargeted to mitochondria and transfers them to the ER for further delivery to downstream organelles along the secretory pathway or for cytosolic proteasomal degradation. In the current project, we are aiming at obtaining the entire picture of this re-transfer of mistargeted proteins by answering the questions of what is the spectrum of the substrates for Msp1-mediated re-transfer, whether such a re-transfer can operate in other organelles, and whether inter-organelle contact sites and chaperones are involved in the re-transfer of proteins. In addition, we are making efforts for the search and analysis of the factors for other subcellular re-localizations and other cases of multiple protein localizations.

In the present study, we have succeeded in showing the mitochondria-to-ER transfer of mistargeted proteins extracted from the mitochondrial outer membrane by Msp1, using time-lapse fluorescent microscopy. mNG-Pex15 Δ 30, a model mitochondrially mistargeted peroxisomal protein, was transiently expressed by β -estradiol under Doa10-defective conditions to prevent its degradation. Then, expression of mNG-Pex15 Δ 30 was shut off and expression of Msp1 was induced by the galactose-inducible promoter. The fate of mNG-Pex15 Δ 30 was monitored by fluorescent microscopy, thereby convincingly demonstrating that Pex15 Δ 30, once mistargeted to mitochondria, is transferred from mitochondria to the ER (Matsumoto, Ono *et al.*, *JCB* accepted, 2022).

Next, we examined which factors other than Msp1 are involved in the transfer of mistargeted TA proteins extracted from the mitochondrial outer membrane by Msp1 to the ER. Newly synthesized ER TA proteins are delivered to the ER by Get3, a chaperone dedicated to TA proteins in the cytosol, and its receptor Get1/2 on the ER (together called the GET system). Therefore, we examined if Pex15 Δ 30 mistargeted to mitochondria also depends on the GET system for its transfer to the ER using *get3* Δ and *get1* Δ *get2* Δ strains. The results

showed that the transfer of Msp1-extracted Pex15 Δ 30 from mitochondria to the ER was dependent on the GET system. However, when Msp1 was overexpressed, a fraction of mistargeted Pex15 Δ 30 could be transferred to the ER even in *get3* Δ and *get1* Δ *get2* Δ cells, suggesting that there is a pathway for mitochondria-to-ER transfer independent of the GET system, albeit with low efficiency (Matsumoto, Ono et al., *JCB* accepted, 2022). Whether this pathway requires the mitochondria-ER contact is an interesting question, and will be a subject of future studies.

Molecular mechanism of β -barrel protein folding by a mitochondrial outer membrane translocator, the SAM complex.

The mitochondrial outer membrane contains β -barrel membrane proteins such as porins and Tom40, which mediate the exchange of small molecules, ions, and proteins between the cytosol and mitochondria and are essential for mitochondrial functions. The SAM complex in the mitochondrial outer membrane is a translocator responsible for the formation of the β -barrel structure of these proteins and their incorporation into the outer membrane. We have previously determined the high-resolution structures of the two forms of the SAM complex, each of which contains different subunit proteins (Takeda et al., *Nature* 2021). We revealed a novel mechanism (β -barrel switch model) in which the SAM complex switches its subunits (Sam50 and Mdm10) with the β -barrel protein substrate to promote its formation of the β -barrel structure and its insertion into the outer membrane. In this study, we have determined the cryo-EM structure of the complex (β -barrel forming intermediate) of the SAM complex and a substrate Tom40 (in preparation). The mechanism of the SAM-mediated β -barrel folding is completely different from the one mediated by the bacterial BAM complex, and therefore, it is extremely interesting to know how this mechanism was acquired evolutionarily.

4. 論文, 著書など(2021.4~2022.3)

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.* May 288, 3285-3299 (2021).

Y. Araiso, K. Imai, and T. Endo (Review), Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate. *FEBS J.* Sep;288, 5300-5310 (2021).

K. Kimura, F. Kawai, H. Kubota-Kawai, Y. Watanabe, K. Tomii, R. Kojima, K. Hirata, Y. Yamamori, T. Endo, Y. Tamura. Crystal structure of Tam41 cytidine diphosphate diacylglycerol synthase from a Firmicutes bacterium. *J. Biochem.* 171, 429-441 (2022).

Y. Araiso, K. Imai, T. Endo (Review), Role of the TOM complex in protein import into mitochondria: structural views. *Ann. Rev. Biochem.*, in press (2022, online published Feb 14, 2022).

S. Matsumoto, S. Ono, S. Shinoda, C. Kakuta, S. Okada, T. Ito, T. Numata, T. Endo. GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. *J. Cell Biol.* 221, e202104076 (accepted on March 14, 2022).

松本俊介, 遠藤斗志也 ミトコンドリア AAA-ATP アーゼ Msp1 による誤配送タンパク質の配送校正機構 (みにれびゅう) 生化学 93, 512-516 (2021)

竹田弘法, 荒磯裕平, 遠藤斗志也. ミトコンドリアへのタンパク質搬入口と膜組み込み装置の構造生物学~TOM 複合体と SAM 複合体のクライオ電子顕微鏡構造 in 「ミトコンドリアダイナミクス~機能研究から疾患・老化まで」 (NTS, 全 458 頁) 第 1 編, 第 7 章, 第 1 節 pp197-202 (2021)

竹田弘法, 遠藤斗志也. SAM 複合体によるミトコンドリア β バレル膜タンパク質の膜組み込み (トピックス) 生物物理 61, 392-394 (2021)

5. 学会発表など(2021.4~2022.3)

(招待講演)

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリア外膜蛋白質挿入装置のクライオEM構造, 日本顕微鏡学会 第77回学術講演会シンポジウム「クライオ電子顕微鏡による最新の成果」, つくば市+ハイブリッド, 2021.6.14-16, 国内, 口頭

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリアタンパク質膜挿入の構造基盤, 第21回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「高速分子動画: タンパク質の構造機能相関研究の最先端」, つくば市+ハイブリッド, 2021.6.16-18, 国内, 口頭

Toshiya Endo, (Plenary lecture) Protein machineries that make and maintain mitochondria 35th Annual Symposium of the Protein Society, オンライン, 2021.7.7-14, 国外, 口頭

遠藤斗志也, タンパク質の細胞内配送原理の再構築, 第94回日本生化学会大会 シンポジウム「マルチファセット・プロテインズ: 拡大し変容するタンパク質の世界」, オンライン, 2021.11.3-5, 国内, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, ミトコンドリア AAA-ATPアーゼMsp1による誤配送タンパク質の配送校正機構, 第94回日本生化学会大会シンポジウム「多面的ミトコンドリア機能による生命機能制御」, オンライン, 2021.11.3-5, 国内, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, Proofreading of protein mislocalization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1, 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「オルガネラ膜タンパク質の標的化と品質管理」横浜+ハイブリッド, 2021.12.1-3, 国内, 口頭

Yuhei Araiso, Akihisa Tsutsumi, Kenichiro Imai, Takuya Shiota, Hirotatsu Imai, Kana Kuzasa, Noriyuki Kodera, Masahide Kikkawa, Toshiya Endo, Structural analysis of the mitochondrial protein import gate by near-atomic resolution snapshot and nanoscale video imaging, 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「多様なミトコンドリアの戦略: 強く健康なオルガネラ構築に向けて: Multifaceted strategies for keeping mitochondria strong and healthy」横浜+ハイブリッド 2021.12.1-3 国内, 口頭

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリアにおける β バレルタンパク質膜挿入の構造基盤 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「生命科学の根幹に迫るミトコンドリアダイナミクスの世界」, 横浜+ハイブリッド, 2021.12.1-3, 国内, 口頭

遠藤斗志也, (特別講演), タンパク質の交通が解き明かすミトコンドリア生合成の仕組み 第20回日本ミトコンドリア学会年会, 東京+ハイブリッド, 2021.12.9-10, 国内, 口頭

遠藤斗志也, (特別講演), タンパク質と脂質の輸送から見えてきたミトコンドリア生合成と機能維持の仕組み AMED難治性疾患実用化研究事業「多様なミトコンドリア病の遺伝子型/表現型/自然歴等をガイドラインに反映させていくエビデンス創出研究」班(村山班・小坂分担班)集中TR会議, オンライン, 2022.2.19, 国内, 口頭

(一般発表)

九笹 加菜, 今井 大達, 古寺 哲幸, 稲津 明広, 遠藤斗志也, 荒磯 裕平, 高速原子間力顕微鏡を用いた

ミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の動的構造解析, 日本生化学会北陸支部 第39回大会, オンライン, 2021.6.5, 国内, 口頭

荒磯 裕平, 包 明久, 今井 賢一郎, 塩田 拓也, 吉川 雅英, 遠藤 斗志也, クライオ電子顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の構造と機能, 日本生化学会北陸支部 第39回大会, オンライン, 2021.6.5, 国内, 口頭

小西雄大, 遠藤斗志也, 阪上春花, 竹田弘法, 齊藤知加, 酵母アルデヒドデヒドロゲナーゼ Hfd1の細胞内二重局在の分子機構, 第73回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2021.6.29-7.2, 国内, 口頭

阪上春花, 遠藤斗志也, 小分子輸送体ポリンによるタンパク質膜透過装置TOM複合体の機能制御の分子機構, 第94回日本生化学会大会, オンライン, 2021.11.3-5, 国内, 口頭+ポスター

Kana Kuzasa, Hirotatsu Imai, Noriyuki Kodera, Akihiro Inazu, Toshiya Endo, Yuhei Araiso, High-Speed atomic force microscopy analysis of the mitochondrial protein import gate TOM complex, 第44回日本分子生物学会年会, 横浜+ハイブリッド, 2021.12.1-3, 国内, ポスター

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(S)

課題名: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・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

篠田沙緒里: 【昭和女子大学 大学生向けラボツアー】

実施日時: 2021年7月5日, 2022年11月10日

場所: 遠藤プロジェクト研究室

内容: 昭和女子大学大学生 3名(7月), 2名(11月)に対し, 研究内容の紹介, 研究室ツアーを行った。研究プロジェクトの紹介をしつつ, 研究室内のさまざまな装置について詳細に説明を行った。

篠田沙緒里: 【未来館来館者向けラボツアー】

実施日時: 2021年8月25日 12:00-16:00

場所: 遠藤プロジェクト研究室

内容: 3階ハブスペース解放に際し, 興味を持った来館者に別途遠藤研の外からの見学と, 普段話すことのない研究者との対談を行った。

篠田沙緒里: 【仙台二校 高校生向けラボツアー】

実施日時: 2021年12月24日 11:20~12:00

場所: 遠藤プロジェクト研究室

内容: 仙台二校の高校生 5名に対し, 研究内容の紹介, 研究室ツアー, 事前に受け付けた質問の回答を合わせた対談を行った。研究室ツアーではミトコンドリアを染色した生きた状態のヒト培養細胞を蛍光顕微鏡を使って実際に観察してもらった。

4) 受賞等

2021年7月 2021 Hans Neurath Award (The Protein Society)

受賞事由 Contribution to the fields of intracellular protein sorting and mitochondrial biology

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反応しない、てんかんを発症しないマウスであることを証明したことによる。加えて、てんかん発症に 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。

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）が、てんかん発作を重積すると、糖尿病を発症し、肥満を呈することがわかってきた。令和3年度には、てんかん発作が20日以上続くと、てんかん発作を示した後に血糖値を亢進し、脳、脂肪組織の重量が増加することを見つけている。現在、扁桃体刺激がもたらす血糖値亢進の原因の究明を目指している。人では、糖尿病が、てんかんを発症の高リスク要因であることや、その逆にてんかんが、心臓血管系発症の高リスク要因であることが知られていることから、てんかんモデルマウスの血糖値亢進の原因の究明は、人に外挿できると思われる。

(1)-2. 視床—大脳皮質神経回路の可塑性に関わるシアル酸転移酵素（St3gal14）の機能解明

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（St3gal14）を欠損したマウスは、てんかん発症を消失した副作用として、うつ、不安障害、睡眠障害を発症するマウスであった(JNC, 2014)。また、この欠損マウスは、聴覚性プレパルス抑制の低下も示すことがわかってきている。この表現型は、ドーパミンD2受容体拮抗薬ハロペリドールや、ドーパミンD2受容体及びセロトニン2A/2C受容体拮抗薬クロザピンの投与で回復する。St3gal14は、視床ニューロンが刺激に反応して発現することから、St3gal14が欠損することで、視床—大脳皮質神経回路を介して、大脳皮質にあるドーパミン受容体やセロトニン受容体に影響を与えたと考えられる。これまでに、St3gal14^{mCherry/+}ノックインマウスの透明化脳の観察により、視床のSt3gal14発現ニューロンが大脳皮質に軸索を伸ばしている像を観察している。今後は、視床—大脳皮質神経回路における構造可塑性の変化を捉えて、ドーパミン受容体やセロトニン受容体を持つ大脳皮質ニューロンへの投射経路を観察し、St3gal14の機能解明に結びつけていく。

脳幹にある視床と呼ばれる領域は嗅覚を除いた聴覚、視覚、体性感覚などの感覚入力を大脳皮質へ中継し、大脳皮質は高度な情報処理をおこなう。しかし、視床に入力されたすべての情報が大脳皮質へ伝達されるわけではなく、必要な情報が選別され、大脳皮質へ送られる。これを視床ゲート機構といい、視床は感覚情報処理において重要な役割を担う。この視床ゲート機構に St3gal4 の関与が示唆される可能性を明らかにする。

2) 精神神経疾患の発症機序と代謝との関連性

側頭葉てんかん～うつ・不安症が発症すると、大脳辺縁系を中心とした神経回路の可塑的变化をもたらすと考えられる。その結果、大脳辺縁系に含まれる視床下部を介した代謝変化が生じると考えられる。

そこで、「気持ちの沈みや不安」を感じている状況から「うつ・不安症」と診断がつく状況に推移する早い段階で、代謝の変化を介した、うつや不安症の診断システムを開発してきた。これまでに高齢者とうつ・不安症モデルマウス、さらに側頭葉てんかんモデルマウスの尿中揮発性有機化合物 (volatile organic compounds, VOCs) を固相マイクロ抽出 (SPMI) ーガス chromatography ー質量分析 (GC-MS) により計測してきた。その結果、うつ・不安症バイオマーカー群 (ヒトとマウス) と側頭葉てんかんバイオマーカー群 (マウス) を発見した。令和3年度においても、尿中 VOCs 検査方法の拡大を進めていた。

また、マウスのうつ・不安症バイオマーカー群と側頭葉てんかんバイオマーカー群である尿中 VOCs から、うつ・不安症や、側頭葉てんかんの発症に相関性を示す体内代謝系の変化を捉えることに成功した。さらに、ヒトとマウス共に同じ代謝系に乗る代謝産物・バイオマーカーが存在することも見つけている (令和3年度投稿中)。今後、ヒト、実験動物への実装や技術応用を目指している。

2. 本年度の研究成果

令和3年度は、準備の年であった。原著論文の発表には未だ至らなかったが、側頭葉てんかんの共存症である糖尿病性肥満の原因が、扁桃体を発火点とするてんかん重積による血糖値の上昇が原因であることを証明した (研究概要(1)-1)。また、St3gal4^{mCherry/+}ノックインマウスが完成し、視床ニューロンで発現する St3gal4 が、視床から大脳皮質に投射していることを発見した (研究概要(1)-2)。最後に、平成28年度以降、代謝負荷に関わる精神疾患の発症に着目し研究を進

めてきた、高齢者うつ・不安症バイオマーカー群および、フレイルバイオマーカー群の発見を記した特許出願が特許化された (特許7057996)。



図2. 二次判別関数による分析により、うつマウスのうつ及び/又は不安症を判定

尿中代謝産物 (VOCs) は、4種の代謝経路から産生された最終代謝産物であり、黄色、青、赤、緑に分類できた。マウスのてんかん、うつ不安症、及び、ヒトのうつ・不安症の判定には、二次判別式で決定する。

3. Research projects and annual reports

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

Epileptic model mice and stress-sensitive model mice showing 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 clarify causal molecules by histological and biochemical studies. The other goal is to develop diagnostic methods and therapeutics based on such metabolic associations. 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. We have found two molecules responsible for epileptogenesis using kindled mice: a growth hormone and a sialyltransferase.

First, we found that the expression of growth hormone was up-regulated along with neural circuits during epileptogenesis. The administration of the hormone into the hippocampus markedly enhanced the progression of kindling. We performed the infusion tests of growth hormone and its receptor antagonist. It showed that the expression of Arc mRNA was strongly correlated with locomotor activity and that the correlation completely distinguished among vehicle, growth hormone, and the receptor antagonist groups. This year, we found that when epileptic seizures continue for more than 20 days, blood glucose levels increase just after epileptic seizures, and brain and adipose tissue weights increase daily. We are now trying to determine why the amygdala stimulation induced hyperglycemia.

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

The deficient mice also exhibited reduced auditory prepulse inhibition. While the thalamic neurons express St3gal4 in response to stimuli, the loss of St3gal4 may affect dopamine and serotonin receptor in the cerebral cortex via the thalamo-cortical circuit. This year, we succeeded in developing St3gal4^{mCherry/+} / St3gal4^{mCherry/-} knock-in mice. Then, we observed images of St3gal4-expressing neurons in the thalamus extending their axons to the cerebral cortex in the transparent brain of the knock-in mice. Next year, we will investigate changes in the structural plasticity in the thalamo-cortical neural pathway, in which cortical neurons that express dopamine and serotonin receptors connect with the thalamic neurons.

Third, we investigate the mechanisms of neuropsychiatric disorders and their metabolic correlations. Temporal lobe epilepsy and depression-anxiety cause plastic changes in neuronal circuits, mainly in the limbic system. Therefore, it suggested that metabolic changes via the limbic system's hypothalamus will occur. Then, we developed the diagnostic procedure for anxiety and depression involving the limbic system, which is associated with metabolism. So far, we have found anxiety and depression biomarkers in mice and human or temporal lobe epilepsy biomarkers.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

1. 藤田明子, Siriporn Tangsudjai, 奥野貴也, 太田 真菜美, 利川 泰博, 織田美伽, 加藤啓子 うつ・不安症モデル St3gal4欠損マウスにおける代謝変化 第94回日本生化学会大会 2021年11月3日~5日 パシフィコ横浜ノース (みなとみらい)
2. 田中 朋也, 利川 泰博, 太田 真菜美, 藤田明子, 加藤啓子 側頭葉てんかんモデルマウスのてんかん発作がもたらす共存症について-てんかん共存症としての肥満・糖尿病-第94回日本生化学会大会 2021年11月3日~5日 パシフィコ横浜ノース (みなとみらい)

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: 令和2-4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

獣医事審議会専門委員

次世代研究者挑戦的研究プログラム・事業統括「トランスファラブルスキルを身に付けた科学技術を牽引するリーダーの育成」(令和3年11月29日~令和8年3月31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し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) 共生微生物である根粒菌には、*Bradyrhizobium elkanii* 系統に多様な菌株が属している。*B. elkanii* 系統のヌスビトハギ連植物根粒菌 12 菌株についてドラフトゲノム配列を取得した。その塩基配列一致度を検討したところ、ダイズ根粒菌とよく似た特徴をもつことがわかった。なかでもアレチヌスビトハギから分離された 3 菌株は、特に高い一致を示した。3 菌株の共生特性を調べたところ、ダイズに有効な地上部の生育効果は見られず、不安定な根粒形成特性を示した。

(2) ダイズ根粒菌 *B. elkanii* HK4-10 と HK5-1 は、ITS 分子系統樹のダイズ根粒菌主系統群からはずれることから、共生関連因子の大規模な水平伝播が予想された。そこで、この2菌株の全ゲノム解読により、それぞれのゲノムは 9,513,838 bp、9,759,560 bp の長さであることを示し、9384 と 9270 遺伝子を予測した。さらに染色体上に、ゲノ

ミックアイランド (GI) をそれぞれ 14 箇所、25 箇所を予測した。その 3 箇所が主系統ダイズ根粒菌と共通であり、ダイズとの共生成立に重要な可動性遺伝因子としての情報が得られた。HK4-10 ゲノムに予測された GI を *B. elkanii* USDA61 の GI と比較し、4 つの共通した GI を見つけた。これらの中には共生アイランドが含まれる。共生アイランドを比較すると、異なる配列やユニークな領域を持つことが分かった。T3SS 遺伝子クラスターには、*nopL* に IS が挿入されていること、*rhcC3* の欠損が見つかった。これらが HK4-10 の共生特性に関与しているかもしれない。また、GI 比較とリファレンスマッピングから、HK4-10 に特異的に存在する GI を検討し、脱窒過程に寄与する *nir-nor* 遺伝子クラスターを持つ GI を見つけた。

(3) 栽培イネ共生細菌 *Azospirillum* sp. B510 株の接種が *Rorippa aquatica* 地上部に及ぼす効果を観察し、16S メタゲノム解析による細菌叢変動のデータを得ることを試みた。接種による異形葉誘導と生育向上について反復実験を行ったが、再現性ある結果を得ることができなかった。地上部生育は安定せず、*Azospirillum* の植物体定着を示すデータが得られなかった。また、細菌叢に多く検出されるのは、*Rhizobium* 属が優先せず、代わりに *Paraburkholderia* 属が優先となる結果が多くなってしまった。今後、この接種実験条件などについて再検討が必要である。

3. Research projects and annual reports

Microorganisms colonize the plant body, many of which do not cause harmful damage to the host plant. It has been isolated from a variety of plants. Some have also been reported to enhance host plant growth, disease resistance, and environmental stress resistance. The application of these properties to plants by colonizing microorganisms has been studied in various fields because of its potential usefulness as a material for agricultural production. We have studied the genomes of environmental microorganisms, especially plant-related bacteria, and reported the genetic information and diversity related to their life cycle and symbiosis. The interaction characteristics of such bacteria with plants are often not correlated with microbial lineages and vary among closely related lineages, so the factors are largely

unknown. In some cases, uncultured microorganisms account for the majority of such microbial populations according to environmental genome analysis. Based on the information obtained from genome research on plants and symbiotic microorganisms, research on symbiotic systems is being carried out with the aim of clarifying how plants and microorganisms can coexist.

(1) Various strains of *Bradyrhizobium elkanii* belong to the rhizobia. We obtained draft genome sequences for 12 *B.elkanii* strains of *Desmodieae* rhizobia. Their sequence identities revealed that they had characteristics similar to those of soybean rhizobia. Among them, three strains isolated from *Desmodium paniculatum* were found to have much in common with soybean rhizobia. When the symbiotic characteristics of the three strains were examined, no effective symbiotic effect was observed in soybean.

(2) Soybean rhizobia *B. elkanii* strains HK4-10 and HK5-1 were excluded from the main soybean rhizobia phylogroup in the ITS phylogenetic tree, suggesting a horizontal gene transfer of symbiosis-related factors. Whole genome sequencing of these 2 strains showed that each genome was 9,513,838 bp and 9,759,560 bp long, and predicted 9384 and 9270 genes. In addition, 14 and 25 genomic islands (GIs) were predicted on chromosomes, respectively. Three of the GIs were common to the main phylogroup soybean rhizobia, and information as a mobile genetic factor important for the establishment of symbiosis with soybean was obtained. The predicted GIs in the HK4-10 genome were compared with those in *B. elkanii* USDA 61 to find 4 common GIs. These include a symbiosis island. Comparison of the symbiosis islands revealed different sequences and unique regions. In the T3SS gene cluster, the insertion of IS in *nopL* and the *rhcC3* deficiency were found. These may be involved in the symbiotic properties of strain HK4-10. GIs specific to HK4-10 were examined by comparison and reference mapping, and found GIs with *nir/nor* gene-cluster that might contribute to the denitrification process.

(3) The effect of inoculation of *Azospirillum* sp. B510, an endophytic bacterium of cultivated rice, on leaf morphology of *Rorippa aquatica* was observed, and data of bacterial flora variation by 16S metagenomic analysis were obtained. Repeated experiments on induction of atypical leaves and growth improvement by inoculation

were carried out, but reproducible results could not be obtained. The shoot growth was not stable, and no data on the colonization of *Azospirillum* in plants were obtained. In addition, *Rhizobium* was not preferred in the bacterial flora, and *Paraburkholderia* was preferred instead. In the future, it is necessary to review the conditions of the inoculation experiment.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

濱崎祐也、蒲生雄大、南澤究、金子貴一、根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* HK4-10のゲノム比較解析、植物微生物研究会第30回研究交流会、オンライン、2018.9.8-10

6. その他特記事項

なし

細胞死研究室

Laboratory of Cell Death

准教授 川根公樹

Associate Prof. Kohki KAWANE, Ph. D.



1. 研究概要

本研究は、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。

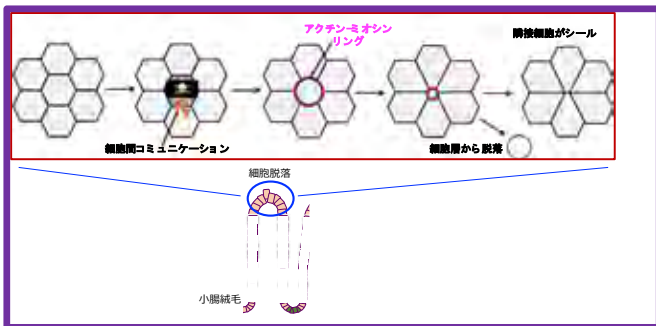


図1. 隣接細胞との相互協調作用によって実行される、社会的細胞終焉と位置付けられる「細胞脱落」

私たちは、細胞脱落の実行機構について解析を進め、これまでに「脱落する細胞は、脱落を実行しながらその側面から局所的に細胞外小胞を形成し、これを隣接する同種の上皮細胞が食食する」種を越え保存された現象を見出し、この小胞形成が細胞脱落の実行に必要な役割を担っていることを示してきた。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。加えて私たちは、細胞脱落における細胞間接着の動態についても解析を行っている。

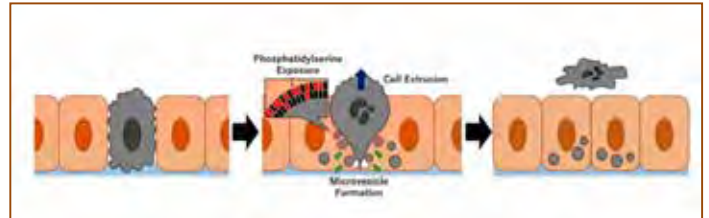


図2. 脱落細胞における局所的細胞断片化が脱落の実行を駆動する この断片化は、ホスファチジルセリンの露出が誘導する細胞外小胞の形成であることもわかった。

2. 本年度の研究成果

本年度は、これらに関して、以下のA,Bの研究を行った。

- A. 私達が見出した、脱落細胞における細胞外小胞形成について、その詳細な特徴づけ及び小胞形成が細胞脱落に果たす役割を明らかにする
- B. 私達が明らかにしてきたアドヘレンスジャンクションの細胞脱落の際の動態について、さらにその詳細を明らかにする

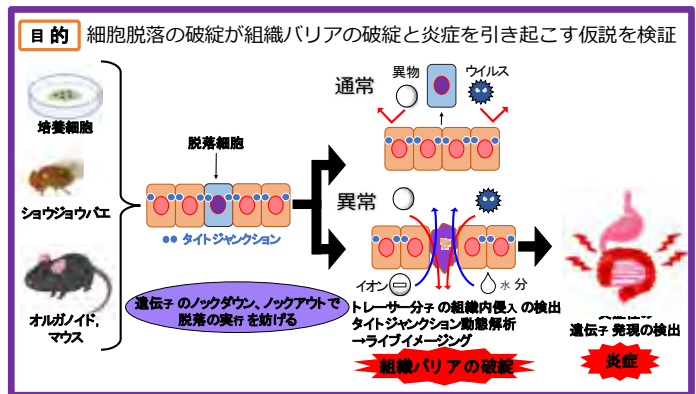


図3. 細胞脱落の異常と疾患の関連性の検証が可能になった。

A.については、この小胞が、それぞれ別の細胞外小胞として分類されている、マイクロベシクルとアポトーシス小体の双方の性質を併せ持つ可能性を見出した。また、細胞外小胞の形成は、脱落する細胞の占めていたスペースに、隣接細胞の侵入スペースを作って、その侵入により脱落を促進している可能性を示唆した。

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)。

B.については、アドヘレンスジャンクションの接着分子、カドヘリンに細胞質側で結合しているカテニンの動態を調べ、 β カテニンがカドヘリン同様、細胞脱落時に細胞境界から消失することを明らかにした。

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.

This year we performed mainly two studies. A. Regarding extracellular vesicles formed in extruding cells, we analyzed hallmarks of the vesicles and the role for cell extrusion. B. Regarding the dynamics of adherens junction during cell extrusion we analyzed the detailed dynamics of adherens junction by focusing molecules in adherens junction other than cadherin.

4. 論文, 著書など

1. Akihito Kira, Ichiko Tatsutomi, Keisuke Saito, Machiko Murata, Izumi Hattori, Haruna Kajita, Naoko Muraki, Yukako Oda, Saya Satoh, Yuta Tsukamoto, Seisuke Kimura, Hiroki Kato, Tsuyoshi Hirashima, Kohki Kawane: Extracellular vesicle formation mediated by local phosphatidylserine exposure promotes efficient cell extrusion. Research Square (preprint). 2022, DOI: 10.21203/rs.3.rs-257262/v2

5. 学会発表など

1. 吉良 彰人, 村田 真智子, 西藤 圭祐, 達富 一湖, 服部和泉, 梶田 春奈, 村木 直子, 小田 裕香子, 佐藤 沙耶, 塚本 雄太, 木村成介, 加藤 博己, 川根 公樹: 「ホスファチジルセリンの露出を介した細胞外小胞の形成が「細胞脱落」を促進する」(ポスター), 第 44 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2021 年 12 月
2. 西藤 圭祐, 吉良 彰人, 村田 真智子, 川根 公樹: 「細胞脱落における脱落細胞でのホスファチジルセリンの露出の役割」(ポスター), 第 44 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2021 年 12 月
3. 達富 一湖, 吉良 彰人, 村田 真智子, 西藤 圭祐, 服部和泉, 川根 公樹: 「細胞脱落の際に形成される細胞外小胞の性質と役割」(ポスター), 第 44 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2021 年 12 月
4. 上川瑠か, 梶田 春奈, 川根 公樹: 「細胞脱落におけるアドヘレンスジャンクションの動態解析」(ポスター), 第 44 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2021 年 12 月
5. 川根 公樹: 「細胞脱落の実行機構」(招待講演), 第 2 回細胞死コロキウム, 2021 年 11 月, オンライン

6. その他特記事項

- 1) 外部資金
武田科学振興財団 ビジョナリーリサーチ助成 (スタート)
課題名: 上皮、内皮のバリア破綻による疾患を社会的細胞死の視点から理解する
研究代表者: 川根公樹, 取得年度: R3 年
- 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



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。そのうち VANDAL ファミリーに関しては切り出しを指標とした転移能を持つ候補の特定をおこない、転移の痕跡を確認した。更に他のいくつかの転移能を持つ可能性のあるコピーを特定し、今後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。

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。

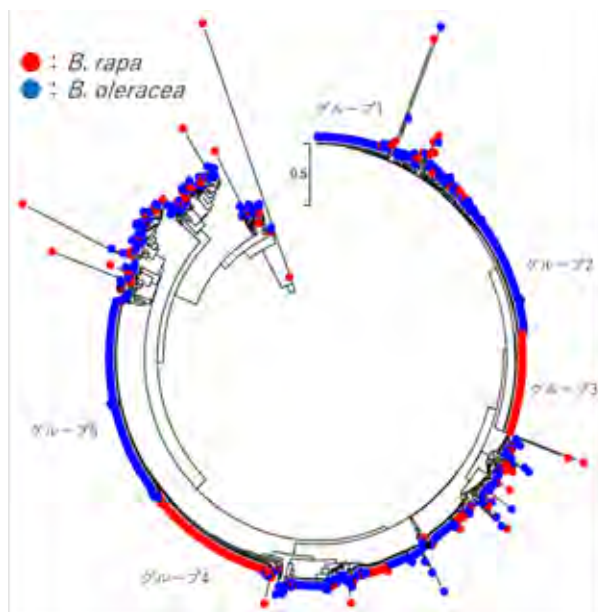


図. アブラナ属の EnSpm ファミリートランスポソンの系統樹

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

なし

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シロイヌナズナの PPR 遺伝子の機能喪失型変異 : 河邊昭, 西田早希, 降旗初佳 日本遺伝学会第 93 回大会 学習院大学 2021 年 9 月 8~10 日 (オンライン開催)

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

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。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を見いだした。

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

The addition of glycans to proteins is one of the important post-translational modifications. We have been investigating the roles of an O-linked sugar chain with, which is called a mucin-type carbohydrate. Its biosynthesis is initiated by a group of enzymes, polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts) that 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 extensively analyzing brain-specific GalNAc-Ts. We isolated *galnt9* and *galnt17* genes to generate a mutant P19 cell line, an embryonic carcinoma cell line that can differentiate into neural cells. We are generating *galnt9* and *galnt17* mutant lines to examine their roles during the neural differentiation.

4. 論文、著書など

なし

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



5. 学会発表など

なし

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

2) その他の活動

文系・理系 10 学部、約 1 万 5000 人が学ぶワンキャンパスが人材を育てる. プレジデント(プレジデント社) 2021.4.2

<https://president.jp/articles/-/43861>

多様な学生が集うキャンパスでの教育. 京都新聞 日本人の忘れもの 知恵会議. 2021.4.21

FM87.0 RADIO MIX KYOTO 開局 5 周年記念特別番組

「5LIVE! WAVE!!」学長スペシャルメッセージ 2021.5.22

新型コロナウイルスとの闘い -安全・安心なキャンパス-

国立情報学研究所シンポジウム 2021.6.11

新型コロナウイルス感染症への対応と対策 -安全で安心なキャンパスへの道- ふしみ人権の集い 2021 2021.7.3

外から見た薬学研究の魅力. 薬学研究奨励財団 薬奨ニュース, July 2021 No.33, p. 5

KBS 京都ラジオ にて放送される 70 周年ラジオオムニバス Sonosaki70~夢は叶う! 2021.9.16

「将棋はさすがが面白い」 研究生から送られた盤と駒を室に. 京都・滋賀日経懇話会 30 周年記念誌, 京滋のリーダーたち, 2021 年 9 月

KBS 京都 京都市ワクチンガイド「取り戻そう! 日常~新型コロナ第6波への備え」 2021.10.24

真贋を見極め, 正しく判断する. 京都新聞, 日本人の忘れもの 知恵会議. 2022.1.1

「大学での学び」と「社会での実践」を段階的に積み重ね, 社会で活躍できる人材を育成するリクルートカレッジマネジメント. Jan. - Mar. 2022, 231 号 pp. 26-27.

進化し続ける 京都産業大学の「教育力」. 読売新聞大阪本社版朝刊, 2022.3.18

人と人、地域・産業・世界をむすぶ人材育成 - 一拠点総合大学の利点を生かした教育- 大学時報 2022 年 3 月 pp. 10-15

一拠点総合大学ならではの学部・学生間の交流とデジタル教育改革の相乗効果でさらなる飛躍をめざす. 大学通信 卓越する大学 2022 年度版, pp.130-131

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。

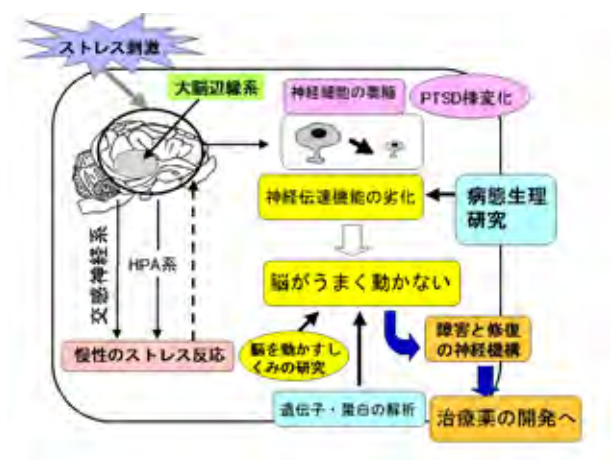


図 1. 本研究の概略

教授 齋藤 敏之

Prof. Toshiyuki Saito, DVM, Ph.D.



2. 本年度の研究成果

1) 高血圧の発症と脳のマイクログリア

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、持続的な動脈 (細動脈) の収縮を引き起こす。このような循環系の変化が脳内血流に影響を与える可能性がある。特に、血管運動中枢のある延髄において、何らかの血流変化が長期にわたって生じ、そのために正常な循環調節中枢の働きに異常をきたし、慢性的な高血圧の発症に結び付いていると考えられるが、その病態にはまだ謎が多い。この研究では、その病態を明らかにするために、高血圧自然発症ラットとその対照ラットを用いて、延髄における病態生理的变化を解析した。解析の結果、高血圧自然発症ラットでは、対照ラットに比べて、Iba-1 陽性細胞の突起の長さが短くなり、その数も減少する傾向が認められた。また、抑制性神経の数が減少し、軽度の傷害を有するニューロンが増えている可能性が示唆された。これらの変化は脳内の炎症によるものと考えられるが、マイクログリアの動態や炎症性 CD 抗原の発現変化などについて、今後、さらに解析する必要がある。

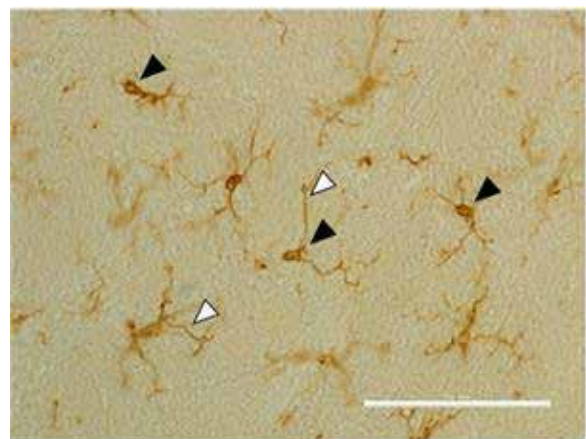
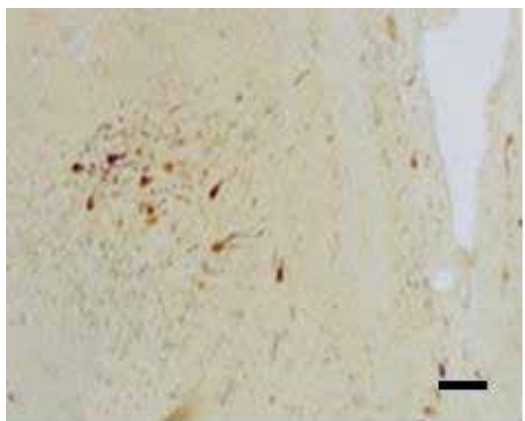


図2. 高血圧自然発症ラットの延髄における Iba-1 免疫陽性細胞の顕微鏡写真。黒矢頭は細胞体、白矢頭は突起を示す。スケールバー:100 μ m. DAB 発色像。

2) 幼若ラットにおける社会的孤立ストレスとオキシトシンの効果

視床下部で産生される神経ペプチドの一つ・オキシトシン (OXT) は、ストレス緩和や抗不安/抗恐怖作用を示すことが分かっており、今日、うつや自閉症など精神疾患の治療や機能性素材の開発などでも注目されている。

本研究は、幼若なWKYラットを用いて、精神的ストレスモデルの1つである社会的孤立ストレスモデルに対するOXTの効果調べた。実験的に社会的孤立ストレスを負荷した幼若ラットにOXTを経鼻接種すると、対照群と比べて、社会的孤立ストレスモデル群でオープンフィールド試験後半5分の移動距離やボックスの中央での滞在時間が増加する傾向が認められた。また、当該動物の脳切片を用いた免疫組織化学的染色により、OXT経鼻投与で、視床下部を含む周辺領域の神経が活性化されている可能性が示唆された。



社会的孤立ストレスラットの脳におけるオキシトシン免疫染色像(写真)。第3脳室の近傍に免疫陽性細胞が観察された。スケールバー:100 μ m. DAB 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.

Besides, another line of the study is progressed on the potential of oxytocin to suppress pathological changes of microglia under the stressful condition.

Research topics:

- 1) Development of detective techniques of degenerated neurons by stress-induced neuroinflammation in the brain,
- 2) How to induce neuro-protective or neuro-damaged microglia in the brain under the stressful conditions and in hypertension.
- 3) Social isolation stress and effects of oxytocin administration in the juvenile rats.

Annual reports:

1) Study on the morphological and functional changes of microglia and hypertension.

It is considered that increased activity of the rostral ventrolateral medulla (RVML) neurons, referring to cardiovascular center, is the primary cause of the essential hypertension. In the medulla oblongata, there exit the synaptic pathway for the arterial baroreflex, in which tonically inhibition via GABA transmission from the caudal VML (CVML) neurons is sent to the RVML. Therefore, we hypothesize that another cause for the essential hypertension may be attenuation of GABA-mediated inhibition from the CVML to the RVML. In this study, we have examined this possibility using the spontaneous hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats. In our present study, microglia possibly contribute to persistently neuroinflammation and the augmented sympathetic nerve activity via attenuating inhibition by GABA neurons in the

vasomotor center (RVLM) of the medulla oblongata, leading to hypertension in the SHR. Further studies are required to reveal the cause-effect relationship between central inflammatory responses and degeneration in the GABAergic neurons in this animal.

2) Study on social isolation stress and effects of oxytocin (OXT) in the juvenile WKY rats.

Recent studies have provided the finding that OXT is able to diminish/weaken the stress response and anxiety in human and animals. We have planned the present study if OXT may attenuate anxiety in the juvenile WKY rats exposed to social isolation stress. The stressed rats receiving nasal administration of OXT have shown a tendency for the increase in the total distance with walking for the latter 5 min and the period staying the central box area in the open field test than those of the control. Immuno-histochemical analysis in the brain of the present animals suggests some of the neurons might be activated in the hypothalamus nearby the third ventricle by nasal administration of OXT. The present findings support the thoughts that OXT might attenuate anxiety with social isolation stress even in the juvenile rat. Further examinations are required to reveal characteristics of the mechanism activating the hypothalamic neurons leading to attenuation of anxiety with application of OXT through the nasal mucosa in the juvenile rat.

4. 発表論文、著書など なし

5. 学会発表など (学会発表)

Shibutani, M., Yokoyama, K., Kawamoto, R. and Saito, T. Concomitant microglial activation with degeneration of GABA neurons in the medulla oblongata of the spontaneous hypertensive rats. The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society

and The 1st CJK International Meeting, Kobe, 2021. 0728-0731, 2P-135 (on-site and 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3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



研究室卒業生との記念写真

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* や *Shmt2* 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。さらに、*Pycr2* は脳において *Shmt2* の発現を制御していることを報告した(Escande-Beillard N. et al., 2020)。一方で、*Shmt2* KO マウスは胚性致死となり、胚発生に *Shmt2* が必要であることも明らかである。*Pycr2* や *Shmt2* のトランスジェニックマウスや組織特異的・時期特異的変異マウス、関連分子の変異マウスを作製・繁殖・解析して、*Pycr2* KO マウスや *Shmt2* KO マウスが示す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、胎生 6 日目~7 日目で胚性致死となることを明らかにしてきた。胎生 6 日目における *LRI* の発現パターンを調べたところ、*LRI* はエピブラスト全体で発現していることが分かった。さらに、初期胚発生に必須である基底膜のリモデリングとその制御に *LR1* が関与

する可能性について、*LRI* 変異マウス胚における基底膜の変化と基底膜分解酵素の発現を解析した。

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。中でも腎動脈の左右非対称性が初めに確立され、続いて左右対称にできた腎臓と腎静脈が左右非対称に位置変化することを明らかにしてきた。本年度は、腎動脈の左右非対称性が確立されるための分子機構を解析した。その結果、腎動脈を分岐している腹部大動脈において細胞増殖や細胞死が左右非対称に起こっていることを明らかにした。さらに、抗アポトーシス因子も腹部大動脈において左右非対称に発現していることを明らかにした。

3) 生体器官の機能における左右差の探索

左右非対称に形成される内臓器官において、左右の形態の違いだけでなく、機能にも左右に違いがあるのではないかと考え、本年度は肝臓のはたらきに関する左右の違いを探索した。マウス肝臓の左右2葉ずつを選び、各種アミノ酸の定量解析を行った結果、いくつかのアミノ酸において分葉間に差が見られた。

4) 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、毛周期や毛包の数の異常について解析を行った。

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、*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明らかにしてきた。さらに、毛周期を制御している毛乳頭細胞で *Pycr2* が発現していることを明らかにしてきたが、本年度、毛包幹細胞でも *Pycr2* が発現していることが示唆されたため、*Pycr2* KO マウスにおける毛包幹細胞数を解析した。また、*Pycr2* KO マウスにおける毛包の数の異常は、生後の早い時期から起こっていることが分かった。

Pycr2 KO マウスは、毛周期や毛包の数の異常以外にも、様々な早老症様の症状を示す。20 週齢以降の *Pycr2* KO マウスで観察される毛周期遅延が早老症の表現型であるかどうか確かめるために、野生型老齢マウスにおける毛周期と関連分子の発現を解析した。その結果、野生型老齢マウスは *Pycr2* KO マウスと同様の毛周期遅延を示

し、毛周期に関わる分子も、野生型老齢マウスにおいて *Pycr2* KO マウスと同様の発現量であることが分かった。

5) セリンをグリシンに変換する酵素 *Shmt2* の変異マウスの解析

Shmt2 KO マウスは胚性致死となることが報告されている。マウス胚発生における *Shmt2* の発現パターンを解析したところ、胚性7日目~8日目では胚全体で、胚性9日目では第一鰓弓、前肢の先端、神経管で発現していることが分かった。また、胚性9日目の *Shmt2* 変異胚の一部は胚のサイズが小さいことが分かった。

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 roles and transcriptional mechanisms of the genes that are asymmetrically expressed using 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 roles of amino acid metabolizing enzymes, *Pycr2* and *Shmt2*. We reported that the *Pycr2* KO mice showed a premature aging-like phenotype and *Pycr2* regulates *Shmt2* in the mouse brain (Escande-Beillard N. et al., 2020). The *Shmt2* KO mouse is embryonic lethal, suggesting *Shmt2* is essential for mouse embryogenesis. We want to clarify the mechanisms of the symptoms in these KO mice using 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 at embryonic

day 6 (E6) ~E7. We analyzed earlier stage embryos and found out that *LR1* is expressed in the epiblast at E6. We wanted to know whether LR1 regulates the basement membrane remodeling in the early mouse embryo, so we have analyzed the basement membrane and the expression of the matrix metalloproteinase in the *LR1* KO mouse embryos.

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

We have been studying the mechanism of L-R asymmetric morphogenesis in the kidney. 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 analyzed the molecular mechanism for the establishment of the L-R asymmetry in the renal arteries. The cell proliferation and cell death are asymmetric in the aorta from which renal arteries branch. Moreover, an anti-apoptosis factor is expressed asymmetrically.

3) Functional differences between left and right in visceral organs.

Several visceral organs are L-R asymmetrically formed. We thought that there might be also the functional differences between left and right in the visceral organs and searched for the difference in the free amino acid level between the left and right lobes of the mouse liver. There were differences in the amount of the several amino acids between lobes.

4) *Pycr2* KO mouse.

Pycr2 is an enzyme for proline biosynthesis. We have been analyzing the defects of the *Pycr2* mutant mice in the hair cycle and in the number of hair follicles.

In the *Pycr2* KO mice, the hair cycle had been delayed after the age of 20 weeks. This year, we analyzed the number of hair follicle stem cells where *Pycr2* may be expressed. We also found out that the number of hair follicles in the *Pycr2* KO mice is already more than in wild-type mice at 15 days old.

Pycr2 KO mice showed a premature aging-like phenotype. To confirm that the hair cycle defect in the *Pycr2* KO mice is a premature aging symptom, we investigated the phenotype of the aged mice. The aged

mice showed the delayed hair cycle and the expression of the molecules related to the hair cycle was also similar to that in the *Pycr2* KO mice.

5) *Shmt2* KO mouse.

Shmt2 is an enzyme for the conversion of L-serine to glycine. It was reported that the *Shmt2* KO mouse is embryonic lethal. We investigated the expression pattern of *Shmt2* in early mouse development. *Shmt2* is expressed in the whole embryo at E7~E8, in the first branchial arch, the AER region of the forelimb bud, and the neural tube at E9. Furthermore, we analyzed the defects of the *Shmt2* KO mouse embryos at the earlier development stage and found out some of the *Shmt2* KO embryos are smaller at E9.



4. 論文, 著書など

Sai X, Ikawa Y, Nishimura H, Mizuno K, Kajikawa E, Katoh TA, Kimura T, Shiratori H, Takaoka K, Hamada H, Minegishi K. Planar cell polarity-dependent asymmetric organization of microtubules for polarized positioning of the basal body in node cells. *Development*. 2022 May 1;149(9):dev200315.

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)

2) 学外活動

大学コンソーシアム京都 第27回FDフォーラム企画検討委員会 副委員長

大学コンソーシアム京都 第27回FDフォーラム第8分科会コーディネーター

血管と神経生物学研究室

Laboratory of Vascular and Neuronal Biology

教授 瀬尾 美鈴

Prof. Misuzu Seo, Ph. D.



1. 研究概要

私たちの研究室の目的は、病気の原因となる細胞内シグナル伝達の異常を明らかにし、シグナル伝達経路の中で特に異常な活性を示す分子を標的として、その分子の活性を制御することにより、患者の治療に役立つ方法を開発することです。現在は、がん患者の治療と遺伝性の疾患において、細胞増殖因子とその受容体、および下流のシグナル伝達経路に異常が見られる課題に取り組んでいます。これらの研究テーマは、がんの新薬(分子標的薬)の開発と再生医療に役立つ基礎研究となります。

2. 本年度の研究成果

1) 大腸がんのオルガノイド培養系の確立と FGFR3 発現による抗がん剤耐性の解析

[背景]FGFR(線維芽細胞増殖因子受容体)は、その異常発現や活性化によりさまざまながん細胞の増殖を促進し抗がん剤耐性を獲得させることが報告されている。FGFR3 は選択的スプライシングにより FGFR3IIIb と FGFR3IIIc が生成され、正常細胞では上皮系細胞で FGFR3IIIb、間葉系細胞で FGFR3IIIc の発現が見られる。しかしながら、正常上皮細胞のがん化とその後の悪性の進行により、FGFR3IIIc の発現が亢進することが報告されている。研究室の先行研究で、大腸がん細胞 Caco2 を用いて、FGFR3 の発現をノックダウンし、FGFR3IIIb または FGFR3IIIc を単独に発現誘導すると、FGFR3IIIc の方が FGFR3IIIb と比較して、より増殖促進効果が強いことが示された(図1)。

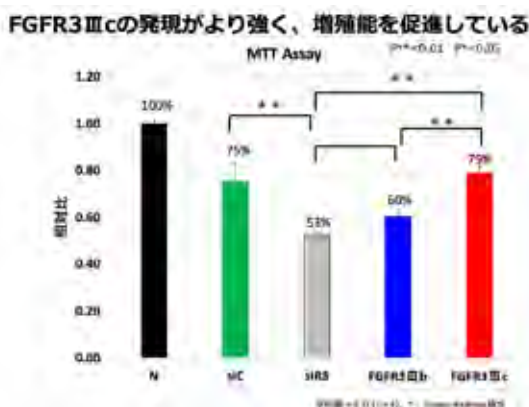


図1. FGFR3 スプライシングアイソフォームの大腸がん細胞 Caco2 を用いた細胞増殖への影響

同様に、浸潤アッセイでも FGFR3IIIc の方が促進効果が強く、大腸がんの標準治療薬である抗がん剤 5-Fu に対す

る耐性獲得の効果も強いことが示された。[目的]本研究において、大腸がん患者の検体から得られたがん組織を用いて、オルガノイド培養系を確立し、臨床においても FGFR3 の発現の亢進が抗がん剤耐性の獲得に寄与するかどうかを検証した。[結果・考察] 大腸がん患者由来の 29 検体を用いてオルガノイド培養系を試みたところ、19 検体でオルガノイドを確立することができた。オルガノイドを Matrigel や Matrimix(511)に包埋して培養したのち、切片を作成して組織免疫染色を行った。FGFR3 発現の見られるオルガノイド内部でも Ki67 陽性を示したことから細胞が増殖していることを示した。6検体から得られたオルガノイドを non-coating 96 well plate に播種し、一晚培養後に 5-Fu を添加して 4 日後に MTT assay を行い、60%生存率が得られる 5-Fu 濃度を比較した。さらに FGFR3 の mRNA 発現を qRT-PCR で解析し 5-Fu 耐性との関係を検討した。その結果、5-Fu に対する耐性と FGFR3IIIb または FGFR3IIIc の発現の間には、弱い正の相関が認められた。この結果は、FGFR3 の発現が 5-Fu の耐性獲得に関与していることを示唆している。今後は、オルガノイドの遺伝子発現の解析結果とがん患者の臨床情報との関連をさらに詳細に比較し、がん患者の治療に有効に活用できることが期待される。FGFR3IIIc が消化器系がん患者の治療予測マーカーとなりうるか、治療の分子標的として有用であるかを検討し、FGFR3IIIc シグナル制御による個別化医療への応用を目指した。

3. Research projects and annual reports

Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy

Deregulated expression of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and their ligands plays critical roles in tumorigenesis. The expression of an alternatively spliced isoforms of FGFR3, FGFR3IIIc, was analyzed by immunohistochemistry in samples from patients with esophageal carcinoma (EC). We found that the expression of FGFR3IIIc was higher in EC than in non-cancerous mucosa. In this study, clinical significance of the increased expression of FGFR3IIIc in the EC patients was examined. We found that Overall Survival in the EC patients with higher expression levels of FGFR3IIIc was shorter than that in those with lower expression levels of FGFR3IIIc ($P < 0.01$). Further, we examined the effect of FGFR3IIIc expression in cell proliferation, invasion, and drug-

resistance, using Caco2 cells as colorectal cancer. The knockdown of endogenous FGFR3 using siRNA treatment significantly abrogated cell proliferation and invasion and the overexpression of FGFR3IIIc in the cells with enhanced cell proliferation and invasion. In addition, the cells overexpressing FGFR3IIIc acquired the drug-resistance to 5-FU. The cell-survival and proliferation stimulating signaling molecules such as Akt, MAPK, PLC γ were activated by FGFR3IIIc expression. Thus, our results suggest that targeting FGFR3IIIc can be a promising strategy for EC and colorectal cancer therapy. Patient-derived cancer organoid is an important live material that reflects clinical heterogeneity. We are now preparing patient-derived cancer organoids from digestive cancer patients to evaluate targeting FGFR3IIIc.

Blockade of VEGF-A/NRP signaling pathway inhibits cell proliferation and invasion in Brain and Prostate cancer cells.

Background: Cancer proliferation and invasion is the most important processes of cancer progression. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) secreted from cancer cells stimulates not only angiogenesis but also cancer cell survival, proliferation, and invasion which eventually leads to cancer metastasis in cancer patients. Neuropilin-1 (NRP1) is a 130 kDa of single-transmembrane glycoprotein identified as a VEGF-A co-receptor. NRP1 and VEGF-A are highly expressed in lung, brain, colon, ovarian, and prostate cancer with poor prognosis. The purpose of this study is to evaluate whether the blockade of VEGF-A/NRP signaling pathway is useful for inhibition of cancer proliferation and invasion *in vitro*. Methods: PC3M (human prostate cancer) and U87MG, A-172 (human glioblastoma) cells were treated with siRNAs targeting VEGF-A, NRP1 and its downstream signaling molecules GIPC1 and Syx. The knockdown effects of these molecules were detected by western blotting, qRT-PCR and Transwell Invasion Assay. EG00229, small VEGF inhibitor that prohibits the binding VEGF-A to NRP1 was administered into U87MG cells and inhibited cells number were determined by cell migration, invasion, proliferation and colony formation assay. Results: In qRT-PCR and western blotting, VEGF-A, NRP1, GIPC1, Syx molecules were inhibited by respective siRNA treatment compared to siControl-treated cells. In PC3M cells, the invasion was suppressed by knockdown with siVEGF-A 33.8%, siNRP1 43%, siGIPC1 55%, siSyx 50% respectively. siGIPC1 was

the most effective inhibitor of PC3M cell. In U87MG and A-172 brain cancer cells, the invasion was suppressed by the knockdown using siRNAs with siVEGF-A 73.2%, siNRP1 75.6%, siGIPC1 71%, siSyx 63.8% and siVEGF-A 58.4%, siNRP1 62%, siGIPC1 53.5%, siSyx 67.2% respectively compared to siControl. siNRP1 and siSyx were the most effective inhibitor of U87MG and A-172 cells respectively. EG00229 inhibitor effectively inhibited the migration, invasion, colony formation and proliferation of U87MG cells with the most 100 μ M concentration. Conclusion: This study provides strong evidence for the importance of VEGF-A/NRP1 signaling pathway in two different cancer cells. Our results suggest that siRNAs treatment of VEGF-A/NRP1 signaling molecules suppressed invasion of PC3M, U87MG and A-172 cells and EG00229 inhibitor inhibited U87MG cells migration, colony formation and proliferation *in vitro*.

4. 論文, 著書など

瀬尾美鈴, 福光一生, 上田修吾, 上野信洋. 消化器系がんに見現する線維芽細胞増殖因子受容体 IIIc のがん悪性化メカニズムの解析と個別化医療への応用. 京都産業大学総合学術研究所報. 第 16 号 p101-116, 2021.7.30

5. 学会発表など

福光一生, 松本寛加, 中元萌, 三好雄大, 上野信洋, 上田修吾, 瀬尾美鈴. 大腸がん細胞における FGFR3 発現と抗がん剤耐性獲得. 第 67 回日本生化学会近畿支部例会、Web 開催、2021.5.29 (口頭発表)

Md.M. Hasan, A. Yamaguchi, M. Wake, S. Nakanishi, N. Ueno, M. Kurokawa-Seo: Inhibition of VEGF-A/NRP1 signaling pathway that promotes cancer cells invasion by RNA interference. 第67回日本生化学会近畿支部例会、Web開催、2021.5.29 (口頭発表)

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: 糖脂質代謝異常症を伴う GnRH 分泌不全発症: 新規 FGF シグナリングの役割の解明

研究分担者: 瀬尾美鈴, 取得年度: R3-R5 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 94 回日本生化学会大会, 男女共同参画推進ワークショップ「ただいま創薬ベンチャー社長に挑戦中」
加藤珠蘭氏講演(株式会社ジェクスヴァル、代表取締役社長)の企画、および司会を担当。Web 開催、2021.11.4

瀬尾美鈴:京都府発明等功労者表彰審査委員として、第 65 回京都府発明等功労者の審査を行った。京都市、2021. 3.10



[写真]

左 2021.11.18 Hasan 君お誕生日お祝い

左下 2022.2.26 卒業研究発表会

右 2022.3.20 令和3年度卒業式&修了式

感染症学研究室

Laboratory of Infectious Disease

1. 研究概要

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

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

2. 本年度の研究成果

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

昨年につき、北海道から鹿児島県まで全国各地で H5 亜型高病原性鳥インフルエンザが検出され、30 農場の発生事例が起こり、200 万羽近い鶏が殺処分された。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。2021 年秋に H5N8 亜型ウイルスによる発生で始まり、年末から H5N1 亜型ウイルスによる発生に変わっており、国内に複数の異なるウイルスが、国内に侵入したと考えられる。また、北海道の広範囲な地域において、4 月下旬まで猛禽類やカラスなど死亡野鳥の感染事例が報告され、さらにキツネとタヌキといった野生動物においても感染事例が報告された。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、琵琶湖周辺および山陰地方の調査において糞便試料を採取しウイルス分離を行い、低病原性鳥インフルエンザウイルス 4 株を分離した。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、今後も野鳥のウイルスを継続して監視する必要がある。

教授 高桑 弘樹

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



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.

Continuing from last year, H5 subtype highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) were detected nationwide from Hokkaido to Kagoshima prefecture, outbreaks occurred on 30 farms, and nearly 2 million birds culled. It can be surmised that migratory birds brought the viruses into Japan and wild birds or animals spread them onto the farms. It started with the outbreak of H5N8 type virus in the fall of 2021, changed to H5N1 type virus from the end of the year, and it is thought that several kinds of viruses were introduced. In addition, in a wide area of Hokkaido, cases of infection of dead birds such as birds of prey and crows were reported until the end of April, and cases of infection were also reported in wild animals such as foxes and raccoon dogs. We surveyed AIVs in wild waterfowl in

this winter in the San-in district. Four strains of low-pathogenic avian influenza virus strains were isolated. 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

Natori Y, Kinase Y, Ikemoto N, Spaziani F, Kojima T, Kakuta H, Fujita J, Someya K, Tatenuma K, Yabuta T, Takakuwa H, Otsuki K. Activated Carbon Impregnated with Elementary Iodine: Applications against Virus- and Bacteria-Related Issues. *Journal of Carbon Research*. (2021) 7, 86.

5. 学会発表など

なし

6. その他特記事項

1) 外部資金

キャノン財団研究助成プログラム「善き未来をひらく科学技術」
課題名: 遺伝子改変鶏を利用した新規ワクチン生産プラットフォーム、研究代表者: 西島謙一、R3-R6 年 (3 年)

2) 知財権等

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

北米に侵入したオオスズメバチの起源個体群の推定(小田 陸斗)

アメリカのワシントン州とカナダのブリティッシュコロンビア州で、2019年にアジア原産のオオスズメバチ *Vespa mandarinia* が相次いで発見された。これらの地域は、両国の国境周辺に位置している。アメリカ大陸には、もともとスズメバチ属のグループが生息していないため、船や飛行機のコンテナなどに紛れて侵入したと考えられている。スズメバチの中でもオオスズメバチは、攻撃性が高いこと、ミツバチを捕食すること、昆虫の上位捕食者であることから、刺傷被害、養蜂業や生態系への影響が懸念されている。発見された地域では、2021年までに複数の巣が発見されたことから、すでに定着していると推定されている。北米に帰化したオオスズメバチは、侵略的外来種であることから、根絶のため早急に侵入起源を特定し、新たな侵入を防ぐ必要がある。本種は、生息地により体色変異を持つことが知られている。北米に侵入した個体は、成虫の体色模様から中国・朝鮮半島・日本との類似性が指摘されている。本研究では、東アジアと北米の個体を対象に遺伝子型解析による侵入起源地の推定を行った。はじめに、次世代シーケンサー(NGS)を使用して、国内4地域と韓国、アメリカ、カナダ、中国のミトコンドリアゲノム全長配列を構築し、分子系統解析を行った。その結果、カナダは日本と同じクレードに、アメリカは韓国と同じクレードに属することが判明した。カナダに帰化した個体は、日本から侵入したことが推定される結果を得た。そこで、カナダの個体が起源とする国内地域の特定を行うため、ミトコンドリアDNAの全長配列から、種内変異の大きい領域を解析するためのシーケンスプライマーを設計した。



准教授 高橋 純一

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



また、NGS データを基にマイクロサテライト DNA マーカーを設計し、これらのプライマーを用いて31個体群195個体からハプロタイプとDNA多型データをもとにカナダに帰化したオオスズメバチの起源個体群について推定を行った。

西表島におけるマドボタル属2種の遺伝的多様性について(永野 壮太郎)

西表島は、沖縄本島から約400km南西にある八重山諸島のひとつで、年平均気温は約24度、年間降水量は約2200mm



の亜熱帯多雨林の生態系を形成している。世界的に見ても、特に生物多様性の高い地域であることから、2021年7月に世界自然遺産に認定された。西表島には約3000種の昆虫が確認されており、南西諸島において面積に対する種数の比率が一番高い。南西諸島にホタル科は6属8種生息している。マドボタル属は、八重山諸島で種分化し、種多様性が高いことが確認されている。西表島には、ヤエヤママドボタル *Pyrocoelia atripennis* (左)とサキシママドボタル *Pyrocoelia abdominalis* (右)の2種が分布している。現在西表島は、観光開発により商業施設や道路の整備が進んでいる。マドボタル属のメスは翅が退化しており、移動性が低いため生息地に道路が整備されると、移動が制限され生息地の分断化につながる。また、夜間照明の増加は、発光により繁殖相手を見つけるホタルにとって、交尾かく乱が起きることも懸念されている。ひとつの生息地に形成される集団を局所個体群と呼ぶ。ホタルは複数の局所個体群が移住によって結びつき、より大きな個体群を形成するメタ個体群を形成している。生態系に配慮されていない無秩序な開発が進むと、局所個体群間の移動が制限されて、メタ個体群が分断化する可能性が懸念されている。ホタルは環境指標生物の1つであり、陸水域の環境が良好でないと生息することができない種である。生息地の減少および分断化が進むと、両種ともに遺伝的多様性の低下による絶滅リスクが高くなる。本研究は、2種のマドボタルにおける個体群間の分断化の有無や遺伝的多様度を明らかにし、環境開発による生物への影響を調査することを目的としている。はじめに、次世代シーケンサーによりミトコンドリアDNAの全長配列を解読した。そこから変異性が高い領域に種特異的のシーケンスプライマーを設計した。さ

らに NGS データからマイクロサテライト DNA 領域を抽出し、PCR 用のマーカーを設計した。開発したこれらの DNA 多型解析用プライマーを用いて、ヤエヤマドボタルは、3 つの局所個体群から 50 個体、サキシマドボタルは 3 局所個体群から 18 個体の多型解析を行った。

絶滅が危惧されているノサップマルハナバチの遺伝的構造の解析と保全単位の設定(藤本 恵里菜)

マルハナバチは、ミツバチ科マルハナバチ属の総称で、ユーラシア大陸の温帯・亜寒帯を起源と



しており、世界に約 250 種が、日本には 14 種の在来種が生息している。国内では、北海道が最もマルハナバチの種多様性および生息数が多い地域で、在来種 11 種と外来種 1 種がいる。ノサップマルハナバチ *Bombus cryptarum florilegus* は、1953 年に北海道の根室半島の歯舞で個体が発見された。根室半島と野付半島の方に分布域が限られていることや、個体数が少ないため、保全に必要な生態情報が不足している。本種は、絶滅が危惧されていることから、環境省レッドリスト 2020 の準絶滅危惧種、北海道レッドリスト 2001 の希少種に指定されている。保全単位は、地域の遺伝的多様性を失わないように、絶滅しやすい種を保護する場合に設定する管理単位である。ノサップマルハナバチの場合、根室半島と野付半島間の距離は約 31km であることから、生息地が分断化され、遺伝子交流が困難であることが予測される。各半島を別の保全単位として設定すべきか、その妥当性を検証するために、両半島の遺伝的構造を解明する必要がある。本研究では、ノサップマルハナバチの保全を目的として、根室半島と野付半島の個体について遺伝的構造を解析した。次世代シーケンス(NGS)解析から得たリードをもとにミトコンドリア DNA の全長を構築・比較した。COXI 遺伝子領域に変異が見られたため、この領域にシーケンス解析用プライマーを設計し、ハプロタイプ多様度の解析をした。また、NGS データから 28 個のマイクロサテライト DNA マーカーを設計し、遺伝的多様度、遺伝子交流、近交係数(2 倍体雄頻度)、性決定遺伝子座数、血縁構造について分析した。ミトコンドリア DNA の結果から根室半島と野付半島の個体の遺伝的距離は、平均 0.00248 で、固有のハプロタイプが 1 個ずつ確認された。近縁種のエゾオオマルハナバチは、北海道内の集団間の平均遺伝的距離が 0.001 と 14 個のハプロタイプが見つかった。2 種の比較からは、ノサップマルハナバチの遺伝的多様性が低いことが推定された。マイクロサテライト DNA 多型解析では、遺伝子交流がない

こと、近親交配により発生する 2 倍体雄が検出された。また、野外調査時に、根室半島納沙布岬の草地で本種の野生巣を初めて発見し、個体の発見から 68 年にわたり不明であった本種の営巣生態に関してはじめて記録することができた。

3. Research projects and annual reports

Discovery of a mature nest of *Bombus cryptarum florilegus* (Hymenoptera: Apidae) from Nemuro Peninsula, Japan

The Japanese bumblebee *Bombus cryptarum florilegus* is threatened with extinction, and for the first time, a detailed study of their nests has been successfully conducted in the Nemuro Peninsula, Hokkaido Island. This bumblebee nested in a dead grass nest of small animals built in a closed space covered by grass on the ground. The number of cells in the nest was 511. It was estimated that 76 new queens were born in this nest, which was the largest among bumblebee species in Hokkaido. Adult new queens (average 5.36 mm in head width) were larger than those of workers (average 4.55 mm in head width). The sex ratio of the mature nest examined in this study was highly female-biased, suggesting the possibility of a split sex ratio in the Nemuro population. The nesting biology of *B. cryptarum florilegus* revealed in this study is essential for future conservation.

4. 論文、著書など

1. 高橋純一・前田美都(B4)・中川郁美(B4)・近野真央(M2)・新村友理(M2)(2022)LAMP法を用いたニホンミツバチとセイヨウミツバチのはちみつ判別法の開発.日本食品工学会誌.印刷中.
2. 小田陸斗(B4)・清拓哉・高橋純一(2022)対馬島に生息するオオスズメバチ(*Vespa mandarinia* Smith, 1852)のミトコンドリアゲノムの全長解析.長崎県生物学会誌.印刷中.
3. 浅見真莉(B4)・高橋純一(2022)リュウキュウヤマガメとヤエヤマセマルハコガメの体表からスワブで採取したDNAによる次世代シーケンス解析.爬虫類両棲類学会報.2022:110-117.
4. 高橋純一(2022)ニホンミツバチの未利用資源である発酵したハチミツの遊離アミノ酸組成について.日本栄養・食品学会誌.印刷中.
5. 藤本恵里菜(B4)・今野英生・高橋純一(2022)根室半島で見つかったノサップマルハナバチの成熟期の巣について.昆虫.25:9-13.

6. 高橋純一 (2022) ツマアカスズメバチの生態と防除. 森林技術. 2月号(958):16-19.
7. 高橋純一 (2022) 写真でみるミツバチの感染症第10回チヂレバネウイルス. 臨床獣医. 3月号:8-9.
8. 高橋純一 (2022) 写真でみるミツバチの感染症第9回サクブルード病. 臨床獣医. 1月号:2-4.
9. [Kishimoto Y.\(B4\)](#), [Okuyama H.](#), [Takahashi J.](#) (2022) Complete mitochondrial DNA sequence of the Eastern Asian catfish *Silurus asotus* (Siluriformes: Siluridae) from Lake Biwa in Japan. Mitochondrial DNA Part B. 7:356-357. Doi:10.1080/23802359.2022.2034546
10. [藤本恵里奈\(B4\)](#)・[高橋純一](#) (2021) 絶滅が危惧されるノサブマルハナバチ. 昆虫と自然. 56:38-41.
11. 奥山永・大庭伸也・清拓哉・[高橋純一](#) (2021) 対馬島に生息するチョウセンケナガニイニイ *Suisha coreana*(Matsumura,1927)のミトコンドリアゲノム全長解析. 長崎県生物学会誌. 88:28-32.
12. [近野真央\(M2\)](#)・[田村直也\(B4\)](#)・[高橋純一](#) (2021) ニホンミツバチのハチミツから単離された酵母 *Zygosaccharomyces siamensis* について. 京都産業大学総合学術研究所所報. 16:71-85.
13. 高橋純一 (2021) 実用化に向けて準備進むエゾオオマルハナバチ. ニューカントリー. 6月号. 19-20.
14. [Kishimoto Y.\(B4\)](#), [Okuyama H.](#), [Takahashi J.](#) (2021) Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese endemic catfish *Silurus biwaensis* (Siluriformes: Siluridae) from Lake Biwa. Mitochondrial DNA Part B. 6:2482-2483. Doi:10.1080/23802359.2021.1920487
15. [Kishimoto Y.\(B4\)](#), [Okuyama H.](#), [Takahashi J.](#) (2021) Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese endemic catfish *Silurus lithophilus* (Siluriformes: Siluridae). Mitochondrial DNA Part B. 6:2559-2561. Doi:10.1080/23802359.2021.1920486
16. Lu SS, [Takahashi J.](#), Yeh WH, Lu ML, Huang JY, Lin YJ, Sung IH. (2021) Evidence for Range Expansion and Origins of an Invasive Hornet *Vespa bicolor* (Hymenoptera, Vespidae) in Taiwan, with Notes on Its Natural Status. 12:320. Doi:10.3390/insects12040320
17. Jeong JS, Kim MJ, Park JS, Lee KH, Jo YH, [Takahashi J.](#), Choi YS, Kim I. (2021) 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. 24:135-147. Doi:10.1016/j.aspen.2021.03.004
18. Ilyasov RA., [Takahashi J.](#), Proshchalykin MY., Lelej AS., Lee MI, Kwon HW., Nikolenko AG. (2021) First Evidence of

Presence of *Varroa underwoodi* Mites on Native *Apis cerana* colonies in Primorsky Territory of Russia Based on *COXI* Gene. 65:177-187. Doi: <https://doi.org/10.2478/jas-2021-0014>

19. 高橋純一 (2021) 写真でみるミツバチの感染症第8回麻痺病. 臨床獣医. 11月号:2-4.
20. 高橋純一 (2021) 写真でみるミツバチの感染症第7回ノゼマ症. 臨床獣医. 9月号:14-16.
21. 高橋純一 (2021) 写真でみるミツバチの感染症第6回ヨーロッパ腐蛆病. 臨床獣医. 7月号:2-3.
22. 高橋純一 (2021) 写真でみるミツバチの感染症第5回チョーク病. 臨床獣医. 5月号:12-14.
23. 高橋純一 (2021) 写真でみるミツバチの感染症第4回アカリダニ症. 臨床獣医. 3月号:6-8.

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
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
 1. 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
 2. 高橋純一 近畿有害生物研究会:顧問



2021年度卒業生

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。

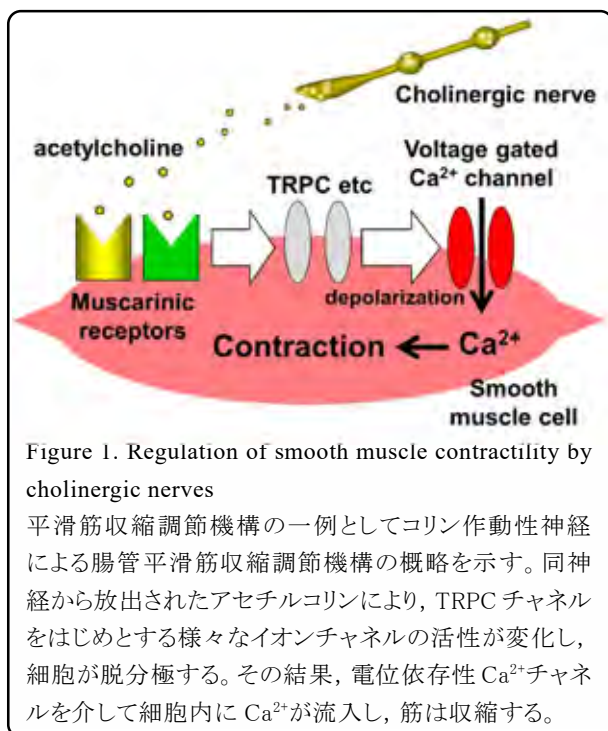


Figure 1. Regulation of smooth muscle contractility by cholinergic nerves

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学的性質、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) 消化管平滑筋の収縮は、腸内容物による組織の伸展によって変化することが知られている。この伸展刺激による調節は、機械刺激感受性イオンチャネルによって仲介されることが示唆されている。機械刺激感受性イオンチャネルは、内在性神経のみならず平滑筋細胞にも発現が知られているものの、そ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、機械刺激感受性陽イオンチャネルとして新しく同定された Piezo1 チャネルの腸管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、内在性神経細胞における Piezo1 チャネルの発現について検討するために、赤色蛍光蛋白質である tdTomato と Piezo1 の融合蛋白質を発現するレポーターマウスから神経細胞標本を作製して検討を行った。その結果、筋層間神経叢の一部の内在性神経細胞において Piezo1 蛋白質の発現が示唆された。

(2) 膀胱平滑筋の収縮はコリン作動性神経により興奮性に調節されている。コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンが平滑筋に発現するムスカリン受容体に結合すると、細胞膜が脱分極する。これにより平滑筋細胞に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャネル ($CaV_{1.2}$) が開口し、同チャネルを介した Ca^{2+} 流入が増加する。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加して筋が収縮する。この膜の脱分極には、非選択的陽イオンチャネルの関与が示唆されているものの、その分子実体については不明である。そこで、本年度はマ

ウス膀胱筋条片標本において、TRPC4/5 開口薬である (-)-englerin A を適用した時に発生する張力変化ならびに経壁電気刺激により誘発したコリン作動性収縮反応に対する TRPC4/5 阻害薬 pico145 の効果をそれぞれ検討した。その結果、膀胱平滑筋のコリン作動性収縮において TRPC4/5 は一部関与するものの、その寄与は小さいことが示唆された。

3. Research projects and annual reports

Research Projects:

(1) Mechanisms of gastrointestinal motility

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

Annual Reports:

(1) The contractility of smooth muscle changes in response to mechanical stretch caused by luminal contents in the gastrointestinal tract, mediated by mechanosensitive ion

channels. Mechanosensitive ion channels are expressed on smooth muscles and intrinsic neurons in the gastrointestinal tracts. However, the molecular identity of these channels and their physiological roles in regulating gastrointestinal motility remain 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, in gastrointestinal motility regulation. This year, we found expression of Piezo1 proteins on the isolated myenteric neurons of the gut, using the reporter mice in which Piezo1 proteins fused with a fluorescent tdTomato are expressed.

(2) The contraction of the bladder's smooth muscles is regulated by acetylcholine (ACh) released from cholinergic nerves, which acts on the muscarinic receptors. Stimulation of the muscarinic receptors by ACh induces a depolarization, opening voltage-gated Ca^{2+} channels (CaV_{1.2}). The increase in $[Ca^{2+}]_i$ results from Ca^{2+} entry into the cell through CaV_{1.2} channels. The activation of nonselective cationic channels has been suggested to be involved in muscarinic depolarization. However, the molecular identity of the cationic channels remains obscure. This year, to elucidate the involvement of transient receptor potential canonical (TRPC) 4/5 channels in the muscarinic contraction of bladder smooth muscles, we investigated the effects of a selective TRPC4/5 channel opener, (-)-englerin A, on muscle tensions and its selective blocker, pico145, on the cholinergic contractions evoked by electrical field stimulation, respectively, in murine bladder smooth muscles, suggesting a minor contribution of TRPC4/5 channels in the cholinergic contractions.

4. 論文, 著書など

該当なし

5. 学会発表など

Pimpjong Kiattisak, 水谷 太一, 松山 勇人, 棚橋 靖行, 海野 年弘: Possible involvement of transient receptor potential melastatin 4 channels in the adrenergic contraction in mouse prostate smooth muscles, 第95回日本薬理学会年会, 福岡市, 2022.3.7, 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, 薬理学・毒性学, 解剖生理学実習, 実験動物学実習, 基礎特別研究, 先端生命科学特別研究1, 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. 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(2021.10.7, 池田高等学校)。

iii. 京都産業大学オープンキャンパスにて実験紹介を担当した(2021.6.7)。



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、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

当研究室で同定した枯草菌 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。ここ数年で、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」を構築してきた。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てきた。(Fujiwara et al., Cell Rep. 2020)。最近、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) の開発も進めてきており、それを用い、タンパク質の co-translational な動的挙動をゲノムワイドに検出できるようになった。

(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。これらに共通の特徴を手がかりとし、前年度までに、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(Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021)。今回、そのサーチをさらに拡張し、30,000 種以上のバクテリアゲノムを対象にアレスト因子の探索を行った。その結果、新規アレスト因子をコードする可能性のある遺伝子が 10 種以上同定された。現在、これらがアレストを引き起こすか否かを検討中である。

3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM, which monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying this class of proteins called 'regulatory nascent chains', which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis on the ribosome. A remarkable property of this class of gene products is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those comprising the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the downstream target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, these regulatory nascent chains serve as a co-translational substrate of the protein localization pathway to be

monitored, such that the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the effectiveness of the localization machinery under given conditions of the cell. Thus, these nascent chains represent unique biological sensors that enable real-time feedback regulation of the target machinery. In the MifM regulatory system, its translation arrest is released when the nascent MifM chain, as a monitoring substrate of YidC (the regulatory target), engages in the YidC-mediated insertion into the membrane. The regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the capacity of membrane protein biogenesis. As introduced above, our interests are also focused more generally on the mechanisms of protein localization and biogenesis, the biological processes where nascent substrates undergo dynamic interactions with the machineries of translation, targeting and translocation. We envision that our research activities should ultimately lead to the development of a new research area that might be called “nascent chain biology”, which aims at understanding the still hidden principle of the central dogma of gene expression, where nascent chains are likely to play key roles.

This year's accomplishments

1) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics using a transposable 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 have recently 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 currently developed 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. This new method indeed allowed us to detect co-translational dynamics of nascent proteins in a genome-wide fashion.

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 have previously 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 (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021). We now continued our search across more than 30,000 eubacterial genomes and identified more than 10 candidate genes that may encode novel arrest peptides.

4. 論文, 著書など

原著論文

Takada H., Mandell Z., Yakhnin H., Glazyrina A., Chiba S.,

Kurata T., Wu K., Tresco B., Myers A., Atkinson G., Babitzke P., Hauryliuk V.; Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmlR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. Nucleic Acids Res. (2022) *in press*

日本語総説

千葉志信、茶谷悠平 (2021) 翻訳途上で機能する新生ポリペプチド鎖. 月刊細胞 53巻9号(2021年8月号), 525-528.

5. 学会発表など

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Hauryliuk、千葉志信: フィブロネクチン結合因子ホモログが駆動する新規翻訳品質管理機構の解析: 2021 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2021. 8. 30-31) オンライン

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Hauryliuk、千葉志信: 細胞内における動態を活写することで明らかとなってきた新規微生物翻訳品質機構の全貌: 第 19 回 微生物研究会 (2021. 10. 13) オンライン (招待講演)

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Hauryliuk、千葉志信: 微生物における新規翻訳品質機構 RQC の解析: 2021 年度ゲノム微生物学会 (2022. 3. 2-4) オンライン

千葉志信: タンパク質局在化装置に関連した翻訳アレスト因子の多様性と共通性: 2021 年度遺伝研研究会 (2022. 3. 8-9) 三島 (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・基盤研究 (C)

課題名: 非チャネル型タンパク質膜組込装置 YidC の分子機構

研究代表者: 千葉志信、取得年度: R3-R5 年 (3 年)

発酵研究所一般研究助成

課題名: グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明

研究代表者: 千葉志信、取得年度: R3-R4 年 (2 年)

科研費補助金・若手研究

課題名: 次世代型 TnDR 法による新生鎖動的挙動の網羅的解析

研究代表者: 藤原圭吾、取得年度: R3-R4 年 (2 年)

戦略的創造研究推進事業・ACT-X (環境とバイオテクノロジー)

課題名: 温故知新、翻訳装置に内在する微生物環境応答機構の理解

研究代表者: 高田啓、取得年度: R3-R5 (3 年)

2) アウトリーチ活動

模擬授業「私たちの生命活動を支えるタンパク質の世界」(三重県立上野高校)(2021/3/11): Zoom オンライン会議

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、特に感染症因子とホストであるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治癒する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

(1) 細菌タンパク質輸送装置の構造と機構の解明:

C. perfringens が持つ二成分毒素はアクチンをADPリボシル化するIaとこれをエンドサイトーシスを経て細胞内へ輸送する装置Ibからなる。この数年、クライオ電子顕微鏡によりIbの構造と機能に焦点を当てた研究を進めてきた。Ib膜孔とIa-Ib膜孔複合体の構造を明らかにしている。これに引き続き、抗生物質耐性菌が問題となり、その強毒化が懸念されている、二成分毒素CDTのクライオ電子顕微鏡により明らかにして、論文化に向けて検討している。

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

2. 本年度の研究成果

(1) トキシン膜透過システムの構造基盤

C. perfringens が持つ2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2.9Å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、2.9Åと2.8Å分解能での解析に成功した。この

結果から、以下のことがわかってきた(1)Iaは7量体のIb膜孔の一つに結合する。(2)IaはN末端のドメインで結合し、アクチンADPリボシル化活性を持つC末端ドメインは、その上に位置する。(3)IaのN末端はこの結合により末端の α ヘリックスが一部解ける。(4)このIaのN末端の先は、Ib膜孔の狭窄部位(直径6Å)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2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)。

ほぼこれと同時に、ディフィシル菌の2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2成分毒素を持ち、この2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つともにダイ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つ合わさったダイヘプタマーの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かと考え、その構造決定を進めてきた。界面活性剤LMNGの存在下で、CDTa結合したCDTb膜孔を調製、電子顕微鏡でのデータ測定と解析を進めてきた。その結果、ダイヘプタマーの14量体とともにイオタ毒素と同様の7量体のCDTb膜孔構造が存在していることがわかってきた。これにCDTaを加えて、クライオ電子顕微鏡での構造決定を行った。其の結果CDTa1分子がCDTb膜孔に結合した構造を明らかにした。この分解能は2.6Åである。さらに漏斗型の狭窄部位のひとつであるNSS-loopに二状態があることを見出し、これがCDTaとの結合とタンパク質透過に重要であることを検証している。

我々は、2成分毒素の構造だけでなく、細胞を対象にした in vivo アッセイおよび電気生理による膜孔測定すなわち in vitro アッセイの系を立ち上げて、機能を確認していこうとしている。さらに Ib を用いた膜孔タンパク質のデザインを目指している。nanopore を用いた DNA シーケンスはすでに実用化されている。同様に nanopore を用いたアミノ酸シーケンスは 20 種のアミノ酸を見分けることができるかどうか今後の課題であるが、それに適した膜孔タンパク質を用いることは重要であろう。これに向けて、Ib 膜孔は天然のタンパク質膜透過システムであり、これを用いた基礎と応用研究は重要であろう。

(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。面白いのは前述のイオタ毒素 Ib やディフィシル菌毒素 CDTb では最狭窄部位は Phe でできた ϕ クランプでできており、これがタンパク質膜透過に最も中であることはわかっている。一方、CPiLE-b のクランプ最狭部位は Ser であり、狭窄部位の大きさも疎水・親水といった違いもあり、どのような影響をしているのか興味深い。ここに焦点を置きながら、これらクロストリジウム属の2成分毒素の、タンパク質の輸送機構、毒性発現機構の全体を明らかにする。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。Ia-アクチン複合体、C3-RhoA 複合体、ScARP-グアニン複合体を明らかにしてきたが、このような研究は世界でもほとんどない。これらの研究により、ADP リボシル化はタンパク質のアミノ酸であれ、あるいは DNA の塩基であれ同じような認識機構で、基質を認識して ADP リボシル化するということを明らかにした。しかしながら、人 PARP (ポリ ADP リボシル化あるいはモノ ADP リボシル化) の認識機構はまだよくわかっていない。この解明のため、構造解析を進めている。

(4) スクミリンゴガイはアルゼンチン原産のリンゴガイ科の大型巻貝で、通称、ジャンボタニシと呼ばれる。日本では食用を目的として、持ち込まれたが、野生化した外来種で、稲を食害することから、防除対象となっている。田んぼで赤い卵

塊を目にするが、この卵に2成分毒素が含まれており、1つはレクチン、もう一つは膜孔毒素であることがわかっている。この卵塊から毒素を精製し、構造決定できないか検討を始めた。卵塊からと毒素を精製した。98KDa のバンドは還元剤存在下で、68KDa と 31KDa の2成分に分かれる。質量分析 MALDI-TOF を用いた mascot 解析から、スクミリンゴガイ由来の毒素であることを確認した。さらに精製した毒素成分が、インビトロで膜孔成分を膜孔化できないか検証をしている。

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) We are studying the two component toxin from *Pomacea canaliculata*. We purified the binary toxin from red egg of *Pomacea canaliculata* and ought to reveal the pore forming mechanism and function.

4. 論文著書など(2021.4~2022.3)

吉田徹、山田等仁、津下英明

日本結晶学会誌 v64(2), p69-76 (2022)

X線結晶学者のためのクライオ電子顕微鏡解析の手引き
クライオ電子顕微鏡による二成分毒素の構造解析：トキシン膜透過システムの構造基盤 (査読あり：総説)

5. 学会発表など

1) 山田等仁 “クライオ電子顕微鏡による *Clostridium perfringens* が産生する二成分毒素の膜透過に伴うアンフォールディング機構の解析”

第21回日本タンパク質科学会(富山) 2021.6.7~9

2) Tomohito Yamada, Akihiro Kawamoto, Toru Yoshida, Hideaki Tsuge “Cryo-EM analysis revealed translocation unfolding in *C. perfringens* binary iota toxin”

ETOX21 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins 2021) (オンライン) 2021.6.28-31

3) 山田等仁, 吉田徹, 川本晃大, 光岡薫, 岩崎憲治, 津下英明 “クライオ電子顕微鏡によって明らかにした二成分毒素の膜透過機構”

第67回トキシシンポジウム (オンライン) 2021.9.9~10

4) 川本晃大, 山田等仁, 吉田徹, 加藤貴之, 津下英明

“クライオ電子顕微鏡によるディフィシル菌由来の二成分毒素複合体の構造とそのタンパク質膜透過機構”

第46回ビタミンB研究委員会(京都楽友会館) 2021.11.27

5) 津下英明

S11 細菌毒素研究の新たな展開を目指して

“ウェルシュ菌およびディフィシル菌由来の二成分毒素：クライオ電子顕微鏡による複合体構造とその膜透過機構”

第95回日本細菌学会(オンライン) 2022.3.29~30 (招待講演)

6. その他特記事項

(1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名：クライオ電子顕微鏡によるタンパク質膜透過の動的構造解析 研究代表者：津下英明 取得年：2021~2023

(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 (10月まで)

(3) 受賞等

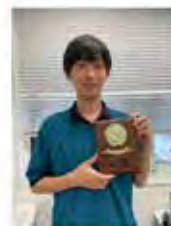
D2の山田等仁さんが、下記の3つの学会で受賞しました！

第21回日本タンパク質科学会 若手奨励賞優秀賞

ETOX21 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins

2021) Poster Prize

第67回トキシシンポジウム 若手優秀賞



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。

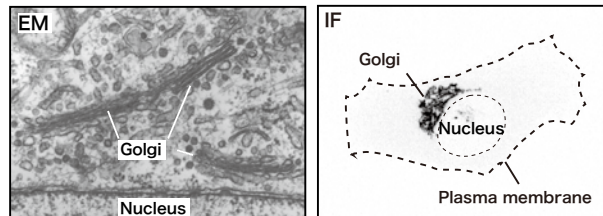


Fig. 1 The structure of the Golgi apparatus. (Left) Stacked cisternal structure. (Right) Ribbon like structure near the nucleus.

2. 研究テーマ

(1) ゴルジマトリクスタンパク質 GM130 のゴルジ体局在化機構と機能

GM130 はゴルジ体の *cis* 側に局在する表在性膜タンパク質であり、ゴルジ体の構造維持に働くとともに、ゴルジ体へのタンパク質局在化に機能していることが示唆されている。近年の我々の研究から、GM130 が 4 量体であり Y 型と I 型の 2 種の構造をとることが明らかとなっている (Ishida et al, *FEBS J.* 282, p2231-, 2015)。ネガティブ染色像を再度精査したところ、Y 型がさらに開いて T 型となり、これが 2 分子結合した十字型の分子と思われる像が発見された。これらの異なる構造型間の変換が GM130 に結合する小型 GTPase である Rab1 によって変化するかどうかを解析している。

(2) ゴルジ体に局在する 5 回膜貫通タンパク質群 YIPF の機能と局在化機構

YIPF タンパク質群は我々が 2003 年に同定したゴルジ体に局在する複数回膜貫通タンパク質群であり、GM130 や GRASP65 と協調してゴルジ体へのタンパク質局在や構造維持に機能している可能性がある。*Saccharomyces cerevisiae* には、Yip1p, Yif1p, Yip3p, Yip4p の 4 種の YIPF が存在し、一方、ヒト YIPF では、YIPF1~6, YIP1B, YIF1A, YIF1B の 9 種が存在する。また、*Saccharomyces cerevisiae* の Yip1p および Yif1p のホモログがベアとなって複合体を形成する (Shaik, et al., *Frontiers Cell Dev.*

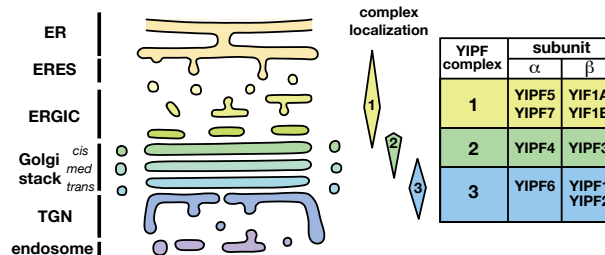


Fig. 2 Three YIPF complexes and their localization

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)。

YIPF の 3 種の複合体がどのような分子機構でゴルジ体の異なる部位に局在しているのか、また、それぞれの機能はどのように異なるかを、遺伝子ノックダウン法、遺伝子破壊法、変異遺伝子発現法などにより解析している。

(3) YIPF の発現・複合体形成調節機構

培養細胞に YIPF 遺伝子の翻訳領域のみを導入して発現を試みたところ、YIPF の α サブユニットの発現は β サブユニットに比べて極度に低かった。内在性 YIPF mRNA の発現情報を精査したところ、 α サブユニットが共通して長鎖の 3'UTR を持つことが明らかとなった (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
YIPF α 1A	YIPF5	3300	4000	+
YIPF α 1B	YIPF7	1000	ND	ND
YIPF α 2	YIPF4	1400	2300	++
YIPF α 3	YIPF6	4000	7500	+
YIPF β 1A	YIF1A	1000	2400	+++
YIPF β 1B	YIF1B	2200	6000	+
YIPF β 2	YIPF3	1500	2000	+++
YIPF β 3A	YIPF1	1700	2400	+++
YIPF β 3B	YIPF2	2200	2400	+++

YIPF の発現が長鎖 3'UTR によってどのように調節されているか、また、それ以外の調節機構があるかどうかを解析している。

3. 本年度の研究成果

YIPF α 1A のコーディング領域にネイティブの 3'UTR を付加し、HEK293 細胞に一過性に発現させると、コーディング領域のみと比べて発現量が 2 倍以上高くなるのが昨年度までに明らかとなっていた (Fig. 3A)。

ノザンプロットで YIPF α 1A の mRNA のサイズを解析したところ、3'UTR 配列の全長が転写されたと考えられる約 3300 base のバンド以外に、3'UTR 配列の中央付近で転写集結したと考えられる約 2000 base のバンド、また、コーディング領域のみで転写集結したと考えられる約 1000 base のバンドの 3 種のバンドが検出された (Fig. 3B, 矢印)。中でも、約 2000 base のバンドのシグナルは、コントロールに比較して顕著に強く、mRNA が増加していることが示唆された。3'UTR による YIPF α 1A の mRNA の発現量の変化を定量的に比較するために、qPCR によって解析したところ、コントロールに比較して 3'UTR の付加により、mRNA の発現量が 2.4 倍以上上昇していた。以上の結果から、YIPF α 1A の発現は、3'UTR の付加によって mRNA レベルで

上昇することが明らかとなった。

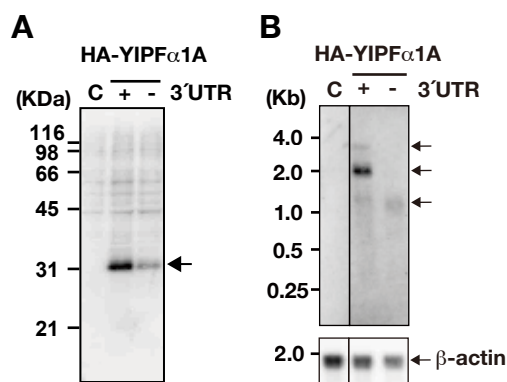


Fig. 3 YIPF α 1A expression is increased by the presence of 3' UTR by mRNA level HA-tagged YIPF α 1A coding region was expressed in HEK293 cells with or without native 3' UTR region. (A) The cell extracts were analysed by western blotting by HA antibody. (B) The RNA was extracted and analyzed by northern blotting using the YIPF α 1A coding region as a probe.

一方、YIPF α 1A の cDNA ORF には非最適コドンが多用されていることが判明したため、YIPF α 1A の cDNA ORF のコドンを最適化して、YIPF α 1A の発現量が上昇するかどうかを解析したところ、予想通り、コドンの最適化により YIPF α 1A の発現量が顕著に上昇することが明らかとなった (Fig. 4)。

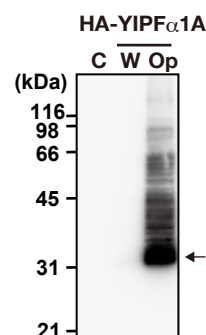


Fig. 4 YIPF α 1A expression is increased by the codon optimization HA-tagged YIPF α 1A coding region (WT) and codon optimized coding region (Op) were expressed in HEK293 cells. The cell extracts were analysed by western blotting by HA antibody.

以上の結果から、YIPF α 1A の発現は、非最適コドンの多用によって低く抑えられている一方で、長鎖の 3'UTR の付加によって mRNA レベルで発現低下が軽減されていることが明らかとなった。非最適コドンの利用によるリボソームの停滞が mRNA の分解を誘導することや、長鎖の 3'UTR の付加が mRNA の安定化を誘導することが知られている。したがって、YIPF α 1A の発現はこれらの調節機構を利用して巧妙に調節されている可能性が示唆された。今後、この調節機能の生理的意義をさらに明らかにしていく予定である。

4. Research projects and annual reports

The 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 by 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 reorientate the centriole to the front of the cells, which enables the directed movement of the cells. We found that the phosphorylation of GRASP65 is important for this reorganization of the Golgi apparatus (Bisel et al. *J. Cell Biol.* 182 p837).

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

Research Projects

(1) The function and localization mechanism of GM130

GM130 is a peripheral membrane protein localized at the Golgi apparatus. It was suggested to maintain the structure of the Golgi apparatus and be involved in the localization of the Golgi proteins. Recently, we have shown that GM130

is a tetramer of two structures that differs in the N-terminus; closed I-shape and open Y-shape (Ishida et al, *FEBS J.* 282, p2231-, 2015). The re-examination of the negatively stained pictures of GM130 revealed that X-shaped structures are supposed to be formed from two T-shaped structures binding at the open N-terminus. We are now examining how and whether these different structures are interchanged or controlled, especially by the binding of Rab1, a small GTPase.

(2) The analyses of the function and the localization mechanism of YIPF proteins

YIPF proteins are a family of multi-span transmembrane proteins localizing in the Golgi apparatus. They are predicted to bind to GM130 and/or 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).

We are examining the function(s) and the localization mechanism of three YIPF complexes at the different sub-compartment of the Golgi apparatus through gene knockdown, gene knockout, and gene expression experiments.

(3) The analyses of YIPF expression and complex formation

We have found that the transient transfection of the coding region of YIPF α subunits yields an extremely low level of the proteins in cultured cells in contrast to the β subunits. Close examination of the endogenous YIPF mRNA information revealed that the YIPF α subunits have longer 3'UTR in common (Table I). This suggested that the longer 3'UTR may enhance the expression of YIPF protein.

We are now examining whether and how the 3'UTR affects the expression of YIPF. Furthermore, we are exploring whether the expression of YIPF is controlled by other means.

Annual progress

Last year, we evaluated the role of the 3'UTR by transiently transfecting the coding region of YIPF α 1A with or without a native 3'UTR to HEK293 cell. As a result, the

protein expression was strongly enhanced with the addition of 3' UTR (Fig. 3A).

Northern blotting was performed to determine the size of the YIPF α 1A mRNA with or without the 3'UTR region (Fig. 3B). Three bands (ca. 3300, ca. 2000, and ca. 1000) were detected for the YIPF α 1A with the 3'UTR region. The signal of the 2000 base band was the strongest and the signal was stronger than the 1000 base band detected for the YIPF α 1A without the 3'UTR region. This suggested that the mRNA level was increased by the addition of the 3'UTR. Quantification by qPCR revealed that the mRNA level was increased 2.4-fold. The above results indicated that the expression of YIPF α 1A was increased in mRNA level by the addition of the 3'UTR.

It was found that YIPF α 1A has non-optimum codons in high frequency in the coding region. To examine whether the non-optimum codons affect the expression of YIPF α 1A, all the non-optimum codons were replaced with optimum codons, and the expression of YIPF α 1A was analyzed. Expectedly, the codon optimization strongly increased the expression of YIPF α 1A (Fig. 4).

Taken together, it was suggested that the expression of YIPF α 1A was suppressed by non-optimal codons, and this was relieved by the presence of the 3'UTR in the level of mRNA. It was reported that the high-frequency non-optimal codon usage induces the mRNA degradation while the presence of the 3'UTR stabilizes the mRNA. Therefore, the expression of the YIPF α 1A is thought to be finely regulated by these factors. The evaluation of this possibility is underway in this laboratory.

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: 4 件

Scientific Reports: 1 件

その他査読等

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

2020 Laboratory Members: 高司時生 Tokio Takaji (M1), 寺坂太賀 Taiga Terasaka (B4), 戸田万理 Mari Toda (B4), 河村駿吾 Shungo Kawamura (B4), 川口晴香 Haruka Kawaguchi (B4), 中西百合香 Yurika Nakanisi (B3), 仲本樹 Itsuki Nakamoro (B3), 宮崎怜那 Reina Miyazaki (B3)

ウイルス学研究室

Laboratory of Virology

准教授 西野 佳以

Associate Prof. Yoshii Nishino,

DVM, Ph.D



1. 研究概要

私達は多くの微生物に囲まれて生きている。ウイルスは微生物の一員であるが、自己複製のために必要な最小限度の遺伝子しか持たないため、動物や植物に寄生し、宿主細胞内の小器官を拝借して増殖する。その結果、寄生した細胞の破壊、細胞機能の障害といった直接的な障害、あるいはウイルス抗原を発現した感染細胞が宿主免疫応答から「異物」と認識されて排除されたり、サイトカイン等の液性因子の産生が誘導されるなどの間接的な障害が引き起こされる。このような感染個体における様々な影響を発症(病)と呼ぶ。私達の研究室では、動物/人獣共通のウイルス感染症、特に神経ウイルス症に注目している。なぜなら、中枢神経系を好むウイルスは免疫応答を誘導しにくく、また血液脳関門の存在により効果的な化学療法剤が限られるために治療法が困難な場合が多い、いわゆる「困難な感染症」として社会的にその解決が望まれているからである。

私達は、「ウイルス性神経・精神神経疾患」を研究するために、ボルナ病ウイルス(BoDV)感染により引き起こされるボルナ病に焦点を絞り研究を行っている。ボルナ病はウマやヒツジに持続的に感染し、時に致死的な神経疾患を引き起こす病気として 100 年以上前から知られていた。現在、ネコ、イヌ、アライグマ、ニホンザル、ウシ、ヒト、鳥類、爬虫類を含む幅広い脊椎動物に感染が認められる新興感染症として認識されている。しかしながら、いまだ発病メカニズムは十分に解明されていない。長らく、ヒトにおける病原性は不明であったが、近年、感染リスから感染したヒトが脳障害により死亡したことが報告されたことから、本感染

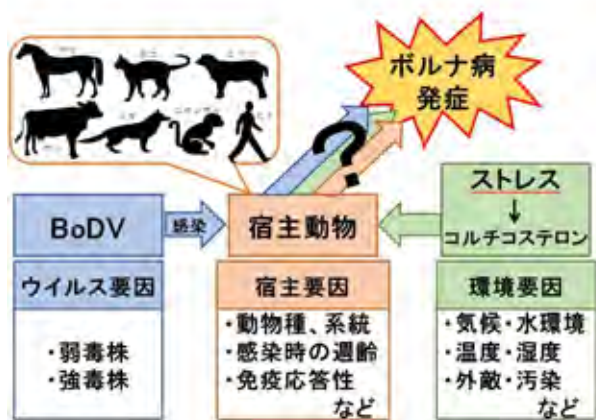
症が人獣共通感染症であり、ヒトでは重篤な脳障害を起こす可能性があることが示された。私達は、BoDV の持続感染性と病原性を多角的に解析する目的で、ラットやマウス等の感染モデル動物における病態の解析(運動障害と行動学的異常)、神経細胞、グリア細胞などの初代培養細胞における病原性の解析、および野外の動物における感染症疫学調査を中心に研究を行っている。

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、ウイルス感染後のマウスにおける副腎皮質ホルモン投与が及ぼす長期的な影響を解析することを目的にした。

5 週齢のオスの C57BL/6N マウスに BoDV-CRNP5 株を脳内接種し、感染 24 日目に 3 週間かけて CORT (5 mg) を放出する錠剤をマウスの皮下背部に埋め込んだ。4 日ごとに体重測定と臨床症状の観察を行い、感染 68 日目に行動学的試験、脳内ウイルス量の測定および脳の組織学的解析を行った。その結果、CORT 処置した感染マウスは CORT 放出期間である 3 週間を過ぎてから感染 68 日目にかけて著しい体重減少が認められた。感染群間では CORT 処置による胸腺重量の減少傾向が認められた。行動学的試験においては、感染により異常が認められた項目は 12 項目中 7 項目あったが、そのうち CORT 処置により異常が増大したものは 1 項目、異常が軽減した項目は 2 項目だった。脳内ウイルス力価は、CORT 処置により有意に増加した。CORT 処置により小脳で炎症が重度化し、小脳に存在するプルキンエ細胞にウイルス抗原が検出されたマウスは、CORT 未処置の感染マウスの 2 倍存在した。また、本試験で用いた CORT 錠剤を皮下に埋め込むことにより作成したストレス負荷マウスでは、処置 8~24 日目まで免疫抑制状態になっていることが示された。

以上の結果から、BoDV 感染後期のマウスへの CORT 処置は、長期的には体重減少を伴う全身状態の悪化を引き起こした。その原因として、脳内のウイルス量の増加、ならびに小脳の機能障害による運動調節、および嚥下・呼吸などの調節異常の関与が示唆された。

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 long-term effect of CORT in mice after BoDV-1 infection.

Five-week-old, male C57BL/6N mice (SLC) were inoculated intracerebroventricularly with 4×10^3 FFU BoDV-1-CRNP5 strain and subcutaneously implanted with CORT pellets (5 mg/pellet) or placebo pellets at 24 days post infection (dpi). The infected mice were weighed and evaluated for clinical signs every 4 days until 68 dpi observation period. Behavioral studies and brain and thymus samples were collected for virological and histological analysis on last day to observe.

The results showed that CORT-administrated infected mice had significant weight loss after 3 weeks, the CORT release period, through 68 dpi. There was a trend toward decreased thymus weight in CORT-administrated mice among the infected groups. In the behavioral study, 7 of the 12 tests were abnormal due to infection. Of these, one abnormality was increased and two were reduced by the CORT-administration. Viral titers in the brain were significantly increased by CORT-administration. Cerebellar inflammation was more severe with CORT-administration. There were twice as many mice with viral antigens detected in Purkinje cells in the cerebellum as in infected mice without CORT-administration. The mice used in this study, in which CORT tablets were administrated subcutaneously instead of being subjected to stress, were shown to be immunosuppressed until days 8-24 of treatment.

These results indicate that the long-term effect of CORT-administration on mice in the late stages of BoDV infection was a deterioration of their general condition accompanied by weight loss. The cause was suggested to be an increase in the amount of virus in the brain and dysfunction of the cerebellum, which is involved in the regulation of movement, swallowing, breathing, and other life-supporting regulatory mechanisms.

4. 論文、著書など

西野佳以:ウイルス性神経疾患におけるストレスの影響ならびに COVID-19 パンデミックにおける社会問題への一考、京都産業大学世界問題研究所紀要、第 37 巻、p.121-125 (2022) (査読無し)

5. 学会発表など

1. 西野佳以:ウイルス性神経疾患におけるストレスの影響、京都産業大学世界問題研究所第 2 回定例研究会、2021.5.26 (京都市)【招待講演】
2. 西野佳以、深田彩人、立花蓮、木村享史:コルチコステロン前処置によるボルナ病ウイルス 1 感染マウスの病態の悪化、第 68 回日本ウイルス学会、2021.11.16-18 (神戸市)
3. 奥西慧菜、秋山聡一朗、深田彩人、立花蓮、木村享史、西野佳以:ボルナ病ウイルス1感染マウスにおけるコルチコステロンの長期的影響、第 68 回日本ウイルス学会、2021.11.16-18 (神戸市)

6. その他特記事項

- 1) 外部資金
科学研究費補助金・基盤研究(C)
課題名: 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-R3(4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
・薬事・食品衛生審議会・専門委員
・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
・FM 京都(α ステーション)谷ロキヨコの「CHUMMY TRAIN 【Dream Challenge】」への出演 (2021. 7. 23)



卒業式の日(2022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な解析方法の構築を進めているところである。発生生物学、遺伝学、生化学、分子生物学、生物情報学を組み合わせ、リボソームの新機能の解明に挑戦している。

2. 本年度の研究成果

(A) Znf598 のゼブラフィッシュ変異体の解析

翻訳の伸長中にリボソームが異常停滞し、後続のリボソームとの衝突が生じると、異常停滞したリボソームは 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した。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 を実施し、野生型および *znf598* 変異体ゼブラフィッシュ胚において、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コドン依存の mRNA 分解機構の解析

mRNA を安定化するコドンと不安定化するコドンは何が違うのか、またこれらのコドンを翻訳する際にリボソームの挙動にどのような違いが生じているのかを実験的に明らかにするために、Parallel Analysis of Codon Effects (PACE) という実験手法を新たに開発した。この手法を用い、ゼブラフィッシュ初期胚においてコドンが mRNA の安定性に及ぼす効果と、tRNA の量、リボソームによる翻訳速度の関係について解析を行った。その結果、mRNA を分解するコドンには対応する tRNA が少なく、そのためにリボソームの減速が起こっていることが明らかになった。この減速が RQC とは独立の機構で mRNA の分解を引き起こしていることが示された。

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 and causes a collision with trailing ribosomes, 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 performed Disome Seq, which analyzes mRNA sequences of approximately 60 bases derived from the two colliding ribosomes by next-generation sequencing (in collaboration with Dr. Shintaro Iwasaki at RIKEN). We revealed the sites of ribosome collision in wildtype and *znf598* mutant zebrafish embryos on transcriptome.

(B) Mechanisms of codon-mediated mRNA decay during zebrafish embryogenesis

To experimentally clarify the difference between mRNA-stabilizing codons and mRNA-destabilizing codons, and how the ribosome traverses those codons, we developed a novel method called Parallel Analysis of Codon Effects (PACE). Using PACE, we analyzed the relationship between the effect of codons on mRNA stability, tRNA levels, and ribosomal translation speed in zebrafish embryos. The results revealed that codons that degrade mRNA have fewer corresponding tRNAs and causes ribosomal slowdown. This codon-mediated slowdown of the ribosome causes mRNA degradation by a mechanism independent of RQC.

4. 論文, 著書など

Y. Mishima and K. Inoue. Tethered function assay to study RNA regulatory proteins in zebrafish embryos. *Methods in Molecular Biology* (2021) 2218:347-354.

Y. Mishima, P. Han, K. Ishibashi, S. Kimura, S. Iwasaki. Ribosome slowdown triggers codon-mediated mRNA decay independently of ribosome quality control. *The EMBO Journal* (2022) e109256

5. 学会発表など

三嶋雄一郎: ゼブラフィッシュ赤血球形成過程におけるリボソーム品質管理の役割 第44回 日本分子生物学会年会, 横浜市, 2021.12.1-3

宇賀神希、今見 考志、**三嶋雄一郎**: Analysis of ribosome ubiquitination during zebrafish development 第44回 日本分子生物学会年会, 横浜市, 2021.12.1-3

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)

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11月)

植物生理学研究室

Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry

1. 研究概要

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

植物の大きな特徴のひとつに光合成がある。高等植物の光合成は葉緑体と呼ばれる複数の膜系からなる形態的にも複雑なオルガネラで進行し、光エネルギーを用いた電子伝達とそれにつづく反応で 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、チオレドキシシンと呼ばれるタンパク質がその制御に中心的な役割を果たす。チオレドキシシンファミリータンパク質の生理学的機能の解析を中心として、以下の具体的な研究項目を設定し、研究を進めている。

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

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

2) 葉緑体チラコイド膜を介した還元力伝達機構の解明

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

教授 本橋 健

Prof. Ken MOTOHASHI, Ph. D.



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

2. 本年度の研究成果

1) 光合成電子伝達分配における起点となるフェレドキシシンからの電子分配とその生理的な意義

陸上植物の葉緑体チオレドキシシンシステムには、NTRCとFd/Trx 経路の2つの経路があり、これらが協調的に機能し、効率的に光合成反応を制御している。NTRC 経路を欠損した *ntrc* 変異株では、葉緑体レドックスバランスが崩れ、植物の成長阻害が観察される(図1, *ntrc*)。その

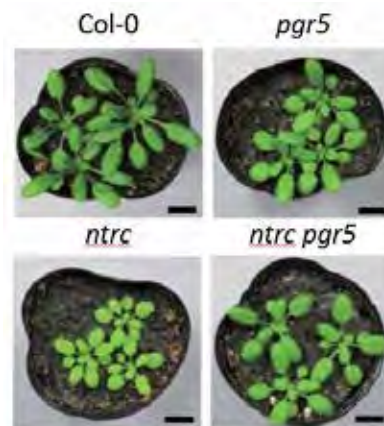


図1 シロイヌナズナ *ntrc* および *ntrcpgr5* 変異体の生育

原因は、Fd/Trx 経路により制御されるカルビン回路酵素活性化の抑制だと考えられている(図2)。一方、Fd から電子は PGR5 依存光化学系 I サイクリック電子伝達経路にも供給されるため、葉緑体のレドックスバランスに影響を与える可能性がある(図2)。本研究では、*ntrc pgr5* 二重変異株を作成し、その影響を植物の生育、光合成電子伝達活性、二酸化炭素固定に関わるカルビン回路酵素の活性化について解析した。

ntrc 変異株では生育阻害が観察されるのに対し、PGR5 依存光化学系 I サイクリック電子伝達経路も欠いた *ntrc pgr5* 二重変異株では、その成長阻害が回復した(図1)。別の光化学系 I サイクリック電子伝達経路を欠い

た *crr2-2* 変異体では同様の生育回復は観察されなかったことから、この生育回復は PGR5 経路が関与していると考えられた。次に *ntrc pgr5* 二重変異株での生育回復の原因を検討すると、*ntrc* 変異株では非光化学的消光 (non-photochemical quenching, NPQ) が高く、光合成電子伝達が野生株と異なっているのに対し *ntrc pgr5* 変異株ではそれが解消していた。また、この関与は NTRC の PGR5 依存光化学系 I サイクリック電子伝達経路への直接的相互作用によるものでないこともわかった。

そこで *ntrc pgr5* 二重変異株での生育回復の原因が、変異株における Fd からの電子分配の変化によるものである可能性を検討するため、Trx システムからの電子で活性化されるカルビン回路酵素の活性化状態を調べた。その結果、*ntrc* 株で活性化が不十分であったカルビン回路酵素 (FBPase, SBPase) は、*ntrc pgr5* 株でそれらの活性化は回復していた。

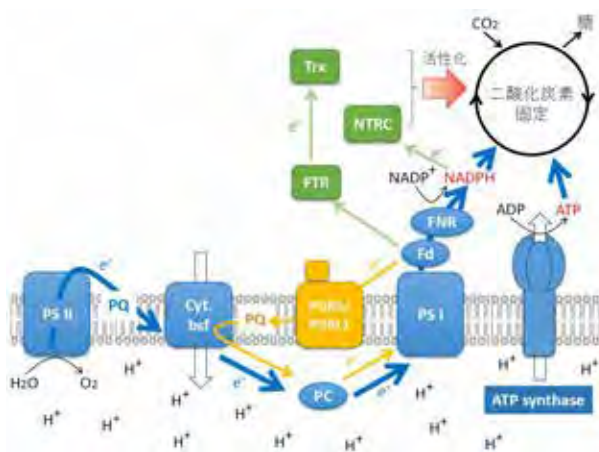


図2 葉緑体における光合成電子伝達経路

これらの結果を総合すると、*ntrc pgr5* 二重変異株の生育回復は、2 つの経路の電子分配が変化したことでカルビン回路酵素の活性化が回復したことによると考えられる (図2)。本研究から、植物は NTRC 経路と PGR5 依存光化学系 I サイクリック電子伝達経路の電子分配を適切に保つことで、光合成の二酸化炭素固定を担うカルビン回路の活性化を適切に制御していることがわかった。光合成電子伝達における電子分配の全体像を理解するにはまだ長い道のりが必要だが、今後のさらなる研究でそれを明らかにすることが期待される。

2) 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 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.

1: Contribution of PGR5-dependent PSI cyclic electron transport to two distinct thioredoxin systems.

Light-dependent activation of chloroplast enzymes is required for rapid induction of photosynthesis after a shift to light from dark. Thioredoxin (Trx) system plays a central function in this process. In the chloroplasts, Trx system consists of two pathways: the first one, classically known as ferredoxin (Fd)/Trx pathway, whereas the second one, NADPH-Trx reductase C (NTRC) pathway. In *Arabidopsis* mutants lacking these pathways, impaired photoreduction of thiol enzymes was shown to result in decreased carbon fixation. Recently, a close relationship between Fd/Trx pathway and PROTON GRADIENT REGULATION 5 (PGR5)-dependent photosystem I (PSI) cyclic electron transport in the induction of photosynthesis has been elucidated. In contrast, how PGR5-dependent pathway is involved in NTRC pathway remains unclear, although NTRC has been shown to physically interact with PGR5. We analyzed *Arabidopsis thaliana* mutants lacking either one of the PSI cyclic pathways, PGR5 in the background of the *ntrc* mutant. Introduction of *pgr5* into the *ntrc* mutant suppressed both growth defects and high non-photochemical quenching (NPQ) phenotype when grown under long-day conditions. This was caused by recovery of decreased Trx-dependent reduction of thiol enzymes during the induction of photosynthesis. These results suggest that PGR5-dependent pathway competes with Fd/Trx pathway for reducing equivalents in the *ntrc* mutant. We propose that PGR5-dependent pathway is properly regulated in the wild type, so as not to disturb

Fd/Trx pathway-dependent activation of chloroplast enzymes.

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

We have been developing new technologies in biochemistry and molecular biology over the past several years. In our developing techniques, we have written a review (in Japanese) of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis imaging systems in order to promote their widespread use.

4. 論文, 著書など

Yuki Okegawa*, Wataru Sakamoto, Ken Motohashi: Functional division of *f*-type and *m*-type thioredoxins to regulate the Calvin cycle and cyclic electron transport around photosystem I. *J. Plant Res. in press* (2022)

Yuki Okegawa*, Natsuki Tsuda, Wataru Sakamoto, Ken Motohashi*: Maintaining the chloroplast redox balance through the PGR5-dependent pathway and the Trx system is required for light-dependent activation of photosynthetic reactions *Plant Cell Physiol.* 63, 92-103 (2022)

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-dulfur 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)

5. 学会発表など

招待講演

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 11 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, オンライン・静岡大学, 2021.5.28-29

一般講演

桶川友季, 本橋健, 坂本亘: *f*型と *m*型チオレドキシニンの光合成制御における機能分担 第 12 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, オンライン・東京工業大学, 2022.5.20-21

桶川友季, 本橋健, 坂本亘: PGR5 の欠損はフェレドキシニンからの電子の流れを変えることによって *ntrc* 変異株の生育阻害を回復させる 第 63 回植物生理学会年会, オンライン・筑波大学, 2022.3.22-24

村井亮太, 桶川友季, 佐藤望, 本橋健: シロイヌナズナにおけるチオレドキシニン制御因子としての CBSX 第 94 回日本生化学会大会, オンライン・パシフィック横浜, 2021.11.3-5

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・島根大学, 2021.3.14-16

桶川友季, 本橋健: *m*型チオレドキシニンは 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・島根大学, 2021.3.14-16

6. その他特記事項

1) 外部資金

なし

2) 学外活動

本橋健: 日本光合成学会常任幹事

3) その他

なし



研究室集合写真 (2021 年 11 月)

膜エネルギー代謝分野

Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism



教授 横山 謙

Prof. Ken Yokoyama, Ph.D

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行ってきた。

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 FoF1 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) 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、V-ATPase を結節点とした代謝調節機構を、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 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

今回用いる変異体 V/A-ATPase (TSSA 変異体) は、活性中心にあるスレオニン残基をセリン残基に、セリン残基をアラニン残基に変えたもので、阻害に関わる ADP の触媒部位に対する親和性が低下している。この変異体酵素の ATP 合成活性や分解活性など、基本的な性質は野生型の V-ATPase とほぼ同じであり、野生型 V/A-ATPase と同等

と考えて良い。精製した TSSA 変異体 V/A-ATPase を、EDTA を含むリン酸緩衝液で透析することで、結合している ADP をほぼ完全に除くことができる。ヌクレオチドを含まない状態の V/A-ATPase (V_{nucfree}) をナノディスクに再構成し、単粒子解析することで、すべての触媒部位が空の状態の構造 (ATP 結合待ち構造) を得ることができる。次に に対して 触媒待ち条件、加水待ち条件、ATP 結合待ち条件になるように反応液を加え反応させた後、瞬間凍結してクライオグリッドを作成した (図 1)。それぞれの反応条件でのクライオグリッドを、Titan Krios で撮影し、単粒子解析することで立体構造を得た。

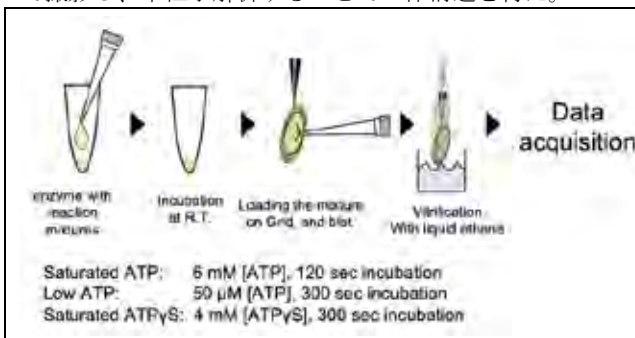


図 1. 実験のセットアップの模式図。触媒待ち条件、ATP 結合待ち条件、ATP 加水分解待ち条件の反応液中の V/A-ATPase を瞬間凍結してクライオグリッドを作成し、Titan Krios で撮影する。画像解析により V/A-ATPase の立体構造を得る。

触媒部分である V_1 ドメインは、触媒部位を形成する 3 つの AB dimer が、回転軸サブユニットを取り囲んでいる。3 つの AB dimer は、ヌクレオチドの有りなしにかかわらず、開いた構造 (AB 開)、やや閉じた構造 (AB 準閉)、閉じた構造 (AB 閉) からなっていた。ATP 濃度が高い条件での構造では、すべての触媒部位に ATP もしくは、分解産物である ADP の密度が観察された ($V_{3\text{nuc}}$)。ATP 濃度が低く、ATP 結合が律速段階になる条件では、AB 準閉、AB 閉にはヌクレオチドの密度が観察されたが、AB 開にはヌクレオチドの密度がなかった。このことは、AB 開に ATP が結合して $V_{3\text{nuc}}$ 構造になることを示す。このことは、全ての触媒部位がヌクレオチドで占められてから、軸の回転が起こることを示す。ATP の加水分解が遅くなる ATP アナログを基質として用いた条件で得られた構造では、AB 閉には ADP が、AB 準閉には ATP が結合していた (V_{prehyd})。このことは AB 準閉の ATP の分解を待っている構造であることを示し、すなわち、AB 準閉の ATP が分解されるには AB 閉への構造変化が伴うことを示す。AB 準閉→AB 閉の構造変化は、軸の回転を伴うので、ATP の加水分解反応と軸の回転が共役していることを示唆する。ATP の加水分解反応は、熱散逸を伴う自発反応なので、

軸の回転が触媒部位間の自由エネルギー差によって駆動されることを示唆する。

3 つの触媒部位で、ATP 加水分解の反応過程が別々かつ同時に起こり、それぞれの反応が軸タンパク質の回転と厳密に共役することで化学反応と軸の回転が共役していることがわかった (図 2)。今回の研究成果により、「2 つの触媒部位間での ATP 加水分解反応の自由エネルギー差が、軸タンパク質の回転を推進する。」ことが明らかになりました。このように精緻で巧妙な仕組みで ATP 合成酵素が機能し、軸の回転により ATP が効率良く作りだされる自然の仕組みは、大変な驚異である。

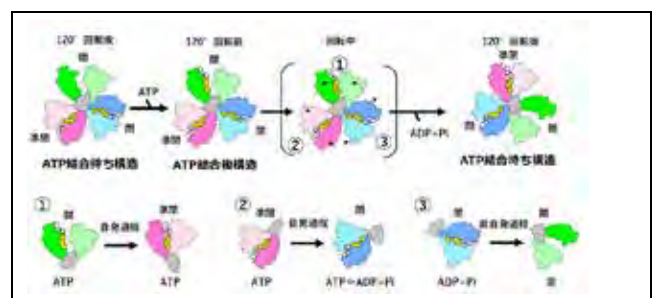


図 2. ATP 結合待ち構造の触媒部位 (空) に ATP が結合して ATP 結合後構造になる。①結合した ATP による開から準閉への構造変化、②ATP が結合した準閉から ATP が加水分解される状態にある閉への構造変化、③ADP と Pi が結合した閉が軸の回転により開になることで ADP と Pi が放出される。②は、ATP が結合した準閉と、分解される状態にある ATP が結合した閉との間に、結合した ATP の状態による自由エネルギー差があり、自発過程になる。①～③の進行と軸の 120°回転が協同することで、1 分子の ATP が分解され ATP 結合待ち構造に戻る。

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 2021

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 atomic models of 18 catalytic intermediates of the V_1 domain of V/A-ATPase under different reaction conditions by single particle Cryo-EM, which revealed that the rotor does not rotate immediately after binding of ATP to the V_1 . Instead, three events proceed simultaneously with the 120° rotation of the shaft: hydrolysis of ATP in ABsemi, zipper movement in ABopen by the binding ATP, and unzipper movement in ABclosed with release of both ADP and Pi. This indicates the unidirectional rotation of V/A-ATPase by a ratchet-like mechanism owing to ATP hydrolysis in ABsemi, rather than the power stroke model proposed previously for F_1 -ATPase.

4. 発表、著書など

1. **Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases.** Kishikawa J, Nakanishi A, Nakano A, Saeki S, Furuta A, Kato T, Mitsuoka K, and *Yokoyama K. *Nature Communications* volume 13, Article number: 1213 (2022)

5. 学会発表など

学会発表

1. Structural intermediates in rotary V/A-ATPase from initial to steady state visualized by time-resolved cryo-electron microscopy. 中西温子、岸川淳一、西澤知宏、光岡薫、横山謙 第 59 回 日本生物物理学会年会 オンライン開催 11/2021 オンライン発表
2. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素の回転機構の解明 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙 2021 年 第 94 回 日本生化学会大会オンライン開催 12/2021 ポスター発表
3. クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析による ATP γ S 存在下 V/A-ATPase の中間体構造 佐伯詩織、岸川淳一、中西温子、中野敦樹、横山謙 第 94 回 日本生化学会大会 オンライン開催 12/2021 ポスター発表
4. 好熱菌 FoF1 の動的構造解析によって回転機構を明らかにする。 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙 2022 年 1/8 生体運動研究合同班会 名古屋大学 口頭発表
5. 構造スナップショットで解き明かす V 型 ATPase の回転機構 横山謙 2022 年 1/8 生体運動研究合同班会 名古屋大学 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2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

Nature 等の査読数件

2021 年度研究室メンバー



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マイ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
フレッシュアーズセミナー	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	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、白鳥	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、高橋
生命医科学1	2	板野、佐藤	微生物学	2	染谷、西野
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	河邊、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
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	健康・医療概論	2	川上
食料資源学2	3	寺地	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

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、治療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) 理科教員の社会との関連内容を扱う際の意識

科学に関する倫理的・法的・社会的課題(ELSI)への認識や理解について社会で広く共有する上で、中等教育は重要な役割を担うと考えられている。特に理科はその特性から重要な位置にある。そこで、この教科を担う中学校および高校の理科教員を対象に、授業における実社会や実社会との関わりを扱う際の意識や考え方を明らかにすることを目的とした意識調査を行った。今年度はこの調査データを論文として報告した。この意識調査の結果から、中学校および高校の理科教員は、理科の授業内容と実社会の関わりに関する知識や認識、経験は、年齢や教員経験によって増すことが示された。しかし、この傾向は高校の理科教員では担当する科目によって異なる

り、学習内容と実社会の関わりを授業で扱う意識は、物理や化学を担当する教員よりも生物の教員が高かった。また科学に関する倫理的問題を授業で扱う際は、事例や様々な人の価値観・意見を知る機会を設けることが多く、生徒自身による意思決定の機会を設けることは多くないことが分かった。中学校や高校の理科教員は、生命科学や ELSI の教育において重要な役割を担うと考えられるが、生徒自身に科学的な根拠に基づいた意思決定ができるような力を身につける場の設定には課題があることが示唆された。

3. Research projects and annual reports

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

1) The consciousness of secondary science teachers when dealing with related contents with society in science instruction

This research aimed to reveal the consciousness of Japanese secondary science teachers when dealing with related content with social and ethical issues in science classes. In this survey, we analyzed the responses obtained from 266 science teachers at junior high schools and 206 science teachers at high schools in Osaka Prefecture. The results of the survey indicated that their knowledge, awareness, and experience about “science, technology, and society” in science classes increase by age and teaching experience. These trends were different in subject in high school. In addition, they more often set up opportunities to learn about various people's values and opinions about ethical issues with science and technology than to express opinions by students in class. If we want to develop students who are capable of making science-based decisions, we think that the more necessary to develop training programs and teaching materials that deal with the relationship between advanced science technology and society.

4. 論文・著書など

川上雅弘, 仲矢史雄, 片桐昌直, 水町衣里, 任田康夫: 理科指導における社会との関連内容を扱う際の中学・高校理科教員の意識 科学教育研究 45(4), 421-429 (2021)

5. 学会発表など

安積典子, 種田将嗣, 萩原憲二, 川上雅弘, 秋吉博之, 山内保典, 尾崎拓郎, 生田享介, 吉本直弘, 仲矢史雄: Google Classroomを用いた課題探究型教員研修e-ラーニングプログラムの開発. 日本科学教育学会第45回年会, オンライン, 2021.8.20-22

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: 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)

科学研究費補助金・基盤(B)

課題名: 細胞の人為的改変に対する制度論と印象論の接合

研究分担者: 川上雅弘, 取得年度: R3-6年(4年)

2) 知財権等 なし

3) 学外活動

川上雅弘: 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 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 21 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

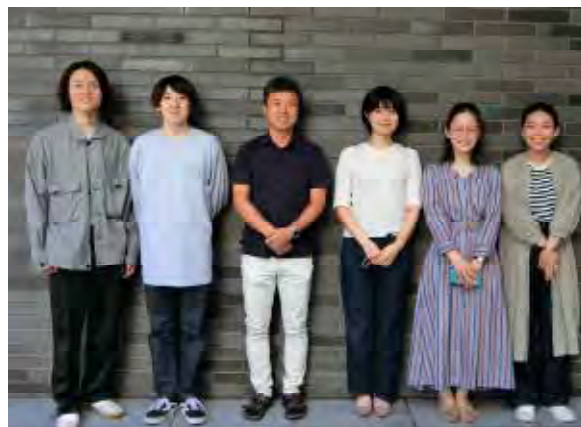
4) 受賞等 なし

5) その他

川上雅弘(指定討論者として): ELSI センター研究会「シリーズ ELSI 人材像を考える #2 『ELSI 人材』はどこで・どのように育成されるのかーライフサイエンス領域における人材育成」, 大阪大学社会技術共創研究センター(オンライン), 2021.10.12

川上雅弘(コメンテータとして): COVID-19 における倫理的・法制度的・社会的課題(ELSI) を考えるー多様な研究開発の視点からー, AMED・JST-RISTEX 連携セッション(オンライン配信), 2021.11.23

川上雅弘: 理解を広げていくことが支えになる. 厚生労働科学研究費補助金(がん対策推進総合研究事業)「ゲノム情報を活用した遺伝性腫瘍の先制的医療提供体制の整備に関する研究」班 主催 患者・市民公開セミナー, アットビジネスセンター大阪梅田(ハイブリッド), 2022.2.27



1期生との集合写真(2021年10月)

1期生: 松見君、佐藤君、小杉さん、菅沼さん、吉本さん



2021年9月の居室(9号館L室), 居室移動後の記録として

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つてよい。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、今年度は特に水没時における気孔形成の抑制機構について解析した。まず、*R. aquatica* を水没させると、4日後には発達中の葉において気孔形成の抑制が観察できた。次に、*SPH* などの気孔形成に関わる遺伝子の発現をQRT-PCRで確認したところ、水没後1時間で発現が減少していた。こ



図1 *Rorippa aquatica*

左：陸上の形態 左：水中の形態

れまでの研究で、*R. aquatica* が水没するとエチレンが蓄積することで葉の形態が変化することがわかっていた。そこで、エチレンの気孔形成への影響を調べたところ、気中であってもエチレン処理により気孔形成が抑制された。水没後の経時的なRNA-seq解析を行ったところ、水没後1 hで気孔形成関連の遺伝子群の発現が低下し始めていた。興味深いことに、光応答関係の遺伝子群の発現が水没後に変動していた。水没時には光環境が変化するため、光強度や光質が気孔に与える影響を調べたところ、*R. aquatica* では、水没時の気孔形成の抑制に光が必要であること、また、青色光は水没時の気孔形成抑制を阻害することがわかった。以上の結果から、エチレン応答や光受容に関わる経路が気孔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.

In order to clarify the submergence response mechanism of *R. aquatica*, this year we analyzed the mechanism of suppression of stomatal development upon submergence. First, we observed that stomatal development was suppressed in developing leaves after 4 days submergence. Next, the expression of genes involved in stomatal development, such as *SPH*, was analyzed by QRT-PCR. The expression of *SPH* decreases in 1 hour after submergence. Previous studies showed that ethylene has important roles in submergence response in *R. aquatica*. Therefore, we investigated the effect of ethylene on stomatal development and found that ethylene treatment suppressed stomatal development even in aerial condition. Time-series RNA-seq analysis revealed that the expression of genes involved in stomatal development began to decline at 1 h after submergence. Interestingly, the expression of light-response-related genes changed after submergence. Since the light environment changes during submergence, we examined the effects of light intensity and light quality on stomata development and found that in *R. aquatica*, light is required to suppress stomatal development during submergence, and that blue light inhibits the suppression of stomatal development during submergence. These results indicate that pathways involved in ethylene response and photoreception regulate stomatal formation.

4. 論文, 著書など

Soon-Ki Han, Jiyan Yang, Machiko Arakawa, Rie Iwasaki, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Eun-Deok Kim, and Keiko U. Torii: Deceleration of the cell cycle underpins a

switch from proliferative to terminal divisions in plant stomatal lineage. *Developmental Cell* **57**, 1-14 (2022)

Yuichiro Mishima, Peixun Han, Kota Ishibashi, Seisuke Kimura, Shintaro Iwasaki: Ribosome slowdown triggers codon-mediated mRNA decay independently of ribosome quality control. *EMBO J.* e109256 (2022)

Ayako N. Sakamoto, Tomoaki Sakamoto, Yuichiro Yokota, Mika Teranishi, Kaoru O. Yoshiyama, Seisuke Kimura: SOG1, a plant-specific master regulator of DNA damage responses, originated from nonvascular land plants. *Plant Direct* **5**, e370-1-19 (2021)

Yaichi Kawakatsu, Tomoaki Sakamoto, Hokuto Nakayama, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Atsushi J. Nagano, Kentaro Yano, Nakao Kubo, Michitaka Notaguchi, Seisuke Kimura: Combination of genetic analysis and ancient literature survey reveals the divergence of traditional *Brassica rapa* varieties from Kyoto, Japan. *Horticulture Research* **8**, 132-1-10 (2021)

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

虫こぶ形成昆虫のヌルデシロアブラムシを用いた二次壁形成誘導エフェクターの同定:中山拓己、大島一正、木村成介、松浦恭和、池田陽子、武田征士、平野朋子、佐藤雅彦、第 63 回日本植物生理学会年会(オンライン)、2022.3.22-24
虫こぶ形成誘導因子 CAP ペプチドは、昆虫プロセシング酵素 CP によって生成される:松澤萌、平野朋子、大島一正、木村成介、泊直宏、佐藤雅彦、第 63 回日本植物生理学会年会(オンライン)、2022.3.22-24

シロイヌナズナにジャスモン酸・サリチル酸双方の蓄積を誘導する新規化合物の作用機構の解析:松本史織、並木健太郎、遠矢龍平、菊地宏樹、前田健太郎、西田えり佳、北畑信隆、斉藤優歩、中野正貴、舟橋汰樹、中澤裕、橋本研志、倉持幸司、安部洋、高橋史憲、浅見忠男、木村成介、朽津和幸、第 63 回日本植物生理学会年会(オンライン)、2022.3.22-24

水陸両生植物 *Rorippa aquatica* は水中環境へ適応のためエチレンと光のシグナル経路を再配線し水没に応答した気孔分化制御を行なっている:池松朱夏、馬瀬樹志、塩崎真子、中山壮大、野口楓子、坂本智昭、木村成介、鳥居啓子、第 63 回日本植物生理学会年会(オンライン)、2022.3.22-24

アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* の形質転換法およびゲノム編集法の開発:天野瑠美、平野朋子、坂本智昭、木村成介、佐藤雅彦、第 63 回日本植物生理学会年会(オンライン)、

2022.3.22-24

虫こぶ形成における二次壁形成誘導能をもつペプチド性分子の同定:中山拓己、池田陽子、松浦恭和、武田征士、大島一正、木村成介、平野朋子、佐藤雅彦、日本共生生物学会第5回大会(オンライン)、2021.11.27-28

虫こぶ形成誘導因子 CAP ペプチドは、昆虫プロセッシング酵素CPによって生成される:松澤萌、大島一正、木村成介、平野朋子、佐藤雅彦、日本共生生物学会第5回大会(オンライン)、2021.11.27-28

虫こぶ形成誘導因子 CAP ペプチドは、昆虫プロセッシング酵素CPによって生成される:松澤萌、大島一正、木村成介、平野朋子、佐藤雅彦、日本共生生物学会第5回大会(オンライン)、2021.11.27-28

染色体レベルゲノムアセンブリーに基づく *Rorippa aquatica* の比較ゲノム解析:坂本智昭、木村成介、日本植物学会第85回大会(オンライン)、2021.9.16-21

様々な環境に応答を示すアブラナ科 *Rorippa aquatica* の形質転換およびゲノム編集の試み:天野瑠美、平野朋子、坂本智昭、木村成介、佐藤雅彦、日本植物学会第85回大会(オンライン)、2021.9.16-21

アブラナ科 *Rorippa aquatica* の栄養繁殖における植物ホルモンのはたらき:天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、小俣恵美、郡司玄、竹林裕美子、小嶋美紀子、池松朱夏、池内桃子、岩瀬哲、坂本智昭、笠原博幸、榊原均、Ali Ferjani、木村成介、超分野植物科学研究会第1回研究会(オンライン)、2021.9.16-21

6. その他特記事項

1) 外部資金

令和3年度～6年度 科学研究費助成事業(基盤研究(B))
「植物の新奇器官「再生繁殖芽」の発生メカニズムと進化的基盤の解明」

令和3年度～令和5年度 Leverhulme Trust Research Project Grant 「Tuning the regenerative competence in Brassicaceae」(Co-Applicant)

令和3年度 国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)大学発新産業創出プログラム 社会還元加速プログラム(SCORE)チーム推進型「虫こぶ形成昆虫由来生理活性ペプチドCAPを利用した新規バイオスティミュラントの汎用製品化」(共同研究開発者)

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

【PCT出願番号】PCT/JP2021/34176

3) 学外活動

Editorial Board Member, Journal of Plant Research

特定非営利活動法人ハテナソン共創ラボ 副理事長

4) 受賞等

2022.1.31 令和3年度(第19回)京都環境賞の特別賞(循環型社会推進賞)(受賞者:嵯峨地域農業づくり協議会)(理工系コーオペ教育プログラムとして協力)

2021.9.11 日本インターンシップ学会第4回榎本記念賞「秀逸

な事例」受賞 木村成介、山岸博、穂崎良典、「理工系専門教育に特化した中長期インターンシッププログラム「理工系コーオペ教育プログラム」の実践」

5) その他

展示協力

異形葉のメカニズムに迫る -水草が環境を感知して葉の形を変える仕組みの研究- 水草展 2021 旅する水草、国立科学博物館筑波実験植物園、2021年8月7日～15日

シンポジウムオーガナイザー

第61回植物バイテクシンポジウム「植物の能力と環境問題:最前線を走る研究者たち」(植物科学研究センター共催)オーガナイザー 2021年12月13日

広報関係

2021年11月14日 所さんの目がテン!「植物の神秘!捨ててしまふ野菜で再生栽培」(読売テレビ)で、植物の栄養繁殖などについて解説(日本テレビ10月24日放送)

2021年7月8日 NHK 京都放送 情報バラエティー番組「ぐるっと関西おひるまえ」でミブナについての研究成果等について放送(約7分)(放送地域:近畿地方)

2021年7月6日 NHK 京都放送 ニュース630「京いちにち」のコーナー「京の特集」でミブナについての研究成果等について放送(約7分)(放送地域:京都府内)

水菜と壬生菜の葉の形態進化についての研究成果が以下の新聞に掲載された。読売新聞(9/19)、高知新聞(8/15)、大分合同新聞(掲載日不明)、北海道新聞(7/31)、日本経済新聞(7/19)、食料新聞(7/1)、産経新聞(6/26、6/20)、毎日新聞(6/13)、中国新聞(6/5)、信濃毎日新聞(6/5)、四国新聞(6/4)、秋田魁新報(6/3)、静岡新聞(6/2)、京都新聞(6/2)

水菜と壬生菜の葉の形態進化についての研究成果が以下で放送された。2021年6月2日 17:45～ KBS 京都「newsフェイス」、2021年6月2日 11:55～ KBS 京都「京都新聞ニュース」



嵯峨野での
カカシ作り



卒業式



教授 佐藤賢一

発生情報／問いづくりラボ

Laboratory of Cell Signaling and Development/Question Formulation

教授 佐藤賢一 Prof. Ken-ichi SATO, Ph. D.

1. 研究概要

私たちは、正常細胞性のチロシンキナーゼSrcが関与する細胞機能を解析対象として、モデル実験系としてアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の卵細胞を用い研究を行っています。卵細胞内のSrcタンパク質（当初はエックスワイケーXykと呼んでいたが、現在はエックスサークxSrcと呼んでいる）を生化学的に同定・精製するとともに、受精に伴いそのチロシンキナーゼ活性が上昇することを明らかにしました。当時は受精に伴うチロシンキナーゼの活性化はウニ卵を用いた研究で報告があるものの、脊椎動物でははじめての例であるとともに、その分子実体を明らかにした点では生物種を越えた世界初の報告でした。その後、受精によって活性化されたSrcの生理機能の解明に重点をおいた実験を行ったところ、Srcは体細胞システムにおける基質としても知られているホスホリパーゼC γ (PLC γ) をリン酸化し活性化することで、受精時における種を越えた普遍的な現象である卵細胞内カルシウム濃度の一過的な上昇 (Ca²⁺ transient) と、それによって誘導される卵活性化 (egg activation) と呼ばれる生化学的および細胞生物学的な諸反応を誘導する働きを持つことが明らかとなりました。この数年来、研究室で重点的に取り組んでいるのは、Srcがいかんして受精により活性化されるのか、そして精子と卵はどのように接着し融合しているのか、という問題です。体細胞システム（正常細胞性）のSrcは、細胞外からの成長因子や環境ストレスなどのシグナルを感知するしくみ（細胞膜受容体やストレスセンサー）を介して活性化することが知られています。一方で、受精卵に伴うSrcの活性化には卵細胞のパートナーである精子が引き金として働いていることは明確である一方で、その具体的な実行因子や卵細胞側の受容体（受容システム）の分子実体は全くわかっていません。マウスでは遺伝子ノックアウトの解析から卵側でCD9と呼ばれる4回膜貫通型タンパク質が、精子側ではIzumo1と呼ばれる1回膜貫通型タンパク質がそれぞれ配偶子間膜融合に必須であることが示されています。そのため、ア

フリカツメガエルでも同じまたは似た分子が存在し、受精時に機能している可能性があります。私たちはこれまでに、卵細胞膜マイクロドメインに存在するウロプラキンIIIという1回膜貫通型タンパク質が精子との相互作用や、その後のSrc活性化に重要な働きをしていることを見いだすことに成功しています。今後も引き続きこのウロプラキンIIIの構造と機能を手がかりにした研究を行うことで、受精成立の分子メカニズムの全貌解明に少しでも近づきたいと考えています。

2. 本年度の研究成果

卵母細胞や卵の老化は、その生殖能力や発育能力を低下させる。活性酸素種 (ROS) が様々な細胞の老化促進に寄与していることは、以前から明らかにされている。本研究では、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* の老化した卵母細胞および卵の細胞内活性酸素レベルを測定し、いくつかの選択的抗酸化剤 (AOXs) が生存率および機能活性に及ぼす影響について検討した。哺乳類培養細胞の活性酸素検出に広く用いられている蛍光細胞透過性色素DCFDAを用い、最適化されたプロトコルで新鮮卵子とベンチ熟成卵子の活性酸素レベルをモニターした。さらに、異なる活性酸素生成機構を標的とした選択的細胞透過性AOXを用いて、*Xenopus*卵母細胞および卵における主要な活性酸素源は細胞膜NADPH oxidaseであり、ミトコンドリア生成は細胞内活性酸素量にそれほど寄与していないことが示された。天然有機化合物アポシニンを用いてNADPHオキシダーゼを標的として阻害すると、*Xenopus*卵母細胞および卵の活性酸素レベルが著しく低下し、正常な表現型を維持し、その機能的能力を支持することがわかった。これは、アポシニンが卵母細胞や卵といった単離された配偶子細胞に対して有益な効果をもたらすという、我々の知る限り初めての報告である。また、アポトーシス卵やポストアポトーシス卵からATPが放出されることを示す証拠が得られ、カスパーゼ依存的な部分的タンパク質分解とATP特異的チャネルタンパク質であるパンネキシン-1の調節がこのプロセ

スに参与し、細胞内ATP濃度の漸減に参与していることが示唆された。

3. Research projects and annual reports

Aging of oocytes and eggs diminishes their reproductive and developmental potential. It has been demonstrated previously that reactive oxygen species (ROS) contribute to accelerated aging of various cells. In the present study, we measured intracellular levels of ROS and investigated effects of several selective antioxidants (AOXs) on the viability and functional activity of aging oocytes and eggs of the African clawed frog *Xenopus laevis*. The fluorescent cell-permeable dye DCFDA, which is widely employed for ROS detection in cultured mammalian cells, was used to monitor ROS levels in the fresh and bench-aged oocytes and eggs by an optimized protocol. It was found that intracellular ROS contents were increased in frog oocytes and eggs aged for 48 h. It was further demonstrated using selective cell-permeable AOXs targeting different ROS-generating mechanisms, that the major source of ROS in *Xenopus* oocytes and eggs is the plasma membrane NADPH oxidase, and that mitochondrial generation contributes to the intracellular ROS content to a lesser extent. Targeted inhibition of NADPH oxidase with a natural organic compound apocynin reduced ROS levels significantly in *Xenopus* oocytes and eggs, maintained their normal phenotype and supported their functional competence. To our knowledge this is the first report concerning beneficial effects of apocynin on the isolated gamete cells, such as oocytes and eggs. In this meeting, we also present evidence that ATP is released from apoptotic and/or post-apoptotic eggs, suggesting that caspase-dependent partial proteolysis and deregulation of pannexin-1, an ATP-specific channel protein, is involved in this process and contributes to a progressive decrease in intracellular ATP concentration.

4. 論文, 著書など

- A.A. Tokmakov, A. Kurotani, K. Sato (2021) Protein pI and intracellular localization. *Front Mol Biosci.* 2021; 8: 775736. Published online 2021 Nov 29. doi: 10.3389/fmolb.2021.775736 PMID: PMC8667598 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8667598/>
- A.A. Tokmakov, K. Sato (2021) Modulation of intracellular ROS and senescence-associated phenotypes of *Xenopus* oocytes and eggs by selective antioxidants. *Antioxidants (Basel)* 2021 Jul; 10(7): 1068. Published online 2021 Jul 1. doi: 10.3390/antiox10071068 PMID: PMC8301133 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8301133/>

5. 学会発表など

佐藤 賢一、寺西 竜雅、トクマコフ アレクサンデル (2021) フリカツメガエル卵母細胞および未受精卵の老化と細胞死における活性酸素およびATPの動態 第44回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) <https://mbsj2021-login.jp/general1-2/contributions/5261/extract>

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都高大連携推進室 室員、神戸大学バイオシグ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

テレビ出演: 佐藤 賢一 NHK-BSプライム「ヒューマニエンス:”がん”それは宿命との戦い」 2021年4月8日放送 <https://www.nhk.jp/ts/X4VK5R2LR1/episode/te/14N5M8PK8M/>

ラジオ出演: 佐藤 賢一 αステーション エフエム京都「CHUMMY TRAIN」 2021年9月3日放送 https://fm-kyoto.jp/blog/chummy_train-post110852/

インタビュー記事: 佐藤 賢一 問いは未来を創るのか?—未知を照らす「創造の触媒」としての問い—

BackcastingLab (バックキャストイングラボ) <https://www.backcasting.net/interview-2021-satoh/>

中学・高校・大学授業: 兵庫県立須磨友が丘高等学校、近畿大学附属高等学校、京都府立西城陽高等学校、京都府立桂高等学校、福山暁の星女子高等学校、徳島県立池田高等学校、同志社大学、筑波大学附属高等学校、宮城県立多賀城高等学校、愛知県立岡崎西高等学校。

教員研修: 徳島県立池田高等学校、米沢興譲館高等学校、宮城県立多賀城高等学校、宮城県教育庁、大阪市立東高等学校、全国私学教育研究集会京都大会、広島県立高陽東高等学校、武蔵野大学、東京都府立嵯峨野高等学校、大学コンソーシアム京都 高校教員交流会 (計2回)、福島県教育センター、学校法人三木学園白陵高等学校、学校法人近江育英会近江高等学校。

企業研修：SDGsを自分ごと化し、企業戦略策定につなぐ（甲府市）

一般向けワークショップ：未来の先生展（オンライン）、ハテナソン・ファシリテータ養成講座：基礎編、応用編（計6回）。

研究室ホームページ：https://peraichi.com/landing_pages/view/ksusatolabsince2007



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、地域内資源循環ならびに地域資源の活用と持続可能な生態系サービスの供給について研究を実施した。

地域内資源循環に関しては、SDGs の社会への広まりとともに活発化してきている食品ロス対策における、堆肥化

准教授 三瓶由紀

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



の動きについて、近畿圏の行政施策の実施状況ならびに海外における事例収集を引き続き行い、その比較を実施し、特にコロナ禍のなかで、食べ残しを扱う堆肥化がどのような課題を有しているかについて整理を行った。

地域資源の活用については、近畿圏を対象に、自然・植物の機能を活かした事例(棚田・果樹園)について、引き続きデータの収集・分析を行った。棚田は地域資源・観光資源として期待される一方で、地形的な制約などによりその維持保全には多大なコストが必要となる。そのため、保全優先度の高い棚田を選定する必要がある、そのためには、地域資源としての棚田を評価する手法の確立が期待される。そこで、棚田について、景観的評価、営農的評価、防災上評価の3つに着目し、今後放棄化が進行する可能性のある棚田をいかに選択的に保全するかを検討する上で活用可能な選定モデル構築の検討を行った。

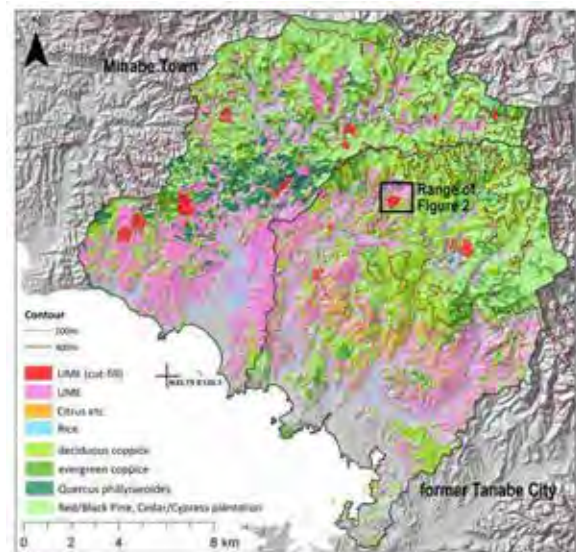


図 調査対象地における植生と梅林

また世界重要農業遺産(GIAHS)に指定されているみなべ・田辺の梅システムについて、開発・管理履歴の異なる梅園を対象に、区画レベルでの植物多様性と土地利用、管理、開発の関係について調査した。その結果、自然地形を活かした伝統的な果樹園では在来種が多く、植物多様性指数が高いこと、切土法で開発された果樹園では外来種の割合が高いが、その程度は表土の保持や充填とい

った区画の歴史、有機農法など個々の農家の管理状況により異なることが示された。

当該地域においては、特定の種や場所の直接的な保護よりはむしろ、土地利用規制やインセンティブ措置などの動的な景観保全策が有効と示唆された。

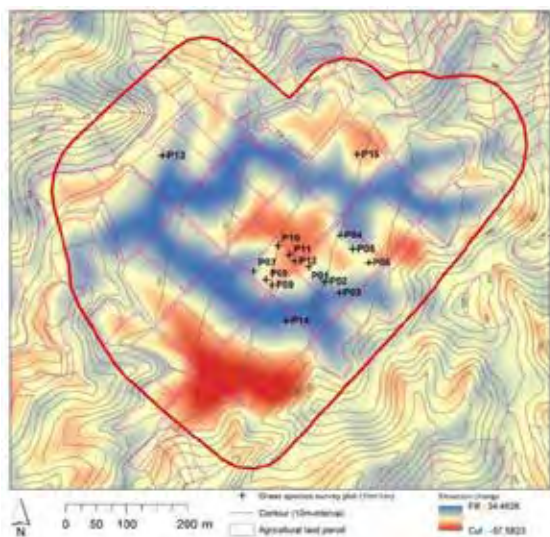


図 梅園パイロットファームにおける人為的な地形変化

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.

This year, we conducted research on 1) regional resource recycling, and 2) utilization of regional resources and supply of sustainable ecosystem services.

We continued to collect information on administrative measures to promote composting in the Kinki region with focus on food loss prevention. We also summarized how composting, which deals with leftover food in the corona disaster, is handled and what issues it may have in the future.

Regarding the utilization of local resources, we continued to collect and analyze data on cases of utilizing the functions of nature and plants in the Kinki region. While terraced rice paddies are expected to be a regional resource and tourism resource, their maintenance and preservation requires significant costs due to topographical constraints and other factors. It is necessary to select terraced rice

paddies with high conservation priority, and for this purpose, it is expected to establish a method to evaluate terraced rice paddies as a regional resource. We focused on three aspects of terraced rice paddies: landscape evaluation, farming evaluation, and disaster prevention evaluation, and studied the establishment of a selection model that can be used to selectively conserve terraced rice paddies that are likely to be abandoned in the future.

Minabe-Tanabe Ume system, which is designated as a Globally Important Agricultural Heritage Site (GIAHS), we investigated the relationship between plant diversity and land use, management, and development at the plot level, targeting ume orchards with different development and management histories. The results showed that traditional orchards with natural topography had more native species and higher plant diversity indices. It was shown that orchards developed using the cut-and-fill method had a high proportion of non-native species, but the extent of this variation depended on the history of the plot, such as topsoil retention and filling, and the management status of individual farmers, such as organic farming methods.

4. 論文、著書など

Yuji Hara, Shinji Oki, Yoshiyuki Uchiyama, Kyuichi Ito, Yuto Tani, Asako Naito, Yuki Sampei: Plant Diversity in the Dynamic Mosaic Landscape of an Agricultural Heritage System: The Minabe-Tanabe Ume System. LAND 10, 559 (2021)

原 祐二・原田 貫生・三瓶 由紀: 郊外商業施設の新設草地におけるバツタ類の分布環境: 緑地設計への指針の一例 南紀生物 63, 101-106 (2021)

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: 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) 知財権 「該当なし」

3) 学外活動 三瓶由紀: 日本造園学会査読委員

4) 受賞等 「該当なし」

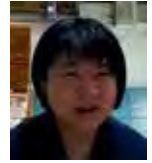
5) その他 なし

細菌学研究室

Laboratory of Bacteriology

准教授 染谷 梓

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



1. 研究概要

微生物はあらゆるところに存在しており、時に動物や人の健康を脅かすこともある。なかでも動物と人の双方に感染する微生物は、人と動物との関わり方が多様化する現代社会において、人獣共通感染症や食品衛生上の問題を引き起こす可能性があるため、大きな注目を集めている。当研究室では、動物と人との間に入って病原体の受け渡し役を担っているマダニや野生動物の疫学調査を実施し、これらのマダニが媒介する感染症が自然界でどのように維持されているのかを解明することをめざしている(図)。また、食肉の流通現場における大腸菌の抗菌薬耐性について調査し、食肉を介し、動物と人との間でどのように耐性遺伝子が拡散していくのかを研究している。



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

2. 本年度の研究成果

マダニやノミなどの吸血性の節足動物は、ヒトと動物の双方に寄生することから、さまざまな人獣共通感染症の病原体を媒介する可能性がある。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。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。さらに、シャーマントラップを利用した小型野生動物の捕獲調査も実施している。マダニの分布状況に大きな変動は認められなかったが、捕獲数が増加した時期もあった。学内への人流の減

少により、野生動物の行動が変化し、マダニの分布に影響したのかもしれない。今後これらの分布の変化について、詳細に検討していく必要がある。

近年、市街地への野生動物の侵入が問題となっており、野生動物からの感染症の伝播が危惧されている。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。これらの分離株について、塩基配列解析を実施したところ、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。人に病原性を示す株との関連をさらに詳細に解析するため、*Bartonella henselae* について、Multi Locus Sequence Typing (MLST1) を実施した。その結果、分離株はいずれも ST1 に分類され、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し、病原性を示す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。今後も引き続き、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。Multiplex PCR により、一部の分離株が保有するプラスミドのレプリコンタイプを決定できた。検出されたレプリコンタイプは、これまでに多剤耐性との関連が示唆されているものであり、分離株の耐性パターンとも一致したことから、このプラスミドによる多剤耐性の獲得が示唆された。

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

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

金美来、村岡綾、古賀由希恵、奥村昌美、川道美枝子、三宅慶一、前田秋彦、染谷梓。ハクビシンから分離された *Bartonella* の系統学的解析。第164回日本獣医学会学術集会、2021.9.7~13 (オンライン)

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医院との共同研究

前田秋彦、染谷梓: 第20回日本バイオセーフティ学会主催 (2021.11.30~12.2)

2) その他



研究室のメンバー(農場研修にて)

植物分子遺伝学研究室

Laboratory of Plant Molecular Genetics

1. 研究概要

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

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

これらの研究は、以前の私学助成のプロジェクトを学内の植物ゲノム科学研究センター(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出しようとしている。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、

教授 寺地 徹

Prof. Toru Terachi, Dr. Agr.



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を開始した。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、「雄性不稔」が品種育成に利用されている作物のミトコンドリアゲノムの構成を解明しようとしている。この雄性不稔は、植物の生育は正常であるが機能を持った花粉が形成されない現象のことを言い、多くの高等植物に見出され、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有な材料を用いて、コムギの近縁種で

あるエギロプス属の各種植物やオオムギ、ライムギなどのミトコンドリアゲノムの構成を調べている。

2. 本年度の研究成果

本年度、1)のプロジェクトについて、以前に作出したタバコおよびレタスの組換え系統のいくつかを閉鎖系温室で育成し、世代更新を行ったが、新たな組換え体を作成する研究は、レタスの1件を除き実施しなかった。1)のプロジェクトを成功させるためには、植物材料の調製が重要であり、特にコムギの場合、播種から未熟胚の調製等に多大な労力が必要とされる一方、このテーマを選択する大学院生がいないので、ここ数年、実験自体を実施できていない。また、トマトについても、組換え体の作出に関して進展はない。現在、海外の研究室で組換え体作出の実績があるトマトの品種、‘IPA6’を入手し、種子の増殖を図っている。

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

これら3種の断片 (#1、#2A および #3)を持つプラスミドに、葉緑体で働くプロモーターおよびターミネーターを連結した *aadA* カセットを挿入し、葉緑体導入用の

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

この結果を受け、葉緑体の複製起点として働く配列をより詳細に解明するため、上記ミニサークル由来の3つの断

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

ここまでの実験結果から、葉緑体ゲノムにはミニサークルに含まれる配列以外にも、複製起点となり得る配列が複数存在するのではないかという仮説を立てた。本年度は、過去の実験を引き継ぎ、この仮説を検証する実験を行なった。すなわち、*aadA* カセットを繋いだ大腸菌のプラスミドベクターに、葉緑体ゲノムの 96%に相当する断片をクローニングし、合計 77 種類のプラスミドコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトの3種類を1組とし、各組を 36 回ずつ、パーティクルボンバードメントによりタバコの葉に導入した。その結果、合計 74 個体の形質転換体を得られ、それらの詳細な解析により、合計 14 種類のプラスミドが葉緑体で自律複製可能であることが判明した。また、この 14 種類のプラスミドのうち2種類は、前述のミニサークルの配列(下図 SX-16, SX-17)を含んでいた。一方、残りの 12 種類のプラスミドはミニサークルには含まれない葉緑体ゲノム断片をインサートとして持っており、これらのプラスミドも葉緑体内に維持されていたことから、本研究を開始する際に立てた、葉緑体ゲノムには複製起点として働く配列が多数存在するという仮説は、ある程度正しいことが証明された。

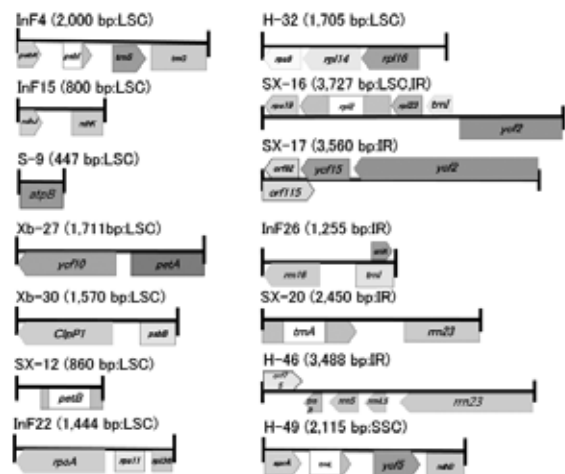


図. 導入プラスミドに自律複製能付与した葉緑体DNA断片

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

のプロジェクトについては、山形県の調査で発見されたハマダイコン(野ダイコン、弘法ダイコンとも呼ばれる)の2個体に注目している。これらの個体は、雄性不稔を示すオグラ型と、正常型のミトコンドリアゲノムをヘテロプラスミックな状態で保持している可能性がある。これまで数多くのハマダイコンを調査してきたが、オグラ型と正常型のヘテロプラスミックな個体は例がなかった。そこでこの個体について、次世代シーケンサーを用いたミトコンドリアゲノムの解読を実施した。データは、現在も解析中であるが、最近の結果では、ヘテロプラスミックな個体の後代は、すべてオグラ型に固定したようである。

上記5)のプロジェクトの一環として、本年度は *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

1. Yamagishi, H., Hashimoto, A., Fukunaga, A. Bang, S. W., Terachi, T.: Intraspecific variations of the cytoplasmic male sterility genes *orf108* and *orf117* in *Brassica maurorum* and *Moricandia arvensis*, and the specificity of the mRNA processing. *Genome* 64, 1081-1089 (2021).

5. 学会発表など

- 辻村真衣, 須佐見朝日, 有村慎一, 山岸博, 寺地徹: mitoTALENを用いたナスの細胞質雄性不稔候補遺伝子ノックアウトの試み. 日本育種学会 第140回講演会, オンライン, 2021.9.23-25
- 新原由依, 山岸博, 辻村真衣, 寺地徹: シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代のオルガネラゲノム解析. 日本育種学会 第140回講演会, オンライン, 2021.9.23-25
- 馬場裕士, 見田知一, 中元海里, 植村香織, 寺地徹: 葉緑体内で自律複製する形質転換ベクターの開発. 日本育種学会 第140回講演会, オンライン, 2021.9.23-25
- 庄司稔弘, 辻村真衣, 竹中祥太郎, 寺地徹: ミトコンドリアの *orf181* は *Aegilops mutica* 細胞質を持つパンコムギ系統の雄性不稔原因遺伝子か? 日本育種学会 第140回講演会, オンライン, 2021.9.23-25
- 寺地徹, 橋本絢子, 福永明日美, 竹中瑞樹, 山岸博: ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する新規稔性回復遺伝子 (*Rfs*) の同定. 2. RFSタンパクの構造と機能. 日本育種学会 第141回講演会 (オンライン・摂南大学), 2022.3.20-21
- 山岸博, 橋本絢子, 福永明日美, 竹中瑞樹, 寺地徹: ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する新規稔性回復遺伝子 (*Rfs*) の同定. 1. 背景および *Rfs* の位置. 日本育種学会 第141回講演会 (オンライン・摂南大学), 2022.3.20-21
- 辻村真衣, 庄司稔弘, 中田聖月, 有村慎一, 竹中祥太郎, 寺地徹: パンコムギ細胞質置換系統で見られる雄性不稔原因遺伝子の分類とミトコンドリアゲノム編集を用いたノックアウトライン

作出の取り組み. 日本育種学会 第141回講演会(オンライン・
摂南大学), 2022.3.20-21

庄司穂弘, 辻村真衣, 寺地徹: *Aegilops mutica*細胞質を持つ
細胞質置換コムギにおける*orf181*の発現解析. 日本育種学会
第141回講演会(オンライン・摂南大学), 2022.3.20-21

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: *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)

共創の場形成支援プログラム 地域共創分野「育成型」

課題名: ゼロカーボンバイオ産業創出による資源循環共創拠点

研究分担者: 寺地徹, 取得年度: R3-4年(2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

摂南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参画しながら、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

日本国内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、日本においても近年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。GIの導入の契機は、日本は東日本大震災の復興であるが、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、

准教授 西田 貴明

Assoc Prof. Takaaki Nishida, Ph.D.



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 Japan. The results of our study show that GI is a common political concept that promotes the use of various ecosystem services in local governments. However, the apparent motivations for the introduction of GI differs among the cities. In most cities in Japan, reconstruction from the Great East Japan Earthquake are 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 local government.

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

西田貴明, 福岡孝則 (2021) グリーンインフラ大賞の概要, 新都市 75, 83-85

西田貴明 (2021) 連携プラットフォームによるグリーンインフラの推進 (特集 防災・減災と交通: SDGs の観点から). 交通工学 562, 38-42

Takeshi Osawa, Takaaki Nishida, Takashi Oka (2021) Potential of mitigating floodwater damage to residential areas using paddy fields in water storage zones. Int. J. Disaster Risk Reduct. 62, 102410

西田貴明, 大上隼太, 塚本文 (2021) 日本における官民連携によるグリーンインフラの推進, フラワー・グリーンビジネスの最新動向と市場, シーエムシー出版, p65-74

Takeshi Osawa, Takaaki Nishida (2022) Toward social infrastructure: typological idea for evaluating implementation potential of green infrastructure. In Green Infrastructure: evaluation, implementation and governance (Nakamura F. eds), Springer. p 61-70

Takeshi Osawa, Takaaki Nishida, Takashi Oka: Paddy fields as green infrastructure (2022) their ecosystem services and threatening drivers. In Green Infrastructure: evaluation, implementation and governance (Nakamura F. eds), Springer. p175-185

Yosuke Masuda, Takaaki Nishida, Takashi Oka, Erika Yoshinari, Takeshi Ikeda (2022) Green Infrastructure: Function, Implementation and Governance. "Analysis of the description of the multifunctionality of farmland in the administrative plans of local municipalities (Nakamura, F eds.) Springer. p487-501

5. 学会発表など

西田貴明, Eco-DRRに関する制度・インセンティブと実践に向けた課題, 第69回日本生態学会大会シンポジウム, 2022年3月17日

西田貴明, 生き物観察から広げる企業CSR活動・自然資本経営, 生物多様性と環境・CSR研究会セミナー, 一般社団法人滋賀グリーン活動ネットワーク, 2022年1月17日

西田貴明, 国内外のグリーンインフラの議論と産学官連携による推進, 第13回都市と自然の共生シンポジウム, 一般社団法人北九州緑化協会, 2021年11月26日

西田貴明, 防災・減災とグリーンインフラ, 地域循環共生圏第6回 寺子屋ローカルSDGs, 環境省, 2021年10月13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: 環境情報科学センター 地域循環共生圏の推進のための研究に関するワーキンググループ メンバー

西田貴明: ブルーカーボン研究会 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: 国土交通省 グリーンインフラ社会実装推進検討会, 委員

西田貴明: 環境省, 開発事業者と地域の連携による地域循環共生圏構築推進に係る検討会, 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: いなべ市 いなべ市グリーンインフラ推進協議会, 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: 一般社団法人加太・友ヶ島環境戦略研究会 理事

西田貴明: 一般社団法人バイオミクリージャパン, アカデミックアドバイザー

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、改良の対象とする形質について集団内に保有される遺伝的多様性を素材として、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) 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希少種である。本種は、送粉昆虫として生息地の植物相や生態系に対して必要な役割を果たしている。

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。得られたこのニー密度の推定値(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。



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。



根室半島の風衝林。海から絶えず強風が吹くため、木が風に傾いて生えている。ノサップマルハナバチは、このような厳しい環境下で送粉昆虫として重要な役割を果たしている。

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。推定に際しては複数の遺伝子座の遺伝子型を同時に考慮して単一の推定値を得る方法を開発した。採集された雄のうち 2 倍体雄が占める割合は 20.0%であり、性決定遺伝子数は 5.0 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。

2) 盲導犬の選抜基準の構築

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



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

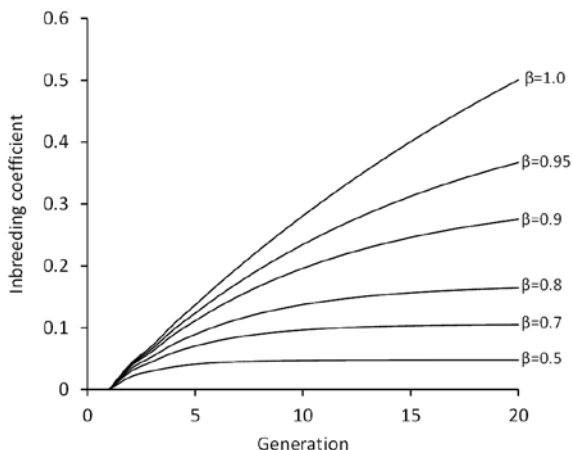
現在利用されている盲導犬の適性試験は、刺激に対する反応、動作量、おとなしさなどに関する 42 項目を 5 段階で評価するものである。各項目を選抜基準にすることは、その数の多さから現実的ではない。そこで、アジア盲導犬繁殖ネットワーク(AGBN)から提供を受けた適性試験の結果に因子分析と共分散構造分析を施し、適性試験の成績を「落ち着き」、「ハンドラーへの集中」、「ストレスコントロール」の 3 つの形質に集約した。これら 3 つの形質について量的遺伝解析を行い、遺伝率、遺伝相関、個体の育種価を推定した。

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。

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。



種々の隔離係数(β)の下での 20 世代間の近交係数の上昇

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 successfully 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: 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 5.0, which is exceptionally small comparing to the published estimates of foreign bumblebee species.

2: Construction of selection criteria in guide dog breeding

Suitability for guide dog has been judged by evaluation with 42 items in Asia Guide dogs Breeding Network (AGBN). 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 records of the evaluation 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.

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 could 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.

Tomihari M., Nobutoki Y., Nakajima N., Yanagawa M., Tagawa M., Hagiya K., Nomura T., Suwa Y., Suzuki H. (2022) Factors contributing to the swimmer puppy syndrome found in Labrador retrievers. *BMC Veterinary Research* 18:120.

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* 92:455-463.

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

脳がそれ自身の中に世界を立体的に映像予測化し、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。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した 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。

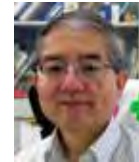
a) Hig タンパク質によるアセチルコリン受容体の局在制御機構

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 (次ページ図参照; 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

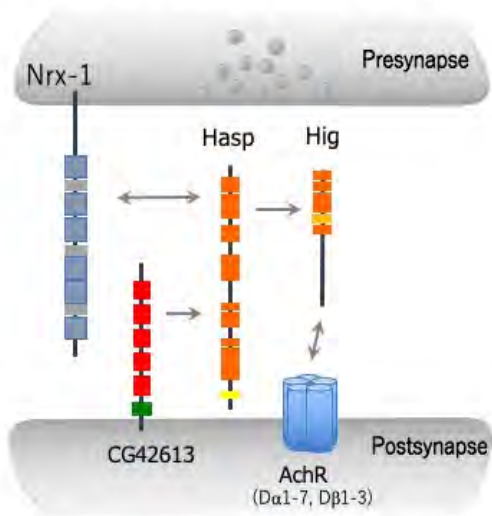
hig 変異体は、成虫時に活動性の低下を示す。この行動上の不活性状態は、Hig タンパク質が睡眠に何らかの関わりをもつことを期待させる。また、睡眠がシナプス活性を反映したものであるとするならば、Hig によって局在制御を受ける nAChR が睡眠をより直接的に制御している可能性がある。そこで、Hig および nAChR の睡眠への関与を調べ、今までに Hig の解析によって得られた情報を睡眠の研究に反映させる。さらに、コリン作動性シナプスに存在する他のタンパク質の睡眠における役割を解析する。

2. 本年度の研究成果

a) Sclamp タンパク質のシナプス間隙構築における役割

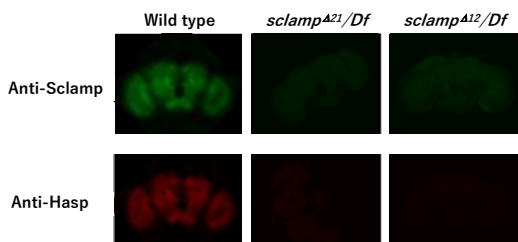
ショウジョウバエ中枢神経系におけるコリン作動性シナプスのシナプス間隙には、共に分泌性のタンパク質である Hig と Hasp が存在している。Hig のシナプス間隙への局在には Hasp と nAChR サブユニット $D\alpha 5$ と $D\alpha 7$ が必要であり、その中でも Hasp が欠損すると Hig はシナプス間隙に検出できなくなる。ところが、Hig が欠損しても Hasp の局在には影響がない。したがって、Hasp の局在化機構には、今までに同定されていないタンパク質が関わっていることになる。Hasp と免疫沈降実験により共沈降したタンパク質の分画をショットガン法に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)、Sclamp および Neurexin-1 という膜タンパク質が同定された。現在、そのうちの Sclamp について解析を進めており (次ページ上図参照、Sclamp は CG42613 と表記)、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

コリン作動性シナプスのシナプス間隙



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 *sclamp* 遺伝子の欠失変異体を染色すると、そのシグナルは消失することから、分離した欠失変異はタンパク質を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イング(WB)においても確認された。この変異体のシナプス領域における Hasp の局在を免疫染色により調べると、Hasp シグナルが消失する(下図参照)ことから、Sclamp はコリン作動性シナプス間隙に Hasp を局在化させるために必要であり、当初期待していた機能をもつタンパク質であることが判明した。ところが、不思議な結果が2点存在した。第一に、WB を用いて、*sclamp* 変異体の脳抽出分画に存在する Hasp を調べたところ、分子量の大きい2本の断片は消失したが、複数の小さい断片は野生型と変わらず存在していた。これらの小さい断片は変異体の脳のどこかに存在するはずだが検出されていない。第二に、*sclamp* 変異体のシナプス領域には前述の通り Hasp は検出されず、また Hasp は Hig のシナプス間隙への局在に必要であることから、*sclamp* 変異体では

Hasp signals disappeared in *sclamp* mutant brains



Hig シグナルも消失することが予想された。ところが、Hig シグナルは野生型と一見変わらず検出された。この結果は、Hig のシナプス間隙への局在には、Hasp が直接はたらくのではなく、Sclamp タンパク質が直接的に作用し、Hasp はその作用を阻害すると思えば説明がつく。この仮説が正しければ、*sclamp* と *hasp* の二重変異体の脳内シナプ領域で Hig の局在は維持されるはずであり、その解析を現在行っている。

Sclamp タンパク質は、脳細胞が産生する転写物の網羅的な解析により、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 の局在を制御しているのか明らかにしていく必要がある。また、Sclamp のシナプスにおける局在部位を、Hig、Hasp コンパートメント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) *sclamp* 変異体の睡眠パターン

Sclamp タンパク質と睡眠との関係を明らかにするため、*sclamp* 変異体を用いて睡眠パターンを調べたところ、1日2回の明期と暗期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、睡眠要求)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。一つの可能性として、定常的に睡眠が不足しているために睡眠要求が高まっており、その結果として明期と暗期の変わり目で活動性が増加しないのかもしれない。また、Sclamp 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必要がある。睡眠要求が高まっているときは、グリアでのカルシウムイオン濃度が高いことが報告されており、その点についてもアプローチしていきたい。

3. Research projects and annual reports

Research Project: How the brain expresses a variety of neural function still remains enigmatic. We are studying regulatory mechanisms underlying synapse differentiation at molecular levels, and also try to understand a genetic program that globally organizes the neural circuits in the brain. To approach these problems, we employ a small brain of *Drosophila*, which comprises 10^5 neurons, only a millionth the size of a human brain. Our research currently focuses on the synaptic cleft matrix, identifying its components, analyzing the process of matrix formation, and revealing roles for matrix in synapse differentiation and brain functions.

The *hig* (*hikaru genki*) gene, identified by a mutant phenotype of reduced locomotor activity (Hoshino et

al., Neuron 1993), encodes a secretory protein with multiple CCP domains and an Immunoglobulin domain. Hig protein localizes to the synaptic clefts, forming matrix at cholinergic synapses, in the brain (Hoshino *et al.*, Development 1996; Nakayama *et al.*, J. Neurosci. 2014, 2016). The goal of this project is to identify new proteins that constitute synaptic matrix, and also to reveal how these proteins are organized in order to form functional matrix during synaptogenesis. In addition, we are interested in building a new model of synaptic structure because the current general model does not incorporate synaptic cleft into the architecture as an integral part of synapse.

Annual reports:

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

To identify a synaptic protein 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, Sclamp and Neurexin-1 were found among the proteins identified in the experiments. Sclamp 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 disappeared in the synaptic regions, indicating a role for Sclamp in Hasp localization. As we have successfully obtained anti-Sclamp antibody, it is now possible to reveal relative positions of Hig, Hasp and Sclamp within a single synaptic cleft, using an ultrahigh resolution microscope.

The *sclamp* mutants exhibited abnormal sleep pattern. During transition period from light-on to -off and light-off to -on, wild-type flies temporarily moved well, but the mutant flies showed less locomotor activity during the periods. It will be interesting to determine which mechanism (light response, circadian rhythm, or sleep need) is involved in the observed abnormal behavior and how Sclamp participates in the sleep regulation.

4. 論文, 著書など

なし

5. 学会発表など

シナプス間隙のナノコンパートメント形成を制御する膜タンパク質 Sclamp

北市三和、中山 実、浜 千尋

第 44 回日本分子生物学会年会

2021 年 12 月 1 日 (ポスター)パシフィコ横浜

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名: 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: 2018-2022 年



環境衛生学研究室

Laboratory of Environmental Hygiene

1. 研究概要

私たちの身の周りには、数え切れない程、様々な微生物が存在する。その中には、いろいろな動植物やヒトに感染して病気を引き起こすものもあれば、そうでないものもある。また、腸内細菌のように動物の腸内で食物の消化を助けるものや、恐らくは動植物の進化の過程で重要な役割を担っているであろうものまで存在する。この様に、私たちの周りに存在する微生物は動物や植物と相互に影響し合っており、生態学的マイクロコスモスやマクロコスモスを形成している。

本研究分野では、微生物の中でも特に「動物からヒト」あるいは「ヒトから動物」に感染する人獣共通感染症(人畜共通感染症、動物由来感染症または Zoonosis)を引き起こす病原微生物についての病原性の発現メカニズムや自然環境中での存在様式の解明、公衆衛生対策のための基礎的な研究を行っている。具体的な研究対象は、蚊やマダニ等の節足動物が媒介する人獣共通感染症である(図1)。近年の地球温暖化に伴う媒介蚊の生息範囲の拡大と、それに伴う各種の節足動物媒介性感染症の流行域の拡大が危惧されている。日本においても、海外で流行するウイルスや細菌等病原体の侵入と、その国内流行への対策が急務となっている。そこで、本研究室では以下の研究テーマについて研究を行っている。

- (1)蚊およびマダニ媒介性人獣共通感染症の京都市における感染疫学的解析と、新規検査法やワクチンの開発
- (2)蚊およびマダニ媒介性人獣共通感染症を引き起こす病原微生物の病原学的・分子生物学的解析

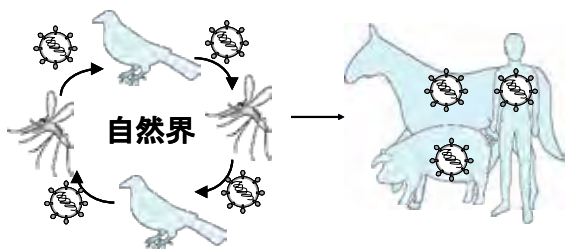


図1. 蚊媒介性人獣共通感染症の感染環

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

教授 前田 秋彦

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



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

前田秋彦: 第20回日本バイオセーフティー学会大会 (11.30-12.2、京都) 会長

前田秋彦: ウイルスは世界を巡る. 第43回都市有害生物管理学会(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: 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理事

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: R3 防虫講習会 講師



2021.6 研究室にて

2021 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

本学では毎年春学期に、本学動物実験委員会主催のもと、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を行っています。また、定期的な開催に加えて、適宜、臨時の教育訓練を実施しています。2021 年度は、新型コロナウイルス感染症の影響により、オンライン実施となりましたが、4 月 7 日の教育訓練には、142 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、動物慰霊祭を執り行っています。2021 年度は 2 月 8 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 46 名、オンライン視聴者は 63 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



2021 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
2021. 4. 28	先端生命 産業生命	齋藤 敏之 (京都産業大 学生命科学部 教授) 浜 千尋 (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！ (4月28日)
2021. 5. 26	先端生命	板野 直樹 (京都産業大 学生命学部 教授) 加藤 啓子 (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！ (5月26日)
2021. 6. 23	先端生命	金子 貴一 (京都産業大 学生命科学部 教授) 河邊 昭 (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！ (6月23日)
2021. 7. 28	産業生命	木村 成介 (京都産業大 学生命科学部 教授) 佐藤 賢一 (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！ (7月28日)
2021. 9. 29	先端生命 産業生命	瀬尾 美鈴 (京都産業大 学生命科学部 教授) 染谷 梓 (京都産業大 学生命科学部 准教授)	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！ (9月29日)
2021. 11. 10	先端生命	高桑 弘樹 (京都産業大 学生命科学部 教授) 高橋 純一 (京都産業大 学生命科学部 准教授)	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！ (11月10日)
2021. 12. 8	先端生命	棚橋 靖行 (京都産業大 学生命科学部 准教授) 津下 英明 (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！ (12月8日)
2021. 12. 22	先端生命 産業生命	寺地 徹 (京都産業大 学生命科学部 教授) 中村 暢宏 (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！ (12月22日)
2022. 2. 25	総合生命科学部	津下 英明 (京都産業大 学生命科学部 教授)	総合生命科学部 卒業研究発表会が開催されました！ (2月25日)

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
4月	産業生命	寺地 徹 教授	生命科学部 寺地 徹 教授が日本育種学会功労賞を受賞しました。
4月			Monthly GSCセミナーを開催しました。(4月14日)
6月	産業生命		生命科学部 産業生命科学科の課題解決型授業(生命科学PBL2)のチームが現地視察を行いました
6月	産業生命	勝 弥一 博士研究員 坂本 智昭 助教 木村 成介 教授	京の伝統野菜ミブナの育種の歴史を解明しました
6月			第2回Monthly GSC「An Activity, Not Magical and Mysterious」
6月	総合生命		総合生命科学部『理工系コーオペロケーションプログラム』嵯峨野地域での産官学連携の取り組みが「関西まちづくり賞」を受賞
6月			第3回Monthly GSCを開催しました(6月9日)
7月	産業生命	トクマコフ アレクサンデル研究員 佐藤 賢一 教授	卵細胞の老化機構とアンチエイジング?~アフリカツメガエルを用いた試み
7月	先端生命	遠藤 斗志也 客員教授	タンパク質動態研究所 遠藤 斗志也 所長が2021年度“Hans Neurath Award (ハンス・ノイラート賞)”を受賞
7月	産業生命	野村 哲郎 教授	マルハナバチの生息地における巣の密度をDNAデータから推定するための方法を開発
8月			第4回 Monthly GSC「自分にしかできないこと」で築くキャリア
9月			英語漬けの3日間「英語サマーキャンプ2021」開催
10月			Monthly GSCセミナーを開催しました(10月13日)
11月	先端生命	永田 和宏 名誉教授 潮田 亮 准教授	小胞体局在還元酵素ERdj5の機能不全は細胞内のカルシウムイオンバランスの攪乱を招き、細胞老化の亢進、個体寿命の短縮を起こすことを解明
11月			Monthly GSCセミナーを開催しました(11月10日)
11月			サイエンスコミュニケーション研究会「サングラス」が船岡山公園で子供向け科学体験イベント「によきによきラボ」を開催
12月	産業生命	三瓶 由紀 准教授	「天平文様のデザイン美を学ぶ研究会」を開催しました
12月	産業生命	三瓶 由紀 准教授	生命科学の知識を活かした社会課題の解決に向けて「天平衣装喫茶~昔の奈良に囲まれて、今の地球を考える~」を実施しました
12月			Monthly GSCセミナーを開催しました(12月8日)
1月	産業生命	三嶋 雄一郎 准教授 木村 成介 教授	mRNAの安定性は遺伝暗号コドンの組み合わせによって変化する。その原因は「リボソームの減速」
2月	先端生命	本橋 健 教授	植物の光合成電子伝達におけるフェレドキシンを起点とする電子分配の一端を解明
3月	先端生命	横山 謙 教授	クライオ電子顕微鏡によるスナップショットにより回転分子モータータンパク質の回転機構を解明

キャンパスマップ



教室早見表

教室名称	建物名称	マップNo
4〇〇	4号館	④
5〇〇〇	5号館	⑤
51〇	6号館(大教室棟)	⑥
10〇〇〇	10号館	⑩
11〇〇〇	11号館	⑪
12〇〇〇	12号館	⑫
13〇〇〇	13号館	⑬
14〇〇〇	14号館	⑭
15〇〇〇	15号館	⑮
16〇〇〇	16号館	⑯
B〇〇〇	万有館	⑱
S〇〇〇	サギタリウス館	⑳
SR〇〇〇	真理館	㉑
T〇〇〇	天地館	㉒

教室名から建物を探せます。
 例) S201 教室の場合
 ⇒ 順文字 S から「サギタリウス館」
 10201 情報処理教室
 ⇒ 順文字 10 から「10号館」
 517 教室の場合
 ⇒ 「5」で始まる3桁の教室は6号館

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3号 2021(令和3年)

発行日 2022(令和4)年8月22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

<https://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/lis/>