

時系列生命現象研究領域

(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) 極細胞中における母性 *Ovo* タンパク質の機能
- b) *Sxl* 遺伝子による始原生殖細胞自律的な性決定機構
- c) JAK/STAT リガンド分布制御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) 極細胞中における母性 *Ovo* 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、これを取り込んだ極細胞（始原生殖細胞）のみが生殖細胞に分化する。これまで、生殖質中に局在する未知の母性因子の働きにより、生殖系列特異的な遺伝子発現が活性化され、その結果、始原生殖細胞が生殖細胞へと分化するように運命づけられると考えられてきた。この母性因子の候補として、*ovo* 遺伝子に注目して機能解析を行なってきた。母性 *Ovo* タンパク質は、特定の DNA 配列に結合し転写を活性化する転写因子として知られている。この機能を特異的に阻害することのできるリプレッサーを始原生殖細胞特異的に発現させることにより母性 *Ovo* の機能阻害をおこなった結果、始原生殖細胞は徐々に退化し、最終的に生殖細胞が形成されない不妊の表現型が観察された。このことから、母性 *Ovo* タンパク質は始原生殖細胞内で遺伝子発現を活性化することにより、生殖細胞への発生を制御する重要な母性因子であると考えられる。母性 *Ovo* タンパク質の機能をリプレッサーの発現や RNA 干渉法により阻害しマイクロアレイ解析を行うことにより、母性 *Ovo* により活性化される遺伝子を網羅的に同定する解析が進行中である。

b) *Sxl* 遺伝子による始原生殖細胞の性決定機構

これまでの研究から、始原生殖細胞特異的に *Sxl* 遺伝子の機能を抑制すると、雌の始原生殖細胞は卵形成を行うことが出来なくなること、雄の始原生殖細胞で *Sxl* を強制発現し、雌個体に移植すると、移植された始原生殖細胞は、卵を形成することが明らかとなった。以上の結果は、始原生殖細胞の雌化に *Sxl* の機能が重要かつ十分であることを示している。すなわち、*Sxl* は、始原生殖細胞の雌化を決定するためのマスター遺伝子として働いていることが明らかになった。*Sxl* は、

RNA 結合タンパク質であり、特定の RNA に結合し、スプライシングや翻訳を制御することが知られている。始原生殖細胞中において Sxl に結合する RNA を同定し、Sxl の下流で働く遺伝子を明らかにする研究が進行中である。

d) JAK/ STAT リガンド分布制御におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割

細胞内シグナルの一種、JAK/ STAT シグナルは、幹細胞を維持や、組織の形作り、免疫応答などの様々な生命現象を制御することが知られている。JAK/ STAT シグナルを活性化するリガンドが組織内で正確な空間パターンをもって分布することは、幹細胞の維持や組織の形態形成の理解に重要である。しかし、JAK/ STAT リガンドの組織内での分布が、どのような仕組みで制御されているのかは不明であった。

私たちは、ショウジョウバエの卵巣をモデルとして用いることで、その分布を制御する分子の特定を試みた。JAK/ STAT シグナルは、ショウジョウバエの卵形成過程においてモルフォゲンとして機能すると考えられてきたが、リガンドの可視化が困難であったため、その分布の様式や、それを制御する仕組みは不明であった。そこで私たちは、JAK/ STAT リガンドの可視化の方法の確立を試み、次にリガンドの分布を制御する分子の特定を試みた。分布を制御する分子としては、細胞外環境の主要な構成因子のひとつである、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の働きに着目した。

HSPG はヘパラン硫酸鎖 (HS 鎖) を側鎖としてもつ糖タンパク質の一種である。細胞外環境における HSPG の重要な働きの一つは、その側鎖あるいはタンパク質部位に様々なリガンド結合することで、リガンドの分布を制御することである。特に GPI アンカーを介して細胞膜表面に結合するタイプの HSPG (グリピカン) は、細胞増殖シグナルのリガンド制御における機能解析が進んでおり、これまでに BMP、Wnt, Hh などの分布を制御することが知られていた。しかし、グリピカンが JAK/ STAT シグナルのリガンドを制御するかどうかは不明であった。

研究の第一歩として、卵巣において JAK/ STAT リガンド (Upd) を可視化することにより、その分布を観察した。その結果、Upd は産生細胞を起点として、濃度勾配をつくって分布することが明らかになった。この卵巣の一部の細胞において、グリピカンの働きを阻害したところ、細胞の表面から Upd の分布は消失した。反対に、一部の細胞でグリピカンを過剰発現した場合、その細胞表面において Upd は異所的に分布することが明らかとなった。以上の結果は、Upd の分布は、細部表面のグリピカンと結合することにより制御されることを示唆している。これは JAK/ STAT シグナルのリガンド分布を制御する仕組みを明らかにした初めて例であり、組織内における JAK/ STAT リガンドの分布制御が重要な、幹細胞維持、組織の形態形成などの全ての生命現象を理解する上で基礎となるものである。

4) 学術論文

Hayashi, Y., Sexton, T. R., Dejima, K., Perry, D. W., Takemura, M., Kobayashi, S., Nakato,

H., Harrison, D. A., "Glypicans regulate JAK/ STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen" *Development*, **139**, 4162-4171 (2012).

Ohhara, Y., Kayashima, Y., Hayashi, Y., Kobayashi, S., Yamakawa-Kobayashi, K. "Expression of β -adrenergic-like octopamine receptors during *Drosophila* development" *Zoological Science*, **29**, 83-89 (2012).

5) 著書、総説

Nishimiya-Fujisawa, C., Kobayashi, S. "Germline stem cells and sex determination in Hydra" *Int. J. Dev. Biol.*, **56**, 499-508 (2012).

6) 国際会議発表リスト

Kobayashi, S. "Mechanism regulating germline sexual identity in *Drosophila* embryos" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

Nishimiya-Fujisawa, C., Kobayashi, S. "Generation of sperm stem cells from multipotent stem cells in *Hydra*" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

Hayashi, Y., Noda, C., Kobayashi, S. "Role of Glycolysis in Primordial-Germ-Cell Development in *Drosophila* Embryos" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

Sato, M., Mon, H., Kusakabe, T., Kobayashi, S. "Establishment of resources to elucidate regulatory network governing germline gene expressinn using *Bombyx mori* cell line BmN4-SID1" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

7) 招待講演

小林悟 「ショウジョウバエの生殖系列の形成とその雌雄を決定するメカニズム」 日本動物学会、第 83 回大会、大阪、2012 年 9 月

林良樹 「ショウジョウバエ配偶子形成過程におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割」 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月

8) 学会および社会的活動

第35回 日本分子生物学会年会 ワークショップ オーガナイザー (林良樹)

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

10) 受賞、表彰

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 A、「ショウジョウバエ生殖細胞系列の性決定機構の解明」、小林悟 (代表) (2012 年-2015 年)

科研費 新学術領域研究 (公募)、「ショウジョウバエ生殖系列における転写制御機構における細胞内代謝状態の役割」林良樹 (代表) (2012 年-2013 年)

科研費 若手 B、「不妊を引き起こす生殖細胞発生異常のシステム解析」、佐藤昌直 (代表) (2011-2013 年)

科研費 基盤 A、「システムバキュロウイルス学の幕開け-タンパク質超発現システムの解明と再構築-」、佐藤昌直 (分担) (2010-2013 年)

12) 特許

時系列生命現象研究領域

(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。体節の前駆細胞である未分化な沿軸中胚葉細胞は胚の最後端に位置する幹細胞様細胞から生み出される。体節が逐次形成されて行くためには、MPC から沿軸中胚葉細胞が順次分化することが重要である。この分化の制御は、発生における幹細胞分化のモデル系としても注目されるが、その分子機構は十分には明らかになっていない。我々はゼブラフィッシュを用いて、幹細胞様細胞から沿軸中胚葉細胞への分化機構を研究している。ゼブラフィッシュでは、Mesoderm progenitor cell (MPC)と呼ばれる幹細胞様細胞が存在し、その未分化性は細胞間シグナル Wnt と転写制御因子 *ntl/bra* 間のポジティブフィードバックによって維持される。それに対して、MPC からの細胞分化が始まる機構については十分な解明がなされていなかったが、我々はこの分化に関わる遺伝子として *mesogenin 1 (msgn1)* を同定した。*msgn1* は bHLH 型の転写調節因子をコードし、MPC から分化し始めた沿軸中胚葉細胞で発現する。そこでまず、その機能阻害胚を作製したところ、尾部の形態形成に軽微な異常が見られた。ゼブラフィッシュの胴体部の発生においては、MPC から沿軸中胚葉細胞の分化に別の転写調節因子 *tbx16/spade tail* が必要であることが既に知られている。そこで、尾部における MPC からの分化における *msgn1* と *tbx16* の関係を調べるため、両者の二重機能阻害胚を作製したところ、*tbx16* 変異体で見られている胴体部での異常に加えて尾部においても MPC から沿軸中胚葉細胞の分化が阻害されており、MPC 細胞が過剰に蓄積していることがわかった。一方、*msgn1* を過剰発現させたところ、沿軸中胚葉細胞の分化とともに発現する *tbx24* の発現が亢進していた。したがって、*msgn1* は *tbx16* とともに尾部の発生過程において、MPC から沿軸中胚葉細胞への分化に必須な役割をはたすことが明らかになった。さらに、*msgn1* による沿軸中胚葉細胞への分化は *ntl* 遺伝子が発現する細胞において顕著に認められた。*ntl* は MPC ならびに *msgn1* が発現を始める初期分化段階の沿軸中胚葉細胞において発現することから、MPC からの初期分化過程においては、*ntl* を発現する細胞に *msgn1* が新たに発現することによって沿軸中胚葉細胞への分化が促進されるものと考えられた。

この研究と平行して、体節細胞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、そこに関与する遺伝子に着目した研究を行っている。本年度は、体節の

境界位置の形成に関わる転写調節因子である Tbx24 タンパク質と転写調節因子 Mesp と Ripply の関係をゼブラフィッシュをモデル系に解析した。

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、その実体は全くわかっていない。また、咽頭弓から派生する様々な器官の発生機構にも大きな興味を持たれる。我々はマウスの3つの Ripply 遺伝子うち、Ripply3 が咽頭弓で発現することを見だし、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。これまでの解析から、Ripply3 変異体胚では、第3, 4咽頭弓の形成に必要であり、その異常は咽頭弓から発達する胸腺や副甲状腺などの形成不全に繋がることが明らかになっている。現在は、咽頭弓の分節形成機構を明らかにすることを目的として、Ripply3 遺伝子の発現調節機構の解明を目指し、咽頭弓での Ripply3 の発現様式の詳細な解析を行っている。

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。このような成果をふまえて、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ている。今年度は、この酵素の必要度が Wnt の種類により異なることをゼブラフィッシュ胚や培養細胞をもちいて明らかにした。それとともに、アフリカツメガエル胚を用いて Wnt タンパク質の細胞外での動態の解析を開始した。

4) 学術論文

Chiu CH, Chou CW, Takada S, and Liu YW. “Development and fibronectin signaling requirements of the zebrafish interrenal vessel.” *PLoS One*. 7(8):e43040. 2012

Yabe T. and Takada S. “Mesogenin causes embryonic mesoderm progenitors to differentiate during development of zebrafish tail somites.” *Dev. Biol.* 370, 213-222, 2012

Chen, Q Takada, R., and Takada S. “Loss of Porcupine impairs convergent extension during gastrulation in zebrafish.” *J. Cell Sci.* 125, 2224-2234, 2012

6) 国際会議発表リスト

Taijiro Yabe, and Shinji Takada, “The role of *mesogenin1* in tail PSM differentiation” in the 10th international conference zebrafish development and genetics, Madison (U.S.A.) June 20-24, 2012.

Yoshiko Kametani, Shinji Takada, and Didier Steinier “Molecular and cellular analysis of blood vessel regeneration in zebrafish caudal fin” in the 10th international conference zebrafish development and genetics, Madison (U.S.A.) June 20-24, 2012.

Yusuke Mii, Kenichi Nakazato, Chan-Gi Pack, Yasushi Sako, Shinji Takada, Atsushi Mochizuki and Masanori Taira “Heparan sulfate nanostructures regulate the range and signal reception of the Wnt morphogen, via endocytosis and signalosome formation.” 14th International Xenopus Conference, Giens Peninsula (France), September 9-13, 2012

7) 招待講演

三井優輔「Heparan sulfate nanostructures (HSNSs)によるWnt モルフォゲンの制御」、京都大学医学研究科セミナー、京都、2012年9月21日

Shinji Takada “Post-translational modification of Wnt Proteins” in the 71st Okazaki Conference on “new perspectives on molecular science of glycoconjugates”, Okazaki, October 13, 2011

三井優輔、中里研一、白 燦基、佐甲靖志、望月敦史、高田慎治、平良眞規 “Heparan sulfate nanostructures (HSNSs)による Wnt モルフォゲンの分布およびシグナル受容の制御：第85回日本生化学会(福岡、2012年12月)

高田慎治、陳 秋紅、高田律子「Wnt タンパク質の脂肪酸修飾の機構と生理的意義」：第85回日本生化学会(福岡、2012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、第85回日本生化学会ワークショップオーガナイザー、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」運営委員、ナショナルバイオリソースプロジェクト「メダカ」運営委員

時系列生命現象研究領域

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の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。今年度は特に、転写因子 **dbx1** を発現する神経前駆体細胞から由来する抑制性神経細胞(以下、**V0-iIN**とよぶ)と、転写因子 **dmrt3** を発現する抑制性神経細胞(以下、**d6-iIN**とよぶ)に関する解析を行った。その結果、**V0-iIN**と **d6-iIN**はともに交叉型介在ニューロンで、遊泳運動の左右の屈曲に関して相互抑制に関与する神経細胞であることが明らかとなった。

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ンネルロドプシン(**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。**Chx10** 発現細胞に神経活動を活性化させるチャン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、後脳の中中部および後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。また、逆に、**Chx10** 発現細胞に神経活動を不活性化させるチャンネルロドプシンを発現する魚を作製し、自発的に起こった遊泳運動を光照射によりスト

ップさせることが可能であるかを検討した。その結果、後脳の中中部および後部に光照射を行うことで、自発的に起こった遊泳運動をストップさせることができた。この結果は、後脳の中中部および後部の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

C. Satou, Y. Kimura and S. Higashijima, “Generation of multiple classes of V0 neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity“ *J. Neuroscience* 32, 1771-1783 (2012).

M. Behra, VE. Gallardo, J. Bradsher, A. Torrado, A. Elkahloun, J. Idol, J. Sheehy, S. Zonies, L. Xu, KM. Shaw, C. Satou, S.Higashijima, B. Weinstein, and SM. Burgess, "Transcriptional signature of accessory cells in the lateral line, using the Tnk1bp1:EGFP transgenic zebrafish line" *BMC Dev. Biol.* 12, 6 (2012).

E. Eklöf-Ljunggren, S. Haupt, J. Ausborn, I. Dehnisch, PS. Uhlén, S. Higashijima, and A. El Manira, "Origin of excitation underlying locomotion in the spinal circuit of zebrafish" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*109, 5511-5516 (2012).

PR. Jusuf, S. Albadri, A. Paolini, P. Currie, F. Argenton, S. Higashijima, WA. Harris, and L. Poggi, "Biasing amacrine subtypes in the Atoh7 lineage through expression of Barhl2" *J. Neuroscience* 32, 13929-13944 (2012).

5) 著書、総説

東島眞一、木村有希子 "オプトジェネティックツールを用いた、ゼブラフィッシュ運動系神経回路の解析" 実験医学 羊土社、2588-2599 (2012).

6) 国際会議発表リスト

7) 招待講演

S. Higashijima, Y. Kimura and C. Satou, “Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish“ 第35回日本神経科学大会、名古屋、2011年9月.

8) 学会および社会的活動

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

10) 受賞、表彰

11) 外部獲得資金

科研費基盤研究(B)、「細胞系譜のライブ追跡手法による、脊髄神経細胞分化機構の解析」、東島眞一(代表) (2011年-2013年).

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) (2012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) (2012-2016年)

12) 特許

戦略的方法論研究領域
(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) 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中に含まれるHemAT-Bsは、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り、酸素センサーの本体として機能するヘムを活性中心として有している。HemAT-Bs中のヘムには、生理的なエフェクター分子である酸素以外に、COも結合するが、COが結合した場合には生理的な応答は起こらない。すなわち、HemAT-Bsは何らかの機構により、生理的なエフェクターである酸素を選択的に認識することにより、酸素センサーとして機能している。本年度の研究においては、時間分解共鳴ラマン分光法を用い、HemAT-Bsによる選択的酸素センシングおよび分子内シグナル伝達の分子機構解明を目的とした研究を行った。CO結合型HemAT-Bsの光解離に伴って生成する反応中間体では、10 ns~100 μ sの時間領域において $\nu(\text{Fe-His})$ (ヘム鉄と軸配位子であるヒスチジン間の伸縮振動モード) の位置は変化しなかった。これに対して、酸素結合型HemAT-Bsにおいては、酸素の光解離後に観測される $\nu(\text{Fe-His})$ は、デオキシ型の $\nu(\text{Fe-His})$ に比べて低波数側にシフトして観測された。これらの結果は、HemAT-Bsに酸素、あるいはCOが結合した場合に、それぞれのヘム近位側のコンフォメーションが異なっていることを示唆している。また、このようなヘム近位側のコンフォメーション変化が、酸素センシングにより誘起される分子内シグナル伝達に関与しているものと考えられる。また、CO結合型HemAT-BsのCO光解離後の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル測定を行い、CO結合に伴うタンパク質コンフォメーション変化を追跡した結果、気体分子の結合・解離によりB-ヘリックス、G-ヘリックスのコンフォメーション変化が誘起されることが分かった。
- 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。今年度も昨年度に引き続き、*L. lactis*の細胞内ヘム濃度制御に中心的な役割を果たしている転写調節因子HrtRの構造機能相関の解明に取り組んだ。アポ型HrtRは、非常に高いDNA結合能 ($K_d = 0.2$ nM) を有しており、遊離のヘム分子が存在しない条件下においてリプレッサーとして機能し、細胞外へのヘム排出に関与するトランスポーター遺伝子の発現を抑制している。細胞内の遊離ヘム濃度が上昇すると、アポ型HrtRにヘム分子が結合することにより、HrtRは標的DNAから解離し、ヘム排出に関与するトランスポーター遺伝子の発現が誘導される。本研究では、アポ型HrtRと標的DNAの複合体の結晶構造解析に成功し、その構造を2.0 Å分解能で決定した。HrtRは、DNA結合モチーフとしてヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを有している。本モチーフ中の認識ヘリックス中に存在するArg46とTyr50の2残基が、HrtRによる標的DNA配列の認識および特異的結合に中心的な役割を果たしていることが分かった。ヘム結合に伴い、HrtRは標的DNAから解離する。これは、ヘム結合に伴ってHrtRのN末ドメイン (DNA

結合ドメイン)の相対配置が変化し,二つのサブユニットにそれぞれ存在するDNA認識ヘリックス間の距離が増大し,その結果,DNA認識ヘリックスが標的DNAの主溝に結合できなくなるためであることが分かった。

4) 学術論文

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, H. ISHIKAWA, Y. MIZUTANI and S. AONO, “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa*” *Chem. Commun.* **48**, 6523-6525 (2012).

S. EL-MASHTOLY, M. KUBO, Y. GU, H. SAWAI, S. NAKASIMA, T. OGURA, S. AONO and T. KITAGAWA, “Site-Specific Protein Dynamics in communication pathway from sensor to signaling domain of oxygen sensor protein, HemAT-Bs: time-resolved ultraviolet resonance Raman study” *J. Biol. Chem.* **287**, 19973-19984 (2012).

H. SAWAI*, M. YAMANAKA*, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO and S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” *J. Biol. Chem.* **287**, 30755-30768 (2012). (* equal contribution)

Y. YOSHIDA, H. ISHIKAWA, S. AONO and Y. MIZUTANI, “Structural dynamics of proximal heme pocket in HemAT-Bs associated with O₂ dissociation” *Biochem. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics* **1824**, 866-872 (2012).

5) 総説, 著書

S. AONO, “Novel bacterial gas sensor proteins with transition-metal-containing prosthetic groups as active sites” *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 678-686 (2012).

青野重利, 「鉄分バランスを整える – 乳酸菌における細胞内へム濃度制御」, *化学* **67**, 68-69 (2012).

6) 国際会議発表リスト

S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Nara (Japan), January 2012.

S. AONO, “Transcriptional regulation by heme acting as a signaling molecule” 221st The Electrochemical Society Meeting, Seattle (U.S.A.), May 2012.

S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis*” 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-7), Jeju (Korea), July 2012.

S. AONO, H. SAWAI, M. YAMANAKA, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacteria” 8th International Biometals Symposium (Biometals 2012), Brussels (Belgium), July, 2012.

H. SAWAI, M. YAMANAKA, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Crystal structures of heme-sensing transcriptional regulator responsible for heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic 11), Granada (Spain), September, 2012.

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. KATO, Y. ASANO, Y. SHIRO, S. AONO, “X-ray crystal structure of Michaelis complex of aldoxime dehydratase, a new heme-containing hydrolyase” EMBO Conference: Catalytic Mechanisms by Biological Systems, Groningen (The Netherlands), October, 2012.

S. AONO, “Molecular mechanism of heme-responsive transcriptional regulation” 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-6), Hong Kong (China), November 2012.

H. SAWAI, M. YAMANAKA, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” The 1st International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), Tokyo (Japan), November, 2012.

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2” 5th Korea-Japan Seminar on

Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Seoul (Korea), February, 2013.

7) 招待講演

S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Nara (Japan), January 2012.

S. AONO, “Transcriptional regulation by heme acting as a signaling molecule” 221st The Electrochemical Society Meeting, Seattle (U.S.A.), May 2012.

S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis*” 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-7), Jeju (Korea), July 2012.

S. AONO, “Molecular mechanism of heme-responsive transcriptional regulation” 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-6), Hong Kong (China), November 2012.

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2” 5th Korea-Japan Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Seoul (Korea), February, 2013.

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 (2009-2010).

学会の組織委員等

14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry組織委員会総務委員長 (2009).

The first International Symposium on Biofunctional Chemistry組織委員 (2012).

Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences -Experiments and Simulations組織委員 (2008-2010, 2012).

文部科学省, 学術振興会, 大学共同利用機関等の委員等

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員 (2005-2007).

日本学術振興会国際事業委員会書面審査委員 (2005-2007).

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2010-2012).

学会誌編集委員

J. Biol. Inorg. Chem., Editorial Advisory Board (2002-2004).

Biosensors, Editorial Board (2010-).

11) 競争的資金

科研費挑戦的萌芽研究, 「環境汚染物質検出用の高感度蛍光プローブを装備したホーミングセルの創製」, 青野重利 (2011年-2012年).

科研費基盤研究(B), 「ガス分子による生体機能制御に関与するセンサータンパク質の構造と機能」, 青野重利 (2011年-2013年).

戦略的方法論研究領域

(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) 高原子価ヘム酵素反応中間体の機能発現の分子機構の研究
- b) 不斉サレン錯体による不斉エポキシ化活性種の研究
- c) 白血球の抗菌に関わる酵素反応中間体の研究

3) 研究活動の概略と主な成果

a) ヘムタンパク質の機能発現において軸配位子がどのような役割をもつかは、古くより興味をもたれ研究が行われているが、未だ明快な解答が得られていない問題の一つである。例えば、ペルオキシダーゼではヒスチジン由来のイミダゾレートが、カタラーゼではチロシン由来のフェノレート、さらにシトクロムP450ではシステイン由来のチオレートが配位している。これらヘム酵素は、鉄4価オキソポルフィリン π -カチオンラジカル(Compound I)とよばれる共通の反応活性種を用いて反応することから、軸配位子はCompound Iの電子構造や反応性を大きく変化させていると考えられていた。ところが、軸配位子がどういった機構でCompound Iの反応性を制御しているのかという問題は、未解明のままであった。我々は、Compound Iモデル錯体を用いてこの問題の解決をめざした。反応速度論的手法や種々の分光学的手法を組み合わせることにより、軸配位子はCompound I自体をより活性にすることにより反応性を高めているのではなく、反応後に生成する鉄3価状態(resting state)の安定性を高めることによりCompound Iの反応性を高めているというユニークな機構で制御していることを見いだした。

b) 遷移金属錯体を用いた不斉酸化反応は、天然物合成、医薬品合成などさまざまな合成反応において極めて重要な反応である。そのため、多くの不斉酸化反応を行う遷移金属錯体が開発されている。それらの中で不斉マンガンサレン錯体(Jacobsen触媒)は、極めて有用性の高い錯体である。しかし、Jacobsen触媒がどのような活性種を生成し、どのように不斉選択性を発現しているかは未解明の問題である。とりわけ、Jacobsen触媒がほとんど平面的な構造であるにもかかわらず高い不斉選択性を示すのは、多くの研究者が注目している点である。我々は、マンガン4価サレン錯体とヨードシリアルエンとの反応により、ヨードシリアルエン付加体の合成、単離に成功した。さらにこの錯体の構造解析にも成功した。結晶構造では、ヨードシリアルエンの配位によりサレン配位子が平面から階段状に大きく構造変化し不斉な環境を作り出していることが明らかとなった。さらにこの錯体と種々のオレフィンとの反応を行い、ヨードシリアルエン付加体が高原子価オキソ錯体を生成せず直接エポキシ化反応を行っていることを明らかにした。

c) 生体内の白血球は、外部から細菌などが体内に侵入すると細菌を取り囲み、白血

球中のミエロペルオキシダーゼという酵素が塩素イオンから次亜塩素酸を作り出し細菌を撃退している。ミエロペルオキシダーゼがどのようにして次亜塩素酸を作り出しているかは未解明である。これまでの研究で、酵素が過酸化水素と反応して、高原子価オキソヘム錯体を形成することが知られていて、これが塩素イオンを酸化して次亜塩素酸を合成していると考えられている。我々は、高原子価オキソヘム錯体のモデルとなるオキソ鉄4価ポルフィリン π カチオンラジカル錯体 (compound-I錯体) を合成し、塩素イオンとの反応を研究した。プロトンの効果を解明するため、トリフルオロ酢酸存在下、compound-I錯体と塩素イオンの反応を-90度で行い、種々の分光法を用いて解析した。その結果、compound-I錯体は塩素イオンと反応してメソクロロ鉄3価イソポルフィリン錯体に変化することを見いだした。さらにこの錯体は、種々の有機化合物を塩素化することができることが明らかにした。これまでイソポルフィリンは不活性な錯体と考えられていたが、ポルフィリン環の置換基により活性化できることが証明された。

4) 学術論文

Z. CONG, S. YANAGISAWA, T. KURAHASHI, T. OGURA, S. NAKASHIMA, and H. FUJII, “Synthesis, Characterization, and Reactivity of Hypochlorito-Iron(III) Porphyrin Complexes”, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 20617-20620 (2012).

Z. CONG, T. KURAHASHI, and H. FUJII, “Formation of Iron(III) Meso-Chloro-Isoporphyrin as a Reactive Chlorinating Agent from Oxoiron(IV) Porphyrin π -Cation Radical”, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 4469-4472 (2012).

T. KURAHASHI and H. FUJII, “Comparative Spectroscopic Studies of Iron(III) and Manganese(III) Salen Complexes Having a Weakly-Coordinating Triflate Axial Ligand”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 85, 940-947 (2012).

C. WANG, T. KURAHASHI, and H. FUJII, “Structure and Reactivity of Iodosylarene Adduct of Manganese(IV) Salen Complex”, *Angew. Chemie. Int. Ed.* 51, 7809-7811 (2012).

A. TAKAHASHI, D. YAMAKI, K. IKEMURA, T. KURAHASHI, T. OGURA, M. HADA, and H. FUJII, “The Effect of the Axial Ligand on the Reactivity of the Oxoiron(IV) Porphyrin π -Cation Radical Complex: Higher Stabilization of the Product State Relative to the Reactant State”, *Inorg. Chem.* 51, 7296-7305 (2012).

T. SATO, S. NOZAWA, A. TOMITA, M. HOSHINO, S. KOSHIHARA, H. FUJII, AND S. ADACHI, “Coordination and Electronic Structure of Ruthenium(II)-*tris*-2,2'-Bipyridine in the Triplet Metal-to-Ligand Charge Transfer Excited State Observed by Picosecond Time-Resolved

Ru K-Edge XAFS”, *J. Phys. Chem. C*, 116, 14232-14236 (2012).

J. ZHU, T. KURAHASHI, H. FUJII, and G. WU, “Solid-state ^{17}O NMR and Computational Studies of terminal Transition metal Oxo Compounds”, *Chem. Sci.* 3, 391-397 (2012).

5) 著書、総説

なし

6) 国際会議発表リスト

H. Fujii, “Reactions of Oxoiron(IV) Porphyrin π -Cation Radicals with Chloride Ion” 40th International Conference on Coordination Chemistry, Valencia (Spain), September 9-13 (2012).

H. Fujii, “ ^{13}C and ^{15}N NMR Spectroscopy of Heme-bound Cyanide ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$) in Ferric Heme Peroxidases” 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Jeju (Korea), July 1-6 (2012).

H. Fujii, “Control of Regioselectivity Of Heme Oxygenase By Reconstruction Of Active Site” Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences-Experiments and Simulations, Nara (Japan), January 9-11, (2012).

7) 招待講演

H. Fujii, “Reactions of Oxoiron(IV) Porphyrin π -Cation Radicals with Chloride Ion” 40th International Conference on Coordination Chemistry, Valencia (Spain), September 9-13 (2012).

H. Fujii, “ ^{13}C and ^{15}N NMR Spectroscopy of Heme-bound Cyanide ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$) in Ferric Heme Peroxidases” 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Jeju (Korea), July 1-6 (2012).

H. Fujii, “Control of Regioselectivity Of Heme Oxygenase By Reconstruction Of Active Site” Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences-Experiments and Simulations, Nara (Japan), January 9-11, (2012).

藤井 浩, 「生体内における常磁性金属イオンと有機ラジカルとの磁氣的相互作用について」, 分子研研究会「レーザー分光および磁気測定による分子構造探求の新展開」(岡崎、愛知県) 2012年7月30-31日

倉橋拓也, 「不斉マンガンサレン触媒から生成する高原子価錯体の分光・磁気測定研究」,

分子研研究会「レーザー分光および磁気測定による分子構造探求の新展開」（岡崎、愛知県） 2012年7月30-31日

藤井 浩, 「鉄イオン含有酵素の反応中間体の電子構造と反応性について」, 北陸先端大（能美市、石川県） 2012年3月10日

藤井 浩, 「金属酵素による酸素活性化機構と酵素機能の関わり」, 筑波大学（つくば市、茨城県） 2012年1月25日

8) 学会および社会的活動

酸化反応討論会幹事（2011-）

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

筑波大学大学院理学専攻化学研究科, 集中講義「無機分析化学特論」 2012年1月24日～25日

10) 受賞、表彰

なし

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）

基盤研究C 「高原子価マンガノキソ錯体の精密反応制御」, 倉橋拓也 （2011年～2015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）

12) 特許

なし

戦略的方法論研究領域
(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) モルテン・グロビュール状態蛋白質化学療法剤複合体の抗腫瘍活性
- b) DMSO停止水素/重水素交換二次元NMR法の改良
- c) GroEL/GroES複合体の構造揺らぎと生物機能
- d) GroEL/GroES複合体形成の熱力学的解析
- e) 質量分析を用いた野生型GroELの水素/重水素交換反応解析

3) 研究活動の概略と主な成果

- a) これまでの我々の研究から, モルテン・グロビュール状態の蛋白質とオレイン酸との複合体の抗腫瘍活性は, オレイン酸によりもたらされており, 蛋白質部分はオレイン酸を選択的に腫瘍細胞に導く担体 (carrier) として働いていると考えられる。そこで, 今年度はモルテン・グロビュール状態の α ラクトアルブミンの運び屋としての特性を利用した新しい抗腫瘍複合体の作製を試みた。不飽和脂肪酸の代わりに抗癌剤とモルテン・グロビュール状態にある α ラクトアルブミンとの複合体を作製し, その抗腫瘍細胞活性を検討した。その結果, 特にアドリアマイシンやパクリタキセルと α ラクトアルブミンとの複合体は, 抗癌剤単独で処理した場合に比べ顕著に高い抗腫瘍細胞活性を示したのに対して, 正常細胞に対する毒性は低下した。
- b) ジメチルスルフォキシド (DMSO) 停止水素/重水素 (H/D) 交換二次元NMR法は, 蛋白質のペプチド・アミド水素のH/D交換反応を実施後, 重水素化DMSO (DMSO-d₆) 溶液中でH/D交換反応を停止させ, DMSO溶液中で変性しH/D交換も停止した蛋白質の二次元NMRスペクトルを取ることで, 各アミド水素の交換反応を追跡する方法である。そのままでは良好なNMRスペクトルの得られない, 蛋白質超分子複合体やアミロイド線維, H/D交換反応が速すぎてアミド水素のNMR信号が十分得られない, 変性蛋白質などのH/D交換反応測定に用いられてきた。しかし, これまでのDMSO停止H/D交換法では凍結乾燥を溶媒交換に用いるため, 変性剤中の蛋白質や高濃度の塩存在下のH/D交換反応には適用できない難点があった。そこで, 凍結乾燥の代わりにスピン脱塩カラムを用いることによりこの難点を克服した。6.0 M 塩酸グアニジン中で変性した¹⁵N標識ユビキチンのH/D交換反応を測定し, スピン脱塩カラムを用いた方法が有効であることを確認した。
- c) 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H/D交換二次元NMRを用いた研究を行っている。昨年に引き続き, GroES単独でのH/D交換反応をDMSO停止H/D交換二次元NMR法と920 MHz NMR装置を用いて追跡した (20 mM KCl, 25 mM リン酸緩衝液, pH 6.5, 25°C)。その結果, GroESの94個のペプチド・アミド水素中33個の交換反応を定量的に求め, それらの水素交換保護因子を決定した。残りの61残基については, 水素交換反応速度定数の下限が求められた。最も強く保護されているアミド水素の保護因子は 10^6 - 10^7 のオーダーであり, 通常の球状蛋白質の保護因子と同程度であったが, 保護因子 10^6 以上の非常に強く保護されたアミド水素の数はわずか10個で, 通常の小さな球状蛋白質について知られている数よりも著しく少なかった。このことは, 7量体GroES中のかかなりの部分がフレキシブルで天然変性状態にあることを示している。保護因子 10^5 以上の強く保護されたアミノ酸残基は疎水性コアを形成する3本

のβストランドに集中しており、残基17-34の可動性ループ領域はあまり保護されていなかった。先行研究において、GroESの熱や変性剤によるアンフォールディング転移の熱力学的解析が報告されており、それらの熱力学パラメータから期待される保護因子は 10^2 - 10^4 のオーダーでH/D交換で求められた最も強く保護されている残基の保護因子よりも数桁小さいことがわかった。このことは、GroESのアンフォールディング転移が、先行研究で仮定されているような単純な二状態や三状態の転移ではないことを示している。

- d) ADPやATPの存在下では、GroELはGroESと1:1の複合体を形成して分子シャペロンとしての完全な機能を発現する。しかし、GroELとGroESの結合の熱力学パラメータについては、未だ十分に知られてはいない。昨年度に引き続き、分子研に設置されている超高感度滴定型熱量計を用いて、GroELの単一リング変異体(SR1)とGroESの結合の熱力学的解析を行った。GroESをSR1で滴定し、3 mM ADP存在下25.0°Cで、結合定数 $K_b = 6.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、エンタルピー変化 $\Delta H_b = 37 \text{ kcal/mol}$ 、エントロピー変化 $\Delta S_b = 156 \text{ cal/mol/K}$ を得た(pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2)。 ΔH_b 、 ΔS_b ともに正で、結合がエントロピー駆動であることがわかった。 ^{15}N 標識したGroESと二次元NMR (HSQC) スペクトルを用いた滴定実験でも、3 mM ADP存在下で 10^5 M^{-1} のオーダーの結合定数が得られたが、3.0 mM ATP存在下では測定限界を超えて結合定数が大きくなった($K_b \gg 10^6 \text{ M}^{-1}$)。
- e) H/D交換質量分析法を用いて野生型GroEL (分子量約80万) の溶液中のコンフォメーション解析を、フロリダ州立大学のMarshall教授のグループとの共同研究として行った。アポ型GroELとATPアナログ(ATP γ S)結合GroELのH/D交換反応を数残基レベルの分解能で観測し、ヌクレオチド結合に伴ったコンフォメーション変化を分子全体にわたって特徴付けることが出来た。

4) 学術論文

J. Chen, H. Yagi, P. Sormanni, M. Vendruscolo, K. Makabe, T. Nakamura, Y. Goto and K. Kuwajima, "Fibrillogenic propensity of the GroEL apical domain: A Janus-faced minichaperone," *FEBS Lett.* **586**, 1120-1127 (2012).

K. Tomoyori, T. Nakamura, K. Makabe, K. Maki, K. Saeki and K. Kuwajima, "Sequential four-state folding/unfolding of goat alpha-lactalbumin and its N-terminal variants," *Proteins* **80**, 2191-2206 (2012).

A. Mukaiyama, T. Nakamura, K. Makabe, K. Maki, Y. Goto and K. Kuwajima, "Native-state heterogeneity of β_2 -microglobulin as revealed by kinetic folding and real-time NMR experiments," *J. Mol. Biol.* **425**, 257-272 (2013).

A. Mukaiyama, T. Nakamura, K. Makabe, K. Maki, Y. Goto and K. Kuwajima, "The molten globule of β_2 -microglobulin accumulated at pH 4 and its role in protein folding," *J. Mol. Biol.* **425**, 273-291 (2013).

K. Makabe, T. Nakamura and K. Kuwajima, "Structural insights into the stability perturbations induced by N-terminal variation in human and goat alpha-lactalbumin," *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 165-170 (2013).

Q. Zhang, J. Chen, K. Kuwajima, H. Zhang, F. Xian, N.L. Young and A.G. Marshall, "Nucleotide-induced conformational changes of tetradecameric GroEL mapped by hydrogen/deuterium exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry," *Sci. Reports* **3**, 1247 doi: 10.1038/srep01247 (2013).

6) 国際会議発表リスト

K. Kuwajima, "Some remaining questions about the mechanism of protein folding," 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Cultural Center of Todaiji-Temple, Nara, January 9–11, 2012.

T. Nakamura, K. Makabe, T. Aizawa, K. Kawano, M. Demura, and K. Kuwajima,

"Structure and biological function of anti-tumor complexes between oleic acid and proteins in the molten globule state," 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Cultural Center of Todaiji-Temple, Nara, January 9–11, 2012.

K. Makabe, T. Nakamura, and K. Kuwajima, "Structural insights into the stability perturbations by N-terminal variations in human and goat α -lactalbumin," 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Cultural Center of Todaiji-Temple, Nara, January 9–11, 2012.

M. Chandak, T. Nakamura, K. Makabe, T. Takenaka, A. Mukaiyama, T. K. Caudhuri, J. Chen, K. Kato, K. Kuwajima, "Structural fluctuation of free GroES and the GroES-SR1 complex studied by the use of hydrogen/deuterium (H/D) exchange," 57th Annual Meeting of the Biophysical Society, Philadelphia, Pennsylvania, USA, February 2-6, 2013.

7) 招待講演

K. Kuwajima, "Some remaining questions about the mechanism of protein folding," The International Conference on Statistical Mechanics of Liquids: From Water to Biomolecules, Okazaki Conference Center, Institute for Molecular Science, Okazaki, February 13–14, 2012.

K. Kuwajima, "Molecular mechanisms of cytotoxicity of HAMLET and other protein-oleic acid complexes," IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2012, Nagoya University, Nagoya, September 4–5, 2012.

K. Kuwajima, "Molecular mechanisms of cytotoxicity of HAMLET and other protein-oleic acid complexes," The 12th KIAS Conference on Protein Structure, Korea Institute for Advanced Study, Seoul, Korea, October 11–13, 2012.

桑島邦博, 「シャペロン超分子複合体の水素交換反応」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子シャペロンの機能発現の新展開と細胞制御」, 大阪大学・蛋白質研究所セミナー, 大阪, 2012年11月15–16日.

K. Kuwajima, "Structural fluctuations and functional expression of the chaperonin complexes," The 6th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions," Kyoto TERRSA, Kyoto, December 5–6, 2012.

K. Kuwajima, "The structure and function of HAMLET and its related protein complexes," The 3rd HAMLET Conference, Lund University, Lund, Sweden, December 7–8, 2012.

8) 学会および社会的活動

学協会役員, 委員

日本蛋白質科学会理事 (2012)

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 (2011, 2012)

学会誌編集委員

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

J. Mol. Biol., Associate Editor, (2004–2011).

BIOPHYSICS, Associate Editor, (2005–).

Spectroscopy -- Biomedical Applications, Editorial Board, (2002–2011).

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

The 11th KIAS (Korea Institute for Advanced Study) Winter School of Protein Folding, High1 Resort, Korea, January 21-25, 2013.

11) 外部獲得資金

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-).

12) 特許

特願2012-147492, 「蛋白質—化学療法剤複合体及びその製造方法, 並びに医薬」, 桑島邦博, 中村敬, 真壁幸樹 (大学共同利用機関法人自然科学研究機構), 岡田誠治 (熊本大学), 2012年.

生命環境研究領域

(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) TRP チャンネルに関する研究

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, TRPM2, 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。TRPV5, TRPV6, TRPM6, TRPM7, TRPP3 も研究対象としている。① **TRPA1 活性化および制御機構の解析**：第一級アルコールが炭素鎖長依存的に TRPA1 を活性化して痛みを惹起することを明らかにし、亜鉛が活性化に関わることを見いだした (Pfluger Archiv, 2012)。ワサビに含まれる2つの isothiocyanate 成分 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MSITC) と 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate (6-MTITC) が TRPA1 を活性化することを明らかにした (Chemical Senses, 2012)。自然に存在する鎮痛薬を探索する目的で、TRPM8 を活性化して TRPA1 を阻害する物質をスクリーニングして、1,8-cineole がそうした性質をもつ理想的な物質であることが明らかになった (Molec. Pain, 2012) (マンダムとの共同研究)。② **TRPV4 による表皮ケラチノサイトのバリア機能制御機構の解析**：マウス表皮ケラチノサイトで温かい温度で活性化する TRPV4 がβカテニン、Eカドヘリンと複合体を形成してアドヘレンスジャンクションを強めて表皮バリア機能維持していることを報告した。ヒト皮膚標本を用いて TRPV4 が同様に表皮バリア機能に関わっていることを明らかにし、温度と TRPV4 化学物質によってダメージからの回復も大きく促進されることが明らかになった (Pfluger Archiv, 2012) (ポーラとの共同研究)。③ **TRPM2 の過酸化水素による感作機構の解析**：過酸化水素処理によって HEK293 細胞に発現させた TRPM2 の熱応答が増強されることが分かった。この増強は過酸化水素による TRPM2 の熱活性化温度閾値の低下 (感作) によることが明らかになり、過酸化水素によって酸化される TRPM2 のメチオニン残基を点変異体によって同定した。マウス腹腔マクロファージでも同様の過酸化水素による TRPM2 機能増強が観察され、TRPM2 欠損マクロファージでは消失していた。TRPM2 欠損マウスのマクロファージでは、サイトカインの産生や微少な温度上昇による貪食能の増強が観察されなかったことから、TRPM2 は細菌感染時にマクロファージで産生される過酸化水素で酸化されて機能増強し、マクロファージ機能を増強させて

感染に対処するものと考えられた(P.N.A.S., 2012)。④ カエルおよびトカゲ TRPA1 チャネルの遺伝子クローニングと機能解析：TRPA1 は冷刺激感受性をもつか温度感受性を持っていないと考えられている。TRPA1 は進化上で TRPV1 よりはるか古くからあり、昆虫では複数の TRPA1 が熱センサーとして機能することがわかっている。最近、毒ヘビ TRPA1 がピット器官での温度受容に関わっていることが報告されたので、ニシツメガエルとグリーンアノールトカゲの TRPA1 を遺伝子クローニングしたところ、どちらも 30-40 度の熱刺激で活性化する熱センサーとして機能することが分かった。化学物質感受性は保存されていた。ニシツメガエルでは感覚神経細胞に TRPV1, TRPA1 という 2つの温度センサーをもっていたものと考えられる(J. Biol. Chem., 2012)(鳥取大学太田利男博士との共同研究)。

4) 学術論文

M. Ohkita, S. Saito, T. Imagawa, K. Takahashi, M. Tominaga M and T. Ohta, "Molecular cloning and functional characterization of *Xenopus tropicalis* frog transient receptor potential vanilloid 1 reveals its functional evolution for heat, acid and capsaicin sensitivities in terrestrial vertebrates" *J. Biol. Chem.*, **287**, 2388-2397 (2012).

K. Shintaku, K. Uchida, Y. Suzuki, Y. Zhou, T. Fushiki, T. Watanabe, S. Yazawa and M. Tominaga, "Activation of TRPA1 by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate" *Br. J. Pharmacol.* **165**, 1476-1486 (2012).

T. Komatsu, K. Uchida, F. Fujita, Y. Zhou and M. Tominaga, "Primary alcohols activate human TRPA1 channel in a carbon chain length-dependent manner" *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* **463**, 549-559 (2012).

H. Usuda, T. Endo, A. Shimouchi, A. Saito, M. Tominaga, H. Yamashita, H. Nagai, N. Inagaki and H. Tanaka, "Transient receptor potential vanilloid 1 - a polymodal nociceptive receptor - plays a crucial role in formaldehyde-induced skin inflammation in mice" *J. Pharmacol. Sci.* **118**, 266-274 (2012).

N. Kida, T. Sokabe, M. Kashio, K. Haruna, Y. Mizuno, Y. Suga, K. Nishikawa, A. Kanamaru, M. Hongo, A. Oba and M. Tominaga, "Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes" *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* **463**, 715-725 (2012).

M. Kashio, T. Sokabe, K. Shintaku, T. Uematsu, N. Fukuta, N. Kobayashi, Y. Mori and M. Tominaga M, "Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6745-6750 (2012).

Y. Kitagawa, A. Miyai, K. Usui, Y. Hamada, K. Deai, M. Wada, Y. Koga, M. Sakata, M. Hayashi, M. Tominaga and M. Matsushita, "Pharmacological characterization of (3S)-3-(hydroxymethyl)-4-(5-methylpyridin-2-yl)-N-[6-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-3-yl]-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine-8-carboxamide (JTS-653), a novel Transient Receptor

Potential Vanilloid 1 antagonist" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **342**, 520-528 (2012).

H. Ogawa, K. Takahashi, S. Miura, T. Imagawa, S. Saito, M. Tominaga and T. Ohta, "H(2)S functions as a nociceptive messenger through Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (Trpa1) activation" *Neuroscience* **218**, 335-343 (2012).

S. Saito, K. Nakatsuka, K. Takahashi, N. Fukuta, T. Imagawa, T. Ohta and M. Tominaga, "Analysis of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP Vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates" *J. Biol. Chem.* **287**, 30743-30754 (2012).

K. Uchida, Y. Miura, M. Nagai and M. Tominaga, "Isothiocyanates from *Wasabia japonica* activate transient receptor potential ankyrin 1 channel" *Chemical Senses* **37**, 809-818 (2012).

M. Takaishi, F. Fujita, K. Uchida, S. Yamamoto, M. Sawada, C. Hatai, M. Shimizu and M. Tominaga, "1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1" *Molec. Pain* **8**, 86 (2012).

K. Nagai, Y. Saitoh, S. Saito and K. Tsutsumi, "Structure and Hibernation-associated Expression of the Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel (TRPV4) mRNA in the Japanese Grass Lizard (*Takydromus tachydromoides*)" *Zoological Science* **29**, 185-190 (2012).

5) 著書、総説

T. Tsunematsu and A. Yamanaka, "The role of orexin/hypocretin in the central nervous system and peripheral tissues" *Vitam. Horm.* **89**, 19-33 (2012).

富永真琴, "酸味および辛み受容のメカニズム" *香料* **254**, 196-202 (2012).

富永真琴, "侵害受容性疼痛" *整形外科* **63**, 712-716 (2012).

木田尚子, 曾我部隆彰, 金丸晶子, 富永真琴 "皮膚の温度センサーTRPV4を活性化する化粧品素材の開発" *アレルギーの臨床* **32**, 659-665 (2012).

富永真琴, "刺激感受性: 温度感受性 TRP チャンネルの生理機能" *日本化粧品学会誌* **36**, 1-7 (2012).

6) 国際会議発表リスト

M. Tominaga, "Regulation of TRPA1 activity in pathological conditions" The 7th International Conference of Neurons and Brain Diseases, Montreal (Canada), June 2012.

□. **Saito**, "Functional evolution of nociceptive receptors TRPA1 and TRPV1 in vertebrates" 2012 Annual Meeting of Society for Molecular Biology and Evolution, Dublin (Ireland), □□□□□ 2012.

M. Kashio, "Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions" 4th International Congress on Cell membranes and Oxidative Stress, Isparta (Turkey) □□□□□ 2012.

T. Tsunematsu, "Long time silencing of orexin/ hypocretin neuronal activity using optogenetics in archaerhodopsin-3-expressing transgenic mice" 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona (Spain) □□□□□□ 2012.

M. Tominaga, "Physiological significance of TRPM2 channel and evolutionary changes in the structure and function of thermosensitive TRP channels" 2012 International Ion Channel Conference, Jeju (Korea), August 2012.

Y. Suzuki, "Epithelial TRP channels for maternal-fetal calcium transport" 2012 International Ion Channel Conference, Jeju (Korea), August 2012.

K. Uchida, "The role of TRPM2 channel in pancreatic b-cell functions" 2012 International Ion Channel Conference, Jeju (Korea), August 2012.

M. Kashio, "Redox signal mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions" 2012 International Ion Channel Conference, Jeju (Korea), August 2012.

Y. Zhou, "A novel alternative splicing variant of mouse TRPA1 regulates its channel activity under physiological and pathological conditions" 14th World Congress of Pain, Milan (Italy), August 2012.

S. Tabuchi, "New model mice for narcolepsy using timing controlled gene expression system in transgenic mice which induces specific ablation of orexin/hypocretin neurons" Neuroscience 2012, □□□□□□□□□□□□□□(USA), October 2012.

F. Fujita, "Modal shift of cool sensor TRPM8 by changing ambient temperature and its application to cosmetics" 27th Congress of International Federation of Societies of Cosmetic Chemists, Johannesburg (South Africa), October 2012.

M. Tominaga, "Molecular mechanisms of nociception through TRPA1 activation" International Conference of Physiological Sciences, Suzhou (China), November 2012.

T. Tsunematsu, "Optogenetic manipulation of orexin neuronal activity affects sleep/wakefulness state in mice" The 7th Asian Sleep Research Society Congress, Taipei (Taiwan), December 2012.

7) 招待講演

富永真琴「治療標的としての皮膚の TRPV3,TRPV4」、第 85 回日本薬理学会年会、京都、2012 年 3 月。

山中章弘「オプトジェネティクスを用いたオレキシン神経活動抑制は徐波睡眠を誘導する」、第 117 回日本解剖学会全国学術集会、甲府、2012 年 3 月。

富永真琴「刺激感受性：温度感受性 TRP チャネルの生理機能」、第 37 回日本化粧品学会、東京、2012 年 6 月。

M. Tominaga, "Physiological significance of TRPM2 channel and evolutionary changes in the structure and function of thermosensitive TRP channels" 2012 International Ion Channel Conference, Jeju (Korea), August 2012.

富永真琴「TRP チャネルを介した侵害受容の分子機構」第 32 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、東京、2012 年 9 月。

富永真琴「動物におけるカルシウム透過性 TRP チャネルを介した環境温度受容」日本植物学会第 76 回大会、姫路、2012 年 9 月。

富永真琴「TRPV1, TRPA1 チャネルを介した侵害受容とその制御機構」第 42 回日本臨床神経生理学学会学術大会、東京、2012 年 11 月。

M. Tominaga, "Molecular mechanisms of nociception through TRPA1 activation" International Conference of Physiological Sciences, Suzhou (China), November 2012.

富永真琴「感覚神経に発現する温度感受性 TRP チャネルの生理機能」第 1 回ニューロカンファレンス和歌山、和歌山、2012 年 12 月。

T. Tsunematsu, "Optogenetic manipulation of orexin neuronal activity affects

sleep/wakefulness state in mice" The 7th Asian Sleep Research Society Congress, Taipei (Taiwan), December 2012.

8) 学会および社会的活動

日本生理学会理事 (富永真琴)

日本生理学会会員委員会委員 (富永真琴)

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

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)

九州大学歯学研究院 非常勤講師 (富永真琴)

富山大学医学薬学教育部 非常勤講師 (富永真琴)

10) 受賞、表彰

第16回食創会「安藤百福賞」

11) 外部獲得資金

科学研究費 基盤研究 (A)、「温度感受性 TRPM2 チャンネルの活性制御機構と免疫応答への関与の解析」、富永真琴 (代表) (2011年-2014年) .

科学研究費 挑戦的萌芽研究、「侵害刺激感受性感覚神経の新分類と TRPV1, TRPA1 の機能連関」、富永真琴 (代表) (2011-2012年)

科学研究費 新学術領域研究 (公募)「脳内温度・浸透圧の感知メカニズムとその破綻」、富永真琴 (代表) (2012年-2013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) (2012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 (代表) (2012年) .

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団助成金「温度感受性 TRPM2 チャンネルを介した免疫機構の研究」富永真琴 (代表) (2012年)

科学研究費 若手研究 (B)、「胎仔骨石灰化のための母子間ミネラル輸送メカニズムの解明」鈴木喜郎 (代表) (2011-2012年)

科学研究費 若手研究 (B)、「TRPM2 を介したインスリン分泌機構と糖尿病発症への関与」内田邦敏 (代表) (2011-2012年)

12) 特許

生命環境研究領域

生命環境研究部門

井口泰泉(教授)

1) 専門領域: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) ミジンコの生殖様式の解明
- d) 爬虫類の温度依存性性分化機構の解明
- e) エストロゲン応答に対する魚の種差の解析および精巣卵誘導機構の解明
- f) エストロゲン受容体の分子進化の解析
- g) アンドロゲン受容体遺伝子による雄性形質発現の分子機構の解明

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。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。また、**Wnt** シグナルや、**Pten/PI3K/Akt** 経路の生殖器官での機能について、主に遺伝子改変マウスなどを使って解析している。さらに、不可逆的細胞増殖の分子的背景を明らかにするために、遺伝子のメチル化を標的に研究を進めている。
- 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が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ている。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、精巢の分化は起こらず卵巣が発達した。さらに、**Dsx** 遺伝子を雌に発生する卵にマイクロインジェクションしたところ、第一触角が伸長し、オスタイプの表現形が形成されたことから、オオミジンコの雄の分化には **Dsx** 遺伝子の発現が必須であることを証明した。また、オオミジンコおよびミジンコの幼若ホルモン受容体をクローニングし、**Met**と**SRC**のヘテロダイマーであることを見出した。さらに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。また、ミジンコの脱皮ホルモン合成系・分解系および幼若ホルモン合成系に参与する酵素の遺伝子のクローニングを行っている。また、人工気象器を用いて、日長、温度、餌などの条件を変え、雄を産仔する環境条件を検討している。

- c) ミジンコの生殖様式の解明:ミジンコは環境の変化に応じて単為生殖と有性生殖を使い分けている。単為生殖では、第1減数分裂後期に分裂が停止した後スキップし、第2減数分裂に相当する分裂のみが起こることを明らかにした。この減数しない減数分裂の特徴を探るため、紡錘系を構成する α チューブリン、中心体を構成する γ チューブリンの免疫染色を行った。その結果、中心体のない樽型の紡錘体が観察された。さらに、 γ チューブリンは中心体があるはずの両極ではなく紡錘系上の両極側に寄って広く分布していた。単為発生卵では、卵割(体細胞分裂)が開始すると典型的な紡錘型の紡錘体が見られるようになるため、それまでの間に中心体が形成(再生)されることになる。一方、有性生殖では、第1減数分裂中期または後期で受精を待ち、受精後に第1分裂が完了し減数すると考えられているが、実際の受精のタイミングや減数分裂の詳細は明らかではない。組織形態学的解析から、第1減数分裂は卵巣卵で起こり、産卵後の卵において第2減数分裂が起こっていることがわかった。受精については、産卵直後の卵内にて侵入した精子が確認できたことから、第1減数分裂のいずれかの段階で起こることは確認された。
- d) 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を解明するための一歩として、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。また、温度を感知すると思われる複数の **TRP**の遺伝子をアメリカワニからクローニングし、アフリカツメガエル卵に導入し、パッチクランプ法により感受する温度を調べている。
- e) エストロゲン応答に対する魚の種差の解析および精巢卵誘導機構の解明: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。エストロゲン類似活性を持つ化学物質の作用を調べるためにはどの魚種を試験魚とすれば良いかを明らかにするために、ニジマスの幼若個体、コイ、ローチ、トゲウオ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノーおよびメダカの雄の成魚を用いて、2 ng/L および 10 ng/L の合成エストロゲン（エチニルエストラジオール）に 1 週間曝露し、ビテロゲニン遺伝子の発現量を解析し、ニジマスが最も反応が良く、コイが最も反応が悪いことを明らかにした。さらに、これらの魚種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て、天然のエストロゲン、各種合成エストロゲンおよびエストロゲン作用を有する化学物質のエストロゲン作用の強さを比較している。また、メダカを用いて、3 種類あるエストロゲン受容体サブタイプのそれぞれの機能を解析する研究を開始している。メダカの雄の成魚を用いて、エストロゲンの影響で誘発される精巣卵のマーカー遺伝子として、卵膜タンパクをコードする Zp5 遺伝子が有用であることを明らかにした。さらに、ニシツメガエルでも、エストロゲン曝露により誘導される精巣卵のマーカー遺伝子を探索し、卵膜タンパクをコードする遺伝子が精巣卵のマーカー遺伝子となることを明らかにした。

- f) 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ている。ヤツメウナギには今まで、肝臓で知られていたエストロゲン受容体に加えて、卵巣にはさらにもう一種類のエストロゲン受容体が存在するが、この受容体遺伝子はリガンド非依存的に DNA に結合するが、エストロゲンは結合しないことを明らかにした。エストロゲンに応答する受容体はナメクジウオでは祖先型のステロイド受容体であり、ヤツメウナギではエストロゲンに依存して転写活性化が起こる真のエストロゲン受容体が進化してきたと考えられる。
- g) アンドロゲン受容体遺伝子による雄性形質発現の分子機構の解明：アンドロゲンは、内外生殖器、性淘汰に関わる多様な形質発現を誘導し、脊椎動物の雄としての形質を特徴付けている。しかし、アンドロゲン受容体による形質発現の分子機構の詳細は明らかではない。これまでに、軟骨魚類に

最も祖先型の機能的なアンドロゲン受容体遺伝子が存在し、真骨魚類の系統で特異的に起きたゲノム倍数化に伴い、真骨魚類では2分子種に重複したことが明らかとなった。これらの2分子種アンドロゲン受容体には転写活性化能、細胞内局在に相違が見られ、機能的に特化したアンドロゲン受容体が真骨魚類の系統で現れたと考えられた。アンドロゲン受容体遺伝子の重複と雄性形質多様化との関連性を進化学的に考察するために、真骨魚類アンドロゲン受容体の構造と機能の関係を解析するとともに、メダカアンドロゲン受容体遺伝子変異体をスクリーニングし、表現型解析を進めている。また性分化前のメダカ初期胚期におけるアンドロゲン受容体遺伝子の機能解析を行い、初期胚血球血管系の発生分化にアンドロゲンシグナリングが関わっていることを見出している。

4) 学術論文

- J.A. St John, E.L. Braun, S.R. Isberg, L.G. Miles, A.Y. Chong, J. Gongora, P. Dalzell, C. Moran, B. Bed'hom, A. Abzhanov, S.C. Burgess, A.M. Cooksey, T.A. Castoe, N.G. Crawford, L.D. Densmore, J.C. Drew, S.V. Edwards, B.C. Faircloth, M.K. Fujita, M.J. Greenwold, F.G. Hoffmann, J.M. Howard, T. Iguchi, D.E. Janes, S.Y. Khan, S. Kohno, A.J. de Koning, S.L. Lance, F.M. McCarthy, J.E. McCormack, M.E. Merchant, D.G. Peterson, D.D. Pollock, N. Pourmand, B.J. Raney, K.A. Roessler, J.R. Sanford, R.H. Sawyer, C.J. Schmidt, E.W. Triplett, T.D. Tuberville, M. Venegas-Anaya, J.T. Howard, E.D. Jarvis, L.J.Jr. Guillette, T.C. Glenn, R.E. Green and D.A. Ray**, “Sequencing three crocodylian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes”. *Genome Biol.*, **13**, 415. 2012. doi: 10.1186/gb-2012-13-1-415.
- A. Lange, Y. Katsu, S. Miyagawa, Y. Ogino, H. Urushitani, T. Kobayashi, T. Hirai, J.A. Shears, M. Nagae, J. Yamamoto, Y. Ohnishi, T. Oka, N. Tatarazako, Y. Ohta, C.R. Tyler and T. Iguchi**, “Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring” *Aquat. Toxicol.*, **109**, 250-258, 2012.
- H. Kakuta, M. Tanaka, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato**, “Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice” *Reprod. Toxicol.*, **33**, 35-44, 2012.
- I. Hirakawa, S. Miyagawa, Y. Katsu, Y. Kagami, N. Tatarazako, T. Kobayashi, T. Kusano, T. Mizutani, Y. Ogino, T. Takeuchi, Y. Ohta and T. Iguchi**, “Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol” *Chemosphere*, **87**, 668-674, 2012.
- T. Nakamura, S. Miyagawa, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Mizutani, T. Sato, K.-I. Morohashi, T. Takeuchi, T. Iguchi and Y. Ohta**, “WNT family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice” *Toxicology*, **296**, 13-19, 2012.
- T. Nakajima, T. Iguchi and T. Sato**, “Hedgehog signaling plays roles in epithelial cell

proliferation in the neonatal mouse uterus and vagina” *Cell Tiss. Res.*, **348**, 239-247, 2012.

T. Maekawa, A. Sakuma, S. Taniuchi, Y. Ogo, T. Iguchi, S. Takeuchi and S. Takahashi, “Transforming growth factor- α mRNA expression and its possible roles in mouse endometrial stromal cells” *Zool. Sci.*, **29**, 377-383, 2012.

J.A. Taylor, C.A. Richter, A. Suzuki, H. Watanabe, T. Iguchi, K.R. Coser, T. Shioda and F.S. vom Saal, “Dose-related estrogen effects on gene expression in fetal mouse prostate mesenchymal cells” *PLoS One*, **7**(10): e48311, 2012.

T. Nakamura, S. Miyagawa, Y. Katsu, T. Sato, T. Iguchi and Y. Ohta, “Sequential changes in expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure” *In Vivo*, **26**, 899-906, 2012.

M. Takase, H. Shinto, Y. Takao and T. Iguchi, “Accumulation and pharmacokinetics of estrogenic chemicals in the pre- and post-hatch embryos of the frog *Rana rugosa*” *In Vivo*, **26**, 913-920, 2012.

K. Oka, S. Kohno, H. Uruchitani, L.J.Jr. Guillette, Y. Ohta, T. Iguchi and Y. Katsu, “Molecular cloning and characterization of the corticoid receptors from the American alligator” *Mol. Cell. Endocrinol.*, **365**, 153-161, 2012.

T. Nakamura, S. Miyagawa, Y. Katsu, T. Mizutani, T. Sato, T. Takeuchi, T. Iguchi and Y. Ohta, “P21 and Notch signalings in the persistently altered vagina induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice” *J. Vet. Med. Sci.*, **74**, 1589–1595, 2012.

E.K. Brockmeier, Y. Ogino, T. Iguchi, D.S. Barber and N.D. Denslow, “Effects of 17 β -trenbolone on Eastern and Western mosquitofish (*Gambusia holbrooki* and *G. affinis*) and anal fin growth and gene expression patterns” *Aquat. Toxicol.*, **128-129C**, 163-170, 2012.

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.*, **83**, E1-6, 2012. doi: 10.4102/jsava.v83i1.8.

C. Hiruta and S. Tochinnai, “Spindle assembly and spatial distribution of γ -tubulin during abortive meiosis and cleavage division in the parthenogenetic water flea *Daphnia pulex*” *Zool. Sci.*, **29**, 733-737, 2012.

R. Haraguchi, D. Matsumaru, N. Nakagata, S. Miyagawa, K. Suzuki, S. Kitazawa and G. Yamada, “The hedgehog signal induced modulation of bone morphogenetic protein signaling: an essential signaling relay for urinary tract morphogenesis” *PLoS One*, **7**(7), e42245, 2012.

Y. Katsu, A. Lange, S. Miyagawa, H. Urushitani, N. Tatarazako, Y. Kawashima, C.R. Tyler and T. Iguchi, “Cloning, expression and functional characterization of carp, *Cyprinus carpio* estrogen receptors and their differential activations by estrogens” *J. Appl. Toxicol.*, **33**, 41-49, 2013.

M. Villacorte, K. Suzuki, A. Hirasawa, Y. Ohkawa, M. Suyama, T. Maruyama, D. Aoki, Y. Ogino, S. Miyagawa, T. Terabayashi, Y. Tomooka, N. Nakagata and G. Yamada, “ β -Catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation” *Oncogene*, (in press) 2012 Sep 3. doi: 10.1038/onc.2012.376.

H. Kakuta, A. Matsushita, K. Arikawa, T. Iguchi and T. Sato, “Cholesterol homeostasis in the ovaries of neonatally diethylstilbestrol-treated mice” *Exp. Clin. Endocr. Diabetes*, (in press).

T. Oka, N. Mitsui-Watanabe, N. Tatarazako, Y. Onishi, Y. Katsu, S. Miyagawa, Y. Ogino, R. Yatsu, S. Kohno, M. Takase, Y. Kawashima, Y. Aoki, L.J.Jr. Guillette and T. Iguchi, “Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors” *J. Appl. Toxicol.*, (in press). doi: 10.1002/jat.2825.

I. Hirakawa, S. Miyagawa, N. Mitsui, M. Miyahara, Y. Onishi, Y. Kagami, T. Kusano, T. Takeuchi, Y. Ohta and T. Iguchi, “Developmental disorders and altered gene expression in the tropical clawed frog (*Silurana tropicalis*) exposed to 17α -ethinylestradiol” *J. Appl. Toxicol.*, (in press). doi: 10.1002/jat.2836.

Y. Goto, M. Kajiwara, Y. Yanagisawa, H. Hirose, T. Yoshimi, M. Uemura, H. Nakano, S. Takahashi, Y. Shida, T. Iguchi, Y. Takahashi and T. Miura, “Detection of vertebrate-type steroid hormones and their converting activities in the neogastropod *Thais clavigera* (Kster, 1858)” *J. Molluscan Studies*, (in press).

5) 著書、総説

S. Miyagawa, R. Yatsu, T. Sudo, K. Igarashi, J. Kanno and T. Iguchi, “Irreversible effect of diethylstilbestrol on reproductive organs and current approach for epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals” In: *Toxicology and Epigenetics*. Ed. Sahu, S.C., John Wiley & Sons, Ltd., pp. 357-364, 2012.

N. Tatarazako and T. Iguchi, “Evaluation of toxicities of herbicides using short-term chronic tests of alga, daphnid and fish” In: *Herbicides, Herbicides - Environmental Impact Studies and Management Approaches*, Alvarez-Fernandez, R. (ed.), ISBN: 978-953-307-892-2, InTech, 2012.

E.G. Grau, R.S. Nishioka, A. Bern, T. Hirano, R. Borski, C. Clarke, K. Foskett, L.J. Guillette, T. Iguchi, L.A. Jones, C. Loretz, S. McCormick, J.A. McLachlan, C.A. Mason, K.T. Mills, Y. Nagahama, C.S. Nicoll, N.H. Richman, M. Sheridan, J.L. Specker, J.J. Sullivan and G. Young, “In memory of Professor Howard A. Bern” *Gen. Comp. Endocrinol.*, **176**, 121-123, 2012.

L.J.Jr. Guillette and T. Iguchi, “Life in a contaminated world” *Science*, **337**, 1614-1615, 2012.

C. Hiruta and S. Tochinai, “How does the alteration of meiosis evolve to parthenogenesis? -

Case study in a water flea, *Daphnia pulex* -” In: Meiosis –Molecular mechanisms and cytogenetic diversity, A. Swan (ed.), ISBN: 978-953-51-0118-5, InTech, 2012.

C. Hiruta, K. Toyota, H. Miyakawa, E. Sumiya and T. Iguchi, “Sexual reproduction is a key element in the life history strategy of water fleas, *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* – Casting a spotlight on male induction and its morphology -” In: *Daphnia: Biology and Mathematics Perspectives*, Nova, (in press).

6) 国際会議発表リスト

T. Iguchi, “Environmental endocrine disruptor molecular screening and the use of *in vitro* assays and toxicogenomics in fish, amphibians and daphnia” Special Symposium on Environmental Genomics 2012, in Shanghai, Shanghai, China, March 26-28, 2012.

A. Lange, M. Sebire, P. Rostkowski, S. Miyagawa, T. Mizutani, T. Iguchi, E.M. Hill and C.R. Tyler, “Bioavailable environmental antiandrogens and their effects on reproduction relevant endpoints in fish” ESCPB (European Society of Comparative Physiology and Biochemistry) meeting. Bilbao, Spain, September 2-5, 2012.

E.K. Anderson, Y. Ogino, D. Barber, T. Iguchi and N.D. Denslow, “Non-aromatizable androgen exposure to mosquitofish (*Gambusia spp*): Links between molecular, physiological, and reproductive system changes” 6th World Congress and 22nd SETAC Europe, Berlin, Germany, May 20-24, 2012.

H. Watanabe, T. Abe, S. Oda, T. Iguchi and N. Tatarazako, “Multi-generational effects of endocrine disrupting chemicals on *Ceriodaphnia dubia*” 6th World Congress and 22nd SETAC Europe, Berlin, Germany, May 20-24, 2012.

C.R. Tyler, P. Hamilton, A. Lange, A. Filby, M. Soffka, O. Lee, A. Takesano, T. Kudoh, G. Paull and T. Iguchi, “New systems (and adapting old ones) for understanding the wider health impacts of EEDs and their mixtures in fish” Gordon Research Conferences, Environmental Endocrine Disrupters, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA, June 3-8, 2012.

I. Hirakawa, S. Miyagawa, N. Mitsui, M. Miyahara, Y. Onishi, Y. Kagami, T. Kusano, T. Takeuchi, Y. Ohta and T. Iguchi, “Histology and gene expression analysis in testis of medaka and frog exposed by ethinylestradiol (EE2)” Gordon Research Conferences, Environmental Endocrine Disrupters, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA, June 3-8, 2012.

D. Volz, D. Villeneuve, H. Aladjov, G. Ankley, S. Belanger, K. Crofton, M. Embry, D. Hinton, M. Hornung, T. Hutchinson, T. Iguchi, R. Johnson, M. Léonard, D. Mount, T. Norberg-King, L. Ortego, S. Padilla, R. Tanguay, J. Tietge, L. Truong, G. Veith, L. Wehmas and G. Whale, “Development of alternatives to the fish early life-stage test: a research strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways during early fish development” 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.

D. Villeneuve, D. Volz, H. Aladjov, G. Ankley, S. Belanger, K. Crofton, M. Embry, D.

Hinton, M. Hornung, T. Hutchinson, T. Iguchi, R. Johnson, M. Léonard, D. Mount, T. Norberg-King, L. Ortego, S. Padilla, R. Tanguay, J. Tietge, L. Truong, G. Veith, L. Wehmas and G. Whale, “Discovering and annotating fish early life-stage (FELS) adverse outcome pathways: Putting the research strategy into practice” 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.

N. Tatarazako, H. Takanobu, H. Watanabe, A. Sawai, Y. Ohnishi and T. Iguchi, “Efficacy of medaka TG229 in the screening of endocrine-disrupting chemicals” 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.

M. Embry, D. Villeneuve, D. Volz, H. Aladjov, G. Ankley, S. Belanger, K. Crofton, D. Hinton, M. Hornung, T. Hutchinson, T. Iguchi, R. Johnson, M. Léonard, D. Mount, T. Norberg-King, L. Ortego, S. Padilla, R. Tanguay, J. Tietge, L. Truong, G. Veith, L. Wehmas and G. Whale, “Alternatives to the fish early life-stage test: developing a conceptual model for early fish development” 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.

7) 招待講演

井口泰泉:「内分泌かく乱化学物質問題の世界の動向と最近の研究」平成23年度 富山大学長裁量経費戦略的研究プロジェクト採択課題「環境先進県とやまにおける産業由来重金属の生物毒性研究の国際的新拠点の形成」公開シンポジウム—生物毒性研究の最前線—, 富山大学理学部多目的ホール, 2012年3月13日.

Y. Ogino, G. Yamada and T. Iguchi, “Molecular analysis of androgen dependent sex characteristics development, western mosquitofish and medaka as model systems. The 2012 Edwin W. Pauley Summer Program in Marine Biology “Integrative, Experimental and environmental physiology of marine organisms” University of Hawaii, USA, July 26-27, 2012.

T. Iguchi, S. Miyagawa and Y. Ogino, “Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species used in the laboratory and field monitoring. The 2012 Edwin W. Pauley Summer Program in Marine Biology “Integrative, Experimental and environmental physiology of marine organisms” University of Hawaii, USA, July 26-27, 2012.

T. Iguchi, “Temperature-dependent sex determination and sex differentiation: alligators, fish and daphnids” Summer School 2012: “Thermal Biology: from Plants to Humans” in Okazaki Institute for Integrative Bioscience, August 8-9, 2012.

T. Iguchi, S. Miyagawa and Y. Ogino, “Establishment of transactivation assays using hormone receptors from various animal species for screening of environmental chemicals” SETAC Asia Pacific, Special lecture, Kumamoto, September 24-27, 2012.

T. Iguchi, “Environmental sex determination in the *Daphnia magna*” University of Birmingham, UK, November 5, 2012.

井口泰泉, 豊田賢治, 角谷絵里, 宮川一志, 蛭田千鶴江, 宮川信一, 「脊椎動物から無脊

椎動物の内分泌かく乱：オオミジンコの性分化遺伝子の解明」．日本比較内分泌学会シンポジウム，福井大学，11月29－12月1日，2012.

8) 学会および社会的活動

宮川一志，「ミジンコ類における捕食者に誘導される表現型多型とその制御機構」．ワークショップ：個体間コミュニケーションが導く表現型可塑性 -その多様性と共通原理．渡邊大、宮川一志(企画)．Joint meeting of The 59th Annual Meeting of ESJ & The 5th EAFES International Congress. 龍谷大（瀬田），3月17日，2012.

K. Toyota, H. Miyakawa, S. Oda, S. Miyagawa, Y. Ogino, N. Tatarazako, Y. Kato, T. Iguchi, “Gene expression analysis of juvenile hormone-responsive genes during critical period for sex determination in *Daphnia magna*. Joint Meeting of The 59th Annual Meeting of ESJ and The 5th EAFES International Congress, Ryukoku University, Otsu, March 17-21, 2012.

角谷絵里，荻野由紀子，宮川信一，宮川一志，豊田賢治，井口泰泉，「オオミジンコ脱皮ホルモン合成経路遺伝子の発現変動」．第83回日本動物学会，大阪大学，9月13－15日，2012.

勝義直，井口泰泉，「無顎類ヤツメウナギのエストロゲン受容体」．第83回日本動物学会、大阪大学、9月13－15日，2012.

遠山早紀，宮川信一，荻野由紀子，勝義直，小林亨，井口泰泉，「メダカのエストロゲン受容体サブタイプの機能解析」．第83回日本動物学会，大阪大学，9月13－15日，2012.

岡香織，太田康彦，井口泰泉，勝義直，「アメリカアリゲーターのアリル炭化水素受容体の単離と機能解析」．第83回日本動物学会，大阪大学，9月13－15日，2012.

中島忠章，井口泰泉，佐藤友美，「胎仔期から成熟期にかけての子宮と膈の分化におけるレチノイン酸シグナルの役割」．第83回日本動物学会，大阪大学，9月13－15日，2012.

中村 武志，宮川 信一，平川 育美，井口 泰泉，太田 康彦，「新生時期にDES暴露をうけた成熟マウスの膈におけるp21, p53及びNotch関連遺伝子の発現」．日本獣医学会．岩手大学，9月14－16日，2012.

谷津遼平，宮川信一，荻野由紀子，井口泰泉，「American alligator (ミシシッピーワニ)における温度依存型性決定機構の同定」．日本動物学会中部支部大会，松本，11月17-18日，2012.

豊田賢治，加藤泰彦，佐藤優，杉浦直美，宮川信一，宮川一志，渡邊肇，小田重人，荻野由紀子，蛭田千鶴江，水谷健，鑓迫典久，井口泰泉，「ミジンコ類における *doublesex* 遺伝子の単離及び発現解析」．日本動物学会中部支部大会，松本，11月17-18日，2012. (最優秀ポスター賞).

角谷絵里，荻野由紀子，宮川一志，豊田賢治，宮川信一，井口泰泉，「オオミジンコ脱皮ホルモン合成経路遺伝子の分子系統解析と脱皮周期中の発現変動」．日本動物学会中部支部大会，松本，11月17-18日，2012. (優秀ポスター賞).

平川育美，宮川信一，勝義直，鏡良弘，鑓迫典久，小林亨，草野輝彦，水谷健，荻野由紀子，渡邊直子，櫻井真紀，大西裕太，太田康彦，井口泰泉，「エチニールエストラジオー

ルがメダカおよびネツタイツメガエルの精巢へ与える影響」。日本動物学会中部支部大会, 松本, 11月17-18日, 2012. (最優秀ポスター賞).

蛭田千鶴江, 豊田賢治, 井口泰泉, 「ミジンコ(*Daphnia pulex*)初期胚へのマイクロインジェクション法の確立に向けて」。日本動物学会中部支部大会, 松本, 11月17-18日, 2012.

宮川一志, 井口泰泉, 「節足動物類における幼若ホルモンの受容機構とその進化の解明」。日本動物学会中部支部大会, 松本, 11月17-18日, 2012.

荻野由紀子, 山田源, 井口泰泉, 「脊動物における Androgen receptor 遺伝子の進化と雄性形質発現の分子機構」。日本動物学会中部支部大会, 松本, 11月17-18日, 2012.

森田慎一, 時下進一, 井口泰泉, 志賀靖弘, 太田敏博, 「オオミジンコの正中線における DmagSIM発現細胞の神経細胞タイプの同定」。第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, 12月11-14日, 2012.

上原政樹, 井口泰泉, 志賀靖弘, 「オオミジンコ付属肢形成におけるNotch Signaling Pathway遺伝子群の機能解析」。第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, 12月11-14日, 2012.

大見川沙織, 森田慎一, 上原政樹, 時下進一, 井口泰泉, 志賀靖弘, 「オオミジンコ *Daphnia magna*におけるHox遺伝子Sex Combs ReducedのRNAi法による機能解析」。第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, 12月11-14日, 2012.

S. Miyagawa, I. Hirakawa, T. Mizutani, S. Tohyama, R. Yatsu and T. Iguchi, “Variation in response sensitivity of fish estrogen receptors to estrogenic environmental contaminants” 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

宮川一志, 井口泰泉, 「ミジンコ類のMetおよびSRCを用いた*in vitro*における幼若ホルモン作用評価系の開発」。環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

遠山早紀, 宮川信一, 荻野由紀子, 勝義直, 小林亨, 井口泰泉, 「化学物質に対するメダカエストロゲン受容体の応答性」。環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

K. Toyota, Y. Kato, M. Sato, N. Sugiura, S. Miyagawa, H. Miyakawa, H. Watanabe, S. Oda, Y. Ogino, C. Hiruta, T. Mizutani, N. Tatarazako and T. Iguchi, “Analysis of sex determining genes involved in male induction in Cladocerans treated by juvenile hormone agonist” 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

T. Nakamura, S. Miyagawa, T. Iguchi and Y. Ohta, “Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure” 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

漆谷博志, 勝義直, 太田康彦, 白石寛明, 井口泰泉, 堀口敏宏, 「軟体動物前鰓類RXRを用いた有機スズ化合物による転写活性誘導差異」。環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

角谷絵里, 荻野由紀子, 宮川一志, 蛭田千鶴江, 豊田賢治, 宮川信一, 井口泰泉, 「オオミ

ジンコ脱皮ホルモン合成経路遺伝子の脱皮周期における時空間的発現解析」. 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

高瀬稔, 井口泰泉, 「性分化後のツチガエルおよびトノサマガエルの生殖腺に対するノニルフェノールおよびビスフェノールAの影響」. 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

Y. Ogino and T. Iguchi, “Functional characterization of medaka AR genes and molecular mechanism of androgen dependent sex characteristics development” 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

I. Hirakawa, S. Miyagawa, Y. Katsu, Y. Kagami, N. Tatarazako, T. Kobayashi, T. Kusano, T. Mizutani, Y. Ogino, T. Iguchi and Y. Ohta, “Gene expression analysis of testis-ova formation in medaka and tropical clawed frog exposed to 17 α -ethinylestradiol” 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

S. Miyagawa, I. Hirakawa, T. Mizutani, S. Tohyama, R. Yatsu, T. Iguchi, “Variation in response sensitivity of fish estrogen receptors to estrogenic environmental contaminants” 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

村田清香, 竹内崇師, 太田康彦, 平川育美, 保永洋平, 宮川信一, 井口泰泉, 「妊娠中にフルタミドを投与した雄ラットの生殖器異常について」. 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

大野満里子, 井原賢, **V. Kumar**, 成宮正倫, 花本征也, 中田典秀, 山下尚之, 宮川信一, 井口泰泉, 田中宏明, 「下水処理中の抗エストロゲン物質同定のための基礎検討」. 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

阿部良子, 渡部春奈, 岡知宏, 山室真澄, 井口泰泉, 鑓迫典久, 「節足動物の内分泌かく乱物質に対する短期検出法の開発」. 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

井原賢, 大野満里子, **V. Kumar**, 成宮正倫, 花本政也, 中田典秀, 山下尚之, 高畠寛生, 小林健太郎, 田中裕之, 宮川信一, 井口泰泉, 田中宏明, 「下水試料および下水高度処理水のエストロゲン様作用・抗エストロゲン作用の評価」. 環境ホルモン学会第15回研究発表会, 東京大学山上会館, 12月18-19日, 2012.

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 会長

日本動物学会 理事 中部支部支部長

日本比較内分泌学会 理事

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

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 編集委員

Biology of Reproduction 編集委員

Journal of Biomedical Research 編集委員

Ecotoxicology and Environmental Safety 編集委員

9)他大学での非常勤講師、客員研究員、客員教授

Medical University of South Carolina and Hollings Marine Laboratory (USA) 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

北海道大学非常勤講師

広島大学両生類研究所 客員研究員

国立環境研究所 客員研究員

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(代表)

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(C)「卵巣癌において異常活性化したリン酸化酵素の同定とその特異的阻害剤の開発」(2011-13)井口泰泉(分担)

科学研究費 基盤研究(A)「生物多様性を考慮したレポータージーンアッセイでの都市下水の内分泌攪乱性の国際比較」(2011-13)井口泰泉、宮川信一(分担)

科学研究費 若手研究(B)「女性ホルモンシステムの破綻と Wnt シグナルについての解析」(2011-12)宮川信一(代表)

科学研究費 基盤研究(C)「アンドロゲンによる造血・血管発生機構の解明」(2011-13)荻野由紀子(代表)

熊本大学発生医学研究所共同研究「アンドロゲンによる初期胚造血・血管発生機構の解明」(2011年)荻野由紀子(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(代表)

科学研究費 特別研究員奨励費 「ミジンコの生殖機構からみた有性生殖と単為生殖の進化」(2012-14)蛭田千鶴江

生命環境研究領域

(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) 糖鎖の機能を詳細に理解するためには、その立体構造を溶液中での揺らぎを含めて明らかにする必要がある。我々は、常磁性ランタニドイオンの導入によって観測される擬コンタクトシフト (PCS) を活用し、NMR 法と分子動力学 (MD) 計算を組み合わせた糖鎖の動的立体構造解析法を開発した。神経細胞膜上に存在する糖脂質 GM3 の糖鎖に常磁性ランタニドイオンを導入し、糖鎖の各水素および炭素原子の化学シフト変化から PCS 値を求めた。一方、MD 計算によって得られた複数のコンフォマーを考慮した立体構造モデルから PCS の理論値を算出し、実験値との比較を行った。その結果、主要なコンフォメーションのみならず、存在割合の低い安定構造を考慮することで両者がよりよく一致することが判明し、これにより溶液中での糖鎖の立体構造の揺らぎを正しく記述することに成功した。さらに、本手法を分岐型糖鎖 GM2 へと拡張し、糖残基間の相互作用を通じて立体構造の揺らぎが制御されている様子を明らかにした。
- b) タンパク質の細胞内運命の決定に関わるいくつかの分子認識メカニズムを構造生物学的アプローチによって解明した。ユビキチン (Ub) -プロテアソーム系で働くタンパク質の中には Ub と相同性の高いドメイン (UBL) を持つものがいくつか存在する。例えば、NF- κ B の活性化制御を通じて免疫応答や細胞の生存など様々な生命現象に関与している直鎖状ユビキチン (Ub) 鎖の生成を触媒する酵素複合体は、HOIL-1L の UBL と HOIP の Ub 会合ドメイン (UBA) の相互作用を通じて形成されている。また、立体構造不全の糖タンパク質から糖鎖を切り離す酵素の N 末端に位置する PUB ドメインがプロテアソーム基質運搬因子 HR23 の UBL と相互作用することを私たちは見出している。これらの分子間相互作用様式を X 線結晶構造解析と NMR 解析を通じて明らかにし、立体構造の類似した Ub/UBL が独自のパートナータンパク質との特異的相互作用を実現する仕組みの一端を明らかにすることができた。また、コラーゲン特異的な分子シャペロン Hsp47 の基質結合部位を解明することにも成功した。

c) 自然界ではタンパク質やDNAが、ウイルス殻などの巨大なカプセル状の構造体に閉じ込められることで、その構造や機能の制御を受けている。一方、人工系では、精密構造をもつカプセル状分子の大きさに限界があり、タンパク質のような巨大な分子を閉じ込めることはこれまでできなかった。我々は、東京大学の藤田誠教授との共同研究を通じて、パラジウムイオンと有機二座配位子、計36個の構成成分から自己組織化した巨大な中空球状錯体を基盤として、その内面に糖鎖の有限ナノ界面を構築し、球状錯体の内部にUbを丸ごと包接することに成功した。すなわち、分子生物学的手法と化学修飾を組み合わせることによりユビキチンを連結した配位子を新たに調製し、これを糖で化学修飾した有機配位子およびパラジウムイオンと混合することで、球状錯体を自己組織化生成した。NMRを利用した拡散速度の計測などを通じて、Ubが球状錯体に封入されていることを実証することができた。

4) 学術論文

L. Mauri, R. Casellato, M. G. Ciampa, Y. Uekusa, K. Kato, K. Kaida, M. Motoyama, S. Kusunoki and S. Sonnino, “Anti-GM1/GD1a complex antibodies in GBS sera specifically recognize the hybrid dimer GM1-GD1a,” *Glycobiology* **22**, 352–360 (2012).

D. Fujita, K. Suzuki, S. Sato, M. Yagi-Utsumi, E. Kurimoto, Y. Yamaguchi, K. Kato and M. Fujita, “Synthesis of a bridging ligand with a non-denatured protein pendant: Toward protein encapsulation in a coordination cage,” *Chem. Lett.* **41**, 313–315 (2012).

K. Takagi, S. Kim, H. Yukii, M. Ueno, R. Morishita, Y. Endo, K. Kato, K. Tanaka, Y. Saeki and T. Mizushima, “Structural basis for specific recognition of Rpt1p, an ATPase subunit of the 26 S proteasome, by the proteasome-dedicated chaperone Hsm3p,” *J. Biol. Chem.* **287**, 12172–12182 (2012).

S. Yamamoto, Y. Zhang, T. Yamaguchi, T. Kameda and K. Kato, “Lanthanide-assisted NMR evaluation of a dynamic ensemble of oligosaccharide conformations,” *Chem. Commun.* **48**, 4752–4754 (2012).

Y. Kamiya, Y. Uekusa, A. Sumiyoshi, H. Sasakawa, T. Hirao, T. Suzuki and K. Kato, “NMR characterization of the interaction between the PUB domain of peptide:N-glycanase and ubiquitin-like domain of HR23,” *FEBS Lett.* **586**, 1141–1146 (2012).

S. Kim, A. Nishida, Y. Saeki, K. Takagi, K. Tanaka, K. Kato and T. Mizushima, “New crystal structure of the proteasome-dedicated chaperone Rpn14 at 1.6 Å resolution,” *Acta Cryst.* **F68**, 517–521 (2012).

H. Yagi, K. Ishimoto, T. Hiromoto, H. Fujita, T. Mizushima, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi, E. Kurimoto, M. Noda, S. Uchiyama, F. Tokunaga, K. Iwai and K. Kato, “A non-canonical UBA-UBL interaction forms the linear-ubiquitin-chain assembly complex,” *EMBO Rep.* **13**, 462–468 (2012).

H. Yagi, S. Watanabe, T. Suzuki, T. Takahashi, Y. Suzuki and K. Kato, “Comparative

analyses of *N*-glycosylation profiles of influenza A viruses grown in different host cells,” *Open Glycoscience* **5**, 2–12 (2012).

N. Sriwilaijaroen, S. Kondo, H. Yagi, H. Hiramatsu, S. Nakakita, K. Yamada, H. Ito, J. Hirabayashi, H. Narimatsu, K. Kato and Y. Suzuki, “Bovine milk whey for preparation of natural *N*-glycans: structural and quantitative analysis,” *Open Glycoscience* **5**, 41–50 (2012).

Y. Zhang, S. Yamamoto, T. Yamaguchi and K. Kato, “Application of paramagnetic NMR-validated molecular dynamics simulation to the analysis of a conformational ensemble of a branched oligosaccharide,” *Molecules* **17**, 6658–6671 (2012).

H. Yagi, T. Saito, M. Yanagisawa, R. K. Yu and K. Kato, “Lewis X-carrying *N*-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the Notch signaling pathway,” *J. Biol. Chem.* **287**, 24356–24364 (2012).

Y. Uekusa, S. Mimura, H. Sasakawa, E. Kurimoto, E. Sakata, S. Olivier, H. Yagi, F. Tokunaga, K. Iwai and K. Kato, “Backbone and side chain ¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignments of the ubiquitin-like domain of human HOIL-1L, an essential component of linear ubiquitin chain assembly complex,” *Biomol. NMR Assign.* **6**, 177–180 (2012).

M. Yagi-Utsumi, S. Yoshikawa, Y. Yamaguchi, Y. Nishi, E. Kurimoto, Y. Ishida, T. Homma, J. Hoseki, Y. Nishikawa, T. Koide, K. Nagata and K. Kato, “NMR and mutational identification of the collagen-binding site of the chaperone Hsp47,” *PLoS ONE* **7**, e45930 (2012).

D. Fujita, K. Suzuki, S. Sato, M. Yagi-Utsumi, Y. Yamaguchi, N. Mizuno, T. Kumasaka, M. Takata, M. Noda, S. Uchiyama, K. Kato and M. Fujita, “Protein encapsulation within synthetic molecular hosts,” *Nature Commun.* **3**, 1093 (2012).

T. Fujita, M. Urushihara, H. Kashida, H. Ito, X. Liang, M. Yagi-Utsumi, K. Kato and H. Asanuma, “Reversed assembling of dyes in an RNA duplex compared with those in DNA,” *Chem. Euro. J.* **18**, 13304–13313 (2012).

5) 著書、総説

K. Kato and Y. Yamaguchi, “Glycoproteins and antibodies: Solution NMR studies,” *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, R. K. Harris and R. E. Wasylshen ed. John Wiley (Chichester), **3**, 1779–1790 (2012).

柳澤勝彦, 松崎勝巳, 加藤晃一, 「アミロイド蓄積開始機構の解明と治療薬開発への展開」, *最新医学*, **67**, 138–158 (2012).

加藤晃一, 「タンパク質の翻訳後修飾の構造生物学研究」, *薬学雑誌*, **132**, 563–573 (2012).

加藤晃一, 「研究戦略 YAKU 学—研究現場から臨床へ—No.38 創薬ターゲットとしての糖鎖」, *薬事日報*, **11133**, 8, (2012).

Y. Kamiya, T. Satoh and K. Kato, “Molecular and structural basis for *N*-glycan-dependent determination of glycoprotein fates in cells,” *Biochim. Biophys. Acta –General Subjects*, **1820**,

1327–1337 (2012).

加藤晃一, 矢木宏和, 「バイオ／抗体医薬品における構造解析」, *バイオ／抗体医薬品の開発・製造プロセス*, 情報機構, 173–183 (2012).

加藤晃一, 矢木宏和, 「X線とNMRによる抗体解析」, *新機能抗体開発ハンドブック*, 浜窪隆雄監修, エヌ・ティー・エス, 65–69 (2012).

加藤明文, 矢木宏和, 加藤晃一, 飯田 茂, 中村和靖, 「糖鎖制御による抗体医薬品の差別化」, *次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線*, 熊谷 泉監修, シーエムシー出版, 144–149 (2012).

加藤晃一, 矢木宏和, 「NMR法による抗体の高次構造」, *次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線*, 熊谷 泉監修, シーエムシー出版, 275–283 (2012).

6) 国際会議発表リスト

Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Yamamoto and K. Kato, “Conformational dynamics of ganglioside GM3 as studied by NMR spectroscopy,” The 5th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Nara (Japan), January 2012.

K. Kumoi, T. Satoh, H. Yagi, T. Hiromoto, T. Mizushima, S. Uchiyama, M. Noda, K. Murata, Y. Kamiya and K. Kato, “Structural basis for the mechanisms underlying proteasomal activation by archaeal PbaB homotetramer,” The 5th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Nara (Japan), January 2012.

S. Kitazawa, M. Yagi-Utsumi, A. Ido, M. Urushitani, K. Sugase, K. Kato and R. Kitahara, “Structure, dynamics and function of high-energy state mutant of ubiquitin,” The 5th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Nara (Japan), January 2012.

K. Kato, “Conformational dynamics of sugar-protein interaction systems as potential therapeutic targets,” The 5th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Nara (Japan), January 2012.

K. Okawa, M. Yagi-Utsumi, K. Takagi, T. Hiromoto, H. Yagi, T. Mizushima, T. Satoh and K. Kato, “Structural and functional analyses of yeast Ump1p, an intrinsically disordered protein operating as proteasome assembly chaperone,” The 5th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Nara (Japan), January 2012.

M. Yagi-Utsumi, P. Boonsri, Y. Yamaguchi and K. Kato, “Spectroscopic characterization of conformational transitions of membrane-binding peptides upon their specific interactions with glycolipids,” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Science: Experiments and Simulations, Nara (Japan), January 2012.

Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Yamamoto and K. Kato, “Application of lanthanide ions for NMR characterization of oligosaccharides,” SOKENDAI Asian Winter School "Basics and Frontiers in Molecular Science", Okazaki (Japan), January 2012.

H. Yagi and K. Kato, “Identification of specific N-glycans expressed on the nervous systems by HPLC mapping method,” GCOE International Symposium, Nagoya (Japan), January 2012.

Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Yamamoto and K. Kato, “Oligosaccharide conformational dynamics analyses by using PCS in conjunction with MD simulation,” The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), Madrid (Spain), July 2012.

Y. Uekusa, S. Sonnino and K. Kato, “NMR analysis of specific carbohydrate-carbohydrate interaction between gangliosides,” The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), Madrid (Spain), July 2012.

S. Kitazawa, T. Kameda, M. Yagi-Utsumi, K. Sugase, K. Kato and R. Kitahara, “NOE-derived solution structure of the high-energy open conformer N₂ of ubiquitin,” XXVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Lyon

(France), August 2012.

R. Kitahara, S. Kitazawa, M. Yagi-Utsumi, N. Baxter, M. Williamson and K. Kato, “Conformational fluctuation of ubiquitin probed by perturbation with pressure and mutation,” XXVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Lyon (France), August 2012.

M. Yagi-Utsumi, P. Boonsri, Y. Yamaguchi and K. Kato, “NMR analyses of the conformational transition of the antibacterial peptide sarcotoxin IA interacting with lipid A,” 4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG 2012 Conference), Jeju (Korea), October 2012.

Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Yamamoto, Y. Uekusa and K. Kato, “Paramagnetic-assisted NMR analyses of conformational dynamics of gangliosides,” 4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG 2012 Conference), Jeju (Korea), October 2012.

K. Yanagi, Y. Kamiya, T. Kitajima, T. Yamaguchi, Y. Chiba and K. Kato, “Comparative conformational analysis of high-mannose-type oligosaccharides using high-field NMR spectroscopy combined with ¹³C-labeling technique,” 4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG 2012 Conference), Jeju (Korea), October 2012.

T. Yamaguchi, Y. Zhang and K. Kato, “NMR spectroscopic approaches to the conformational dynamics of oligosaccharides by paramagnetic tagging,” The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), Tokyo (Japan), November 2012.

S. Kitazawa, T. Kameda, M. Yagi, K. Sugase, N. Baxter, K. Kato, M. Williamson and R. Kitahara, “Solution structure of the alternatively folded state of ubiquitin,” The 6th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Kyoto (Japan), December 2012.

T. Kuniyama, M. Yagi-Utsumi, T. Nakamura, K. Kuwajima and K. Kato, “Multiple binding models in molecular recognition process of GroEL as studied by NMR spectroscopy,” The 6th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Kyoto (Japan), December 2012.

K. Inagaki, Y. Uekusa, Y. Kamiya, T. Satoh and K. Kato, “Redox-dependent conformational dynamics of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate binding region,” The 6th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Kyoto (Japan), December 2012.

Y. Uekusa, Y. Zhang, K. Yanagi, T. Yamaguchi and K. Kato, “Conformations, dynamics, and interactions of sugar chains as studied by NMR spectroscopy,” The 6th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Kyoto (Japan), December 2012.

M. S. Chandak, T. Nakamura, K. Makabe, T. Takenaka, J. Chen, K. Kato and K. Kuwajima, “Hydrogen-deuterium (H/D) exchange studies on free GroES and the GroEL-SR1-ADP chaperonin complex,” The 6th International Symposium, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Kyoto (Japan), December 2012.

7) 招待講演

K. Kato, “Protein dynamics in the ubiquitin-proteasome system,” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Science-Experiments and Simulations, Nara, January 2012.

加藤晃一, 「糖鎖の生命分子科学」, 基礎生物学研究所・生理学研究所・分子科学研究所—名古屋工業大学 第4回合同講演会, 岡崎, 2012年1月.

K. Kato, “Structural Basis for Improved Efficacy of Therapeutic Antibodies by Engineering of their Fc Glycans,” Antibodies Asia 2012, Shanghai (China), February 2012.

加藤晃一, 「糖鎖機能解明への分子科学的アプローチ」, 山手イブニングセミナー, 岡崎, 2012年5月.

- K. Kato**, “Structural observations on sugar chains as protein extensions for functional promotion,” 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 2012 年 6 月.
- K. Kato**, “Structural glycomics approaches for characterization of biotherapeutics and their application to atomic anatomy of antibodies,” BioChina 2012, Shanghai (China), June 2012.
- K. Kato**, “Structural views of carbohydrate-protein interaction systems as potential therapeutic targets,” The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), Madrid (Spain), July 2012.
- 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連関の探査」, 新学術領域「揺らぎと生体機能」平成 24 年度合同班会議, 作並, 2012 年 7 月.
- K. Kato**, “High Resolution Analysis of Protein Glycosylation,” 日本製薬工業協会 バイオ医薬品委員会, 東京, 2012 年 9 月.
- 加藤晃一, 「ATP 非依存性シャペロンの構造ダイナミクスと機能発現メカニズム」, 新学術領域「揺らぎと生体機能」「水と ATP」合同公開シンポジウム「ゆらぎと水-生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」, 大阪, 2012 年 9 月.
- 矢木真穂, 「アミロイド β の構造転移と分子間相互作用」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー・包括脳ネットワーク研究会 第 3 回神経科学と構造生物学の融合研究会, 大阪, 2012 年 10 月.
- 加藤晃一, 「糖鎖改変による抗体医薬の機能向上の構造基盤」, 第 4 回糖鎖科学中部拠点研究会, 名古屋, 2012 年 10 月.
- K. Kato**, “Structural biology of post-translational modifications of proteins,” Seminar in Department of Biochemistry Yonsei University, Seoul (Korea), October 2012.
- K. Kato**, “NMR of glycoproteins,” Pharmaceutical NMR Lecture Series in Osaka, Osaka, October 2012.
- K. Kato**, “Conformational dynamics and interactions of glycoconjugates of therapeutic interest,” Commemorative Symposium on the 20th Anniversary of the Mizutani Foundation for Glycoscience, Tokyo, November 2012.
- 加藤晃一, 「複合糖質の構造生物学: 創薬標的としての糖鎖」, 第 40 回構造活性相関シンポジウム, 岡崎, 2012 年 11 月.
- 加藤晃一, 「生体分子の自己組織化プロセスの精密構造解析」, CREST 「ナノ界面技術の基盤構築」研究領域第 2 回公開シンポジウム「ナノ界面が生み出す次世代機能」, 東京, 2012 年 12 月.
- K. Kato**, “NMR Characterization of Conformational Fluctuations of Oligosaccharides and Glycoconjugates,” 新学術領域研究「揺らぎと生体機能」第 6 回公開シンポジウム, 京都, 2012 年 12 月.
- 加藤晃一, 「複合糖質の立体構造・ダイナミクス・相互作用」, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012 年 12 月.
- K. Kato**, “High Resolution Analysis of Protein Glycosylation,” CASSS CMC Strategy Forum

Japan 2012, Tokyo, December 2012.

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評議員(2006- 2012) 理事(2008-2012).
- 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-).

学会の組織委員等

第 51 回 NMR 討論会運営委員 (2012).

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(2009-).
- 生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出基礎的研究推進事業 書類審査専門委員(2009-).
- 大阪大学蛋白質研究所「共同利用・共同研究」委員会超高磁場 NMR 共同利用・共同研究専門部会委員(2012-).

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-).
- Glycobiology*, Editorial board member (2011-).

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
- 国立長寿医療研究センター認知症先進医療開発センター, 客員研究員

10)受賞、表彰

- 山口拓実, 日本化学会第 92 春季年会優秀講演賞 (学術)
- Zhang Ying, 平成 24 年度総合研究大学院大学学長賞
- 雲井健太郎, 第 12 回日本蛋白質科学会年会ポスター賞

11) 外部獲得資金

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）、「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-）.

医薬基盤研究所先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業、「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技術の確立を目指した研究」、加藤晃一（分担）（2010年-）.

科研費研究活動スタート支援、「アミロイド線維末端の特異構造の解明に基づく線維伸長メカニズムの理解」、矢木真穂（代表）（2011年-）.

科研費挑戦的萌芽研究、「分子シャペロン機能を有するシャトル型プロテアソーム活性化因子の同定と構造機能解析」、加藤晃一（代表）（2012年-）.

科研費若手研究（B）、「常磁性金属修飾糖鎖を用いた過渡的相互作用の動的観察」、山口拓実（代表）（2012年-）.

科研費基盤研究（A）、「糖鎖認識系を標的とする創薬を目指した複合糖質機能の構造基盤の解明と分子設計」、加藤晃一（代表）（2012年-）.

生命環境研究領域
(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・局所的翻訳を制御する RNA 粒子タンパク質ノックアウトマウスの解析
- b) RNA 粒子複合体構成分子の同定と解析

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 の輸送およびそれに伴う局所的な翻訳制御は、重要な遺伝子発現システムのひとつである。このシステムによって、刺激入力のあったシナプスでのみタンパク質を合成し、そのシナプスが選択的に強化されて神経ネットワークが形成される。神経樹状突起へ輸送される mRNA は、「RNA 粒子」と呼ばれる構造体に取り込まれる。RNA 粒子は mRNA、リボソーム、RNA 結合タンパク質等で主に構成される高次複合体で、mRNA 輸送と局所的翻訳制御において中心的役割を担う。我々は、マウスを用いて mRNA 輸送と局所的翻訳を制御する分子メカニズムを解析し、そのシナプス形成、神経ネットワーク形成、ひいては記憶や学習における役割について研究を進めている。

我々は以前、RNA 粒子の構成因子として RNG105 という RNA 結合タンパク質を新規に同定した。RNG105 は樹状突起への mRNA 輸送に関与し、その機能が局所的翻訳、さらに神経ネットワークの構築に必要であることを明らかにした (Shiina *et al.*, *J. Neurosci.* **30**, 12816-12830, 2010)。RNG105 ノックアウトマウスを作成したが、胎仔期において脳神経細胞の細胞死が起こり、呼吸不全で生後間もなく致死であった。記憶や学習といった高次脳機能への RNG105 の関与を調べるために、我々は Cre/loxP システムを用いた RNG105 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを新たに作成した。Cre リコンビナーゼを発現誘導するプロモーターとして、胎仔期では働かず生後に大脳で活性化する CaMKII α プロモーターを用いた。その結果、成体まで成長する RNG105 cKO マウスを得ることに成功した。オープンフィールド行動実験では、通常のマウスは新しい環境に置いても数回の試行を繰り返すと探索行動が低下していくが、RNG105 cKO マウスは数回の試行後でも探索行動が低下しなかった。この結果は、RNG105 cKO マウスが新しい環境に慣れる上で何らかの問題があることを示している。現在我々は、RNG105 cKO マウスの学習や記憶の能力に問題がないかどうかの詳細な解析に着手している。

RNG105 と RNA 結合ドメインを共有しているパラログとして、RNG140 の解析もおこなっている。RNG105 と RNG140 は、異なった種類の RNA 粒子に局在し、異なった時期、すなわち、RNG105 は胎仔期の脳に、RNG140 は成体の脳に発現する、という点で性質を異にする (Shiina and Tokunaga, *J. Biol. Chem.* **285**, 24260-24269, 2010)。我々は RNG140 ノックアウトマウスを得ており、これは

cKO ではなくても成体まで成長することを確認した。このマウスを用いて RNG140 の高次脳機能解析および行動解析をおこなうべく、B6 系統に戻し交配をおこなっている。

- b) RNA 粒子は神経細胞には存在するが、他の多くの細胞種には存在しない。しかし、そのような細胞も酸化ストレスやウイルス感染などのストレスに曝されると、RNA 粒子の形成が誘導される。この RNA 粒子は「ストレス粒子」と呼ばれ、構造的にも機能的にも神経の RNA 粒子に非常に良く似ている。我々は以前、RNG105 が神経 RNA 粒子のみならずストレス粒子の構成因子であること、また、RNG105 を繊維芽培養細胞に過剰発現すると mRNA を取り込んだストレス粒子の形成が誘導されることを明らかにした。我々はストレス粒子の構成因子群をさらに同定・解析し、神経 RNA 粒子の研究へと展開することを目指している。

我々は、ストレス粒子の構成因子として NFAR2 を新規に同定した。NFAR2 は RNG105 と共にストレス粒子に局在し、ストレス粒子の形成を促進することを明らかにした。ストレス粒子の形成には、ストレス環境下で活性化する PKR 等のキナーゼがマスター制御因子であることがわかっているが、NFAR2 は PKR によってリン酸化され、そのリン酸化によってストレス粒子への局在が増加し、ストレス粒子形成をさらに促進することも明らかにした。さらに、NFAR2 の結合パートナーである NF45 は NFAR2 によるストレス粒子形成を抑制するが、NFAR2 のリン酸化によってその抑制が効かなくなることも明らかにした。以上の結果から、通常は NF45 のような抑制因子が働き、NFAR2 によるストレス粒子形成は抑制されているが、ストレスによって PKR が活性化し NFAR2 がリン酸化されると、抑制に打ち勝ち、ストレス粒子が形成されるというモデルが考えられた。ノックアウトマウスを用いた実験により、PKR が記憶や学習に関わるということが報告されていることから、今回我々が明らかにした分子メカニズムが脳神経細胞の RNA 粒子においてどのような役割を果たすかを解析することは非常に興味深いと考えられる。

5) 著書、総説

椎名伸之, “RNA granule による樹状突起への mRNA 輸送と局所的タンパク質合成” 細胞工学, **31**, 655-659 (2012).

7) 招待講演

椎名伸之 「mRNA 輸送・翻訳制御粒子の形成・解体メカニズム」、第3回神経科学と構造物学の融合研究会、大阪大学、2012年10月。

8) 学会および社会的活動

学会誌編集委員

The Journal of Biochemistry, Advisory Board (2011-)

Cell Structure and Function, Editorial Board (2013-)

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).

科研費挑戦的萌芽研究、「神経シナプス機能の基盤となるスパイン形態の解析」、椎名伸之（代表）（2011年-2012年）.

生命環境研究領域

(客員)

笹井理生 (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) 核内ゲノム3次元構造のダイナミクス

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、(i) 開発を続けてきた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) の改良を行い、モデル蛋白質としてアデニレートキナーゼに応用した。アデニレートキナーゼの構造揺らぎがフォールディング/アンフォールディング過程と類似していることを示し、構造転移の遷移状態についての新しい物理的描像を提案した。また、この方法を DHFR に適用し、基質の化学反応と蛋白質の構造変化とくにループ領域の構造乱れが共役して起こる様子を記述した。(ii) アクトミオシンの粗視化モデルを開発し、ATP 加水分解の各ステップおよびミオシンの構造変化の各ステップにおいて自由エネルギーランドスケープを計算し、ミオシンの並進運動、及びレバーアーム運動と化学反応の関係を解析し、レバーアーム模型と偏りのあるブラウン運動模型の2つを統一して考える描像の構築に向けて、シミュレーションを行った。
- b) 生体分子ネットワーク理論について、(i) 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。とくに、その効果を個数と DNA 状態変化の両方を表現する空間中の渦として可視化し、ノイズの物理的起原を明確にした。(ii) 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持つことを数値的に示した。分化に伴う細胞状態間の遷移過程を表すエピジェネティックランドスケープを定量的に計算し、ランドスケープの構造と、ランドスケープの持つ非平衡速度流の構造が分化プロセスに大きな影響を与えることを示した。
- c) 間期の1倍体出芽酵母の核内にある16本すべての染色体の動きを解析する、分子動力学計算法を開発し、改良を行った。テロメアの核膜へのアンカーを壊す変異体では、

染色体はより自由に運動すると考えられるが、そのときの各遺伝子部位の離合・集散と遺伝子発現レベルの変動の関係についての解析を行った。

4) 学術論文

N. Tokuda, T. P. Terada, and M. Sasai, "Dynamical modeling of 3D genome organization in interphase budding yeast" **102**, 296-304 (2012).

Nishimura, S. I. Ueda, M. and M. Sasai, "Non-Brownian dynamics and strategy of amoeboid cell locomotion" *Phys. Rev. E*, **85**, 041909_1-8 (2012).

5) 著書、総説

笹井理生、寺田智樹、生体分子のつくるシステム「ゲノム系計算科学（計算科学講座第7巻）」、共立出版、美宅成樹編、173-219 ページ（2013）

6) 国際会議発表リスト

M. Sasai, "Non-adiabatic switching in eukaryotic gene regulation" The Gordon Research Conference on Stochastic Physics in Biology, Ventura (USA), January 2013.

N. Tokuda, M. Sasai, "Effects of fluctuation of chromosome conformation and spatial arrangement of genes on the pattern of gene expression" Biophysical Society 57th Annual Meeting, Philadelphia (USA), February 2013.

7) 招待講演

M. Sasai, "Slow dynamics of chromatin and non-adiabatic gene switches" Characterizing Landscapes: From Biomolecules to Cellular Networks Schedules, Telluride (USA) June 2012.

笹井理生 「Kai 蛋白質振動系における理論的課題」日本蛋白質科学会年会、名古屋、2012年6月.

笹井理生 "Consistency principle of protein conformation and its extension" 第50回生物物理学会年会、名古屋、2012年9月.

M. Sasai, "Structure of free energy surfaces of protein folding and function" Workshop on Molecular Functional Dynamics: Fundamental to Life Activity, Okazaki(Japan), October 2012

M. Sasai, "Revisiting the consistency principle of protein conformational change" 12th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul(Korea) October 2012.

M. Sasai, "Heterogeneous dynamics and fluctuations in biomolecular networks" RIKEN Quantitative Biology Center Inaugural Symposium "Towards Whole-Cell Modeling", Kobe (Japan), November 2012.

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

KIAS Scholar, Korea Institute for Advanced Study, Seoul, Korea

11) 外部獲得資金

科研費基盤研究(A)、「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）.

科研費挑戦的萌芽研究、平成 23-25 年度、「E S 細胞における動的遷移と統計物理」、笹井理生（代表）（2011年-2013年）.

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生体内の恒常性維持に必須の役割を持ち、欠乏は重篤な疾患に繋がる。ステロイドホルモンは、副腎ステロイド、黄体ホルモン、男性ホルモン、女性ホルモンに大別され、それぞれ「ホルモン依存的な転写制御因子」であるステロイドホルモン受容体を介して生理機能を発揮する。このステロイドホルモン受容体遺伝子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。私たちの研究グループは様々な進化段階の生物種からステロイドホルモン受容体遺伝子の単離を試み、分子進化・機能進化の解明を目指している。今回、軟骨魚類であるゾウギンザメ(全頭類に属する)から、女性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体の単離を試みた。その結果、2種類のエストロゲン受容体を持っている事を明らかにした。これら2種類はそれぞれ高等脊椎動物が持つアルファ型およびベータ型の受容体に相当する。これまで、軟骨魚類ではベータ型の受容体のみが単離されていたが、今回の成果から既に軟骨魚類の進化段階で、2種類のエストロゲン受容体を有する事を初めて示す事ができた。さらに、機能解析の結果、ベータ型は通常のエストロゲン受容体と同じく、ホルモン依存的な転写活性を持つ事を確認した。しかし、アルファ型受容体はホルモンが無い状態でも転写活性を有する事が判明した。これは受容体蛋白質のN末側のA/B領域によると考えられた。今後、生物進化に伴いどのようにホルモン依存性能を獲得したのかを解明すると共に、発現解析や標的遺伝子の探索等の解析により生体内での機能の解明にも取り組む予定である。

b) 爬虫類に分類される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するというユニークな性決定機構をもつ。この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。私たちの研究グループは性決定・性分化メカニズムへのダイオキシン受容体の関与を想定し、ワニからダイオキシン受容体及びコアクチベーターであるArntの遺伝子単離を行なった。これまで爬虫類では判明していなかった3種類のダイオキシン受容体と2種類のArntの単離に成功した。実際に、リガンドとして用いられる3-メチルコラントレンやインディゴによって転写活性が増加する事を確認した。またその特異性や活性の強さは、受容体とコアクチベーターの組み合わせによって変動する事も判明した。さらに性分化関連遺伝子との関係を調べたところ、卵巣の分化に必要とされるエストロゲンの合成酵素であるアロマターゼ遺伝子の転写を調節している事を示唆する結果を得た。この結果は、ワニの性決定時期におけるダイオキシン受容体の関与を示唆する初めての成果であり、今後、ダイオキシン受容体がどのように

アロマターゼ遺伝子の転写調節を行っているのかを詳細に解析すると同時に、温度依存的な性決定機構の全体像の解明に迫りたい。

4) 学術論文

A. Lange*, Y. Katsu*, S. Miyagawa, Y. Ogino, H. Urushitani, T. Kobayashi, T. Hirai, JA. Shears, M. Nagae, J. Yamamoto, Y. Ohnishi, T. Oka, N. Tatarazako, Y. Ohta, CR. Tyler, T. Iguchi (* These authors contributed equally), “Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring” *Aquat. Toxicol.*, **109**, 250-258 (2012).

I. Hirakawa, S. Miyagawa, Y. Katsu, Y. Kagami, N. Tatarazako, T. Kobayashi, T. Kusano, T. Mizutani, Y. Ogino, T. Takeuchi, Y. Ohta, T. Iguchi, “Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol” *Chemosphere*, **87**, 668-674 (2012).

T. Nakamura, S. Miyagawa, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Mizutani, T. Sato, KI. Morohashi, T. Takeuchi, T. Iguchi, Y. Ohta, “Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice” *Toxicology*, **296**, 13-19 (2012).

T. Nakamura, S. Miyagawa, Y. Katsu, T. Sato, T. Iguchi, Y. Ohta, “Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure” *In vivo*, **26**, 899-906 (2012).

T. Nakamura, S. Miyagawa, Y. Katsu, T. Mizutani, T. Sato, T. Takeuchi, T. Iguchi, Y. Ohta, “P21 and Notch signalings in the persistently altered vagina induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice” *J. Vet. Med. Sci.*, **74**, 1589-1595 (2012).

7) 招待講演

勝 義直「エストロゲン受容体の分子進化と機能進化」、日本進化学会第 14 回東京大会、首都大学東京南大沢キャンパス、2012 年 8 月

11) 外部獲得資金

科学研究費補助金 基盤研究 (C) 「生物進化に伴うエストロゲン受容体の遺伝子重複と機能獲得の解明」、勝 義直 (代表) (2011 年- 2013 年)

公益財団法人 クリタ水・環境科学振興財団 研究助成「医薬品類による水環境汚染を調査する簡易バイオアッセイ法の確立」勝 義直 (代表) (2012 年- 2013 年)