



岡崎統合バイオサイエンスセンター レポート2010

自然科学研究機構 岡崎共通研究施設
岡崎統合バイオサイエンスセンター

O
kazaki
|
nstitute for
|
ntegrative
|
B
ioscience

岡崎統合バイオサイエンスセンター レポート2010

自然科学研究機構 岡崎共通研究施設
岡崎統合バイオサイエンスセンター

岡崎統合バイオサイエンスセンター レポート2010の刊行にあたって

岡崎統合バイオサイエンスセンターは、岡崎3機関（基礎生物学研究所、生理学研究所、分子科学研究所）と連携し、新たなバイオサイエンスを切り開くことを目的として設置された、上記3研究所の共通研究施設である。岡崎統合バイオサイエンスセンターでは、平成22年度から「環境分子・生体分子応答機構研究推進事業」、「生命機能分子から生命システムの全体像にせまる統合バイオサイエンス」の2つの研究プロジェクトを推進している。「環境分子・生体分子応答機構研究推進事業」においては、環境分子による生理機能攪乱の本質を明らかにし、環境分子が生物へ及ぼす影響の定量予測法の確立、環境分子による生物への悪影響の低減策確立のための科学的基盤の確立を目的として、1) 環境分子の受容・応答機構研究、2) 環境分子による生理機能攪乱の統合的研究、3) 生殖細胞分化機構研究、4) 細胞のストレス応答・ストレス防御機構研究、5) 生体分子による正常生理機能制御の統合的研究、6) 環境分子の生物影響に関する統合的データベース構築というサブテーマを設定して研究を実施している。また、「生命機能分子から生命システムの全体像にせまる統合バイオサイエンス」においては、高次生命現象を生命機能分子の構造的側面にまで掘り下げて理解することにより、生命システムの全体像を解き明かすことを目的として、1) 生命現象の機能解析（特に神経回路網形成や視覚の解析）、2) 生命機能分子の網羅的探索（特に発生・神経回路網形成に関わる蛋白質の遺伝子レベルでの解析）、3) 生命機能分子の構造・機能解析（網羅的探索で明らかにされた蛋白質（大部分は天然変性蛋白質）のうち高次生命現象にとって重要なもの、およびチャネル蛋白質やセンサー蛋白質などの膜蛋白質を対象とする）、4) 高次生命システムと生命機能分子の計算機シミュレーションというサブテーマを設定して研究を実施している。これらのプロジェクトは、岡崎統合バイオサイエンスセンターにおける研究の中核であるとともに、岡崎統合バイオサイエンスセンターと岡崎3機関との間の連携の核として役割も担っている。岡崎統合バイオサイエンスセンターとしては、構成員の総力を挙げて、これらのプロジェクトに取り組んでいる。

2010年度は、岡崎統合バイオサイエンスセンターにとっては設立10周年という節目の年であった。10周年という節目を契機とし、今後さらに岡崎統合バイオサイエンスセンターを発展させるためにはセンターはどうあるべきかについての議論も進めているところであるが、センターの発展のためには関係する皆様方の御理解と御支援が不可欠である。これまで以上の、御理解、御支援をお願いする次第である。

目 次

序 言

1 平成22年度 構成員一覧	3
2 研究領域の現状	
1. 時系列生命現象研究領域	
1-1 発生遺伝	7
1-2 分子発生	10
1-3 神経分化	13
2. 戦略的方法論研究領域	
2-1 ナノ形態生理	17
2-2 生物無機	24
2-3 生体物理	27
2-4 生体分子物性	30
3. 生命環境研究領域	
3-1 細胞生理	34
3-2 生命環境	39
3-3 生命分子	46
3-4 神経細胞生物	55
3-5 客員部門	57

1 平成22年度 構成員一覽

平成22年度 構成員一覧

青野重利 (岡崎統合バイオサイエンスセンター長)

時系列生命現象研究領域

発生遺伝研究部門

小林 悟 (教授)
林 良樹 (助教)
佐藤 昌直 (助教)
野田 千代 (技術職員)
影山 裕二 (統合バイオ特任助教)
熊田 裕司 (博士研究員)
橋山 一哉 (博士研究員)
藤澤 千笑 (博士研究員)
稲垣 幸 (博士研究員)
久保 悟 (総研大生)
大原 裕也 (総研大生)
篠塚 裕子 (総研大生)
新實香緒里 (技術補佐員)
佐藤 香織 (技術支援員)
石原日登美 (技術支援員)
本多 聡子 (事務/技術支援員)

分子発生研究部門

高田 慎治 (教授)
大久 保直 (助教)
矢部泰二郎 (助教)
内海 秀子 (技術職員)
高田 律子 (博士研究員)
陳 秋紅 (博士研究員)
中山 啓 (博士研究員)
高橋 潤 (博士研究員)
石谷 閑 (総研大生)
高橋 浩之 (総研大生)
Wanglar Chimwar (総研大生)
篠塚 琢磨 (総研大生)
高代加代子 (技術支援員)
富田 早苗 (技術支援員)
大原かおり (技術支援員)
鵜飼 咲枝 (秘書)

神経分化研究部門

吉村由美子 (教授)
東島 眞一 (准教授)
森 琢磨 (助教)
森 正浩 (技術職員)

足澤 悦子 (博士研究員)
石川 理子 (博士研究員)
木村有希子 (博士研究員)
佐藤 千恵 (博士研究員)
中川 直 (総研大生)
石神久美子 (技術支援員)
鈴木 幸子 (研究支援員)
伊藤 浩子 (研究支援員)
伊木志成子 (研究支援員)
寺澤 洋子 (研究支援員)
比賀 昌子 (事務支援員)

戦略的方法論研究領域

ナノ形態生理研究部門

永山 國昭 (教授)
村上 政隆 (准教授)
大橋 正人 (助教)
片岡 正典 (計算科学研究センター, 助教)
Radostin Danev (助教)
小原 正裕 (技術職員)
細木 直樹 (博士研究員)
香山 容子 (博士研究員)
永田 麗子 (計算科学研究センター, 博士研究員)
福田 善之 (博士研究員)
永谷 幸則 (博士研究員)
飯島 寛文 (総研大生)
河口 美江 (事務支援員)
小瀧 弘子 (秘書)
永谷 恵 (技術支援員)
杉谷 正三 (共同研究員)
新田 浩二 (共同研究員)
伊藤 俊幸 (共同研究員)
児玉 英彦 (共同研究員)
高瀬 弘嗣 (共同研究員)
三宮 工 (共同研究員)
岩間 尚文 (特別訪問研究員)

生物無機研究部門

青野 重利 (教授)
吉岡 資郎 (助教)
澤井 仁美 (特任助教)
山中 優 (博士研究員)

谷澤三佐子（事務支援員）

夏目 和歌（特別訪問研究員）

Medina Johan（特別訪問研究員）

生体物理研究部門

藤井 浩（准教授）

倉橋 拓也（助教）

Cong Zhiqi（研究員）

中川 貴文（研究員）

Wang Chunlan（総研大生）

Oii Mei Lee（総研大生）

谷澤三佐子（事務支援員）

生体分子物性研究部門

桑島 邦博（教授）

真壁 幸樹（助教）

中村 敬（特任助教）

陳 進（統合バイオ特任助教）

竹中 健朗（博士研究員）

高橋 一暢（特別共同利用研究員）

水木 寛子（技術支援員）

田中 景（事務支援員）

生命環境研究領域

細胞生理研究部門

富永 真琴（教授）

山中 章弘（准教授）

曾我部隆彰（特任助教）

齋藤 茂（博士研究員／特任助教）

福田 直美（技術職員）

梅村 徹（博士研究員）

内田 邦敏（博士研究員）

Boudaka Ammar（日本学術振興会外国人特別研究員）

加塩麻紀子（総研大生）

常松 友美（総研大生）

周 一鳴（総研大生）

高山 靖規（総研大生）

松本恵理子（総研大生）

田淵紗和子（総研大生）

新宅 健司（総研大生）

川口 仁（特別共同利用研究員）

三原 弘（特別共同利用研究員）

水野 秀紀（特別共同利用研究員）

伊藤 嘉美（技術支援員）

福田阿由子（技術支援員）

杉浦 由佳（技術支援員）

齋藤くれあ（技術支援員）

西村 慶子（技術支援員）

生命環境研究部門

井口 泰泉（教授）

宮川 信一（助教）

萩野由紀子（助教，9月より）

水谷 健（技術職員）

平川 育美（共同研究員）

中村 武志（総研大生）

佐藤 優（総研大生）

豊田 賢治（総研大生）

谷津 遼平（総研大生）

角谷 絵里（総研大生）

遠山 早紀（総研大研究生）

小林かおる（特定技術職員）

林 友子（技術支援員）

今泉妙依子（秘書）

生命分子研究部門

加藤 晃一（教授）

山口 拓実（助教）

神谷由紀子（特任助教）

植草 義徳（日本学術研究会特別研究員）

矢木 真穂（特別訪問研究員）

杉原 隆広（特別訪問研究員）

Mahesh S. Chandak（総研大生）

西尾 美穂（特別共同利用研究員）

平野 貴志（特別共同利用研究員）

宇野 剛（特別共同利用研究員）

山本さよこ（特別共同利用研究員）

鈴木万里子（技術支援員）

磯野裕貴子（技術支援員）

田中 景（事務支援員）

神経細胞生物学研究部門

椎名 伸之（准教授）

中山 啓（助教）

松田 知里（技術支援員）

客員部門

笹井 理生（客員教授）

勝 義直（客員准教授）

2 研究領域の現状

1. 時系列生命現象研究領域

1-1 発生遺伝

小林 悟（教授）

1) 専門領域：発生生物学

2) 研究課題：

- a) 極細胞中における Nanos タンパク質の機能
- b) 極細胞の自律的性決定機構
- c) 雄生殖幹細胞ニッチ形成機構
- d) 生殖幹細胞ニッチにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 極細胞中における Nanos タンパク質の機能

ショウジョウバエの卵中には生殖質と呼ばれる特殊な細胞質が局在しており、これを取りこんだ極細胞のみが生殖細胞に分化する。生殖質中には、生殖細胞の形成に関わる複数の母性因子が局在しており、このような因子の一つとして母性 Nanos タンパク質が知られている。Nanos タンパク質は、RNA 結合タンパク質である Pumilio タンパク質とともに、特異的な mRNA の翻訳制御に関与する。これまでに、極細胞中において Nanos タンパク質が翻訳制御するターゲット mRNA を網羅的に同定することを試みてきた。その結果、6 種類の mRNA が極細胞中において Nanos により翻訳抑制を受けることが明らかとなった。これらターゲット mRNA のうち、細胞分裂制御に関わるものに関して機能解析を行なっている。

b) 極細胞の自律的性決定機構

これまでに、Sex lethal (Sxl) 遺伝子が、雌の極細胞中でのみ発現すること、その発現時期は極細胞が生殖巣へと移動する短い期間に限られることが明らかとなっている。また、ショウジョウバエの始原生殖細胞（極細胞）の雌化に Sex lethal (Sxl) が必須であることを明らかにしてきた。さらに、Sxl が発現することが極細胞の雌化に十分であることを証明することができた。雄の極細胞で Sxl を強制発現させ、雌個体に移植すると、機能的な卵に分化する（論文投稿中）。これまでに、生殖細胞自律的な性決定機構の存在は予想されていたにもかかわらず、その実体は明らかではなかった。本研究は、生殖細胞自律的な性決定機構のマスター遺伝子を同定した初めての例である。現在、Sxl 下流の遺伝子カスケードを明らかにすることを試みている。

c) 雄生殖幹細胞ニッチ形成機構

極細胞は、生殖巣を構成する体細胞とともに胚生殖巣を構成する。これまでに、受容体型膜タンパク質 Notch を介した体細胞間の相互作用により雄の生殖幹細胞ニッチの形成が活性化されることが明らかになっている。また、受容体型膜タンパク質である Sevenless (Sev) および Egfr が胚生殖巣の後半部の体細胞で活性化し、その領域に生殖幹細胞ニッチが形成されるのを阻害していることも明らかとなっている。これら受容体のリガ

ンドは、極細胞で発現することから、極細胞の減少に伴い生殖幹細胞ニッチ領域が胚生殖巣の後半部へと拡大する。この機構は、極細胞数が減少した場合であっても、生殖幹細胞ニッチの拡大により、生殖幹細胞を確保するために必要である (Kitadate et al., 2010)。

d) 短鎖ペプチドによる変態期の遺伝子発現制御

11アミノ酸および32アミノ酸の短鎖ペプチドをコードするショウジョウバエ *polished rice* (*pri*) 遺伝子が、変態期において遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることを見いだした。*pri* 遺伝子の機能を一部欠いた変異体では、変態初期に発生が停止するが、これはステロイドホルモンの一種、脱皮ホルモン (エクジソン) に依存した遺伝子発現機構が一部損なわれることに起因することを明らかにした。また、*pri* 遺伝子はエクジソンに依存して発現することを明らかにしており、*pri* 遺伝子がエクジソンシグナル経路の重要な因子であることが明らかになった (Kondo et al., 2010)。

4) 学術論文

Y. Kitadate and S. Kobayashi, “Notch and Egfr signaling act antagonistically to regulate germline stem cell niche formation in *Drosophila* male embryonic gonads” *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **107**, 14241-14246 (2010).

T. Kondo, S. Plaza, J. Zanet, E. Benrabah, P. Valenti, Y. Hashimoto, S. Kobayashi, F. Payre, Y. Kageyama, “Small Peptides Switch the Transcriptional Activity of *Shavenbaby* During *Drosophila* Embryogenesis” *Science*, **39**, 336-339 (2010).

R. Niwa, K. Ito, T. Namiki, Y. Shimada-Niwa, M. Kiuchi, S. Kawaoka, T. Kayukawa, Y. Banno, Y. Fujimoto, S. Shigenobu, S. Kobayashi, T. Shimada, S. Katsuma, and T. Shinoda, “*Non-molting glossy/shroud* encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the “Black Box” of the ecdysteroid biosynthesis pathway” *Development*, **137**, 1991-1999 (2010).

5) 著書, 総説

林良樹, 小林悟, 中藤博志, “ショウジョウバエ生殖幹細胞システムにおけるニッチの場構築の分子機構” 細胞工学, **29**, 645-651 (2010).

6) 国際会議発表リスト

K. Hashiyama, Y. Hayashi and S. Kobayashi, “*Sex lethal* acts autonomously in the germline progenitors to initiate female development in *Drosophila*” CSHL meeting, Germ Cells, New York (USA), October, 2010.

Y. Hayashi H. Nakato and S. Kobayashi, “The role of heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila* germline stem cell niche” CSHL meeting, Germ Cells, New York (USA), October, 2010.

7) 招待講演

K. Hashiyama, Y. Hayashi and S. Kobayashi, “Mechanism regulating sex determination of the germline progenitors in *Drosophila* embryos” Satellite Symposium to SDB and Japanese SDB Joint Meeting, Germ Cells, New Mexico (USA), August, 2010.

8) 学会および社会的活動

日本発生生物学会運営委員

9) 他大学での非常勤講師，客員教授

藤田保健衛生大学医学部客員教授

筑波大学非常勤講師

11) 外部獲得資金

科研費新学術領域研究（計画），「ショウジョウバエ卵巣／精巣における GSC／ニッチ・システムの解明」，小林悟（代表）（2008年－2012年）。

科研費基盤 B，「ショウジョウバエ生殖細胞系列の運命決定機構および性差形成機構」，小林悟（代表）（2009年－2011年）。

科研費若手研究 B，「ショウジョウバエ生殖幹細胞の「ニッチの場」形成の分子メカニズムの解析」林良樹（代表）（2009年－2011年）。

科研費若手研究（スタートアップ），「ショウジョウバエ生殖細胞系列における性決定機構」，橋山一哉（代表）（2009年－2011年）。

科研費新学術領域研究（計画），「遺伝学的アプローチによる高分子非コード RNA マシナリーの生理機能解析」，影山裕二（代表）（2009－2013年）。

科研費基盤 B，「上皮細胞の形態を制御する短鎖ペプチドの機能」，影山裕二（代表）（2008－2012年）。

内藤記念科学振興財団・科学奨励金，「非分泌性短鎖ペプチドによる細胞間コミュニケーションの新たなかたち」，影山裕二（代表）（2010－2011年）。

1-2 分子発生

高田 慎治 (教授)

1) 専門領域：発生生物学, 分子生物学

2) 研究課題：

- a) 脊椎動物の体節形成機構に関する研究
- b) 脊椎動物の鰓弓の発生機構に関する研究
- c) 脊椎動物の発生過程における細胞間シグナルの機能に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 脊椎動物の体節は頭部側から尾部側にかけて逐次、周期的に形成される。個々の体節ユニットが時間経過とともに順次形成されていく仕組みは、すでにその理解が進んでいる多くの発生現象には認められていない独特なものであり、その解明には興味もたれる。本年度は体節の構造的周期性を理解する上で最も重要である、体節間の境界位置の形成機構を解明することを目的として、そこに関与する Ripply 遺伝子に着目して研究を行った。昨年度までの研究から、脊椎動物には Ripply 遺伝子が3つ存在し、そのうち Ripply 1 と 2 は体節の発生過程で発現すること、これら2つの遺伝子の機能をともに欠落させた二重変異体マウスでは体節内の前後極性に異常をきたし、体節がほぼ完璧に前方化を起していることが明らかになっていた。一方、最近の他のグループの研究から、体節間の境界位置は、転写調節因子である Tbx 6 タンパク質の分布により決められること、そしてこの分布は別の転写調節因子 Mesp 2 を介して Tbx 6 タンパク質の分解が制御されることにより制御されることが示されている。それに対して我々は、Ripply 1 と Ripply 2 の発現が Mesp 2 により誘導されること、さらに Ripply 1 と 2 の二重変異体マウス胚では、Tbx 6 mRNA の発現パターンは正常であるにもかかわらず、Tbx 6 タンパク質が存在する領域が本来よりも大きく拡張し、体節間の境界位置が決定されなくなることを突き止めた。すなわち、Mesp 2 により Ripply 1 および Ripply 2 遺伝子の発現が誘導され、その結果 Tbx 6 タンパク質の分解が引き起こされ、体節の境界位置が決定するものと考えられた。現在、これらの結果に基づき、Ripply による Tbx 6 タンパク質の分解機構の解析を進めているところである。
- b) 咽頭弓は体節と同様に頭部側から尾部側にかけて逐次、周期的に形成されることが知られている。したがって、体節形成と咽頭弓形成の間には何らかの共通する分子メカニズムが存在するのではないかと考えられるが、そのような考え方の妥当性は明らかにされていない。一方、咽頭弓からは様々な器官が派生することから、その発生機構にも大きな興味もたれる。我々はマウスの3つの Ripply 遺伝子うち、Ripply 3 が咽頭弓で発現することを見いだした。そこで、Ripply 3 のノックアウトマウスを作成しその表現型の解析を行った。Ripply 3 ホモ変異体は、生後すぐにチアノーゼを呈して致死となった。さらなる詳細な解析から、Ripply 3 変異体胚では、第3, 4咽頭弓がほとんど形成されず、咽頭弓動脈も全く形成されないこと、そしてその結果として、心室中隔壁欠損や大動脈の形成異常を引き起こすことが明らかになった。また、Ripply 3 変異体胚では、咽頭弓から発達する胸腺や副甲状腺も形成不全になることが観察された。したがって、Ripply 3 は咽頭弓ならびに心臓や動脈系、胸腺、副甲状腺などの器官が正常に形成されるために必要であることが明らかになった。

さらに, Ripply3 は咽頭弓で発現する転写制御因子 Tbx 1 機能を制御することも示された。すなわち, 体節と咽頭弓においては異なる組み合わせの Tbx と Ripply 遺伝子が相互作用していることが明らかになったことになり, 両組織の発生のしくみを考える上で興味を持たれた。

- c) 形態形成が正しく進行するためには, 分泌性シグナルタンパク質の分泌や拡散が厳密に制御される必要がある。我々は, 分泌性シグナルタンパク質である Wnt タンパク質には特殊な不飽和脂肪酸が付加していることを見だし, この脂肪酸付加が Wnt の分泌には必要であることを明らかにした。今年度はこのような成果をふまえ, 分泌された Wnt タンパク質の実体の解析を進めるとともに, 細胞外に分泌された Wnt タンパク質のイメージングやゼブラフィッシュを用いた脂肪酸付加酵素の役割について研究を進めた。

4) 学術論文

T. Okubo, A. Kawamura, J. Takahashi, H. Yagi, M. Morishima, R. Matsuoka and S. Takada, “Ripply3, a Tbx1 repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice” *Development* in press

J. Takahashi, A. Ohbayashi, M. Oginuma, D. Saito, A. Mochizuki, Y. Saga and S. Takada, “Analysis of Ripply1/2-deficient mouse embryos reveals a mechanism underlying the rostro-caudal patterning within a somite.” *Dev. Biol.* **342**, 134-145 (2010).

M. Nishita, S. Itsukushima, A. Nomachi, M. Endo, Z. Wang, D. Inaba, S. Qiao, S. Takada, A. Kikuchi and Y. Minami, “Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating dishevelled polymerization.” *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3610-3619 (2010).

Y. Yoshinaga, T. Kagawa, T. Shimizu, T. Inoue, S. Takada, J. Kuratsu and T. Taga, “Wnt3a promotes hippocampal neurogenesis by shortening cell cycle duration of neural progenitor cells.” *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 1049-1058 (2010).

H. Hashimoto, K. Shinohara, J. Wang, S. Ikeuchi, S. Yoshida, C. Meno, S. Nonaka, S. Takada, K. Hatta, A. Wynshaw-boris and H. Hamada, “Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia.” *Nat. Cell Biol.* **12**, 170-176 (2010).

Y. Miyaoka, M. Tanaka, T. Imamura, S. Takada and A. Miyajima, “A novel regulatory mechanism for Fgf18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and delta-like protein (Dlk)” *Development* **137**, 159-167(2010).

R. Katayama, T. Ishioka, S. Takada, R. Takada, N. Fujita, T. Tsuruo and M. Naito, “Modulation of Wnt signaling by the nuclear localization of cellular FLIP-L” *J. Cell Sci.* **123**, 23-28. (2010).

9) 招待講演

Shinji Takada “Specific lipidation of secreted Wnt proteins” in ACE Biomedical Science Symposium, Cheingju (Korea) Nov.6 2010.

Takdash Okubo, Hisato Yagi, Rumiko Matsuoka, Shinji Takada “Ripply3, a Tbx1 modulator, is required for the pharyngeal apparatus and cardiovascular development” in 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (京都2010年2月).

高田慎治「体節と咽頭弓の分節構造の発生機構」：仙台・動物発生コロキウム2010 (仙台, 2010年1月)

高田慎治「脊椎動物の反復構造を形作る分子システムー体節と咽頭弓の発生についてー」：第1回「発生システム」シンポジウム (千葉, 2010年2月).

高田慎治「細胞外環境における Wnt タンパク質の挙動：これからの課題」(京都, 2010年2月).

高田慎治「咽頭弓と体節の発生における Jagged シグナルとフィブロネクチンの相互作用」：ミニシンポジウム「細胞外環境による高次生命現象の制御」第62回日本細胞生物学会(大阪, 2010年5月).

高田慎治「分泌性シグナルタンパク質 Wnt における脂肪酸修飾の意義」(埼玉, 2010年9月).

高田慎治「アシル基転移酵素 Porcupine による Wnt の脂肪酸修飾とその発生における役割」：ワークショップ「アシル基転移酵素の生物学と疾患」第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会合同大会(神戸, 2010年12月).

8) 学会および社会的活動

日本発生生物学会運営委員, 日本分子生物学会会員(高田慎治)

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

埼玉大学理学部非常勤講師(高田慎治)

1-3 神経分化

吉村 由美子（教授）

1) 専門領域：神経生理学

2) 研究課題：

- a) 大脳皮質神経回路の機能解析
- b) 大脳皮質視覚野の経験依存的発達メカニズムの解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 大脳皮質視覚野ニューロンは特定の視覚刺激に対して選択的に反応することは古くから知られている。しかしながら、そのような反応選択性の素過程となる神経回路基盤については未だ不明な点が多い。そこで、特定の視覚刺激に反応した細胞群が形成する神経回路を調べる目的で、神経活動に依存して誘導される最初期遺伝子 Arc をプロモータとして蛍光蛋白 Venus を発現する Arc-Venus トランスジェニックマウスを使用して実験を行った。このマウスに水平方向の視覚刺激を与え、活動依存的に Venus を発現させた後、その視覚野からスライス標本を作製した。蛍光顕微鏡観察下で、2/3層の Venus 陽性細胞からホールセル記録を行い、近傍にある別の Venus 陽性細胞、あるいは Venus 陰性細胞をグルタミン酸局所投与により刺激し、記録細胞への入力を調べた。その結果、Venus 陽性細胞ペア（水平の傾き刺激に反応したと推測される細胞間）の興奮性神経結合は、Venus 陽性-陰性ペア（最適方位が異なる細胞間）と比較して高い割合で検出された。従って、同じ情報処理に関与するニューロン群は選択的に神経結合していると考えられる。
- b) 大脳皮質視覚野の視覚機能は、生後の視覚経験に強く依存して成熟することが知られている。これまでに我々は、ラット大脳皮質視覚野スライス標本を用いた研究により、大脳皮質視覚野内に、1) 非常に微細なスケールの特異的神経回路網が埋め込まれていること、2) 生後直後からの暗室飼育により発達期の視覚体験を完全に遮断すると微小神経回路網の形成が阻害されることを見出している。本年度は、線や図形など形態に関する視覚情報のみの遮断が神経回路発達に及ぼす影響を調べるために、発達過程で開眼する直前に両眼の眼瞼を縫合して飼育したラットを用いて解析を行った。両眼遮蔽したラットは明暗刺激を受けるが、形態視は著しく阻害されている。この視覚野よりスライス標本を作成し、ケージドグルタミン酸による光スキャン刺激法と、複数の 2/3層錐体細胞からの同時ホールセル記録法を用いて神経回路の機能解析を行った。その結果、両眼遮蔽した視覚野では正常な視覚体験を経た視覚野と同様な確率と強度で、記録細胞間に興奮性結合が検出された。一方、特異的な興奮性神経結合による微小神経回路は、ほとんど観察されなかった。従って、個々のニューロン間の神経結合は明暗など単純な視覚刺激があれば正常に形成されるが、それらの神経結合が特定の細胞をグループ化して微小神経回路網を形成するためには正常な視覚体験が必要であると考えられる。視覚反応選択性は幼若期の視覚体験に依存して形成されることから、この神経回路は視覚野ニューロンの反応選択性に関与することが示唆される。

4) 学術論文

J. Schwenk, M. Metz, G. Zolles, R. Turecek, T. Fritzius, W. Bildl, E. Tarusawa, A. Kulik, A. Unger, K. Ivankova, R. Seddik, JY. Tiao, M. Rajalu, J. Trojanova, V. Rohde, M. Gassmann, U. Schulte, B. Fakler and B. Bettler, “Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits” *Nature*. **465**, 231-235 (2010).

A. Ishikawa, S. Shimegi, H. Kida and H. Sato, “Temporal properties of spatial frequency tuning of surround suppression in the primary visual cortex and the lateral geniculate nucleus of the cat” *Eur J Neurosci*. **31**, 2086-2100 (2010).

J. H. Marshel, T. Mori, K. J. Nielsen and E.M. Callaway, “Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo” *Neuron* **67**, 562-74 (2010).

7) 招待講演

Yumiko Yoshimura, “Activity dependent maturation of functional local circuits”, 56th NIBB International Conference, Okazaki (Japan) March 2010.

吉村由美子, “大脳皮質神経回路の経験依存的発達”, 第10回脳と心のワークショップ, ルスツ, 2010.1

吉村由美子, “大脳皮質視覚野における微小神経回路網の経験依存的発達”, 第87回生理学会大会, 盛岡, 2010.5月.

8) 学会および社会的活動

日本生理学会, 日本神経科学会, 日本神経回路学会, 北米神経科学会

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

名古屋大学, 客員教授 (環境医学研究所) (吉村由美子)

鳥取大学大学院医学研究科, 非常勤講師 (吉村由美子)

11) 外部獲得資金

科研費基盤研究 (B), 「大脳皮質錐体細胞間抑制性結合の機能的役割」, 吉村由美子 (代表) (2009-2011年).

科研費新学術領域研究, 「視覚情報処理の基盤をなす皮質内メゾ回路の構築と形成」, 吉村由美子 (代表) (2010-2014年).

科研費若手研究 (B), 「大脳皮質の錐体細胞間抑制を担う神経回路微細構造の解明」足澤悦子 (代表) (2009-2010年).

JSTさきがけ, 「視覚系をモデルとした, 情報処理の基盤をなす神経回路の解析」, 吉村由美子 (代表) (2008-2011年).

大幸財団学術研究助成, 「大脳皮質の錐体細胞間抑制を担う神経回路の構造基盤」, 吉村由美子 (代表) (2009-2010年).

公益信託成茂神経科学研究助成基金, 「マウス海馬におけるカイニン酸型受容体サブユニット GluK2/3 (GluR6/7)および GluK5 (KA2) の局在解析」, 足澤悦子 (代表) (2010年).

堀科学芸術振興財団第19回研究助成, 「新規トレース法を用いた大脳視覚野における情報処理過程とシナプス出入力関係の解析」, 森琢磨 (代表) (2010-2011年).

1-3 神経分化

東 島 眞 一 (准教授)

1) 専門領域：発生神経科学，神経生理学

2) 研究課題：

- a) ゼブラフィッシュを用いた，脊髄・後脳運動系神経回路網の解析
- b) 特定のクラスの神経細胞の活動を光遺伝学的に変化させることによる，ゼブラフィッシュ脊髄・後脳運動系神経回路機能の解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 異なった転写因子の発現の組み合わせにより，形態学的に異なったタイプの介在神経細胞が分化してくることが示されてきている。しかしながら，これらの介在神経細胞が，最終的に神経回路網の中で，どのような役割を果たす神経細胞へ分化していくかについては不明な点が多い。ゼブラフィッシュは，その脊髄神経回路が単純であるため，上記の課題を追求するためのよいモデル生物である。こういった背景の元，我々は，特定の転写因子の発現する神経細胞の回路中での機能解析を，ゼブラフィッシュを用いて進めている。特定の種類の神経細胞で，蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し，それら神経細胞を生きたまま可視化することを方法論の中心に据えて研究している。可視化することで，神経細胞の発生過程をダイレクトに追跡することができ，また，機能している神経回路中で，蛍光を発する特定のクラスの神経細胞をねらって電気生理学的な解析を行うことができる。このような解析を通じて，神経発生から神経機能解析までをつなげていきたいと考えている。
- b) a) の項の研究により，特定のクラスの神経細胞を可視化できるようになり，その神経回路中での役割が推測できるようになると，次なる課題は，その神経細胞の活動に人為的に変化を加えて，その結果（たとえば動物の行動パターン）を見ることである。それにより，推測された神経細胞の役割を，より確かな因果関係として提示することができるようになる。特に，近年開発されたチャネルロドプシン（ChR）を代表とする光遺伝学的ツールは，体が透明なゼブラフィッシュに好適である。今年度は転写因子 Chx10 を発現する細胞の解析を中心に研究を行った。これまでの電気生理学的な解析により，脊髄 Chx10 細胞は遊泳行動時に同側の運動ニューロンにフェージックな興奮性入力をするを明らかにしている。Chx10 細胞群の遊泳行動における役割をさらに解析するために，Chx10 発現細胞にチャネルロドプシンを発現する魚を作製し，様々な領域に光照射を行った。その結果，後脳の後方部から脊髄の前方部にわたる領域において，光刺激により遊泳行動の誘発が可能であることが示された。特に後脳後半部は光刺激に最も強く反応した。また，カルシウムイメージングや電気生理学的解析により，後脳 Chx10 細胞が仮想遊泳行動時に活動することを明らかにした。この結果は，後脳後半部の Chx10 細胞群が遊泳行動の開始・維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

4) 学術論文

M. Koyama, A. Kinkhabwala, C. Satou, S. Higashijima and J.R. Fetcho, “Mapping a sensory-motor network onto a structural and functional ground plan in the hindbrain” *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, in press.

A. Kinkhabwala, M. Riley, M. Koyama, J. Monen, C. Satou, Y. Kimura, S. Higashijima and J.R. Fetcho, “A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish” *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, in press.

M. Agetsuma, H. Aizawa, T. Aoki, R. Nakayama, M. Takahoko, M. Goto, T. Sassa, R. Amo, T. Shiraki, K. Kawakami, T. Hosoya, S. Higashijima and H. Okamoto, “The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish” *Nature Neuroscience* **13**, 1354-1356 (2010).

S. Nakamura, K. Kobayashi, T. Nishimura, S. Higashijima and M. Tanaka, “Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka” *Science* **328**, 1561-1563 (2010).

H. Tsutsui, S. Higashijima, A. Miyawaki and Y. Okamura, “Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart” *J. Physiology* **588**, 2017-2021 (2010).

S. Kani, Y-K. Bae, T. Shimizu, K. Tanabe, C. Satou, M. Parsons, E. Scott, H. Baier, S. Higashijima and M. Hibi, “Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum” *Developmental Biology* **343**, 1-17 (2010).

H. Wada, A. Ghysen, C. Satou, S. Higashijima, K. Kawakami, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi, “Dermal morphogenesis controls lateral line patterning during postembryonic development of teleost fish” *Developmental Biology* **340**, 583-594 (2010).

6) 国際会議発表リスト

S. Higashijima, “Development and function of V2 neuron in zebrafish spinal cord” 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, Paris (France), May 2010.

8) 学会および社会的活動

セッションオーガナイザー (in 9th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, Madison (UAS), June, 2010)

11) 外部獲得資金

科研費新学術領域研究分子行動学, 「ゼブラフィッシュを用いた, 脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理の解明」, 東島眞一 (代表) (2008-2012年).

理化学研究所共同研究, 「蛍光タンパク質を応用した in vivoイメージング技術の開発」, 東島眞一 (共同研究担当者) (2008-2010年).

ナショナルバイオリソースプロジェクト, 「ゼブラフィッシュの収集, 保存, 提供」, 東島眞一 (分担) (2007-2011年).

財団法人金原一郎記念医学医療振興財団助成金, 「脊椎動物脊髄神経細胞の多様性形成機構の解析」, 東島眞一 (代表) (2010年).

2. 戦略的方法論研究領域

2-1 ナノ形態生理

永山 國昭 (教授)

1) 専門領域：生物物理学，電子顕微鏡学

2) 研究課題：

- a) 位相差電子顕微鏡の開発と応用
- b) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発と応用
- c) LINAC-HVEMの開発
- d) 細胞内膜系の生理機能とメカニズム

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 位相差電子顕微鏡の開発と応用

無帯電位相板の作成法は一応確立したが，新たな困難が生まれた。すなわちたとえ一見良い無帯電位相板ができて氷包埋試料に電子線を当てると水と有機物がバーストし，試料直下10mm程度の所にある位相板を汚し帯電させることである。この原因については現在2説あり，1つは位相板材料である炭素膜自体が水蒸気下で酸化し帯電するとする説，もう1つは炭素膜上の微小汚れが酸化するとする説である。後者の場合のみこの問題は解決可能である。現在この最後の難関を突破するべく研究を続けている。こうした帯電問題を抱えつつも，位相板を大量に作り帯電したら新品に次々に変えて行くことで，極めて良質の高コントラスト高解像度の電顕像が撮られるようになった。最新の結果として Structure 誌に発表され epsilon 15 フェージ [Murata et al. 2010] および J. Virology 誌に発表されたヘルペスウイルス [Rochat et al. 2010] の高解像度立体構造がある。この他膜蛋白質 TRPV4 の立体構造解析にも応用された [Shigematsu et al. 2010]。

3次元構造をおこすトモグラフィー（立体断層法）でも位相差法は有効性を発揮する。今まで DNA-脂質複合体，蛋白質複合体 [Hosogi et al. 2011]，ウイルス [Danev et al. 2010]，培養神経細胞 [Fukuda et al. 2009] などに応用されてきたが，やはり位相差独自の高コントラストトモグラムが観察されている。トモグラフィーは平均像でなく真に1個の蛋白質，ウイルス細胞について立体像を起こすので，多数の粒子の平均像に依拠する1粒子解析法より位相差の長所がより生かされる。

b) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発と応用

CRESTの支援を受け開発したのが蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を完全一体化し生物試料について同一視野を同一時間で“観”ることを可能とする，電子・光子ハイブリッド顕微鏡である。開発の動機は2つあった。1つは電顕は高分解能だが“観”たい所を観れないことである。電顕は蛍光顕のような特異的ラベルが苦手な上，視野が極めて狭いからである。例えば細胞中に潜むウイルス1匹を探すのはほとんど不可能であった。2つめは蛍光顕と電顕が一体化されれば Google Earth のように自由に“観”たい所を飛び回りかつクローズアップができる自由度が得られるからである。ハイブリッド顕微鏡装置は2009年春に組み上がり，生物学的応用が

現在も続いている。特に蛍光蛋白質発現培養細胞 (PtK2) で YFK-actin の局在が蛍光で特異的に電顕像で高解像度に同時観察できた。

c) LINAC-HVEM の開発

位相差法では電子線が炭素膜がささざるため散乱による多少の像損失が起こり、S/N 比が若干悪化する。この傾向は加速電圧が高くなると改善される。その意味で 500kV 以上の超高圧電子顕微鏡 (HVEM) が位相差と相性が良い。補正予算を受け 500kV 位相差電顕の開発を行った。500kV 電顕は通常 10 億円以上するがそのコストを半減させるため新規のデザインによる電顕を作成した。汎用型で最も性能が安定し多彩な付属機器を持つ 200kV 電顕に線型加速器 (LINAC) 技術を導入し 500kV にアップグレードした。対物レンズ上方に加速器、後方に減速器を置き、対物レンズと試料部分のみ 500kV 加速になるようにした。具体的には 100kV (400kV 加速) 500kV (300kV 減速) 200kV の加減速を行った。現在最終調整に入っている。

d) 細胞内膜系の生理機能とメカニズム

エンドサイトーシス経路やゴルジ体などの細胞内膜系のメンブレントラフィックによる細胞の増殖・分化、組織・形態形成におけるシグナル統合機構を明らかにする事を目的として研究をすすめてきた。たとえばエンドサイトーシス経路は、細胞の環境応答の前線となっているメンブレントラフィック経路であり、ゴルジ体や細胞膜への外向き輸送と、消化器官であるリソソームへの内向き輸送間を選別し、細胞内膜系の分子の運命を決定する。このようなエンドサイトーシス経路の作用は、細胞のシグナル伝達、極性形成などにおいて重要な役割を果たしているが、その機能、メカニズムの詳細はわかっていない。

以前より上皮系細胞の特定の細胞内膜系のオルガネラに局在し、極性細胞の形態形成シグナルを制御する因子の探索同定を、FL-REX (fluorescence localization-based retrovirus-mediated expression cloning) 法を介して進めてきた。極性上皮細胞から cDNA-GFP 融合ライブラリーを構築し、上皮細胞株に発現させ、エンドソーム-ゴルジ細胞内膜系様の局在を示す細胞をクローン化した。得られた GFP 融合蛋白質を解析したところ、これらはもともとなった細胞の cDNA ライブラリー内容を反映すると考えられる特徴的な膜蛋白質群からなり、特定の GFP 融合ライブラリーからは、発生における形態形成シグナル制御に関わっていることが既知である複数の膜蛋白質も得られた。また、特定の膜オルガネラに局在するいくつかの機能詳細不明の蛋白質を同定した。

これまでに、強制発現やアンチセンスモルフォリーノオリゴを用いた機能解析実験の結果、FL-REX 法によりエンドソーム-ゴルジ系に局在することの判明した膜蛋白質の中から、初期発生に関与する新たな機能分子の候補を挙げることに成功した。また、これらの蛋白質の作用メカニズムを解明するため、蛋白質への変異導入により、エンドソーム-ゴルジへの局在シグナルとその制御についての解析をすすめ、複数の翻訳後修飾シグナルによる重層的な局在制御メカニズムを明らかにしつつあり、その役割の解明に取り組んでいる。

今後、引き続き、細胞内膜系のメンブレントラフィックと、細胞の極性形成や組織および個体の形態形成をつなぐ機能分子の探索を行い、その分子レベル、細胞レベル、形態形成レベルでの作用機構を、細胞生物学、分子生物学、生化学的手法を駆使して解析する。このことにより、分子、細胞、組織、個体レベルの各階層をつなぐ、形態形成シグナル制御の統合的理解を目指す。

4) 学術論文

Hideki Shigematsu, Takaaki Sokabe, Radostin Danev, Makoto Tominaga and Kuniaki Nagayama, "A 2.5nm Structure of rat TRPV4 Cation Channel Reveals a Hanging Gondola Shape with a Large Cavity in the Transmembrane

Region” *J. Biol. Chem.*, **285**, 11210-11218 (2010).

Alexandre R. Loukanov, Naomi Kamasawa, Radostin Danev, Ryuichi Shigemoto and Kuniaki Nagayama, “Immunolocalization of Multiple Membrane Proteins on a Carbon Replica with STEM and EDX”, *Ultramicroscopy*, **110**, 306-374 (2010).

Radostin Danev, Shuji Kanamaru, Michael Marko and Kuniaki Nagayama, “Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Tomography” *J. Struct. Biol.*, **171**, 174-181 (2010).

Kazuyoshi Murata, Xiangan Liu, Radostin Danev, Joanita Jakana, Michael F. Schmid, Jonathan King, Kuniaki Nagayama and Wah Chiu, “Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Microscopy and Tomography for Structure Determination at Nanometer and Subnanometer Resolutions”, *Structure*, **18**, 903-912 (2010).

Naoki Hosogi, Hideki Shigematsu, Hiroyuki Terashima, Michio Homma and Kuniaki Nagayama, “Zernike phase contrast cryo-electron tomography of sodium-driven flagellar hook-basal bodies from *Vibrio Alginolyticus*” *J. Struct. Biol.*, **173**, 67-76 (2011).

Rochat R H, Liu X, Murata K, Nagayama K, Rixon F and Chiu W, “Seeing the Genome Packaging Apparatus in Herpes Simplex Virus type I (HSV-1) B-capsids” *J. Virology*, **85**, 1871-1874 (2011).

5) 著書, 総説

Kuniaki Nagayama, Radostin Danev, Hideki Shigematsu, Naoki Hosogi, Yoshiyuki Fukuda, Koji Nitta and Yasuko Kaneko, “Phase Contrast Enhancement with Phase Plates in Biological Electron Microscopy” *Microscopy Today*, **18**, 10-13 (2010).

Radostin Danev and Kuniaki Nagayama, “Phase Plates for Transmission Electron Microscopy” *Methods in Enzymology*, **481**, 343-369 (2010).

6) 国際会議発表リスト

K. Nagayama, “Phase Contrast Innovation and CLEM (Correlative Light-Electron Microscope)”, China-Japan Cryo-EM Forum 2010, Beijing (China), January 2010.

K. Nagayama, “Phase Contrast Electron Microscopy and Integrative Bioimaging”, The 3rd International Symposium for Bioimaging, Okazaki (Japan), January 2010.

K. Nagayama, “An Electron-Photon Hybrid Microscope for Real-time Correlative Microscopy”, Gordon Research Conference 2010: Three Dimensional Electron Microscopy, Il Ciocco (Italy), June 2010.

K. Nagayama, “Phase Plates Free from Contaminant Charging”, Microscopy & Microanalysis 2010, Portland (USA), August 2010.

K. Nagayama, “Phase Plate Electron Microscopy Opens a Novel Nano-Imaging from Protein to Brain”, The 4th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology, Shanghai (China), August 2010.

K. Nagayama, “Charge-free Phase Plate Electron Microscopy”, International Workshop of 3D molecular Imaging by Cryo-EM, Beijing (China), August 2010.

K. Nagayama, “On-line and Off-line Correlative Light-Electron Microscopy”, 6th International Conference on Structure Biology & Functional Genomics 2010, Singapore (Singapore), December 2010.

7) 招待講演

永山國昭「位相差電子顕微鏡と統合バイオイメージング」, 2009年度日本顕微鏡学会関西支部特別企画講演会, 岡崎, 2010年1月

永山國昭「[越境と出会い]で育まれる科学の精神性」, 第48回生物物理学年会, 仙台, 2010年9月

永山國昭「科学コミュニケーションを雑用にしないために」, 生物物理フォーラム, 第48回生物物理学年会, 仙台, 2010年9月

永山國昭「4次元イメージングで観る新しい自然像」, 大学共同利用機関シンポジウム「万物は流転する」, 東京, 2010年11月

永山國昭「IUPABの50年とこれから」, 日本生物物理学学会50周年記念講演会, 東京, 2010年12月

8) 学会および社会的活動

国際純粋・応用生物物理学連合 (IUPAB) (会長)

アジア生物物理学連合 (ABA) (理事)

日本生物物理学学会

日本顕微鏡学会

日本物理学会

日本化学会

日本学術会議 IUPAB 分科会委員長

群馬県立高崎高等学校スーパーサイエンスハイスクール授業

12) 特許

発明者: 永山國昭, 飯島寛文, 寺川進, 新井善博

出願者: 自然科学研究機構, Nagayama IP Holdings, LLC, 日本電子 (株)

題目: 複合顕微鏡装置

出願番号: 特願 2010-88201

発明者: 永山國昭, 永谷幸則, 新井善博

出願者: 自然科学研究機構, Nagayama IP Holdings, LLC

題目: 電子顕微鏡用対物レンズ系

出願番号: 特願 2010-134729

2-1 ナノ形態生理

村上 政 隆 (准教授)

1) 専門領域：生理学, 分泌生理学

2) 研究課題：

- a) 傍細胞輸送の形態学的生理学的基盤
- b) 漢方薬の唾液水分分泌増強作用機構

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 上皮膜を構成する細胞間にはタイト結合が存在し、体内環境と外部環境を境界するバリアとして議論してきた。水分を大量に分泌する唾液腺では持続分泌時に60%以上の水分がタイト結合を越えて分泌された。無化学固定試料の凍結切断試料を電子顕微鏡観察すると、claudin 索は網目構造はとらず数本の平行に走ることが明確になり、深部のアクチン線維網と直接結合し、傍細胞輸送が活性化されるとき網目が小さくなることを観察していた。2009年から2010年にかけて傍細胞輸送の駆動力に静水圧が寄与するか否かを検討する目的で、灌流動脈圧を測定しながら、灌流流速を変化させ、水分分泌速度、蛍光マーカー (Lucifer Yellow) の分泌を測定した。その結果、灌流圧に応じて、水分分泌も蛍光マーカー分泌も変化し、傍細胞輸送の駆動力に静水圧が寄与することが判明した。ムスカリン受容体刺激で NO が産生され血管抵抗が低下し血流を増加させる機構が提示された。基礎実験としてこれを確認した所、L-NAME=0.3mMを与えると圧は140mmHgから180mmHgに上昇し、血管の弾性低下を示した。また、L-NAME存在下の実験で、カルバコールによる分泌刺激で動脈圧は 111 ± 9 mmHgに低下し、L-NAMEがない場合の 103 ± 5 mmHgに対し有意差はなく、分泌刺激中の動脈圧の減少はNOには依存しないことが判明した。本実験では、1) 灌流流速を変化させ、毛細管床の静水圧を上昇させた場合、蛍光色素分泌速度が静水圧に比例して増加した。2) 高静水圧では水分分泌は比例して増加しなかったが、低圧側の測定では水分分泌速度と静水圧は比例し、高圧では水がリークする可能性が示された。即ち唾液水分分泌のうち大部分を占める傍細胞輸送は灌流圧が駆動力になり溶媒が起動することにより起こる。そして溶媒移動に牽引され水と溶質が移動すると結論された。

b) 唾液腺の水分分泌を増加させる漢方薬のうち、この漢方薬のみで傍細胞経路の開閉を起す丹参 (DS) について、小さい分子を通す傍細胞経路がより活性化されることが見つかっていたが、水分分泌反応の用量依存性を調べると、用量が大きくなると反応の潜時が短くなり、受容体が唾液腺細胞の表面ではないことが示唆された。DS水溶液のHPLCパターンを検討すると、水溶性有効成分として報告されている Salvianolic acid B がもっとも大きなピークとして測定された。今後このピークを注目し、経口投与により血液中に出現する濃度を検討し、摘出灌流腺の結果と対応させ、生体内でのDS用量依存性を推定する。

これまで、15種類の漢方薬の唾液分泌増強を起こし3つの分泌パターンに分類され、漢方薬の分類と対応することが確認された。各分類の代表的な漢方薬を用い、エネルギー状態を調べた。漢方薬のみの投与で酸素消費の増加と分泌増強に対応する酸素消費増加が観測された。Na/KATPaseを阻害する ouabain の投与により、増加した酸素消費の一部は減少したことから、一部は Na/K ATPase の活性化が起こっていることが確認され

た。今後、酸素消費増加の意味することをさらに明らかにする必要がある。

4) 学術論文

B. Qi, T. Narita, K. Satoh, M.-Y. Guo, O. Katsumata-Kato, M. Murakami, J. Fujita-Yoshigaki and H. Sugiya, “Characteristics of neurokinin A-induced salivary fluid secretion in perfused rat submandibular gland” *Arch. Oral Biol.* 55: 737-744 (2010).

Y. Seo, K. Satoh, K. Watanabe, H. Morita, A. Takamata, T. Ogino and M. Murakami, “Mn-bicine: A low affinity chelate for manganese ion enhanced MRI” *Magn. Reson. Med.* in press. (2010).

5) 著書, 総説

村上政隆, 実験 MRSのための周辺技術: 臓器灌流法と生理学モニター。成瀬昭二編「磁気共鳴スペクトルの医学応用—基礎から臨床まで—」インナービジョン, 東京, 第2章5節, 印刷中 (2010)

6) 国際会議発表リスト

M. Matsuki-Fukushima, M. Murakami, J. Fujita-Yoshigaki, O. Katsumata-Kato and H. Sugiya, Involvement of aquaporin-6 in osmoregulation of rat parotid secretory granules. 88th General Session of the IADR (July Barcelona, Spain)

M. Murakami and F. Wei, Hydrostatic pressure contributes to the paracellular salivary secretion. 88th General Session of the IADR (July Barcelona, Spain)

B. Qi, T. Narita, M. Murakami and H. Sugiya, Analysis of saliva fluid flow by perfusion system. 88th General Session of the IADR (July Barcelona, Spain)

M. Murakami and F. Wei, Paracellular transport of salivary gland: size, control and driving force. 21th International Symposium on Morphological Sciences (September, Taormina, Italy)

S. Hashimoto, M. Murakami, M. Matsuki-Fukushima, T. Narita and Y. Shibukawa, Cytoskeletal change of paracellular pathway in perfused rat submandibular glands. 21th International Symposium on Morphological Sciences (September, Taormina, Italy)

M. Murakami, Role of paracellular route for salivary secretion. 1st Conf. Interdisciplinary Research in Traditional Medicine and Modern Medical Bioscience (November, 南京 中国)

10) 招待講演

M. Murakami, “Paracellular transport is important for supply of water and substrates into saliva: Morpho-Physiological approach in the isolated perfused submandibular gland.” 江蘇省高齢医学研究会研究会特別講演, 5月徐州中国

M. Murakami, “Paracellular transport is important for supply of water and substrates into saliva: Morpho-Physiological approach in the isolated perfused submandibular gland.” 南京医科大学国際交流学院特別講演, 5月南京中国

村上政隆「消化管の入口, 唾液腺の分泌」静岡県立大学月例セミナー静岡県立大学, 10月

11) 学会および社会的活動

日本生理学会評議員および編集委員

日本磁気共鳴医学会評議員

日本唾液腺学会評議員

第8回唾液腺と外分泌生物学に関するゴードン会議（2010–2011）co-chair

9) 他大学での非常勤講師，客員教授

日本大学松戸歯学部（非常勤講師）

岐阜大学医学部（非常勤講師）

11) 外部獲得資金

科研費基盤研究（C），「唾液分泌における傍細胞輸送の駆動力と細胞内信号による調節」，村上政隆（代表）
（2008年–2010年）。

2-2 生物無機

青野重利(教授)

1) 専門領域：生物無機化学

2) 研究課題：

- a) ヘム含有型気体分子センサータンパク質の構造と機能に関する研究
- b) ヘムをシグナル分子とする新規な転写調節因子の構造と機能に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の酸素に対する走化性 (Aerotaxis) 制御系において酸素センサーとして機能するシグナルトランスデューサータンパク質である Aer 2 タンパク質が、ヘムを活性中心とする新規な酸素センサータンパク質であることを見出した。Aer 2 タンパク質では、分子中に存在する PAS ドメインがセンサードメインとして機能しており、PAS ドメイン中にヘムが含まれていることが分かった。ヘム含有 PAS ドメインを有するセンサータンパク質は、これまでにいくつか報告されている。代表的なものとして、FixL, EcDOS などがある。これらのヘム含有 PAS ドメインと Aer 2 の PAS ドメインのアミノ酸配列を比較すると、Aer 2 のアミノ酸配列中で、FixL, EcDOS においてヘム近位側軸配位子として機能している His に対応する位置に His (His234) が保存されている。His234 を Ala に置換した H234A 変異体は、ヘムをほとんど含まないアポ体として発現することが分かった。これらの結果より、Aer 2 では His234 がヘム近位側軸配位子として機能していると考えられる。共鳴ラマン分光法を用いて Aer 2 のヘム近傍構造の解析を行い、ヘムに配位した酸素あるいは一酸化炭素と相互作用するアミノ酸残基の同定を行った。
- b) 乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) はヘム生合成系を欠損しているが、外部からヘム分子を取込むことにより酸素呼吸により生育可能である。しかし、必要量以上に取り込まれたヘム分子は、活性酸素産生などにより細胞毒性を示すため、細胞内のヘム濃度は厳密な制御を受けている。本年度の研究において、YgfC タンパク質が乳酸菌細胞内のヘム濃度制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。YgfC は、ヘムをシグナル分子 (エフェクター分子) とする転写調節因子であり、その DNA 結合活性がヘムの有無により制御されていることを明らかにした。ヘムを含まないアポ型 YgfC は、DNA 結合活性を有しており、リプレッサーとして機能していると考えられる。一方、ヘムが結合することにより、YgfC は DNA 結合活性を失うことが分かった。

4) 学術論文

H. Sawai, S. Yoshioka, T. Uchida, M. Hyodo, Y. Hayakawa, K. Ishimori and S. Aono, "Molecular Oxygen regulates the enzymatic activity of a heme-containing diguanylate cyclase (HemDGC) for the synthesis of cyclic di-GMP" *Biochim. Biophys. Acta. Proteins and Proteomics* **1804**, 166-172 (2010).

H. Nakajima, N. Takatani, K. Yoshimura, M. Ito, S. Aono, Y. Takahashi and Y. Watanabe, "The role of the Fe-S cluster in the sensory domain of nitrogenase transcriptional activator VnfA from *Azotobacter vinelandii*" *FEBS J.* **277**, 817-832 (2010).

6) 国際会議発表リスト

H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Kato, Y. Asano, Y. Shiro and S. Aono, “X-ray Crystal Structure of Michaelis Complex of A Novel Heme Enzyme Aldoxime Dehydratase” 10th European Biological Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic10), Thessaloniki, (Greece), June 2010.

S. Aono, “Trap of the Michaelis Complex of a Novel Heme Enzyme, Aldoxime Dehydratase” 6th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-6), New Mexico, (USA), July, 2010.

H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Kato, Y. Asano, Y. Shiro and S. Aono, “Enzymatic reaction mechanism of aldoxime dehydratase revealed by X-ray crystal structure of Michaelis complex” 5th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC5), Kaohsiung, (Taiwan), November 2010.

S. Aono, “A new oxygen sensor protein adopting a heme-containing PAS domain as a sensor for aerotaxis control” Pacificchem 2010, Hawaii, (USA), December 2010.

H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Kato, Y. Asano, Y. Shiro and S. Aono, “X-ray crystal structure of the Michaelis complex of a novel heme enzyme, aldoxime dehydratase OxdRE” Pacificchem 2010, Hawaii, (USA), December 2010.

Y. Yoshida, H. Ishikawa, S. Aono and Y. Mizutani, “Protein dynamics and sensing mechanism of gas sensor protein HemAT” Pacificchem 2010, Hawaii, (USA), December 2010.

7) 招待講演

S. Aono, “A new oxygen sensor protein adopting a heme-containing PAS domain as a sensor for aerotaxis control” Pacificchem 2010, Hawaii (USA), December 2010.

S. Aono, “Trap of the Michaelis Complex of a Novel Heme Enzyme, Aldoxime Dehydratase” 6th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-6), New Mexico, (USA), July 2010.

澤井仁美, 杉本宏, 加藤康夫, 浅野泰久, 城宜嗣, 青野重利「ヘム蛋白質の新規な構造と機能：アルドキシム脱水酵素の活性制御機構」, 日本蛋白質科学会2010年度年会, 札幌, 2010年6月.

8) 学会および社会的活動

学協会役員等

触媒学会生体関連触媒研究会世話人 (2002-).

日本化学会生体機能関連化学部会幹事 (2007-).

日本化学会東海支部常任幹事, 会計幹事 (2009-2010).

学会の組織委員等

Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences -Experiments and Simulations 組織委員 (2008-2010).

文部科学省, 学術振興会, 大学共同利用機関等の委員等

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2010-).

学会誌編集委員

Biosensors, Editorial Board (2010-).

11) 外部獲得資金

科研費特定領域研究（公募研究）, 「ガス分子により駆動される新規なセンサータンパク質の機能発現機構」, 青野重利（2007年－2010年）.

科研費研究活動スタート支援, 「ヘム含有 PAS ドメインをセンサーとする新規なシグナル伝達タンパク質の構造と機能」, 澤井仁美（2010年－2011年）.

2-3 生体物理

藤井 浩 (准教授)

1) 専門領域：生物無機化学，物理化学

2) 研究課題：

- a) ヘム酵素反応中間体の機能発現の分子機構の研究
- b) Jacobsen 触媒の不斉誘起機構の研究
- c) シアンイオンを NMR プローブとしたヘムタンパク質の機能解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 酸化反応に関わる金属酵素の機能制御機構を解明するため，高酸化反応中間体のモデル錯体を合成し，電子構造と反応性の関わりを研究した。オキソ鉄 4 価ポルフィリン π -カチオンラジカル錯体は，チトクローム P450 の活性反応中間体として知られ，さまざまな炭化水素の水酸化反応を行う。シトクローム P450 によるアルカンの水酸化反応における水素原子のトンネル効果の作用機構を解明するため，オキソ鉄四価ポルフィリン π -カチオンラジカル錯体を低温下で合成し，ベンジル位に水素を持つ炭化水素の水酸化反応の反応過程を研究した。反応速度の温度依存性や H.D 同位体効果から，水素原子のトンネル効果について考察した。モデル錯体に結合する軸位の配位子を変化されることにより，モデル錯体の活性を変化させ水素原子トンネル効果への影響を研究した。また，異なる C-H 解離エネルギーをもつ炭化水素を用いて，C-H 結合エネルギーと水素原子トンネル効果に関わりを検討した。これらの実験から，水素原子トンネル効果を制御する因子を解明した。
- b) 不斉酸化能を有するマンガ 3 価サレン錯体の反応選択性の機構を研究した。エチレンジアミン部位に不斉を導入したマンガサレン錯体は，Jacobsen 触媒として知られ，不斉エポキシ化反応を可能にする。我々は，Jacobsen 触媒がどのような機構で不斉エポキシ化反応を誘起しているのかを，活性反応中間体から研究を行ってきた。これまでの研究で，マンガイオンが 3 価から 4 価に酸化されると，サレン骨格が不斉歪みを起こすこと，軸配位子の配位力の強さが不斉歪みを制御する因子であることを見出した。本年度は，エポキシ化反応の活性種と考えられているマンガオキソ錯体の同定と反応性の解明に成功した。マンガ 4 価オキソ錯体を合成し，種々の分光法で同定することができた。マンガ 4 価オキソ錯体は，非常に容易にプロトン化を受けマンガ 4 価ヒドロキシ錯体を生成することを示した。これらオキソ錯体とヒドロキシ錯体の反応性を比較した結果，オキソ錯体が高い反応性を有することを見出すことができた。
- c) 金属酵素と強く結合するシアンイオンをプローブとした金属酵素の構造・機能測定法の開発を行った。我々はこれまで，ヘムタンパク質に結合したシアンイオンの ^{13}C ， ^{15}N NMR シグナルがヘム近傍の構造や水素結合ネットワークを検索する優れたプローブであることを明らかにした。この手法をペルオキシダーゼの変異体に適応した。ヘム近傍のアミノ酸を置換したさまざまな変異体を作成し，水素結合ネットワークと酵素機能の関わりを研究した。その結果，ヘムの軸位に配位するヒスチジン残基からの電子供与性効果と過酸化水素との反応により生成する活性種の生成速度が相関することを見出した。この相関がどのような機構で発現しているかを研究した結果，ヒスチジン残基からの電子供与性がヘム近傍の水分子とヘム鉄の結合の強さを変化させ，こ

れが過酸化水素との反応速度を制御しているという新しい制御機構を提案することができた。

4) 学術論文

T. Kurahashi, A. Kikuchi, Y. Shiro, M. Hada and H. Fujii, “Unique Property and Reactivity of High-Valent Manganese-Oxo versus Manganese-Hydroxo in the Salen Platform,” *Inorg. Chem.* **49**, 6664-6672 (2010).

H. Ishimura, H. Fujii and T. Ogura, “Resonance Raman Study of a High-Valent Fe=O Porphyrin Complex as a Model for Peroxidase Compound II,” *Chemistry Letters* **39**, 332-333 (2010).

S. Nozawa, T. Sato, M. Chollet, K. Ichyanagi, A. Tomita, H. Fujii, S. Adachi, and S. Koshihara, “Direct Probing of Spin State Dynamics Coupled with Electronic and Structural Modifications by Picosecond Time-Resolved XAFS,” *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 61-63 (2010).

D. Nonaka, H. Wariishi, K. G. Welinder and H. Fujii, “Paramagnetic ¹³C and ¹⁵N NMR Analyses of the Push-and Pull-Effects in Cytochrome c Peroxidase and Coprinus cinereus Peroxidase Variants: Functional Roles of Highly-Conserved Amino Acids around Heme,” *Biochemistry* **49**, 49-57 (2010).

6) 国際会議発表リスト

H. Fujii, “Functional Role of Heme *d*₁ in Catalytic Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” International Symposium on Picobiology, Hyogo (Japan), March (2010).

H. Fujii and S. Mochizuki, “Functional Role of Unique Heme *d*₁ in Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

T. Kurahashi and H. Fujii, “Critical Factors for the Formation of a Chiral Conformation in Manganese Salen Complexes, Related to Enantioselective Epoxidation” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

H. Fujii and S. Mochizuki, “Functional Role of Unique Heme *d*₁ in Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” 5th Asian Bioinorganic Chemistry Conference, Kaohsiung (Taiwan), November (2010).

7) 招待講演

H. Fujii and S. Mochizuki, “Functional Role of Unique Heme *d*₁ in Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

T. Kurahashi and H. Fujii, “Critical Factors for the Formation of a Chiral Conformation in Manganese Salen Complexes, Related to Enantioselective Epoxidation” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

藤井浩, 「アキシシャル位配位子による高原子価サレンマンガン錯体の電子構造と反応性の制御」, 日本化学会第4回関東支部大会筑波大学(筑波)2010年8月.

藤井浩, 「酸化反応を触媒する金属酵素の反応中間体の電子構造」, 第4回生物物質科学フォーラム東京工業大学(東京)2010年5月.

H. Fujii and D. Nonaka, “¹³C and ¹⁵N NMR Spectroscopy of Heme-bound Cyanide (¹³C¹⁵N) in Ferric Heme Peroxidases” Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences-Experiments and Simulations, Nagoya, Japan December (2009).

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

兵庫県立大学大学院生命理学研究科, 客員准教授, 2007年2月～

11) 外部獲得資金

基盤研究B「高原子価オキソ金属錯体の反応性と反応選択性を制御する分子機構の解明」, 藤井浩 (2010年–2013年).

科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (CREST)「 ^{63}Cu NMRによる酵素およびそのモデル錯体の反応場の機能計測」藤井浩 (分担) (2005年–2010年).

グローバル COE プログラム「ピコバイオロジー: 原子レベルの生命科学」拠点形成事業 (分担) (2007年–2012年).

2-4 生体分子物性

桑 島 邦 博 (教授)

1) 専門領域：蛋白質科学，生物物理学，生体分子科学

2) 研究課題：

- a) α ラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態の特性と生物機能
- b) ヒト及びヤギ α ラクトアルブミン変異体の結晶構造解析
- c) OspA のフォールディング機構
- d) 大腸菌シャペロニン GroEL の ATP 結合の速度論
- e) GroEL/GroES 複合体の構造揺らぎと生物機能
- f) tRNA メチル基転移酵素の前定常状態速度論

3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 腫瘍細胞選択的細胞死活性を持つ α ラクトアルブミン-脂肪酸（オレイン酸）複合体は，蛋白質のフォールディング中間体（モルテン・グロビュール）が脂肪酸と複合体を形成することによって新規な生物活性を発現する例であり，活性発現の分子機構に興味を持たれる。NMRを用いた昨年度までの研究で，ヤギとヒト α ラクトアルブミンのオレイン酸結合部位の同定に成功している。本年は，ヤギ α ラクトアルブミン-脂肪酸複合体のオリゴマー形成を磁場勾配 NMR 法を用いて解析した。その結果，生理的条件下では複合体のモノマーと 10量体程度のオリゴマーが共存していた。
- b) 大腸菌中で発現した組換え体 α ラクトアルブミンは乳より調製した真性体よりも著しく不安定であり，不安定化の分子機構に興味を持たれる。そこで，本年は，ヤギ α ラクトアルブミン N 末端残基欠失変異体 (E1M) と組み換え型ヒト α ラクトアルブミンの結晶構造を，それぞれ 1.60 Å, 1.81 Å の分解能で決定した。E1M の立体構造は真性体ヤギ α ラクトアルブミンの立体構造とほぼ一致していた。一方，組み換え型ヒト α ラクトアルブミンの立体構造は，N 末端領域のみが真性体とは顕著に異なっていた。昨年度までのヒト α ラクトアルブミン変異体 (K1M) の結果も含めて，(1) ヤギおよびヒト α ラクトアルブミン組換え体は，いずれも，N 末端への Met 残基付加によって，N 末端域に局在化した立体構造変化が起こる，(2) このような立体構造変化が蛋白質を著しく不安定化させる，(3) N 末端残基欠失変異体 (E1M と K1M) では Met 残基付加によって N 末端の位置が真性体の位置に戻るため，立体構造も真性体の構造に戻り，安定性も回復することが分かった。
- c) ボレリア菌由来 Outer Surface Protein A (OspA) は N 末端ドメインと C 末端ドメイン間に単層 β シート領域を持つ特徴的な双ドメイン蛋白質であり， β シートそのものの物理化学的特性を調べる上で有用なモデルである。OspA のフォールディング機構を明らかにするため，尿素による変性状態からの巻き戻り反応をストップフロー法により調査している。昨年ストップフロー蛍光スペクトルによる解析に引き続き，ストップフロー円二色性 (CD) を用いた解析を行った。巻き戻り反応に伴う CD 変化は 2 つの指数関数で表され，N 末端ドメインのみが形成した経路上の中間体を經由する，三状態の巻き戻り過程であることが明らかとなった。
- d) 大腸菌のシャペロニン GroEL は代表的な分子シャペロンであり，二重リング構造を持つ 14 量体の超分子複

合体である。GroEL は ATP-Mg²⁺との結合に伴って協同的な構造転移（アロステリック転移）を示し、この転移がその機能発現にとって重要である。GroEL にトリプトファン残基を導入した変異体（Y485W）の蛍光スペクトルを利用して、その ATP-Mg²⁺結合とアロステリック転移の速度論的な研究を行っている。本年は、蛍光ストップフロー法を用いて Y485WのATP-Mg²⁺結合過程を測定した。K⁺非存在下で、ATP-Mg²⁺の結合に伴う蛍光強度変化が観察された。この反応は二分子反応として良く表され、結合と解離の反応速度定数を決定することが出来た。これらの速度定数から求められた結合定数は、等温滴定型熱量計により決定した結合定数と一致した。結合速度定数のアイリングプロットから求めた活性化エンタルピーは 14-15 kcal/molと十分大きいので、ATP-Mg²⁺の GroEL への結合は、拡散律速的な遭遇複合体形成の後、高エネルギーの遷移状態を通じて進行することが分かった。

- e) シャペロニン複合体 GroEL/GroES の構造揺らぎと機能発現との関係を明らかにするために水素/重水素（H/D）交換二次元 NMR を用いた研究を行っている。本年は、GroES 単独での H/D 交換反応を TROSY-NMR 法を用いて追跡した。結果、モバイルループ領域の大きな構造揺らぎが観察された。しかし、交換速度が速いため、DMSO 停止 H/D 交換二次元 NMR 法による測定結果と合わせて解析する必要があり、現在、その測定を進めている。
- f) tRNA (Gm18)メチル基転移酵素（TrmH）は、S アデノシルメチオニンから tRNA の G18 へのメチル基転移を触媒する。酵素反応速度論、ゲルシフトアッセイ、さまざまな tRNA^{Phe} 変異体を用いた阻害実験などから、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の TrmH によるグアニン塩基認識部位の柔軟性や、認識部位の原子団に関する知見が得られていた。酵素による基質認識の分子機構をさらに明らかにするため、ストップフロー蛍光スペクトルを用いて、前定常状態における酵素反応の速度論的解析を行った。その結果、TrmH と tRNA との結合反応は少なくとも 3 段階より成り、最初の 2 分子結合反応の後、2 段の 1 分子反応的な誘導適合（induced-fit）過程の起こることが分かった。

4) 学術論文

T. Kanzaki, S. Ushioku, A. Nakagawa, T. Oka, K. Takahashi, T. Nakamura, K. Kuwajima, A. Yamagishi and M. Yohda, “Adaptation of a hyperthermophilic group II chaperonin to relatively moderate temperatures,” *Protein Eng. Des. Sel.* **23**, 393-402 (2010).

T. Nakamura, K. Makabe, K. Tomoyori, K. Maki, A. Mukaiyama and K. Kuwajima, “Different folding pathways taken by highly homologous proteins, goat β -lactalbumin and canine milk lysozyme,” *J. Mol. Biol.* **396**, 1361-1378 (2010).

A. Ochi, K. Makabe, K. Kuwajima and H. Hori, “Flexible recognition of the tRNA G18 methylation target site by TrmH methyltransferase through first binding and induced fit processes,” *J. Biol. Chem.* **285**, 9018-9029 (2010).

5) 総説, 著書

中村敬, 真壁幸樹, 桑島邦博, 「何がタンパク質のフォールディング経路を決めるのか?」, *MedicalBio* 10 月 別冊「揺らぎと生体機能」(寺嶋正秀監修), オーム社, pp.49-54 (2010).

6) 国際会議発表リスト

A. Mukaiyama, T. Takahashi, K. Makabe and K. Kuwajima, “Hydrogen-exchange kinetics of the Escherichia coli chaperonin complex,” 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Science. Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22-23, 2009.

K. Makabe, S. Koide and K. Kuwajima, “Role of the Main-Chain Hydrogen Bonding in β -Sheet Register,” 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences. Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22-23, 2009.

T. Nakamura, K. Makabe, T. Aizawa, K. Kawano, M. Demura and K. Kuwajima, “The molten globule state and its biological function in ϵ -lactalbumin,” 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences. Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22-23, 2009.

J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, “A Potassium Switch of ATP-Induced GroEL Conformational Changes,” 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences. Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22-23, 2009.

J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, “Dissect a bimolecular mechanism of ATP binding to the chaperonin GroEL,” 35th FEBS Congress, Gothenburg, Sweden, Jun.26-Jul. 1, 2010.

K. Makabe, T. Nakamura and K. Kuwajima, “Folding study of outer surface protein A,” 24th annual symposium of the protein society, San Diego, USA, Aug. 1-5, 2010.

J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, “Dissect a bimolecular mechanism of ATP binding to the chaperonin GroEL,” YSF forum, OzBio2010 conference, 12th IUBMB conference, 21st FAOBMB conference, Melbourne, Australia, Sep. 23-26, 2010.

K. Makabe, T. Nakamura and K. Kuwajima, “Folding study of outer surface protein A,” The 4th International Symposium of Molecular science of fluctuations toward biological functions, Nov. 30 -Dec. 1, 2010.

T. Nakamura, K. Makabe, T. Aizawa, K. Kawano, M. Demura and K. Kuwajima, “The molten globule state and its biological function in α -lactalbumin”, 4th International Symposium of “Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions”, Piazza Omi, Ohtsu, Nov. 30 -Dec. 1, 2010.

J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, “Dissecting a bimolecular mechanism of ATP binding to the chaperonin GroEL,” 4th International Symposium of “Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions”, Piazza Omi, Ohtsu, Nov. 30 -Dec. 1, 2010.

7) 招待講演

K. Kuwajima, “Molecular mechanisms of protein folding,” 2010 Annual Meeting of Asian CORE Program “Frontiers of Materials, Photo-, and Theoretical Molecular Sciences,” Insitute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, February 28-March 2, 2010.

K. Kuwajima, “Is the Folding Pathway Conserved in Homologous Proteins?,” Bit Life Science's 3rd Annual Protein and Peptide Conference “After a Solution of the Machines of Life,” Beijing International Convention Center, Beijing, China, March 21 -23, 2010.

桑島邦博, 「蛋白質フォールディング問題とバイオサイエンス」, 蛋白研 - 統合バイオ共同セミナー, 大阪大学

蛋白質研究所, 2010年4月22日.

K. Kuwajima, "Identification of fatty-acid binding site in the anti-tumor complex of α -lactalbumin by 920-MHz NMR spectroscopy," IPR Seminar "Cooperation in Protein Science between Asian and Pacific Countries," the Institute for Protein Research, Osaka University, June 14 (Mon), 2010.

桑島邦博, 「蛋白質フォールディング経路の速度論的理解」, 2010年日本物理学会秋季大会シンポジウム「揺らぎが決める生体分子の構造形成と機能発現」, 大阪府立大学・中百舌鳥キャンパス, 2010年9月.

K. Kuwajima, "Identification of fatty-acid binding site in the anti-tumor complex of α -lactalbumin by 920-MHz NMR spectroscopy," The 10th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul, Korea, September 30-October 2, 2010.

J. Chen, "Alpha-crystallin domain assembly and GroEL dynamics," Workshop on Recent Advances in Protein Folding and Molecular Chaperones, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, Oct. 9-10, 2010.

K. Kuwajima, "Molecular Mechanisms of Protein Folding," The Overseas Sokendai Lecture in Bangkok FY2010 & The Inaugural CU-IMS Joint Symposium, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, October 20-21, 2010.

8) 学会および社会的活動

学協会役員, 委員

日本蛋白質科学会会長 (2010-)

日本生物物理学会中部支部長 (2009-)

日本生化学会評議員 (2005-)

学会の組織委員

KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), 組織委員 (2001-).

文部科学省, 学術振興会等の役員等

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2010)

学会誌編集委員

Proteins: Structure, Function & Bioinformatics, Editorial Board, (1993-).

J. Mol. Biol., Associate Editor, (2004-).

BIOPHYSICS, Associate Editor, (2005-).

Spectroscopy --Biomedical Applications, Editorial Board, (2002-).

11) 外部獲得資金

基盤研究 (B), 「シャペロニン GroELの第二のATP結合部位とその機能的役割」, 桑島邦博 (2008-2010).

新学術領域 (揺らぎと生体機能) 計画研究, 「シャペロニンの構造揺らぎとフォールディング介助機能」, 桑島邦博 (2008-).

基盤研究 (S) 分担 (代表東北大学大学院熊谷泉) 「ナノ世界のインターフェースとしてのタンパク質工学的デザイン学」真壁幸樹 (2010-).

アステラス病態代謝研究会「蛋白質工学的なアプローチによるアミロイドの基本骨格構造形成の物理化学的基盤の解明」真壁幸樹 (2010-2011).

3. 生命環境研究領域

3-1 細胞生理

富永真琴（教授）

1) 専門領域：分子細胞生理学，神経科学

2) 研究課題：

- a) 温度感受性 TRP チャンネルに関する研究
- b) 睡眠・覚醒に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) TRPV1 は初めて分子実体の明らかになった温度受容体であるが，哺乳類では9つの温度感受性 TRP チャンネル（TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1）が知られており，それぞれ特異的な活性化温度閾値がある。強い熱刺激と冷刺激は痛みを惹起することから，温度感受性 TRP チャンネルの一部は痛み受容体として捉えうる。①マウス胎生期での温度感受性 TRP チャンネル遺伝子の発現解析から，TRPV2 mRNA が TRPV1, TRPM8 よりかなり早く胎生期10日頃から脊髄前角運動神経と後根神経節細胞に発現していることが判明した。TRPV2 蛋白質の発現，機能的発現も確認し，TRPV2 が機械伸展刺激を感知して軸索伸展をもたらしていることを見いだした。②腸管神経叢の抑制性運動神経にも TRPV2 が発現していることを遺伝子および蛋白質レベルで確認し，nNOS との共発現を観察した。腸管抑制性運動神経の TRPV2 は機械刺激によって活性化した。TRPV2 刺激薬でマウス小腸の収縮力が NO 依存的に減弱し，TRPV2 刺激薬は腸管からの NO 放出を促進した。TRPV2 刺激薬によってマウス腸管内の物質移動は著しく促進された。食塊による腸管壁伸展を抑制性運動神経の TRPV2 が感知し，Ca²⁺流入から NO 産生をもたらして肛門側の腸管弛緩を導いているものと考えられた。③ TRPV4 の表皮ケラチノサイトでの機能を明らかにする目的でケラチノサイト cDNA ライブラリーから TRPV4 と結合する蛋白質を探索し，βカテニンが結合することを見いだした。TRPV4 欠損皮膚では細胞間接着構造が乱れ，タイトジャンクションの形態，機能異常から水分の漏出が起これ，皮膚のバリア機能が大きく減弱していることが明らかになった。皮膚温で TRPV4 が活性化して細胞内へ Ca²⁺を流入させ，細胞骨格編成からアドヘレンスジャンクション機能，タイトジャンクション機能を増強しているものと考えられた。④ TRPP チャンネルに属する PKD2L1 と PKD1L3 は複合体を形成して酸受容（オフ応答）に関わることが知られている。マウス舌有郭乳頭において，PKD2L1/PKD1L3 複合体がオフ応答を示す酸受容体として機能していることを細胞染色法，Caイメージング法，パッチクランプ法を用いて明らかにした。⑤ミツバチは特異な温度依存性社会行動をとることが知られている。ミツバチの TRP チャンネルを探索し，いくつかの TRP チャンネル遺伝子を得た。そのうち，ミツバチに特異的な TRPA チャンネルが34度を超える温度刺激や昆虫忌避剤あるいは防虫剤として知られる複数の化学物質によっても活性化することを見いだした。ミツバチを使った行動解析でも，熱刺激や活性化能が明らかになった化学物質刺激に対して，ミツバチが忌避行動をとることが判明した（名古屋大学門脇辰彦博士との共同研究）。

b) ① 睡眠覚醒調節に重要な視床下部のオレキシン神経細胞が、覚醒を維持するメカニズムを神経細胞レベルにおいて明らかにした。オレキシン神経特異的に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現する遺伝子改変マウスとオレキシン受容体欠損マウスを用い、オレキシン神経細胞がオレキシン2受容体を介してオレキシンによって活性化されることを見いだした。免疫電子顕微鏡を用いた解析によって、オレキシン神経細胞同士が直接シナプス様構造によって連絡していることを明らかにしたことより、オレキシン神経間のポジティブフィードバックによるオレキシン神経活動の持続が覚醒の維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。② 睡眠覚醒調節に重要な視床下部のオレキシンペプチド産生神経に光活性化蛋白質 (チャネルロドプシン, ハロロドプシン, メラノプシン) を発現する遺伝子改変マウスを作成した。それらのマウス視床下部に光ファイバーを用いて様々な波長の光を照射し、オレキシン神経を脱分極あるいは過分極させることに成功した。神経活動を光で制御することによって、マウスの睡眠覚醒を人為的に制御制御に成功した。

4) 学術論文

C. Peyrot des Gachons, K. Uchida, B. Bryant, A. Shima, J. Sperry, L. Dankulich-Nagrudny, M. Tominaga, A. Smith III, G. Beauchamp and P. Breslin, “Unusual pungency from extra-virgin olive oil is due to restricted spatial expression of oleocanthal’s receptor” *J. Neurosci.* **31**, 999-1009 (2011).

K. Uchida, K. Dezaki, B. Damdindorj, H. Inada, T. Shiuchi, Y. Mori, T. Yada, Y. Minokoshi and M. Tominaga, “Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice” *Diabetes* **60**, 119-126 (2011).

N. Hirashima, T. Tsunematsu, K. Ichiki, H. Tanaka, T.S. Kilduff and A. Yamanaka, “Neuropeptide B induces slow wave sleep in mice” *Sleep* **34**, 31-37 (2011).

H. Mihara, A. Boudaka, K. Shibasaki, A. Yamanaka, T. Sugiyama and M. Tominaga, “Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through NO production in mice” *J. Neurosci.* **30**, 16536-16544 (2010).

A. Yamanaka, S. Tabuchi, T. Tsunematsu, Y. Fukazawa and M. Tominaga, “Direct interaction between orexin neurons activates these neurons through the OX2R” *J. Neurosci.* **30**, 12642-12652 (2010).

K. Kohno, T. Sokabe, M. Tominaga and T. Kadowaki, “Honey bee thermal/chemical sensor, AmHsTRPA, reveals neofunctionalization and loss of Transient Receptor Potential channel genes” *J. Neurosci.* **30**, 12219-12229 (2010).

T. Sokabe, T. Fukumi-Tominaga, S. Yonemura, A. Mizuno and M. Tominaga, “The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes” *J. Biol. Chem.* **285**, 18749-18758 (2010).

H. Kawaguchi, A. Yamanaka, K. Uchida, K. Shibasaki, T. Sokabe, Y. Maruyama, Y. Yanagawa, S. Murakami and M. Tominaga, “Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)/PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells” *J. Biol. Chem.* **285**, 17277-17281 (2010).

F. Fujita, T. Azuma, M. Tajiri, H. Okamoto, M. Sano and M. Tominaga, “Significance of hair-dye base-induced sensory irritation” *International Journal of Cosmetic Science* **32**, 217-224 (2010).

H. Shigematsu, T. Sokabe, R. Danev, M. Tominaga and K. Nagayama, “A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by zernike phase-contrast cryo-EM” *J. Biol. Chem.* **285**, 11210-11218 (2010).

K. Shibasaki, N. Murayama, K. Ono, Y. Ishizaki and M. Tominaga, “TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons” *J. Neurosci.* **30**, 4601-4612 (2010).

K. Uchida, T. Shiuchi, H. Inada, Y. Minokoshi and Tominaga M, “Metabolic adaptation of mice in a cool environ-

ment” *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* **459**, 765-774 (2010).

5) 著書, 総説

A. Yamanaka and T. Tsunematsu, “New approaches for the study of orexin function” *J Neuroendocrinol* **22**, 818-824 (2010).

富永真琴, “侵害刺激受容に関わる transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 及び transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) の活性化, 制御メカニズム” *薬学雑誌* **130**, 289-294 (2010).

富永真琴, “TRPチャネルを介した温度受容の分子機構” *アレルギーと神経ペプチド* **6**, 39-46 (2010).

曾我部隆彰, 富永真琴, “膀胱伸展を感知する TRPV4 チャネル” *医学のあゆみ* **233**, 497 (2010).

富永真琴, “酸味受容のメカニズム—オフ応答を司る分子と生物学的意義—” *化学と生物* **48**, 419-423 (2010).

富永真琴, “TRP チャネルとバリア機能” *アレルギー・免疫* **17**, 53-59 (2010).

富永真琴, “温度受容の分子機構” *からだと温度の事典 彼末一之編集* (朝倉書店) p.19-22 (2010).

鈴木喜郎, “カルシウム恒常性維持を担う TRP チャネル” *腎と透析* **69**, 359-362 (2010).

6) 国際会議発表リスト

S. Saito, R. Shingai and M. Tominaga, “Evolution of the temperature sensor TRPV3 channel: shift in the temperature sensitivity between mammals and western clawed frog” SMBE-2010-Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, Lyon (France), July 2010.

T. Tsunematsu, S. Tabuchi, M. Tominaga and A. Yamanaka, “Optical inhibition of orexin neuronal activity using transgenic mice in which orexin neurons express a light-activated protein, halorhodopsin” 7th FENS Forum of European Neuroscience, Amsterdam (Netherlands), July 2010.

S. Tabuchi, T. Tsunematsu, M. Tominaga and A. Yamanaka, “Orexin/hypocretin activates orexin neurons via the OX2R” 7th FENS Forum of European Neuroscience, Amsterdam (Netherlands), July 2010.

A. Yamanaka and T. Tsunematsu, “New approaches to studying orexin function” The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen (France), July 2010.

M. Tominaga, “Activation of PKD2L1/PKD1L3 complex by scid in mouse taste cells” 8th International symposium for molecular mechanisms of taste and olfaction, Fukuoka (Japan), November, 2010.

S. Tabuchi, T. Tsunematsu, Y. Fukazawa, M. Tominaga and A. Yamanaka, “Orexin neurons are directly and indirectly activated by orexin through the orexin 2 receptor” Neuroscience 2010, San Diego (USA), November 2010.

7) 招待講演

A. Yamanaka and T. Tsunematsu, “New approaches to studying orexin function” The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen (France), July 2010.

富永真琴 「温度受容の分子機構」, 第28回内分泌代謝学サマーセミナー, 長崎, 2010年7月.

M. Tominaga, “TRP ion channels . novel sensor molecules for temperature and chemical stimuli” 第17回日本排尿機能学会, 山梨, 2010年9月.

M. Tominaga, “Activation of PKD2L1/PKD1L3 complex by scid in mouse taste cells” 8th International symposium for

molecular mechanisms of taste and olfaction, Fukuoka (Japan), November, 2010.

8) 学会および社会的活動

日本生理学会会員委員会委員 (富永真琴)

日本生理学会教育委員会委員 (山中章弘)

日本神経科学学会男女共同参画委員会委員 (富永真琴)

国際疼痛学会倫理委員会委員 (富永真琴)

日本疼痛学会理事 (富永真琴)

The Journal of Physiological Sciences, Editorial board member (M. Tominaga)

Pflüger Archiv European Journal of Physiology, Editorial board member (M. Tominaga)

Molecular Pain, Editorial board member (M. Tominaga)

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

名古屋大学大学院医学研究科非常勤講師 (富永真琴)

名古屋大学大学院理学研究科非常勤講師 (富永真琴)

三重大学大学院医学研究科非常勤講師 (富永真琴)

金沢大学医薬保健学域非常勤講師 (富永真琴)

九州大学大学院歯学府非常勤講師 (富永真琴)

和歌山県立医科大学生涯研修・地域医療センター非常勤講師 (富永真琴)

島根大学大学院医学研究科非常勤講師 (山中章弘)

立命館大学総合理工学院薬学部非常勤講師 (山中章弘)

11) 外部獲得資金

科学研究費基盤研究 (A), 「温度感受性 TRPM2 チャンルの生理学的意義の解明」, 富永真琴 (代表) (2007年-2010年).

科学研究費挑戦的萌芽研究, 「局所脳温の測定と脳温が神経活動に与える効果の解析」, 富永真琴 (代表) (2009年-2010年).

科学研究費特定領域研究細胞感覚「温度センサー TRP チャンルの機能制御機構と生理学的意義の検討」, 富永真琴 (代表) (2006年-2010年).

科学研究費基盤研究 (B), 「下部尿路知覚神経伝達におけるイオンチャンネルの役割と新規治療応用に関する研究」, 富永真琴 (分担) (2008年-2010年).

科学研究費基盤研究 (B), 「多様な季節的多型を誘導するホルモン協働作用の分子様式」, 富永真琴 (分担) (2008年-2011年).

総合研究大学院大学学術融合研究事業, 「生物の赤外線センシングメカニズムの基礎的調査研究」, 富永真琴 (分担) (2010年).

総合研究大学院大学学術融合研究事業, 「臍島移植をモデル系とした機械-化学応答細胞死のイメージングサイエンス」, 富永真琴 (分担) (2010年).

(独)科学技術振興機構さきがけ研究「本能機能を司る視床下部神経回路操作と行動制」, 山中章弘 (代表) (2009年-2011年).

科学研究費若手研究 (A), 「睡眠覚醒制御に関わる神経機構統合的解明」, 山中章弘 (代表) (2008年-2011年).

科学研究費挑戦的萌芽研究, 「インビボにおける特定神経活動の制御法の開発」, 山中章弘 (代表) (2008年-2010年).

科学研究費基盤研究 (B), 「オレキシン産生神経とその制御システムの生理的役割」, 山中章弘 (分担) (2009年-2011年).

財団法人武田科学振興財団特定研究助成, 「光操作による大脳基底核疾患の病態解明と治療法開発」, 山中章弘 (共同申請者) (2010年-).

若手研究者による分野間連携研究プロジェクト, 「オプトジェネティクスを用いた個体行動制御技術の開発とその研究応用」, 山中章弘 (代表) (2010年).

科学研究費若手研究 (B), 「温度感受性 TRP チャネルの活性化メカニズムと構造 - 機能関連解明 - 」, 曾我部隆彰 (代表) (2009年-2010年).

科学研究費特定領域研究「多様な季節型を誘導するホルモン協働作用の分子解析」, 曾我部隆彰 (分担) (2009年-2010年).

科学研究費研究活動スタート支援「母子間カルシウムおよびマグネシウム輸送を担う分子の同定」, 鈴木喜郎 (代表) (2010年).

科学研究費補助金若手研究 (B) 「TRPチャネルと相互作用分子の機能相関」, 梅村徹 (代表) (2009年-2010年).

科学研究費補助金若手研究 (B) 「恒温動物の体温調節機能の進化: 温度感覚と非震え熱産生機構に関する遺伝子の比較解析」, 齋藤茂 (代表) (2008年-2010年).

12) 特許

富永真琴 (マンダム(株)との共出願) 「アルコール類の刺激を抑制する成分のスクリーニング」特願 2010-077286

3-2 生命環境

井口泰泉（教授）

1) 内分泌学, 分子生物学, 生殖生物学, 環境科学

2) 研究課題:

- a) 周生期のマウスに対する性ホルモンの組織不可逆化誘導機構に関する研究
- b) オオミジンコの性決定機構の解明
- c) 爬虫類の温度依存性性分化機構の解明
- d) 魚の性ホルモン受容体遺伝子の単離・機能解析および精巣卵誘導機構の解明
- e) エストロゲン受容体の分子進化の解析

3) 研究活動の概略と主な成果:

- a) 周生期のマウスに対する性ホルモンの組織不可逆化誘導機構に関する研究: マウスの子宮および膣はエストロゲン (女性ホルモン) の標的器官であり, エストロゲンに依存して細胞増殖および細胞分化を示す。しかし, 生後3日以内 (臨界期) にエストロゲンの投与を受けたマウスの膣は, エストロゲン非依存的に細胞増殖を続け, 腫瘍化へと向かう。したがって, 内分泌かく乱物質の周生期での影響を調べる良いモデル系となると考えられる。膣では臨界期のエストロゲン投与により, 上皮成長因子 (EGF) ファミリーの遺伝子発現が継続し, erbB および EGF 受容体がリン酸化し, エストロゲン受容体 α の AF1 領域もリン酸化しており, 細胞増殖因子発現のオートループが形成されていることを明らかにしている。出生直後の非芳香化アンドロゲンの5 α -ジヒドロテストステロン投与によっても, マウス膣上皮のエストロゲン非依存の増殖が起こる。エストロゲン受容体 α ノックアウトマウスを用いた研究から, 臨界期でのエストロゲンやアンドロゲン投与による膣上皮のエストロゲン非依存の不可逆的増殖にはエストロゲン受容体 α が不可欠であることも明らかにした。
- b) オオミジンコの性決定機構の解明: 水質や環境化学物質の影響を調べるのに汎用されているオオミジンコは, 単為生殖によりメスがメスを産んで増殖する。しかし, 餌不足, 混雑および短日などの環境の変化によりオスを産み, 生まれたオスとメスが交尾して乾燥に耐えられる耐久卵を産む。耐久卵は新たに水が入るとメスに発生する。オオミジンコは1週間程度で成体になり3日毎に産仔する。また, 体が透明であり, 卵はシャーレの中でも発生する。また, 我々が中心となってオオミジンコから多くの ESTs を得ている。オオミジンコのゲノムコンソーシアムにも協力しており, ゲノム解析の終了も近い。農薬 (昆虫成長制御剤, 植物保護剤) として用いられる幼若ホルモン類似物質をオオミジンコの卵形成の特定の時期に特定の濃度で曝露すると100%オスを産むことを見出した。オオミジンコのオスに関連した遺伝子を探索し, 雌雄で発現の差がある遺伝子 Dsx 遺伝子を見出した。オオミジンコでは遺伝子導入手法も確立されていなかったために, オオミジンコの卵に遺伝子を導入する手法を確立し, 幼若ホルモン曝露によりオスになる卵に Dsx 遺伝子のダブルストランドを用いて RNA 干渉法を行い発現量を下げたところ, 第一触角はメスタイプを示し, 精巣の分化は起こらず卵巣が発達した。さらに, ショウジョウバエで Dsx を制御する tra 遺伝子はオオミジンコでも存在するが発現に雌雄差はなく, オオミジンコでは性分化の制御には関与していない可能性も示した。マイクロアレイを用いて幼

若ホルモン応答遺伝子を探索している。

- c) 爬虫類の温度依存性性分化機構の解明：爬虫類の中には温度によって性が決定する種類（ワニ、大部分のカメ、一部のトカゲ）がいる。しかし、性染色体に依存しない温度依存性性決定機構の分子メカニズムは解明されていない。性決定には温度よりもエストロゲンの作用が強いことから、エストロゲンを含む性ホルモン受容体に着目して研究を進めている。アメリカワニは卵を30度で孵卵すると100%メスに、33度で孵卵すると100%オスになるという温度依存性性分化を示す。温度よりもエストロゲンの作用が強く、オスになる33.5度で孵卵してもエストロゲンやエストロゲン作用を持つ農薬などを塗付するとメスに発生する。この温度依存性性分化のメカニズムに興味を持ち、熱ショックタンパク質遺伝子の Hsp 関連遺伝子を単離して、雌雄での発現を比較した結果、このうちの数種類は雌雄で発現に性差があることを見出した。また、温度依存性性分化時期の胚を用いて性分化関連遺伝子の発現を調べ、発生ステージが進むにつれてオスでは AMH（抗ミュラー管ホルモン）遺伝子、メスではアロマターゼ遺伝子の発現が増加することを見出した。
- d) 魚の性ホルモン受容体遺伝子の単離・機能解析および精巣卵誘導機構の解明：化学物質の内分泌かく乱作用の研究を開始した時点では、化学物質のエストロゲン作用と水生生物への化学物質の影響に焦点が当てられていた。イギリスの河川では下水処理場からのエストロゲンおよびエストロゲン類似物質によるコイ科のローチの精巣卵が1985年頃から問題になっていた。化学物質のエストロゲン作用を簡便に、しかも正確に把握するために、魚類を含む水生生物からエストロゲン受容体遺伝子を単離して機能解析すること、さらにエストロゲンで誘起されるオスでの精巣卵誘導機構を解明することを目指している。ローチのステロイドホルモン産生に関与する酵素の遺伝子群、性分化関連遺伝子およびホルモン受容体遺伝子のクローニングを行った。さらに、イギリスの河川中に見出されている濃度（4 ng/L）のエチニールエストラジオール（排卵抑制剤の成分）を受精直後のローチに120日間曝露すると、3割のオスの精巣に卵ができ（精巣卵）、250–720日曝露すると全てメスになることを実験的に示した。また、馬の尿中に含まれるエストロゲン的一种（エクイリン）をイギリスの河川中に見出した。エクイリンとその代謝産物はホルモン補充療法に使用されたものであり、ローチのエストロゲン受容体に極めて高い活性を示すことを明らかにした。また、テイラピアから3種類のエストロゲン受容体のクローニングし、それらの機能についての研究を行った。さらに、2種のサメ類（トラザメ、ジンバイザメ）からエストロゲン受容体遺伝子をクローニングし、簡便に化学物質のエストロゲン作用を検出できるレポーターアッセイ系を確立した。
- e) エストロゲン受容体の分子進化の解析：エストロゲンは、エストロゲン受容体を介して脊椎動物の生殖器官の発生・分化・維持機構に密接に関与している。しかし、この「エストロゲン–エストロゲン受容体」のシグナル伝達系が進化上どの段階から出来上がってきているのかは不明である。エストロゲン受容体遺伝子の分子進化を解明する目的で、進化上脊椎動物の祖先とされているナメクジウオのほか、軟骨魚のサメ類（トラザメ、ジンバイザメ）、各種の両生類（アカハライモリ、トウキョウサンショウウオ、アホロートル、アフリカ産のガマ）、爬虫類のヘビ（アオダイショウ、オキナワハブ）から、エストロゲン受容体 α と β の遺伝子を単離し、レポーターアッセイ系を確立した。これら動物のエストロゲン受容体は環境化学物質のビスフェノール A や DDT などによりエストロゲン受容体は活性化されること、ナメクジウオでは、エストロゲン受容体にはエストロゲンは結合せず、より祖先型のステロイド受容体にエストロゲンが結合して転写活性を上げることを見出した。

4) 学術論文

B.C. Moore, M.R. Milnes, S. Kohno, Y. Katsu, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Influences of sex, incubation temperature, and environmental quality on gonadal estrogen and androgen receptor messenger RNA expression in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*)” *Biol. Reprod.*, **82**, 194-201 (2010).

Y. Katsu, K. Kubokawa, H. Urushitani and T. Iguchi, “Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen-and androgen-response elements” *Endocrinology*, **151**, 639-648 (2010).

S. Miyagawa, Y. Katsu, Y. Ohta, T. Sudo, D.B. Lubahn and T. Iguchi, “Estrogen receptor α is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5α -dihydrotestosterone exposure” *Biol. Reprod.*, **82**, 497-503 (2010).

Y. Kato, K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi, “Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*” *Genomics*, **95**, 160-165 (2010).

T. Horiguchi, H. Urushitani, Y. Ohta, T. Iguchi and H. Shiraishi, “Establishment of a polyclonal antibody against the retinoid X receptor of the rock shell *Thais clavigera* and its application to rock shell tissues for imposex research” *Ecotoxicology*, **19**, 571-576 (2010).

Y. Kato, K. Kobayashi, H. Watanabe and T. Iguchi, “Introduction of foreign DNA into the water flea, *Daphnia magna*, by electroporation” *Ecotoxicology*, **19**, 589-592 (2010).

S. Kohno, Y. Katsu, H. Urushitani, Y. Ohta, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Potential contributions of heat shock proteins to temperature-dependent sex determination in the American alligator” *Sex. Devel.*, **4**, 73-87 (2010).

Y. Katsu, E. Taniguchi, H. Urushitani, S. Miyagawa, M. Takase, K. Kubokawa, O. Tooi, T. Oka, N. Santo, J. Myburgh, A. Matsuno and T. Iguchi, “Molecular cloning and characterization of ligand-and species-specificity of amphibian estrogen receptors” *Gen. Comp. Endocrinol.*, **168**, 220-230 (2010)..

Y. Saitoh, T. Hikake, S. Hayashi, T. Iguchi and T. Sato, “Involvement of insulin-like growth factor-I for the regulation of prolactin synthesis by estrogen and postnatal proliferation of lactotrophs in the mouse anterior pituitary” *Cell Tiss. Res.*, **340**, 147-158 (2010).

T. Hikake, S. Hayashi, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato, “Differential involvement of IGF-I and estrogen on prolactin cells in the mouse anterior pituitary” *Exp. Biol. Med.*, **235**, 974-980 (2010).

Y. Katsu, S. Kohno, H. Narita, H. Urushitani, K. Yamane, A. Hara, T.M. Clauss, M.T. Walsh, S. Miyagawa, L.J.Jr. Guillette and T. Iguchi, “Cloning and functional characterization of Chondrichthyes, cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame* and whale shark, *Rhincodon typus* estrogen receptors” *Gen. Comp. Endocrinol.*, **168**, 496-504 (2010).

L.K. Davis, Y. Katsu, T. Iguchi, D.T. Lerner, T. Hirano and E.G. Grau, “Transcriptional activity and biological effects of mammalian estrogen receptor ligands on three hepatic estrogen receptors in Mozambique tilapia” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **122**, 272-278 (2010).

Y. Katsu, K. Matsubara, S. Kohno, Y. Matsuda, M. Toriba, K. Oka, L.J.Jr. Guillette, Y. Ohta, and T. Iguchi, “Molecular cloning, characterization and chromosome mapping of reptilian estrogen receptors” *Endocrinology*, **151**, 5710-5720 (2010).

S. Oda, Y. Kato, H. Watanabe, N. Tatarazako and T. Iguchi, “Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog” *Environ. Toxicol. Chem.*, **30**, 232-238 (2010).

J.G. Myburgh, F.W. Huchzermeyer, H.B. Groenewald, J.T. Soley, L.C. Bekker, D.G. Booyse, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Technique for the collection of clean urine from the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*)” *J. South African Vet. Assoc.*, (in press).

D.S. Bermudez, J.P. Skotko, Y. Ohta, A.S.P. Boggs, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Sex steroid and thyroid hormone receptor expressions in the thyroid of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) during different life stages” *J. Morphol.*, (in press).

T. Chakraborty, Y. Katsu, L.Y. Zhou, S. Miyagawa, Y. Nagahama and T. Iguchi, “Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: an *in vitro-in vivo* correlation” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, (in press).

T. Chakraborty, Y. Shibata, L.Y. Zhou, Y. Katsu, T. Iguchi and Y. Nagahama, “Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*” *Mol. Cell. Endocrinol.*, (in press).

A. Lange, G.C. Paull, P.B. Hamilton, T. Iguchi and C.R. Tyler, “Implications of persistent exposure to treated wastewater effluent for breeding in wild roach (*Rutilus rutilus*) populations” *Environ. Sci. Technol.*, (in press).

H. Urushitani, Y. Katsu, S. Miyagawa, S. Kohno, Y. Ohta, L.J.Jr. Guillette and T. Iguchi, “Molecular cloning of anti-Mullerian hormone from the American alligator, *Alligator mississippiensis*” *Mol. Cell. Endocrinol.*, (in press).

5) 著書, 総説

G. Van Aggelen, G.T. Ankley, W.S. Baldwin, D.W. Bearden, W.H. Benson, J.K. Chipman, T.W. Collette, J.A. Craft, N.D. Denslow, M.R. Embry, F. Falciani, S.G. George, C.C. Helbing, P.F. Hoekstra, T. Iguchi, Y. Kagami, I. Katsiadaki, P. Kille, L. Liu, P.G. Lord, T. McIntyre, A. O’Neill, H. Osachoff, E.J. Perkins, E.M. Santos, R.C. Skirrow, J.R. Snape, C.R. Tyler, D. Versteeg, M.R. Viant, D.C. Volz, T.D. Williams and L. Yu, “Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements and future outlook” *Environ. Health Perspect.*, **118**, 1-5 (2010).

T. Iguchi, S. Miyagawa and T. Sudo, “Modern genetics of reproductive biology”. In: Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility, Cambridge University Press, Woodruff, T., Janssen, S.J., Guillette, L.J.Jr., and Giudice, L.C. (Eds.), 60-71 (2010).

M. Halder, M.A. Leonard, T. Iguchi, J.T. Oris, K. Ryder, S.E. Belanger, T.A. Braunbeck, M.R. Embry, G. Whale, T. Norberg-King and A. Lillicrap, “Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology” *Integ. Environ. Assess. Manage.*, **6**, 484-491 (2010).

T.M. Edwards, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Genes to ecosystems: viviparous fishes and endocrine disruption”. In: Viviparous Fishes II. Carmen, M. ed. (in press).

M.C. Celander, J.V. Goldstone, N.D. Denslow, T. Iguchi, P. Kille, R.D. Meyerhoff, B.A. Smith, T.H. Hutchinson and J.R. Wheeler, “Species extrapolation for the 21st century” *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).

H. Watanabe, Y. Kato and T. Iguchi, “Application of ecotoxicogenomics for understanding mode of action of chemicals and species extrapolation” In: Handbook of Systems Toxicology. Eds. Casciano, D.A. and Sahu, S.C., John Wiley &

Sons, Ltd. (in press).

井口泰泉, “化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究 (第2期) の成果” 環境ホルモン学会ニューズレター, 13 (2) :2, 2010.

宮川信一, 勝義直, 井口泰泉, “両生類女性ホルモン受容体の種特異性及びリガンド特異性” 比較内分泌学会ニューズレター, 36 (139), 283-285, 2010.

6) 国際会議発表リスト

Y. Kato, K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi, “Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustaceans, *Daphnia magna*” Daphnia Genomics Consortium 2010, Leuven University, (Belgium), March 26-30, 2010.

T. Iguchi, Y. Kato, S. Miyagawa, K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako and H. Watanabe, “Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*” Daphnia Genomics Consortium 2010, Leuven University, (Belgium), March 26-30, 2010.

S. Miyagawa, K. Toyota, Y. Kato, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi, “Gene expression analysis of *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone agonists” 11th e. hormone Symposium, Tulane University, New Orleans, (USA), October 19-23, 2010.

Y. Ohta, T. Takeuchi, C. Park, Y. Yasunaga, M. Sugiyama, I. Hirakawa, S. Miyagawa and T. Iguchi, “Morphometric study on external genitalia development in male rats given flutamide during pregnancy” e. hormone Symposium, Tulane University, New Orleans, (USA), October 19-23, 2010.

T. Iguchi, “Overview of the 11th UK-Japan Workshop at Osaka in 2009 and the future plan from Japan’s point of view” 12th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

A. Lange, S. Miyagawa, T. Iguchi and C.R. Tyler, “Development and application of molecular approaches for advancing our understanding on the responses of test and sentinel fish (and other species) to xenohormones” Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

R.M. Goodhead, B.D. Johnston, P. Cole, M. Baalousha, T. Iguchi, J.R. Lead and C.R. Tyler, “Bioavailability in fish of cerium oxide nanomaterials exposed via the water in combination with natural organic matter” Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

C.R. Tyler, A. Lange, P. Hamilton, A.L. Filby, O. Lee, T. Kudoh, A. Takesano, G.C. Paul, R.M. Goodhead, O. Osborne, E. Santos, R. van Aerle and T. Iguchi, “Applying ‘Systems biology’ for establishing the mechanisms and functional consequences of exposure to endocrine disrupting chemicals and other emerging contaminants of the aquatic environment” Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

7) 招待講演

T. Iguchi, “Sex determination mechanisms of water flea, *Daphnia magna*” Howard Bern Symposium: Recent Advances in Comparative Endocrinology, University of California at Berkeley (USA), March 2-3, 2010.

T. Iguchi, “Endocrine disruption in invertebrates: sex determination of *Daphnia magna*” 11th e. hormone Symposium,

Tulane University, New Orleans (USA), October 19-23, 2010.

T. Iguchi, “Current status of the endocrine disruptor research in Japan and OECD” 2010 Symposium What’s in Our Water? CSIRO Discovery Centre, Black Mountain, Canberra, (Australia), November 10-11, 2010.

井口泰泉「欧米の化学物質と生物影響・内分泌かく乱物質」, 第19回環境化学討論会市民学生講座中部大学, 2010年6月23日.

井口泰泉「内分泌かく乱化学物質と環境」, 環境と水, 岩手大学, 2010年8月1日.

井口泰泉「オオミジンコの性決定機構」, シンポジウム, 脊椎動物の性決定及び性分化機構—“性転換研究”の最前線—, (社)日本動物学会第81回大会, 東京大学駒場キャンパス, 2010年9月23-25日.

井口泰泉「オオミジンコの性分化機構」岡崎高校, スーパーサイエンスハイスクール, 2010年10月28日.

井口泰泉「生物に対する内分泌かく乱作用に関する調査研究の動向と対応の方向性」環境省主催平成22年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー, 東京大学山上会館, 2010年12月15日.

8) 学会および社会的活動

環境省中央環境審議会臨時委員

厚生労働省薬事・食品衛生審議会臨時委員

内閣府食品安全委員

会容器包装部会委員

OECD Validation Management Group 委員

OECD Endocrine Disruptor Testing and Assessment 委員

日本内分泌かく乱化学物質学会副会長

Journal of Applied Toxicology 編集長 (アジア地区)

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 特集号編集長

Biology of Reproduction 編集委員

Journal of Biomedical Research 編集委員

Ecotoxicology and Environmental Safety 編集委員

横浜雙葉中学・高等学校土曜講座講師

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

フロリダ大学客員教授

東京工業大学非常勤講師

東京薬科大学非常勤講師

横浜市立大学非常勤講師

横浜雙葉中学・高校土曜講座講師

11) 外部獲得資金

環境省日英共同研究「魚類精巣卵の発症機構」宮川信一, 井口泰泉 (代表)

環境省基盤研究「ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析」井口泰泉

環境省「魚類エストロゲン受容体を用いた種特異性・リガンド特異性の in vitro スクリーニング系の開発」宮川信一

環境省「トキシコゲノミクスを応用した化学物質の内分泌かく乱作用スクリーニング手法の開発」井口泰泉
科学研究費挑戦的萌芽研究「環境指標生物であるミジンコの逆遺伝学的手法の開発：エコゲノミクスの新規アプローチ」(2010年—2011年) 井口泰泉(代表)

科学研究費基盤研究(A)「有機スズによる腹側類のインポセックス誘導：レチノイド X 受容体関与説の高度化」(2009年—2011年) 井口泰泉(分担)

科学研究費若手研究(B)「発生過程における“突出・伸長”現象のメカニズム解析」(2009年—2010年) 宮川信一(代表)

日本化学工業協会長期自主的研究「ミジンコ (*Daphnia magna*) の性決定機構の解明」井口泰泉

3-3 生命分子

加藤 晃一 (教授)

1) 専門領域：構造生物学，タンパク質科学，糖鎖生物学，NMR 分光光学

2) 研究課題：

- a) NMR 分光法をはじめとする物理化学的手法による複合糖質およびタンパク質の構造・ダイナミクス・相互作用の解析
- b) 生化学・分子生物学的アプローチによる複合糖質およびタンパク質の機能解析
- c) ナノテクノロジーと構造生物学の融合による生命分子科学研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 天然変性タンパク質を対象に超高磁場 NMR 解析を行った。 α -synuclein は生理的条件下で立体構造を形成していない，天然変性タンパク質の 1 つであり，本タンパク質の会合体はパーキンソン病や他のシヌクレイン病に特徴的な filamentous inclusion の主要な構成成分となっていることが知られている。ポリフェノール化合物はこの会合を数 μ M オーダーの IC₅₀ 値で阻害できることが報告されており，そのような条件下では α -synuclein は非毒性で可溶性のオリゴマーを形成することが示されていた。しかしながら，これらポリフェノール化合物と α -synuclein のオリゴマー形成の詳細なメカニズムはこれまで不明であった。そこで私たちはポリフェノールおよびその類縁体である exifone, gossypetin, dopamine 存在下で α -synuclein 2 量体を調製して，阻害剤が結合した α -synuclein のオリゴマー構造を 920MHz NMR 装置を用いて解析し，これらの化合物による阻害メカニズムを明らかにした。

一方，オステオポンチン (OPN) は細胞外マトリクスタンパク質として細胞接着性を介した生体機能調節を行っている天然変性タンパク質である。本タンパク質は分子の中央部にインテグリン結合配列を有しており，その C 末端側近傍にトロンピンによる切断される領域を有している。この切断をうけるとインテグリンに対する結合活性が上昇する。我々は常磁性効果を利用した NMR 解析により，OPN が溶液中で C 末端部が N 末端側に空間的に近接したコンフォメーションを取り得ることを明らかとした。OPN がトロンピンによる切断をうけると，このような分子内相互作用が消失し，その結果，インテグリンが OPN 上の結合部位に対してアプローチし易くなるものと考察される。

b) ERGIC-53 と MCFD2 は複合体を形成することによって糖タンパク質である血液凝固第 5・第 8 因子の細胞内輸送を司る分子装置として機能している。これら 2 つのタンパク質の変異による細胞内輸送障害は先天性の止血異常症である血液凝固第 5 第 8 因子欠乏症の病因となる。ERGIC-53 は糖鎖認識ドメイン (CRD) を有する I 型膜タンパク質であり，MCFD2 はカルモジュリン様の EF ハンド構造を有する Ca²⁺ 結合型タンパク質である。我々は，ERGIC-53-CRD と MCFD2 の複合体による血液凝固因子の輸送機構を明らかとするため，X 線結晶構造解析，超遠心解析，NMR 解析を駆使してこれら 2 つのタンパク質の複合体の 3 次元構造を決定した。興味深いことに，MCFD2 上の ERGIC-53-CRD との相互作用部位は EF ハンド構造を有するタンパク質に共通

するリガンド結合部位とは異なっていた。さらに、ERGIC-53-CRD が結合することによって MCFD2 に、特にその EFハンドタンパク質に共通するリガンド結合部位において立体構造変化が誘起されることも判明した。これらのことから MCFD2 は ERGIC-53 と結合することにより構造変化が誘起され、血液凝固因子に対する結合能を新たに獲得する可能性が示唆された。また、これまでに報告されている MCFD2 の遺伝子変異は、ERGIC-53 との相互作用部位に相当する部位に集中していることから、両タンパク質の相互作用が損なわれることが、血液凝固第 5 第 8 因子欠乏症をもたらしていることが示された。

また、4つのユビキチンが全て Lys48 を介したイソペプチド結合により連結された環状テトラユビキチンの結晶構造を明らかにすることに成功した。

- c) 糖鎖およびその集合体を対象に、NMR を利用して立体構造情報を取得する方法を開発した。N, N'-ジアセチルキトビオースの還元末端に EDTA 誘導体を導入し、それに種々のランタニドイオンを配位することによって糖鎖の NMR 信号に誘起される擬コンタクトシフトを観測した。それによって糖鎖の 3次元構造モデルを構築することが可能となった。本方法の応用範囲をより複雑な糖鎖の構造解析に拡張するために、マンノース 8 残基と N-アセチルグルコサミン 2 残基からなる高マンノース型糖鎖について試料の大量調製法を検討した。糖鎖のプロセッシング経路にかかわる酵素をコードする遺伝子 (*Och1*, *Mnn1*, *Mnn4*) を欠損した酵母変異体を、¹³Cで標識したグルコースを唯一の炭素源とする培地中で培養することにより、目的の高マンノース型糖鎖を¹³C標識体として大量に調製することに成功した。

一方、超高磁場 NMR を用いてガングリオシドクラスターとアミロイド β ($A\beta$) の相互作用を解析した。Lyso-GM1 ミセルに由来する NMR 信号の帰属を完了し、核オーバーハウザー効果がもたらす距離情報に基づいて、その糖鎖部分の 3次元構造を決定した。さらに、スピララベル化した $A\beta$ を用いて、lyso-GM1 ミセルの NMR 信号に誘起される常磁性効果を観測した。これにより両者の相互作用様式を明らかにすることができた。

4) 学術論文

E. Sakata, T. Satoh, S. Yamamoto, Y. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, E. Kurimoto, K. Tanaka, S. Wakatsuki and K. Kato, "Crystal structure of UbcH5b~ubiquitin intermediate: Insight into the formation of the self-assembled E2~Ub conjugates" *Structure*, **18**, 138-147 (2010).

Y. Yamaguchi, M. Masuda, H. Sasakawa, T. Nonaka, S. Hanashima, S.-I. Hisanaga, K. Kato and M. Hasegawa, "Characterization of inhibitor-bound α -synuclein dimer: Role of α -synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding" *J. Mol. Biol.*, **395**, 445-456 (2010).

H. Yagi, M. Yamamoto, S.-Y. Yu, N. Takahashi, K.-H. Khoo, Y. C. Lee and K. Kato, "N-Glycosylation profiling of turtle egg yolk: expression of galabiose structure" *Carbohydr. Res.*, **345**, 442-448 (2010).

O. Serve, Y. Kamiya, A. Maeno, M. Nakano, C. Murakami, H. Sasakawa, Y. Yamaguchi, T. Harada, E. Kurimoto, M. Yagi-Utsumi, T. Iguchi, K. Inaba, J. Kikuchi, O. Asami, T. Kajino, T. Oka, M. Nakasako and K. Kato, "Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface" *J. Mol. Biol.*, **396**, 361-374 (2010).

M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi and K. Kato, "NMR characterization of the interactions between lyso-GM1 aqueous micelles and amyloid β " *FEBS Lett.*, **584**, 831-836 (2010).

- T. Dojima, T. Nishina, T. Kato, T. Uno, H. Yagi, K. Kato, H. Ueda and E. Y. Park**, “Improved secretion of molecular chaperone-assisted human IgG in silkworm, and no alterations in their *N*-linked glycan structures” *Biotechnology Progress*, **26**, 232-238 (2010).
- M. Nishio, Y. Kamiya, T. Mizushima, S. Wakatsuki, H. Sasakawa, K. Yamamoto, S. Uchiyama, M. Noda, A. R. McKay, K. Fukui, H.-P. Hauri and K. Kato**, “Structural basis for the cooperative interplay between the two causative gene products of combined factor V and factor VIII deficiency” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4034-4039 (2010).
- N. Takemae, R. Ruttanapumma, S. Parchariyanon, S. Yoneyama, T. Hayashi, H. Hiramatsu, N. Sriwilaijaroen, Y. Uchida, S. Kondo, H. Yagi, K. Kato, Y. Suzuki and T. Saito**, “Alteration in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs” *J. Gen. Virol.*, **91**, 938-948 (2010).
- Y. Yamaguchi, S. Hanashima, H. Yagi, Y. Takahashi, H. Sasakawa, E. Kurimoto, T. Iguchi, S. Kon, T. Uede and K. Kato**, “NMR characterization of intramolecular interaction of osteopontin, an intrinsically disordered protein with cryptic integrin-binding motifs” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 487-4918 (2010).
- S. Sato, O. Morohara, D. Fujita, Y. Yamaguchi, K. Kato and M. Fujita**, “Parallel-stacked aromatic hosts for orienting small molecules in a magnetic field: Induced residual dipolar coupling by encapsulation” *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3670-3671 (2010).
- Y. Wada, A. Dell, S. M. Haslam, B. Tissot, K. Canis, P. Azadi, M. Backstrom, C. E. Costello, G. C. Hansson, Y. Hiki, M. Ishihara, H. Ito, K. Kakehi, N. Karlsson, C. E. Hayes, K. Kato, N. Kawasaki, K.-H. Khoo, K. Kobayashi, D. Kolarich, A. Kondo, C. Lebrilla, M. Nakano, H. Narimatsu, J. Novak, M. V. Novotny, E. Ohno, N. H. Packer, E. Palaima, M. B. Renfrow, M. Tajiri, K. A. Thomsson, H. Yagi, S.-Y. Yu, and N. Taniguchi**, “Comparison of methods for profiling *O*-glycosylation: Human Proteome Organization Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1” *Mol. Cell Proteomics*, **9**, 719-727 (2010).
- J. Hoseki, H. Sasakawa, Y. Yamaguchi, M. Maeda, H. Kubota, K. Kato and K. Nagata**, “Solution structure and dynamics of mouse ARMET” *FEBS Lett.*, **584**, 1536-1542 (2010).
- C. A. Sandoval, F. Bie, A. Matsuoka, Y. Yamaguchi, H. Naka, Y. Li, K. Kato, N. Utsumi, K. Tsutsumi, T. Ohkuma, K. Murata and R. Noyori**, “Chiral η^6 -arene/*N*-tosylethylenediamine.ruthenium(II) complexes: Solution behavior and catalytic activity for asymmetric hydrogenation” *Chem. Asian J.*, **5**, 806-816 (2010).
- N. Hosokawa, L. O. Tremblay, B. Sleno, Y. Kamiya, I. Wada, K. Nagata, K. Kato and A. Herscovics**, “EDEMI accelerates the trimming of α 1,2-linked mannose on the C branch of *N*-glycans” *Glycobiology*, **20**, 567-575 (2010).
- S. Kim, Y. Saeki, K. Fukunaga, A. Suzuki, K. Takagi, T. Yamane, K. Tanaka, T. Mizushima and K. Kato**, “Crystal structure of yeast Rpn14, a chaperone of the 19 S regulatory particle of the proteasome” *J. Biol. Chem.*, **285**, 15159-15166 (2010).
- H. Yagi, M. Yanagisawa, K. Kato and R. K. Yu**, “Lysosome-associated membrane protein 1 is a major SSEA-1-carrier protein in mouse neural stem cells” *Glycobiology*, **20**, 976-981 (2010).
- K. Masuda, Y. Yamaguchi, N. Takahashi, R. Jefferis and K. Kato**, “Mutational deglycosylation of the Fc portion of immunoglobulin G causes *O*-sulfation of tyrosine adjacently preceding the originally glycosylated site” *FEBS Lett.*, **584**, 3474-3479 (2010).
- M. Nakasako, A. Maeno, E. Kurimoto, T. Harada, Y. Yamaguchi, T. Oka, Y. Takayama, A. Iwata and K. Kato**,

“Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase from a thermophilic fungus” *Biochemistry*, **49**, 6953-6962 (2010).

T. Satoh, E. Sakata, S. Yamamoto, Y. Yamaguchi, A. Sumiyoshi, S. Wakatsuki and K. Kato, “Crystal structure of cyclic Lys48-linked tetraubiquitin” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **400**, 329-333 (2010).

T. Nakagawa, S. Takeishi, A. Kameyama, H. Yagi, T. Yoshioka, K. Moriwaki, T. Masuda, H. Matsumoto, K. Kato, H. Narimatsu, N. Taniguchi and E. Miyoshi, “Glycomic analyses of glycoproteins in bile and serum during rat hepatocarcinogenesis” *J. Proteome Res.*, **9**, 4888-4896 (2010).

M. Sugiyama, E. Kurimoto, H. Sahashi, E. Sakata, Y. Morimoto, K. Itoh, K. Mori, T. Fukunaga, Y. Minami and K. Kato, “SANS investigation of assembly state of proteasome activator 28 and the 20S proteasome” *J. Phys.: Conf. Ser.*, **247**, 012020 (2010).

H. Yagi, M. Yanagisawa, Y. Suzuki, Y. Nakatani, T. Ariga, K. Kato and R. K. Yu, “HNK-1 epitope-carrying Tenascin-C spliced variant regulates the proliferation of mouse embryonic neural stem cells” *J. Biol. Chem.*, **285**, 37293-37301 (2010).

5) 著書, 総説

神谷由紀子, 加藤晃一, “糖鎖によるタンパク質社会の秩序維持” *化学工業*, **61**, 23-31 (2010).

N. Hosokawa, Y. Kamiya and K. Kato, “The role of MRH domain-containing lectins in ERAD” *Glycobiology*, **20**, 651-660 (2010).

K. Kato, Y. Yamaguchi and Y. Arata, “Stable-isotope-assisted NMR approaches to glycoproteins using immunoglobulin G as a model system” *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **56**, 346-359 (2010).

K. Matsuzaki, K. Kato and K. Yanagisawa, “A β polymerization through interaction with membrane gangliosides” *Biochim. Biophys. Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1801**, 868-877 (2010).

Y. Yamaguchi and K. Kato, “Dynamics and interactions of glycoconjugates probed by stable-isotope-assisted NMR spectroscopy” *Methods in Enzymology*, **478**, 305-322 (2010).

N. Hosokawa, K. Kato and Y. Kamiya, “Mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins in mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation” *Methods in Enzymology*, **480**, 181-197 (2010).

加藤晃一, 矢木真穂, “神経変性疾患にかかわる天然変性タンパク質の分子構造ダイナミクス” *Medical Bio* 別冊揺らぎと生体機能, オーム社, 寺嶋正秀編, 32-37 (2010).

坂田絵理, 佐藤匡史, 山口芳樹, 若槻壮市, 加藤晃一, “細胞の中の不要なタンパク質に目印をつける仕組み” *日本結晶学会誌*, **52**, 255-261 (2010).

坂田絵理, 佐藤匡史, 山口芳樹, 若槻壮市, 加藤晃一, “ユビキチン鎖伸長の構造的基盤” *PF NEWS*, **3**, 20-24 (2010).

6) 国際会議発表リスト

N. Takemae, R. Ruttanapumma, S. Parchariyanon, S. Yoneyama, T. Hayashi, Y. Hiromoto, Y. Uchida, K. Kato, Y. Suzuki, T. Tsuda, T. Saito, “Changes in receptor binding specificity of classical swine H1 influenza viruses due to egg-adaptation” International Symposium on Neglected Influenza Viruses, Amelia Island (USA), February 2010.

T. Yamaguchi, Y. Kamiya, H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, “A systematic methodology for structural glyco-biology” 2010 Annual Meeting of Asian CORE Program, Frontiers of Materials, Photo-, and Theoretical Molecular Sciences. Taipei (Taiwan), March 2010.

O. Morohata, D. Fujita, S. Sato, Y. Yamaguchi, K. Kato, M. Fujita, “Magnetic orientation by encapsulation into magnetically oriented host complex” 5th International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry, Nara (Japan), June 2010.

S. Yamamoto, T. Yamaguchi, M. Erdelyi, C. Griesinger, K. Kato, “Paramagnetic NMR approach to conformational analysis of *N*-glycans” Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference, Florence (Italy) July 2010.

K. Kato, Y. Kamiya, Y. Yamaguchi, “A systematic approach to NMR-based structural glyco-biology” Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference, Florence (Italy) July 2010.

T. Hirano, O. Serve, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, R. Kitahara, K. Kato, “Dynamics of multi-domains proteins seen by NMR: the di-ubiquitin model” Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference, Florence (Italy) July 2010.

M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, K. Yanagisawa, K. Kato, “Structural basis of the interaction between ganglioside clusters and amyloid- β peptide” Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference, Florence (Italy) July 2010.

Y. Kamiya, Y. Chiba, Y. Jigami, K. Kato, “Development of metabolic ¹³C-labeling techniques for NMR structural analyses of high-mannose-type oligosaccharides” The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Tokyo (Japan), August 2010.

M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, K. Yanagisawa, K. Kato, “Interactions between amyloid β and ganglioside clusters as characterized by NMR spectroscopy” 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Cairns (Australia) August 2010.

R. Kitahara, T. Hirano, M. Yagi, K. Hata, Y. Taniguchi, K. Akasaka, K. Kato, “High-pressure NMR characterizes conformational fluctuation of Lys48-linked diubiquitin” 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Cairns (Australia) August 2010.

Y. Uekusa, M. Kamihira-Ishijima, O. Sugimoto, T. Ishii, S. Kumazawa, K. Nakamura, K. Tanji, K. Kato, A. Naito, T. Nakayama, “The molecular aspects of green tea catechin interacting with phospholipid membranes as revealed by solution and solid-state NMR spectroscopy” 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Cairns (Australia) August 2010.

M. Nishio, Y. Kamiya, T. Mizushima, M. Yagi-Utsumi, S. Wakatsuki, K. Kato, “Structural basis for intracellular trafficking of coagulation factors V and VIII by the cooperative interplay between lectin and EF-hand protein” The 3rd International Symposium on Protein Community (ISPC-Nara2010), Nara (Japan) September 2010.

S. Sato, O. Morohara, D. Fujita, Y. Yamaguchi, K. Kato, M. Fujita, “RDC analysis of a guest accommodated in a magnetic aligning host complex” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry in OSAKA, JAPAN (60CCCCO), Osaka (Japan), September 2010.

Y. Uekusa, T. Ishii, K. Kato, A. Naito, T. Nakayama, “The study of catechin.phospholipid membranes interaction by solution and solid-state NMR spectroscopy” Mini-session for Young Researchers of Tea Science, The 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science (ICOS2010), Shizuoka (Japan), October 2010.

- Y. Uekusa, M. Kamihira-Ishijima, O. Sugimoto, T. Ishii, S. Kumazawa, K. Nakamura, K. Tanji, K. Kato, A. Naito, T. Nakayama**, “The study of catechin.phospholipid membranes interaction by solution and solid-state NMR spectroscopy” The 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science (ICOS2010), Shizuoka (Japan), October 2010.
- S. Kim, T. Mizushima, Y. Saeki, K. Tanaka, K. Kato**, “Crystal structure of Hsm3p, an assembly chaperone of the 19S regulatory particle of the proteasome” The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association, Busan (Korea), November 2010.
- Y. Kamiya, M. Nishio, T. Mizushima, M. Yagi-Utsumi, S. Wakatsuki, K. Kato**, “Molecular basis of sugar recognition by intracellular lectins in glycoprotein-fate” The 1st Yonsei-IMS Joint Workshop: “Structural Biology and Molecular Function”, Jeju (Korea), November 2010.
- M. Yagi-Utsumi**, “NMR analyses of interaction modes of amyloid β with GM1 clusters” The 1st Yonsei-IMS Joint Workshop: “Structural Biology and Molecular Function”, Jeju (Korea), November 2010.
- M. Nishio**, “Structural basis for intracellular trafficking of coagulation factors by the cooperative interplay between lectin and EF-hand protein” The 1st Yonsei-IMS Joint Workshop: “Structural Biology and Molecular Function”, Jeju (Korea), November 2010.
- T. Hirano**, “Dynamics of Lys48-linked di-ubiquitin as studied by NMR spectroscopy” The 1st Yonsei-IMS Joint Workshop: “Structural Biology and Molecular Function”, Jeju (Korea), November 2010.
- M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, K. Yanagisawa, K. Kato**, “NMR analyses of the interaction between amyloid β and GM1 clusters” 2nd Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) conference, Taipei (Taiwan), October 2010.
- Y. Kamiya, M. Nishio, K. Kato**, “Molecular basis of the glycoprotein-fate determination governed by the intracellular lectins” 2nd Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) conference, Taipei (Taiwan), October 2010.
- T. Yamaguchi, S. Yamamoto, M. Erdelyi, C. Griesinger, K. Kato**, “Paramagnetic-tagging approach for NMR characterization of *N*-linked oligosaccharides” 2nd Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) conference, Taipei (Taiwan), October 2010.
- M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, K. Yanagisawa, K. Kato**, “NMR characterization of the interaction between amyloid β -peptide and ganglioside clusters” The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Honolulu (USA), December 2010.
- Y. Kamiya, Y. Chiba, Y. Jigami, K. Kato**, “Development of metabolic ¹³C-labeled techniques for NMR spectroscopic analyses of high-mannose-type oligosaccharides” The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Honolulu (USA), December 2010.
- T. Yamaguchi, S. Yamamoto, M. Erdelyi, C. Griesinger, K. Kato**, “NMR spectroscopic approaches to the conformational characterization of *N*-linked oligosaccharides by introducing paramagnetic tags” The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Honolulu (USA), December 2010.
- Y. Uekusa, M. Kamihira-Ishijima, O. Sugimoto, T. Ishii, S. Kumazawa, K. Nakamura, K. Tanji, K. Kato, A. Naito, T. Nakayama**, “Interaction of epicatechin gallate with model phospholipid membranes as revealed by solid-state NMR

spectroscopy” The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Honolulu (USA), December 2010.

7) 招待講演

加藤晃一「タンパク質の細胞内品質管理における分子センシング機構」, 平成21年度「バイオ分子センサー」連携研究公開シンポジウム, 岡崎, 2010年1月.

加藤晃一, 山口拓実, 神谷由紀子「超高磁場 NMR 分光法による天然変性タンパク質および糖脂質クラスターの構造解析」, 自然科学研究機構分子科学研究所分子スケールナノサイエンスセンター運営委員会 (第11回), 岡崎, 2010年3月.

加藤晃一「抗体医薬の開発に向けた多次元 HPLC 法および NMR 法による糖鎖解析技術」, 抗体/バイオ医薬品開発に向けたタンパク質・糖鎖・抗体価の分析・測定, 東京, 2010年3月.

加藤晃一「複合糖質の構造・機能解析の体系的な研究戦略」, 蛋白研 - 統合バイオ合同セミナー, 大阪, 2010年4月.

西尾美穂, 神谷由紀子, 水島恒裕, 若槻壮市, 笹川拓昭, 山本一夫, 内山進, 野田勝紀, A. R. McKay, 福井希一, H. P. Hauri, 加藤晃一「レクチンと EF ハンドタンパク質の協働的相互作用による血液凝固因子の細胞内輸送の構造基盤」, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2010年6月.

加藤晃一, 神谷由紀子「真核細胞発現系を用いた糖タンパク質の安定同位体標識」, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2010年6月.

加藤晃一「NMR を利用したタンパク質・複合糖質の揺らぎの検出とその機能関連の探査」, 新学術領域「揺らぎと生体機能」平成22年度合同班会議, 加賀, 2010年6月.

矢木真穂, 加藤晃一「ガングリオシドクラスターに結合したアミロイド β の NMR 構造解析」, 平成22年度生理学研究所研究会糖鎖機能研究会...分子レベルでの解明を目指して, 岡崎, 2010年7月.

K. Kato, “NMR characterization of the interactions between amyloid β and gangliosidic micelles” Max Planck Institute for Biophysical Chemistry Seminar, Göttingen (Germany), July 2010.

K. Kato, “A systematic structural glycobiology by NMR in conjunction with X-ray crystallography and sugar library approaches” The Chinese University of Hong Kong Seminar, Hong Kong (China), July 2010.

K. Kato, “A systematic structural glycobiology by NMR in conjunction with X-ray crystallography and sugar library approaches” Hong Kong University Seminar, Hong Kong (China), July 2010.

K. Kato, “Structural Glycomics by NMR and Sugar Library Approaches” WCU Special Seminar, Seoul (Korea), July 2010.

K. Kato, “A systematic approaches of structural glycobiology based on NMR and sugar library” International Workshop on Glycan Structure Analysis of Therapeutic Recombinant Glycoproteins, Bucheon (Korea), July 2010.

加藤晃一「超高磁場 NMR による複合糖質の動的構造・相互作用解析」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 吹田, 2010年7月.

K. Kato, “NMR Characterization of Conformations, Dynamics, and Interactions of Glycoconjugates” ICS2010, Tokyo, August 2010.

加藤晃一「複合糖質の構造・機能解析」, 岡崎統合バイオサイエンスセンター・サマースクール, 岡崎, 2010

年8月.

加藤晃一「920MHz NMR 装置を利用した複合糖質の構造・ダイナミクス・相互作用の解析」, ナノネット機能別会合 (分子物質合成・極限環境), 岡崎, 2010年9月.

加藤晃一, 「複合糖質の体系的構造解析: NMR と糖鎖ライブラリーによるアプローチ」, 第59回高分子討論会, 札幌, 2010年9月.

K. Kato, “Structural and functional glycomics based on HPLC database, sugar library, and NMR spectroscopy” BIT’s 8th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology (IDDST2010), Beijing (China), October 2010.

K. Kato, “Structural and Functional Analyses of Post-Translationally Diversified Proteins” The 1st Yosei-IMS Joint Workshop, Jeju (Korea), November 2010.

水島恒裕, 加藤晃一, 森本幸生, 田中啓二「プロテアソームの構造生物学」, BMB2010, 神戸, 2010年12月.

K. Kato, T. Mizushima, “Structural views of the ubiquitin-proteasome system” The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Honolulu (USA), December 2010.

8) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本バイオイメーキング学会評議員 (1995-).

日本生化学学会評議員 (2002-).

日本糖質学会評議員 (2003-).

日本核磁気共鳴学会理事 (2008-).

NPO バイオものづくり中部理事 (2008-).

日本蛋白質科学会理事 (2010-).

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員

日本学術振興会先端科学シンポジウム事業委員会プランニング・グループ・メンバー

学会誌編集委員

Open Glycoscience, Editorial board member (2008-).

Glycoconjugate Journal, Editorial board member (2009-).

World Journal of Biological Chemistry, Editorial board member (2010-).

Journal of Glycomics & Lipidomics, Editorial board member (2010-).

その他

株式会社グライエンス取締役 (2005-).

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

お茶の水女子大学, 客員教授

名古屋市立大学薬学部, 大学院薬学研究科, 特任教授

理化学研究所, 客員研究員

10) 受賞, 表彰

神谷由紀子, 糖鎖科学名古屋拠点若手研究者奨励賞

矢木真穂, 第74回日本生化学会中部支部例会奨励賞

西尾美穂, 糖鎖科学名古屋拠点第8回「若手のカフォーラム」奨励賞

11) 外部獲得資金

ターゲットタンパク研究プログラム, 「巨大で複雑なタンパク分解装置の動態と作動機構」, 加藤晃一 (分担) (2007年-).

戦略的創造研究推進事業 CREST プログラム, 「自己組織化有限ナノ界面の化学」, 加藤晃一 (分担) (2007年-).

科研費基盤研究 (B), 「ポスト小胞体品質管理における細胞内レクチンの分子認識と超分子形成の構造基盤の解明」, 加藤晃一 (代表) (2009年-).

科研費基盤研究 (C), 「タンパク質高次構造におけるダイナミクスの解析」, 加藤晃一 (分担) (2009年-).

科研費若手研究 (スタートアップ), 「細胞内レクチンと Ca 結合タンパク質との連携による生体機能発現の分子基盤の探究」, 神谷由紀子 (代表) (2009年-2010年).

科研費若手研究 (研究活動スタート支援), 「オリゴ糖鎖ナノクラスターの精密構築と生体分子認識機構の解明」, 山口拓実 (代表) (2009年-).

科研費特定領域研究「タンパク質社会」(公募研究), 「糖鎖認識を介したタンパク質社会の秩序維持機構の構造基盤の解明」, 神谷由紀子 (代表) (2010年-).

科研費基盤研究 (B), 「脳領域依存的なアミロイドベータ蛋白質蓄積の分子機構解明」, 加藤晃一 (分担) (2010年-).

厚生労働省長寿医療研究開発費, 「アルツハイマー病根治薬の開発」, 加藤晃一 (分担) (2010年-).

医薬基盤研究所保健医療分野における基礎研究推進事業, 「抗体医薬品等のバイオ医薬品の合理的開発のための医薬品開発支援時術の確立を目指した研究」, 加藤晃一 (分担) (2010年-).

3-4 神経細胞生物

椎名伸之(准教授)

1) 専門領域：細胞生物学, 神経生物学

2) 研究課題：

a) mRNA 輸送・局所的翻訳による神経ネットワーク形成制御機構の解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 神経樹状突起への特定の mRNA の輸送とそれに引き続いて起きるシナプス刺激依存的な局所的翻訳は、シナプスの形成や可塑性、ひいては学習記憶等の高次脳機能に必須の役割を果たしている。樹状突起への mRNA 輸送と局所的翻訳制御は RNA granule と呼ばれる高次核酸-タンパク質複合体によって主に担われている。我々は RNA granule の構成要素として RNA 結合タンパク質 RNA granule protein 105 (RNG105) およびそのパラログ RNG140 を同定し、その機能解析をおこなった。RNG105 遺伝子を破壊したマウスの大脳神経細胞を培養し、その神経細胞では特定の mRNA の樹状突起への輸送が低下していることを明らかにした。さらにその神経樹状突起ではシナプス結合が減少、樹状突起は短縮し、本来密に発達するはずの神経ネットワークが、貧弱に退化してしまうことを明らかにした。神経樹状突起は、軸索からの興奮刺激を受け取るいわゆるアンテナの役割を果たしており、我々の結果は、アンテナを長く伸ばして多くの入力を受ける、すなわち多くのシナプス結合を作るためには、樹状突起へ mRNA を輸送し、局所的に翻訳することが必要であることを示した。

RNG105 のパラログ RNG140 の解析にも着手した。この両者は高度に保存された RNA 結合ドメインを持ち、両遺伝子は脊椎動物にのみ保存されていた。組織発現は両者とも脳において極めて高いことから、これらのタンパク質は脊椎動物の中樞神経系の高次機能に関与すると考えられた。実際、神経培養細胞で RNG105 あるいは RNG140 の RNAi によるノックダウンをおこなうと、いずれも樹状突起の貧弱化、樹状突起のシナプス結合の減少を引き起こした。しかしこの RNAi の効果は、RNG140 のノックダウンは RNG105 の発現によってレスキューされず、その逆も然りであった。また、RNG105 と RNG140 が局在する RNA granule は構成タンパク質が全く異なっており、RNG105 と RNG140 の発現時期も、それぞれ胎仔期と出生後と大きく異なっていた。以上の結果により、RNG105 と RNG140 の両 RNA 結合タンパク質が樹状突起と樹状突起シナプスの形成を担うことを明らかにした。そして両者が機能する時期やパスウェイは異なっている可能性を示した。

4) 学術論文

N. Shiina, K. Yamaguchi and M. Tokunaga, "RNG105 deficiency impairs the dendritic localization of mRNAs for Na⁺/K⁺ ATPase subunit isoforms and leads to the degeneration of neuronal networks" *J. Neurosci.*, **30, 12816-12830 (2010).**

N. Shiina and M. Tokunaga, "RNA granule protein 140 (RNG140), a paralog of RNG105 localized to distinct RNA

granules in neuronal dendrites in the adult vertebrate brain” *J. Biol. Chem.*, **285**, 24260-24269 (2010).

6) 国際会議発表リスト

N. Shiina, “RNG105 deficiency impairs the dendritic transport of mRNA and leads to the degeneration of neuronal networks” The 16th International Conference of the International Society of Differentiation, Nara (Japan), November 2010.

7) 招待講演

椎名伸之「神経細胞における mRNA 輸送と局所的翻訳の分子機構」, 日本植物学会第74回大会, 春日井, 2010年9月.

椎名伸之「神経樹状突起への mRNA 輸送と局所的翻訳の役割」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 吹田, 2010年10月.

8) 学会および社会的活動

日本細胞生物学会

日本分子生物学会

岡崎高校スーパーサイエンスハイスクール授業

11) 外部獲得資金

科研費新学術領域研究, 「包括型脳科学研究推進支援ネットワーク」, 椎名伸之 (分担) (2010年–2014年).

科研費基盤研究 (C), 「細胞増殖, ストレス応答, 神経回路形成における mRNA 粒子による翻訳調節機構の解析」, 椎名伸之 (代表) (2008–2010年).

3-5 客員部門

笹井理生（客員教授）

- 1) 専門領域：理論および計算生物物理学
- 2) 研究課題：
 - a) 蛋白質の構造・運動・機能に関する理論的研究
 - b) 生体分子ネットワーク理論
 - c) 真核細胞のアメーバ様運動のモデル
- 3) 研究活動の概略と主な成果：
 - a) 蛋白質の構造・運動・機能について、新しい統計力学モデルと粗視化分子動力学モデルを開発し、エネルギーランドスケープ描像によって多くの実験を統一的に説明できることを示して、構造変化における揺らぎの効果とエントロピー効果の重要性を明らかにした。とりわけ、(i) 蛋白質フォールディングに伴う大規模構造変化の統計力学モデルをアロステリック転移の分析のために拡張し、NtrC, Ras, カルモジュリン, CheY などのアロステリック蛋白質を例にとりて構造転移とその揺らぎの機構を解析し、構造転移経路の数が大きいことによる転移速度の増大効果を示した。さらに、リガンド結合前に結合後の構造をとる前駆揺らぎを可能とする機構として、エントロピー効果の重要性を指摘した。(ii) より直接に立体構造を扱う方法として、アロステリック転移の多体粗視化モデル（カメレオンモデル）を開発し、アデニレートキナーゼなどのモデル蛋白質の分子動力学計算を行って、構造揺らぎとそれに伴うエントロピーの効果の重要性を示して新しい方法の有効性を議論した。(iii) また、ミオシン II のレバーアーム運動と非等方ブラウン運動の両者を許容する粗視化モデルを用いて分子動力学シミュレーションを実行し、アクトミオシン系の力発生における2つの機構の関係について解析した。ヌクレオチドを結合したミオシンとアクチンフィラメントの間の静電相互作用によって滑り運動が駆動されること、滑り運動とともにアクチン-ミオシン間の結合が強まり、ヌクレオチドを放出してクレフトを閉じたミオシンとアクチンとの疎水的なパッキングを経て rigor 状態へ向かうことなど、力発生のシナリオを提案し、長年の論争解決に向けて、原子レベルの詳細に基づくエネルギーランドスケープ描像による理解の道筋を示すことができた。
 - b) 遺伝子スイッチの機構、遺伝子スイッチのつくるネットワークの確率的挙動、蛋白質相互作用ネットワークの挙動を分析して、生体分子のつくるネットワークがシステムとして機能する様子を理論的に解析した。(i) そのうち、DNA の構造変化のモンテカルロシミュレーションでは、インシュレーター対の相互作用によってエンハンサーが DNA のループに閉じ込められるときの転写頻度の低下について、ループの立体構造の観点からその機構を議論した。(ii) また、Nanog, Oct4, Sox2 などの ES 細胞のコア遺伝子のつくるネットワークの遺伝子発現を表す確率過程シミュレーションを実行し、ES 細胞の多能性状態のなかにサブ状態が複数存在すること、そのサブ状態間の遷移に伴って ES 細胞は大きな揺らぎを示すこと、サブ状態を経て多能性を失い分化する転移が生じることなどの仮説を提案した。(iii) さらに、遺伝子スイッチの確率過程を経路積分法に

よって分析し、DNAの状態変化の時定数と遺伝子産物の個数変化の時定数の大小関係によってノイズ発生機構が変化する様子を分析した。(iv) また、シアノバクテリアの概日周期の *in vitro* 再構成系のシミュレーションを行った。シアノバクテリアの蛋白質 KaiA, KaiB, KaiC の相互作用によって *in vitro* で振動リズムが発生するが、その際、KaiC による ATP 加水分解反応が KaiC の構造変化を促すフィードバック機構が存在し、KaiA, KaiB との相互作用を変調して安定した周期的振動を生み出す積極的な役割を果たしているという仮説を提案して、このシステムの温度補償性の起源を分析した。

c) 真核細胞のアメーバ運動による化学走向性のシミュレーションを行った。通常、細胞の運動前面における受容体からのシグナルのカスケードとアクチン繊維ネットワークの形成がモデル化されることが多いが、本研究では、細胞後部におけるアクチン繊維形成を阻害する因子の蓄積に着目し、これらの因子の揺らぎが細胞の形と運動の揺らぎとなって現れる細胞スケールのフィードバック機構を分析した。さらに、このフィードバック機構により、複雑な環境下での高効率の細胞運動が実現するという予測を提示した。また、化学勾配のない環境でアメーバ様細胞が示す super-diffusive 運動が、上記のフィードバック機構により定量的に説明可能であることを示した。

4) 学術論文

N. Tokuda, M. Sasai and G. Chikenji, “Roles of DNA looping in enhancer-blocking activity” *Biophys. J.* **100**, 126-134 (2011).

T. Nagai, T. P. Terada and M. Sasai, “Synchronizaion of circadian oscillation of phosphorylation level of KaiC *in vitro*” *Biophys. J.* **98**, 2469-2477 (2010).

K. Itoh and M. Sasai, “Entropic mechanism of large fluctuation in allosteric transition” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7775-7780 (2010).

M. Takano, T. P. Terada and M. Sasai, “Unidirectional Brownian motion observed in an *in silico* single molecule experiment of an actomyosin motor” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7769-7774 (2010).

5) 著書, 総説

笹井理生, 伊藤一仁, 佐々木尚, “タンパク質の論理” 超多自由度系の新しい科学, (計算科学講座第10巻) (共立出版, 笹井理生編) p.181-216 (2010).

笹井理生, 計算科学の考え方, 超多自由度系の新しい科学, (計算科学講座第10巻) (共立出版, 笹井理生編) p.9-18 (2010).

6) 国際会議発表リスト

J. Lee, M. Sasai, C. Seok, J. Lee, “De novo protein structure prediction using fragment based potential and conformational space annealing” The 54th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco (USA), February 2010.

K. Itoh and M. Sasai, “Entropic mechanism of large fluctuation in allosteric transition” Gordon Research Conference on Protein Folding Dynamics, Ventura, (USA), January 2010.

7) 招待講演

K. Itoh and M. Sasai, “Statistical mechanics of protein allostery: roles of back-bone and side-chain fluctuations” The 10th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), Sep. 2010.

S. I. Nishimura, M. Ueda and M. Sasai, “Anomalous Dynamics of Eukaryotic Cell Locomotion, Emergent behaviour of biomolecular ensembles and networks” Beijing (China), Aug. 2010.

S. I. Nishimura, M. Ueda and M. Sasai, “Anomalous Dynamics of Eukaryotic Cell Locomotion” Dynamic Days Asia Pacific 6, Sydney (Australia), July 2010.

M. Sasai, “Synchronization and Noise in a Protein-Based Circadian Oscillator” Biological Networks -Principles and Dynamics, Beijing (China), July 2010.

M. Sasai, “Stochastic gene expression in the early Drosophila embryo” Characterizing Landscapes: From Biomolecules to Cellular Networks, Telluride (USA), June 2010.

M. Sasai, “Molecular Mechanism of A Protein-Based Circadian Clock” Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University, Nagoya (Japan), March 2010.

K. Itoh, M. Takano, T. P. Terada and M. Sasai, “Harnessing the thermal noise with molecular machines” International Symposium on “Molecular Theory for Real Systems”, Kyoto (Japan) January 2010.

11) 外部獲得資金

科研費基盤研究 (A), 平成20-23年度, 「分子モーターの機能ファネル理論」, 笹井理生 (代表) (2008年-2011年).

3-5 客員部門

勝 義 直 (客員准教授)

1) 専門領域：比較内分泌学

2) 研究課題：

- a) ステロイドホルモン受容体の分子進化に関する研究
- b) 爬虫類の温度依存的な性決定の分子機構解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) ステロイドホルモンは動物の生殖・分化・恒常性維持等多様な機能を持つ脂溶性リガンドであり、その受容体は「リガンド依存的な転写制御因子」という特徴を持つ核内受容体スーパーファミリーの一員である。このステロイドホルモン受容体は生物進化のどの段階から出現してきたのか？という問題はまだ未解決のまま残されている。この問題解決の為に、脊椎動物にもっとも近い無脊椎動物であると位置付けられているナメクジウオから女性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体 (ERと略す) の単離を試みた。その結果ナメクジウオの段階で脊椎動物型 ER のオーソログを持っている事が分かった。しかし、機能解析から DNA との結合は認められるがリガンドとは結合しない事、転写補助因子との結合が出来ない事等、機能的に完全型の ER ではないということが判明した。これとは別のタイプのステロイドホルモン受容体の単離にも成功している。この受容体は ER の仲間ではなく、それ以外の 3-ケトステロイドホルモン受容体 (脊椎動物のアンドロゲン受容体や糖質コルチコイド受容体を含む) の仲間グループ分けされる。驚くべき事に、この 3-ケトステロイドホルモン受容体 (SR と略す) はエストロゲンに反応し、エストロゲン応答 DNA 配列を介した転写活性を誘導する事が分かった。ナメクジウオではあたかも SR が ER としての役割を担っているかのようだ。またこの SR はアンドロゲン応答 DNA 配列も認識できる事が分かった。しかし、アンドロゲンやプロゲステロンおよび副腎ステロイドには反応しない。ナメクジウオの ER は SR によるエストロゲン応答 DNA 配列を介した転写活性を阻害できる事から生体内では SR の抑制因子として機能していると推測された。今後、さらなる生体内での機能の解明が必要である。
- b) 爬虫類のうちでワニは性染色体を持っておらず胚発生中の温度によって性が決定している。温度の刺激がどのように性の決定・分化に繋がるのか？という疑問はこれまで未解決である。温度と性決定の機構を結びつける為に、熱ショックタンパク質 (HSP) に注目し、遺伝子の単離を行なった。12種類の HSP 遺伝子の単離に成功し、胚発生過程での発現パターンを解析した。その結果、雄になる温度で HSP27、雌になる温度で HSP70A の発現が顕著に増加する事が分かった。この結果は、ワニの性決定時期における HSP の関与を示す初めての成果であり、今後これらの HSP の発現と性決定に関与する遺伝子群との関連を解析する予定である。

4) 学術論文

BC. Moore, MR. Milnes, S. Kohno, Y. Katsu, T. Iguchi and LJ. Guillette, “Influences of sex, incubation temperature, and environmental quality on gonadal estrogen and androgen receptor messenger RNA expression in juvenile American

alligator (*Alligator mississippiensis*)” *Biol. Reprod.*, **82**, 194-201 (2010).

S. Koho*, **Y. Katsu***, **H. Urushitani**, **Y. Ohta**, **T. Iguchi** and **LJ. Guillette** (*These authors contributed equally), “Potential contributions of heat shock proteins to temperature-dependent sex determination in the American alligator” *Sex. Dev.*, **4**, 73-87 (2010).

S. Miyagawa, **Y. Katsu**, **Y. Ohta**, **T. Sudo**, **DB. Lubahn** and **T. Iguchi**, “Estrogen receptor ESR1 is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5alpha-dihydrotestosterone exposure in mice” *Biol. Reprod.*, **82**, 497-503 (2010).

Y. Katsu, **K. Kubokawa**, **H. Urushitani** and **T. Iguchi**, “Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen-and androgen-response elements” *Endocrinology*, **151**, 639-648 (2010).

Y. Katsu, **E. Taniguchi**, **H. Urushitani**, **S. Miyagawa**, **M. Takase**, **K. Kubokawa**, **O. Tooi**, **T. Oka**, **N. Santo**, **J. Myburgh**, **A. Matsuno** and **T. Iguchi**, “Molecular cloning and characterization of ligand-and species-specificity of amphibian estrogen receptors” *Gen. Comp. Endocrinol.*, **168**, 220-230 (2010).

L. Davis, **Y. Katsu**, **T. Iguchi**, **DT. Lerner**, **T. Hirano** and **EG. Grau**, “Transcriptional activity and biological effects of mammalian estrogen receptor ligands on three hepatic estrogen receptors in Mozambique tilapia” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **122**, 272-278 (2010).

Y. Katsu, **S. Kohno**, **H. Narita**, **H. Urushitani**, **K. Yamane**, **A. Hara**, **TM. Clauss**, **MT. Walsh**, **S. Miyagawa**, **LJ. Guillette** and **T. Iguchi**, “Cloning and functional characterization of Chondrichthyes, cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame* and whale shark, *Rhincodon typus* estrogen receptors” *Gen. Comp. Endocrinol.*, **168**, 496-504 (2010).

Y. Katsu, **K. Matsubara**, **S. Kohno**, **Y. Matsuda**, **M. Toriba**, **K. Oka**, **LJ. Guillette**, **Y. Ohta** and **T. Iguchi**, “Molecular cloning, characterization and chromosome mapping of reptilian estrogen receptors” *Endocrinology*, **151**, 5710-5720 (2010).

11) 外部獲得資金

科学研究費補助金基盤研究 (C) 「性ステロイドホルモン受容体の分子進化の解析」, 勝義直 (代表) (2008年-2010年).

科学研究費補助金基盤研究 (C) 「アメリカワニを用いたハ虫類における内分泌かく乱物質の生殖影響に関する基礎的研究」, 勝義直 (分担) (2009年-2011年).

岡崎統合バイオサイエンスセンター レポート2010

2011年3月発行

自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）
岡崎統合バイオサイエンスセンター

岡崎市明大寺町字東山5-1
電話 0564-59-5201

印刷・製本 ブラザー印刷株式会社
<http://brother-p.com>



自然科学研究機構 岡崎共通研究施設
岡崎統合バイオサイエンスセンター

〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山5-1
<http://www.oib.orion.ac.jp/>