

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：

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 **細胞外温度依存性の TRPM8 活性化温度閾値変化の解析**: 30 度のときには TRPM8 の冷刺激による活性化温度閾値が約 28 度で、40 度のときにはその活性化温度閾値が約 35 度まで上昇することが分かった。この活性化温度の閾値変化は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) 依存的であることを見いだした。また、human TRPM8 の 1008 番目のアルギニンがこの PIP₂ の作用に関わることが、点変異体解析によって明らかになった。同じ温度の水を、それ以前に曝露されていた温度によってより冷たく感じたり、より温かく感じたりする現象 (ウェーバーノ 3 ボトル実験) が末梢感覚神経末に発現するメントール受容体 TRPM8 の PIP₂ の依存的な活性化温度閾値の変化で説明できるかもしれないと考えられた (J. Neurosci., 2013)。

② **TRPA1 スプライスバリエントによる機能制御機構の解析**: マウス感覚神経に Exon20 を欠失したスプライスバリエント TRPA1b を見いだした。TRPA1b は full length TRPA1 (TRPA1a) と結合して TRPA1a の細胞膜移行を促進し、TRPA1 の機能を増強させていることが分かった。また、マウスの炎症性疼痛モデルと神経障害性疼痛モデルにおいて、TRPA1 欠損マウスでは有意に機械刺激痛覚過敏が減弱しており、TRPA1 が炎症性疼痛および神経障害性疼痛発生に関わっていることが分かった。さらに、TRPA1a 遺伝子の発現増加は一過的であったが、TRPA1b 遺伝子は持続的に増加しており、この TRPA1b の増加が TRPA1 機能増強を介して炎症性疼痛および神経障害性疼痛発生をもたらしているものと考えられた (Nature Commun., 2013)。

③ **亜鉛イオンによる TRPM5 の機能抑制機構の解析**: 細胞外亜鉛イオン (Zn²⁺) が細胞内 Ca²⁺ 濃度増加によって活性化した TRPM5 電流を生理的濃度域で濃度依存的に抑制することがわかった。また、温度によって増大した TRPM5 電流も抑制した。この細胞外 Zn²⁺ による抑制はポア阻害作用によらないことがわかったが、ポアループの複数のアミノ酸が関与していることが、点変異体解析によって明らかになった (J. Biol. Chem.,

2013)。

4) 学術論文

F. Fujita, K. Uchida, M. Takaishi, T. Sokabe and M. Tominaga, "Ambient temperature affects the temperature threshold for TRPM8 activation through interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate" *J. Neurosci.* **33**, 6154-6159 (2013).

S. Miura, K. Takahashi, T. Imagawa, K. Uchida, S. Saito, M. Tominaga and T. Ohta, "Involvement of TRPA1 activation in acute pain induced by cadmium in mice" *Mol. Pain* **9**, 7 (2013).

T. Mannari, S. Morita, E. Furube, M. Tominaga and S. Miyata, "Sensing of Blood-Derived Information by Astrocytic TRPV1 in the Sensory Circumventricular Organs of Adult Mouse Brains" *Glia* **61**, 957-971 (2013).

H. Ota, K. Katanosaka, S. Murase, M. Kashio, M. Tominaga and K. Mizumura, "TRPV1 and TRPV4 play pivotal roles in delayed onset muscle soreness" *PLoS ONE* **8**, e65751 (2013).

S. Oda, K. Uchida, X. Wang, J. Lee, Y. Shimada, M. Tominaga and M. Kadowaki, "TRPM2 contributes to antigen-stimulated Ca²⁺ influx in mucosal mast cells" *Pflüger Archiv. Eur. J. Physiol.* **465**, 1023-1030 (2013).

S. Tabuchi, T. Tsunematsu, T.S. Kilduff, S. Sugio, M. Xu, K.F. Tanaka, S. Takahashi, M. Tominaga M and A. Yamanaka, "Influence of inhibitory serotonergic inputs to orexin/hypocretin neurons on the diurnal rhythm of sleep and wakefulness" *SLEEP* **36**, 1391-1404 (2013).

Y. Zhou, Y. Suzuki, K. Uchida and M. Tominaga, "Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity" *Nat. Commun.* **4**, 2408 (2013).

K. Uchida and M. Tominaga, "Extracellular zinc ion regulates TRPM5 activation through its interaction with a pore loop domain" *J. Biol. Chem.* **288**, 25959-25955 (2013).

T. Tsunematsu, S. Tabuchi, K.F. Tanaka, E.S. Boyden, M. Tominaga and A. Yamanaka, "Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice" *Behav. Brain Res.* **255C**, 64-74 (2013).

K. Nakatsuka, R. Gupta, S. Saito, K. Takahashi, M. Tominaga and T. Ohta, "Identification of molecular determinants for a potent mammalian TRPA1 antagonist by using species differences" *J. Mol. Neurosci.* **51**, 754-76 (2013).

5) 著書、総説

西本れい, 富永真琴 "Transient Receptor Potential (TRP)と臨床麻酔" *臨床麻酔* **3**, 339-347 (2013).

富永真琴, "寒冷時に指先が痛くなる理由" *日本医事新報* **4647**, 66-67 (2013).

富永真琴, "温度感受性 TRP チャネルと疾患" *医学のあゆみ* **245**, 831-837. (2013).

- 富永真琴, "皮膚の温度受容体の機能と製品開発" *FRAGRANCE JOURNAL* **7**, 53-57 (2013).
- 富永真琴, "植物由来の食品成分と温度感受性 TRP チャネル" *化学と生物* **51**, 592-594 (2013).
- 富永真琴, "温度感受性 TRP チャネル" *生体の科学* **64**, 436-437 (2013).
- 富永真琴, "TRP チャネル (TRPV1, TRPA1) の慢性疼痛への関与と鎮痛" *臨床整形外科* **48**, 1175-1178 (2013).
- 富永真琴, "TRP チャネルとかゆみ・痛みの関係—治療への応用を踏まえて" *Derma No.* **212**, 11-16 (2013).
- 鈴木喜郎, "カルシウム輸送体 TRPV5/6 の機能と異常" *腎と骨代謝* **26**, 175-180 (2013).

6) 国際会議発表リスト

- M. Tominaga**, "Nociception and TRP channels" Joint symposium on Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica & Tzu Chi University, Hualien (Taiwan), March 2013.
- M. Tominaga**, "Physiological Function of TRPV4 in choroid plexus" 8th International Conference for Neurons & Brain Diseases, Singapore (Singapore), July 2013.
- S. Saito**, "Functional evolution of noxious temperature and chemical receptors, TRPA1 and TRPV1, in vertebrates" SMBE2013 annual meeting of Society for Molecular Biology and Evolution, Chicago (USA) July 2013.
- M. Tominaga**, "Functional Regulation of TRPM5 and TRPA1" The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of taste and Olfactory Perception, Fukuoka (Japan), October 2012.
- M. Tominaga**, "Molecular mechanisms of nociception through TRPA1 activation" The 44th NIPS International Symposium & the 5th Asian Pain Symposium, Okazaki (Japan), December 2013.
- Y. Zhou**, "Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity" The 44th NIPS International Symposium & the 5th Asian Pain Symposium, Okazaki (Japan), December 2013.
- M. Takaishi**, "1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. The 44th NIPS International Symposium & the 5th Asian Pain Symposium, Okazaki (Japan), December 2013.

7) 招待講演

- M. Tominaga**, "Nociception and TRP channels" Joint symposium on Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica & Tzu Chi University, Hualien (Taiwan), March 2013.
- 富永真琴「TRP チャネルと安全性薬理」、第4回日本安全性薬理研究会学術集会、東京、2013年2月。
- 富永真琴「温度感受性 TRP チャネルと皮膚・免疫機能」、第24回多摩アレルギー懇話会、東京、2013年5月。
- 富永真琴「温度感受性 TRP チャネルによる温度受容・侵害受容」、第156回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013年9月。
- M. Tominaga**, "Functional Regulation of TRPM5 and TRPA1" The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of taste and Olfactory Perception, Fukuoka

(Japan), October 2012.

富永真琴「侵害受容の分子機構」、第43回日本臨床神経生理学会学術大会、東京、2013年11月.

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

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、「マウス TRPA1 スプライスバリエントの病態生理学的意義は何か?」、富永真琴 (代表) (2013-2014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)

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 チャネルを介した免疫機構の研究」富永真琴 (代表) (2012-2014年)

科学研究費 若手研究 (B)、「温度感受性 TRP チャネルの活性化への温度依存的な細胞膜脂質流動性変化の関与」、内田邦敏 (代表) (2013年-2014年)

科学研究費 若手研究 (B)、「ミクログリア機能への温度センサーTRPM2 の寄与」、加塩麻紀子 (代表) (2013年-2014年)

科学研究費 若手研究 (B)、“Roles of spinal dorsal horn TRP channels in neuropathic pain”、周一鳴 (代表) (2013年-2014年)

科学研究費 特別研究員奨励費、「I 型糖尿病における TRPA1、TRPM2 チャネル関与の検討」富永真琴 (代表) Derouiche Sandra (分担) (2013年-2015年)

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) 核内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関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、紡錘糸を構成する 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糸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。このミジンコの生殖機構の分子メカニズム解明のため、遺伝子の機能解析手法の開発に着手した。まず、初期胚に対してマイクロインジェクションが行えるよう条件検討を行った。その結果、マイクロインジェクションを用いた RNA 干渉法の確立に成功し、現在は人工制限酵素 TALEN を用いた突然変異体の作出に取り組んでいる。並行して、作出の

見込まれる変異体系統の維持に役立つ単為発生卵の凍結保存技術の確立を目指した研究を進めている。

- 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。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) 核内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、ジンベイザメ、）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。またメダカ尻鰭二次性徴発現過程において、アンドロゲンのエフェクター因子として、Bmp7や Lef1 が重要な役割を果たしていることを見出している。

4) 学術論文

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 (2013).

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).

- 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*, **121**, 94-101 (2013).
- T. Katoh, S. Hayashi, T. Iguchi and T. Sato**, ”Epithelial-stromal interactions in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol” *In Vivo*, **27**, 333-337 (2013).
- K. Toyota, Y. Kato, M. Sato, N. Sugiura, S. Miyagawa, H. Miyakawa, H. Watanabe, S. Oda, Y. Ogino, C. Hiruta, T. Mizutani, N. Tatarazako, S. Paland, C. Jackson, J.K. Colbourne and T. Iguchi**, “Molecular cloning of doublesex genes of four cladocera (water flea) species” *BMC Genomics*, **14**, 239 (2013).
- H. Miyakawa, K. Toyota, I. Hirakawa, Y. Ogino, S. Miyagawa, S. Oda, N. Tatarazako, T. Miura, J.K. Colbourne and T. Iguchi**, “A mutation in the Methoprene tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans” *Nature Commun.*, **4**, 1856 (2013).
- S.W. Jeong, Lee, S.S. Yum, T. Iguchi and Y.R. Seo**, “Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in *Daphnia magna* in terms of reproductive activity” *Mol. Cell. Toxicol.*, **9**, 149-158 (2013).
- T. Oka, N. Mitsui-Watanabe, N. Tatarazako, Y. Onishi, Y. Katsu, S. Miyagawa, Y. Ogino, R. Yatsu, S. Kohno, T. 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.*, **33**, 991-1000 (2013).
- 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 17 α -ethinylestradiol” *J. Appl. Toxicol.*, **33**, 1001-1010 (2013).
- H. Urushitani, Y. Katsu, Y. Ohta, H. Shiraishi, T. Iguchi and T. Horiguchi**, “Cloning and characterization of the retinoic acid receptor-like protein in the rock shell, *Thais clavigera*” *Aquat. Toxicol.*, **142-143C**: 403-413 (2013).
- C. Hiruta, K. Toyota, H. Miyakawa, Y. Ogino, S. Miyagawa, N. Tatarazako, J.R. Shaw and T. Iguchi**, “Development of a microinjection system for RNA interference in the water flea *Daphnia pulex*” *BMC Biotechnol.*, **13**, 96 (2013).
- K. Kakui, C. Hiruta**, “Selfing in a malacostracan crustacean: why a tanaidacean but not decapods” *Naturwissenschaften*, **100**, 891-894 (2013).
- Y. Naraki, C. Hiruta, S. Tochinai**, “Identification of the precise kairomone-sensitive period and histological characterization of necktooth formation in predator-induced polyphenism in *Daphnia pulex*” *Zool. Sci.*, **30**, 619-625(2013).
- H. Miyakawa, H. Gotoh, N. Sugimoto and T. Miura**, “Effect of juvenoids on predator-induced polyphenism in the water flea, *Daphnia pulex*” *J. Exp. Zool. Part A*, **319A**, 440-450 (2013).

- A. Hattori, Y. Sugime, C. Sasa, H. Miyakawa, Y. Ishikawa, S. Miyazaki, Y. Okada, R. Cornette, L. C. Lavine, D. J. Emlen, S. Koshikawa, T. Miura**, “Soldier morphogenesis in the damp-wood termite is regulated by the insulin signaling pathway” *J. Exp. Zool. Part B*, **320**, 295-306 (2013).
- H. Gotoh, H. Miyakawa, A. Ishikawa, Y. Ishikawa, Y. Sugime, D.J. Emlen, L.C. Lavine, T. Miura**, “Developmental link between sex and nutrition; *doublesex* regulates sex-specific mandible growth via juvenile hormone signaling in stag beetles” *PLoS Genet.*, **10**, e1004098 (2014).
- Y. Ogino, I. Hirakawa, K. Inohaya, E. Sumiya, S. Miyagawa, N. Tatarazako, N. Denslow, G. Yamada and T. Iguchi**, “Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka. *Endocrinology*, **155**, 449-462 (2014).
- C. Hiruta, S. Tochinai**, “Formation and structure of the ephippium (Resting egg case) in relation to molting and egg laying in the water flea *Daphnia pulex* De Geer (Cladocera: Daphniidae)” *J. Morphol.*, (in press).
- K. Toyota, Y. Kato, H. Miyakawa, R. Yatsu, T. Mizutani, Y. Ogino, S. Miyagawa, H. Watanabe, H. Nishide, I. Uchiyama, N. Tatarazako and T. Iguchi**, “Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*” *J. Appl. Toxicol.*, (in press).
- A. Nakamura, H. Takanobu, I. Tamura, M. Yamamuro, T. Iguchi and N. Tatarazako**, “Verification of responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to antiandrogens, vinclozolin and flutamide, in short-term assays” *J. Appl. Toxicol.*, (in press).
- M. Ichikawa, E. Murai, Y. Hashiguchi, T. Iguchi and T. Sato** “Effects of diethylstilbestrol (DES) on luteinizing hormone-producing cells in the mouse anterior pituitary” *Exp. Biol. Med.*, (in press).
- A. Nakamura, H. Takanobu, I. Tamura, M. Yamamuro, T. Iguchi and N. Tatarazako** “Fish multi-generation test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*)” *J. Appl. Toxicol.*, (in press).
- R. Abe, H. Watanabe, M. Yamamuro, T. Iguchi and N. Tatarazako** “Establishment of a short-term *in vivo* screening method for detecting chemicals having juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*” *J. Appl. Toxicol.*, (in press).
- H. Batia, A. Kumar, Y. Ogino, J. Du, A. Gregg, J. Chapman, M. McLaughlin and T. Iguchi** “Adult male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) as a test model to assess anti-androgenic effects of flutamide in the Australian rivering environment” *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).
- H. Batia, A. Kumar, Y. Ogino, A. Gregg, J. Chapman, M. McLaughlin and T. Iguchi**, “Di-n-butyl phthalate causes estrogenic effects in adult male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*)” *Aquat. Toxicol.*, (in press).

S. Miyagawa, M. Harada, D. Matsumaru, K. Tanaka, C. Inoue, C. Nakahara, R. Haraguchi, S. Matsushita, K. Suzuki, N. Nakagata, R.C. Ng, K. Akita, V.C. Lui, G. Yamada “Disruption of the temporally regulated cloaca endodermal β -catenin signaling causes anorectal malformations” *Cell Death Differ.*, (in press).

S. Miyagawa, M. Sato, T. Sudo, G. Yamada and T. Iguchi “Unique roles of estrogen-dependent Pten control in epithelial cell homeostasis of mouse vagina” *Oncogene*, (in press).

5) 著書、総説

Å. Bergman, J.J. Heindel, K.A. Kidd, S. Jobling, R.T. Zoeller, G. Becher, P. Bjerregaard, R. Bornman, I. Brandt, J.V. Brian, A. Kortenkamp, D. Muir, R. Ochieng, N.E. Skakkebaek, T. Iguchi, J. Toppari, T.J. Woodruff “State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals” 2012. pp. 260, WHO and UNEP (2013).

Å. Bergman, J.J. Heindel, K.A. Kidd, S. Jobling, R.T. Zoeller, G. Becher, P. Bjerregaard, R. Bornman, I. Brandt, J.V. Brian, A. Kortenkamp, D. Muir, R. Ochieng, N.E. Skakkebaek, T. Iguchi, J. Toppari, T.J. Woodruff “The impact of endocrine disruption: A consensus statement on the state of the science” *Environ. Health Perspect.*, **121**, A104-106 (2013).

H.C. Stolzenberg, T. Frische, V.L. Dellarco, G. Timm, A. Gourmelon, T. Iguchi, F. Ingerslev, M. Roberts “The regulatory need for tests to detect EDCs and assess their hazards to wildlife 59” In: *Endocrine Disruptors: Hazard Testing and Assessment Methods*, Matthiessen, P. (ed.) Wiley, pp. 59-99 (2013).

Å. Bergman, A.M. Andersson, G. Becher, M. van den Berg, B. Blumberg, P. Bjerregaard, C.G. Bornehag, R. Bornman, I. Brandt, J.V. Brian, S.C. Casey, P.A. Fowler, H. Frouin, L.C. Giudice, T. Iguchi, U. Hass, S. Jobling, A. Juu, K.A. Kidd, A. Kortenkamp, M. Lind, O.V. Martin, D. Muir, R. Ochieng, N. Olea, L. Norrgren, E. Ropstad, P.S. Ross, C. Rudén, M. Scheringer, N.E. Skakkebaek, O. Söder, C. Sonnenschein, A. Soto, S. Swan, J. Toppari, C.R. Tyler, L.N. Vandenberg, A.M. Vinggaard, K. Wiberg, R.T. Zoeller “Science and policy on endocrine disruptors must not be mixed: a reply to a “common sense” intervention by toxicology journal editors” *Environ. Health*, **12**, 69 (2013).

C. Hiruta, K. Toyota, H. Miyakawa, E. Sumiya, 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: El-Doma, M (ed.) *Daphnia: Biology and Mathematics Perspectives*, Nova Science Publishers, (in press).

H. Miyakawa, T. Iguchi, T. Miur, “Developmental process of defensive morph in *Daphnia pulex*” In: El-Doma, M (ed.) *Daphnia: Biology and Mathematics Perspectives*. Nova Science Publishers, (in press).

S. Kohno, B.B. Parrott, R. Yatsu, S. Miyagawa, B.C. Moore, T. Iguchi, L.J. Guillette Jr. “Gonadal differentiation in reptiles exhibiting environmental sex determination” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, (in press).

- 井口泰泉, 岩波生物学辞典第5版、巖佐庸、倉谷滋、齋藤成也、塚谷雄一 (編) (2013).
- 宮川一志、蛭田千鶴江、豊田賢治、角谷絵里、荻野由紀子、宮川信一、鑪迫典久、井口泰泉, “ミジンコ類における環境依存型性決定を制御する分子機構” 比較内分泌学, **39** (149), 106-111 (2013).
- 井口泰泉, 巻頭言“内分泌かく乱物質問題の新たな動き” 環境ホルモン学会ニュースレター, **15** (1), 1 (2013).
- 井口泰泉, 研究最前線 “内分泌かく乱物質問題に対するWHO・UNEPの報告書” 環境ホルモン学会ニュースレター, **15** (1), 2 (2013).
- 宮川信一、井口泰泉, “第4章 環境ホルモン” 排水・汚水処理技術集成 Vol. 2, エヌ・ティイー・エス, 49-57 (2013).
- 宮川一志、豊田賢治、宮川信一、鑪迫典久、井口泰泉, 研究最前線“ミジンコの幼若ホルモン受容体遺伝子の解明” 環境ホルモン学会ニュースレター, **16** (2), 2 (2013).
- 井口泰泉, 共著「環境年表平成25・26年」国立天文台編, 丸善, pp. 454 (2013).

6) 国際会議発表リスト

- K. Petersen, M.T. Cronin, Ø. Evensen, F. Falciani, N. Garcia-Reyero Vinas, T. Høgåsen, T. Iguchi, K. Langford, A. Lillicrap, E.J. Perkins, B. Salbu, I. Sylte and K.E. Tollefsen** “Development of adverse outcome pathways for endocrine disruption in *Daphnia magna*” 17th Pollutant Responses in Marine Organisms (*PRIMO*) Congress, University of Algarve, Faro, Portugal, May 5-8 (2013)
- A. Lange, S. Miyagawa, J. Corcoran, P. Rostkowski, J. Horwood, E.M. Hill, T. Iguchi and C.R. Tyler** “Transactivation nuclear receptor bioassays inform on relative chemical potencies and interspecies differences for endocrine disrupting chemicals in teleosts” 17th Pollutant Responses in Marine Organisms (*PRIMO*) Congress, University of Algarve, Faro, Portugal, May 5-8 (2013).
- T. Iguchi**, “Aquatic environments and endocrine activity: The regulatory approach in Japan” SETAC Europe 23rd Ann. Meet. Glasgow, UK, May 12-16 (2013).
- Y. Ohta, S. Miyagawa and T. Iguchi** “External genitalia development in male and female rats given flutamide *in utero*” SETAC Europe 23rd Ann. Meet. Glasgow, UK, May 12-16 (2013).
- T. Iguchi, K. Toyota, H. Miyakawa, C. Hiruta, Y. Ogino, S. Miyagawa and N. Tatarazako** “Environmental sex determination of water flea, *Daphnia magna*” 17th International Congress of Comparative Endocrinology (*ICCE 2013*), Facultat de Biologia at the Universitat de Barcelona, July 15-19 (2013).
- H. Miyakawa, K. Toyota, I. Hirakawa, Y. Ogino, S. Miyagawa, S. Oda, N. Tatarazako, T. Miura, J.K. Colbourne, T. Iguchi** “A Single amino acid substitution in the Methoprene-tolerant (Met) alters juvenile hormone use by insects and crustaceans”. Insect Hormones International Workshop, McNamara Center, University of Minnesota, USA, July

21-26 (2013).

E. Sumiya, Y. Ogino, H. Miyakawa, C. Hiruta, K. Toyota, S. Miyagawa, T. Iguchi

“Ecdysteroids are involved in regulatory mechanism of a reproductive cycle in *D. magna*”
Daphnia Genome Consortium, Birmingham University, January 20-22 (2014).

C. Hiruta, S. Tochinnai, T. Iguchi, “Abortive meiosis found in the oogenesis of parthenogenetic

Daphnia pulex” EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22 (2014).

C. Hiruta, K. Toyota, H. Miyakawa, S. Miyagawa, Y. Ogino, N. Tatarazako, J.R. Shaw, D.

Tanaka, T. Iguchi, “Approach to establishing tools for gene functional analysis and cryopreservation in *Daphnia pulex*”. EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22 (2014).

S. Miyagawa, K. Toyota, H. Miyakawa, C. Hiruta, Y. Kato, H. Watanabe, N. Tatarazako, S.

Paland, C. Jackson, J.K. Colbourne, T. Iguchi, “Cloning and their expression pattern of doublesex genes of cladocera” EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22 (2014).

K. Toyota, H. Miyakawa, C. Hiruta, E. Sumiya, Y. Ogino, S. Miyagawa, T. Iguchi “Analysis of

juvenile hormone as a sex-determining hormone in *Daphnia pulex*”. EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22 (2014).

H. Miyakawa, K. Toyota, I. Hirakawa, Y. Ogino, S. Miyagawa, S. Oda, N. Tatarazako, T.

Miura, J.K. Colbourne, T. Iguchi “A single amino acid substitution in the Methoprene-tolerant (Met) alters juvenile hormone use by insects and crustaceans”. EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22 (2014).

7) 招待講演

T. Iguchi, S. Miyagawa, Y. Ogino, Y. Ohta, S. Kohno and L.J. Guillette Jr. “Establishment of

transactivation assay systems using thyroid hormone receptors from various animal species and identification of marker genes of testis-ova in *Oryzias latipes* and *Silurana tropicalis*”
International Symposium for Toxicity Assessment (IST16), Cape Town, South Africa, February 22-25 (2013).

T. Iguchi “Toxicogenomics and environmental sex determination in *Daphnia magna*”, 9th

International Conference on Toxicogenomics-2013, Seoul, Korea, October 14-15 (2013).

井口泰泉”ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析”化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー, 東京国際交流会館、12月13日 (2013).

荻野由紀子、井口泰泉, “アンドロゲン受容体遺伝子の進化と雄性形質発現の分子機構”

岡山大学、9月27日 (2013)

8) 学会および社会的活動

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

環境保全功労者表彰 (6月29日)

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

熊本大学 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) (2009年-2014年)

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) (2013年)

環境省 基盤研究「ゼノパスを用いた甲状腺ホルモンかく乱作用のためのアッセイ系の検討」井口泰泉 (代表) (2013年)

厚生労働省 科学研究費補助金「化学物質の子どもへの影響評価に関する研究 - 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、それに基づく試験スキームの最適化」井口泰泉 (分担) (2011年-2013年)

科学研究費 基盤研究(B)「節足動物及び脊椎動物を用いた環境に依存する性決定機構の解明」(代表) (2012-2014)

科学研究費 挑戦的萌芽研究「生殖細胞解析のための遺伝子改変ミジンコの作製とモデル化」井口泰泉 (代表) (2012年-2013年)

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」井口泰泉（分担）（2011年-2013年）

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」井口泰泉、宮川信一（分担）（2011年-2013年）

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」荻野由紀子（代表）（2011年-2013年）

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」蛭田千鶴江（2012年-2014年）

科学研究費 特別研究員奨励費「オオミジンコ(*Daphnia magna*)の環境性決定機構の解明」豊田賢治（2012年-2014年）

科学研究費 特別研究員奨励費「脊椎動物における温度依存型性決定初期因子、及び下流シグナルネットワークの解明」谷津遼平（2013年-2015年）

バイオセンシング研究領域
(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) 新規なセンサー型転写調節因子の構造と機能に関する研究
- b) 細胞内の遷移金属イオンの恒常性維持に関与するタンパク質の構造機能相関解明

3) 研究活動の概略と主な成果

- a) ヘム (鉄ポルフィリン錯体)、およびビタミンB12 (コバラミン錯体) は、代表的な遷移金属含有型補欠分子族であり、タンパク質中に存在するこれらの分子が活性中心として機能することにより、多様な生理機能を発現することはよく知られている。ヘムタンパク質に関する研究は、これまでに数多く報告されており、新規な研究対象とはならないと考えられがちであるが、近年になって、ヘムおよびヘムタンパク質の新規な生理機能が次々と報告され始め、多くの研究者の注目を集めている。それらの代表的な例として、酸素、CO、NOなどのガス分子に対するセンサーとしての機能を有し、遺伝子発現制御、走化性制御、セカンドメッセンジャーの合成・分解を介した多様な生理機能制御などに関与する一群のヘムタンパク質がある。ガス分子センサータンパク質においては、分子中に組み込まれたヘムがセンサー活性中心として機能することにより、新規な生理機能を発現している。当研究室でもこれまでの研究において、ヘムを活性中心とする一連のガス分子センサータンパク質の構造機能相関解明に関する研究を行ってきた。また近年、遷移金属イオン・遷移金属含有補欠分子族の新規な生理機能として、こららが生体系におけるシグナルセンシング・シグナル伝達に関与している例が報告され、生物無機化学の新たな研究対象として大きな注目を集めている。本研究では、ビタミンB12 (コバラミン) をセンサー活性中心として利用している、新規な光センサー型転写調節因子CarH、ヘム (鉄プロトポルフィリン) 分子をシグナル分子とする新規な転写調節因子HrtRおよびPefRを研究対象とし、これらセンサー型転写調節因子による光・ヘム分子センシング、外部シグナル (光、ヘム分子) によるセンサー型転写調節因子の機能制御、ならびに外部シグナルに応答した遺伝子発現制御の分子機構解明を目的とした研究を行っている。
- b) 鉄、銅、コバルト等の遷移金属イオンは、必須微量元素として生物には必須のものであり、その濃度が不足した場合には欠乏症による不具合がある一方で、必要量以上の遷移金属イオンが細胞内に存在すると細胞毒性を示す。したがって、生物は細胞内の遷移金属イオン濃度を適正に維持し、その恒常性を保つために精緻な制御システムを発達させている。また、細胞内では金属イオンのみならず、ヘムや鉄硫黄クラスターといった金属イオン含有型補欠分子族についても厳密な制御システムが存在している。本研究では、このような制御系の中でも特に、鉄含有補欠分子族であるヘムの細胞内濃度制御に関わるヘム輸送タンパク質、ならびに遷移金属イオンセンサーとして機能する一連の転写調節因子を対象とし、それらの構造機能相関の解明を目的とした研究を行っている。

4) 学術論文

K. Nakatani, H. Ishikawa, S. Aono and Y. Mizutani, "Heme-binding properties of heme detoxification protein from *Plasmodium falciparum*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439,**

477-480 (2013).

T. Isida and S. Aono, “A model theoretical study on ligand exchange reactions of CooA” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 6139-6148 (2013).

5) 総説, 著書

S. Aono, “The Dos family of globin-related sensors using PAS domains to accommodate haem acting as the active site for sensing external signals” *Adv. Microbial Physiol.* **63**, 273-327 (2013).

6) 国際会議発表リスト

S. Aono, “Signal sensing and signal transduction in heme sensor proteins” 223rd The Electrochemical Society Meeting, (Toronto, Canada), May 2013.

S. Aono, H. Sawai, M. Yamanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, “Transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” International Bio-iron Meeting 2013, (London, UK), April, 2013.

S. Aono, H. Sawai, M. Yamanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis” 4th International Symposium on Metallomics (Oviedo, Spain), July, 2013.

H. Ishikawa, K. Nakatani, S. Aono, Y. Mizutani, “Identification of active-site residues in heme detoxification protein” 16th International Biological Inorganic Chemistry (Grenoble, France), July, 2013.

A. Otomo, H. Ishikawa, M. Mizuno, Y. Mizutani, S. Aono, “Structural changes in the heme and heme pocket upon CO dissociation of CooA observed by time-resolved resonance Raman spectroscopy” 16th International Biological Inorganic Chemistry (Grenoble, France), July 2013.

A. Pavlou, E. Pinakoulaki, H. Yoshimura, S. Aono, “Protein conformational dynamics and kinetic properties of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT as revealed by time-resolved step-scan FTIR spectroscopy” 16th International Biological Inorganic Chemistry (Grenoble, France), July, 2013.

H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Aono, “Molecular mechanisms of the transcriptional regulation by heme sensing” 16th International Biological Inorganic Chemistry (Grenoble, France), July, 2013.

S. Aono, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” 6th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, (Okazaki, Japan), November, 2013.

7) 招待講演

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

S. Aono, “Signal sensing and signal transduction in heme sensor proteins” 223rd The Electrochemical Society Meeting, Tronto (Canada), May 2013.

S. Aono, “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2” 6th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Okazaki (Japan), November 2013.

S. Aono, “Biological signal transduction using heme as a signaling molecule” The 64th Conference of Japan Society of Coordination Chemistry, Okinawa (Japan), November 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-).

Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences -Experiments and Simulations組織委員

(2008-2010, 2012-2013).

学会誌編集委員

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

Biosensors, Editorial Board (2010-).

Chemistry Letters, Section Editor (2013-).

9)大学での講義

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, 「先端薬学特論」 2013年6月.

東京工業大学生命理工学部生命工学科, 「生命理工学特別講義第三」 2013年7月.

11)競争的資金

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).

科研費挑戦的萌芽研究, 「生物の環境センシング機能を基盤とした高感度な環境汚染物質検出システムの構築」, 青野重利 (2013年-2014年).

生命時空間設計研究領域

(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) カイコ生殖系列培養細胞株を用いた *vasa* 遺伝子を活性化する遺伝子ネットワークの解析
- c) 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により阻害しマイクロアレイ解析を行った。その結果、母性 *Ovo* タンパク質は、極細胞中において（体細胞全体と比較し）高発現する遺伝子の活性化に関与し、逆に極細胞で（体細胞と比較し）発現が低い遺伝子の抑制に関わる傾向があることが明らかとなった。今後は、下流遺伝子の機能解析を進める予定である。

b) カイコ生殖系列培養細胞株を用いた *vasa* 遺伝子を活性化する遺伝子ネットワークの解析

解析が行われているほとんど全ての動物の生殖系列において *vasa* や *nanos* さらに *piwi* 等の遺伝子が発現していることが明らかになっている。これら生殖系列遺伝子が発現活性化することが、生殖系列の確立ととらえることができる。しかし、これまでに生殖系列遺伝子の活性化機構はほとんど明らかになっていない。この問題を解決するため、生殖系列

遺伝子の活性化に関わる遺伝子ネットワークを解明することを試みている。この解析を行う上での培養細胞の優れた利点を考慮し、カイコ生殖系列培養細胞株 (BmN4-SID1) を用いてネットワーク解析を開始した。 *vasa* の活性化に関わる遺伝子を RNAi スクリーンで同定し、 *ovo* を含むそれらの遺伝子を出発点として、1) それぞれの遺伝子の機能阻害によるゲノムワイドな遺伝子発現の変化を次世代シーケンサーを用いて明らかにし、2) そのデータを基にシステム生物学的解析によりネットワークを構築することを行ってきた。これまでに、ごく一部ではあるがネットワークを描くことが可能になり、今後 *vasa*, *nanos*, *piwi* 等の生殖系列遺伝子の活性化に関わるネットワークの主要部が明らかになると期待される。ネットワーク中で制御に重要な遺伝子を特定し、その *in vivo* における機能をショウジョウバエ始原生殖細胞を用いて明らかにすることにより、ネットワークの妥当性と保存性を検証する。

c) 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

ショウジョウバエの生殖幹細胞は精巣および卵巣の先端部分において、ニッチ細胞と呼ばれる特殊な生殖巣体細胞に接するように存在している。ニッチ細胞は生殖幹細胞の維持に必要な細胞増殖因子 (ニッチシグナル) を分泌することで、ニッチ細胞に接する生殖幹細胞を維持する。しかし、分泌性のニッチシグナルがなぜニッチ細胞の近傍にのみとどまり、その領域にのみ幹細胞を維持することができるのか、その分子メカニズムは明らかになっていない。ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) はヘパラン硫酸を側鎖として持つ糖タンパク質の一種であり、細胞膜表面あるいは細胞外基質を構成する主要な因子の一つであり、その側鎖あるいはタンパク質部位に様々な細胞増殖因子を結合することにより、増殖因子の空間的分布を制御する。私たちはこの HSPG の分子機能に着目して研究を行った結果、膜結合型 HSPG であるグリピカンが、それぞれ卵巣および精巣のニッチ細胞で発現すること、そしてその働きが生殖幹細胞の維持に必要であること、卵巣においてグリピカンをニッチ細胞以外で異所的に発現した場合、幹細胞の存在する領域の拡大が誘導されることを明らかにしてきた。さらに、膜貫通型 HSPG であるシンデカンおよび分泌型 HSPG であるパールカンもニッチ細胞において発現が観察され、生殖幹細胞維持に関与することを示す結果が得られた。今後は、これら HSPG の機能を阻害した卵巣におけるニッチシグナルである Dpp 分子の分布を可視化することを試み、3 種類の HSPG がニッチシグナルの分布に及ぼす影響について明らかにすることを試みる。

4) 学術論文

Hira, S., Okamoto, T., Fujiwara, M., Kita, H., Kobayashi, S. and Mukai, M. "Binding of *Drosophila* maternal Mamo protein to chromatin and specific DNA sequences" *Biochem Biophys Res Commun*, **438**, 156-160 (2013).

Dejima, K., Takemura, M., Nakato, E., Peterson, J., Hayashi, Y., Kinoshita-Toyoda, A,

Toyoda, H., Nakato, H. "Analysis of *Drosophila* glucuronyl C5-epimerase: implications for developmental roles of heparan sulfate sulfation compensation and 2-O-sulfated glucuronic acid" *J. Biol. Chem.*, **288**, 34384-34393 (2013).

Lim, R., Anand, A., Nishimiya-Fujisawa, C., Kobayashi, S. and Kai, T. "Analysis of Hydra PIWI proteins and piRNAs uncover early evolutionary origins of the piRNA pathway" *Dev. Biol.*, **386**, 237-251 (2014).

5) 著書、総説

6) 国際会議発表リスト

Hayashi, Y. "Role of Glycolysis in Primordial-Germ-Cell Development in *Drosophila* embryos" International Symposium on Transcription and Metabolism, Hyogo, Nov, 2013.

7) 招待講演

小林悟 「生物が命をつなぐメカニズム」 静岡大学附属浜松、浜松、2013年10月

林良樹 「ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における解糖系の役割」
第一回がんと代謝研究会、山形、2013年10月

林良樹 「ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における細胞内代謝の新規役割」
第二回発生過程におけるエネルギー代謝を考える会、愛知、2013年2月

8) 学会および社会的活動

日本動物学会中部支部代表委員

日本発生生物学会運営委員

愛知県立岡崎高校 SSH 運営指導委員

愛知県立時習館高校 SSH 評価委員

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

高知大学非常勤講師（林良樹）

10) 受賞、表彰

11) 外部獲得資金

科研費 新学術領域研究（総括班）、「動物における配偶子産生システムの制御」、小林悟（代表）（2013年–2017年）

科研費 新学術領域研究（計画）、「ショウジョウバエ PGC の形成を制御する遺伝子ネットワークの解明」、小林悟（代表）（2013 年-2017 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 A、「ショウジョウバエ始原生殖細胞におけるミトコンドリア品質管理機構の解析」林良樹（代表）（2013 年-2016 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）

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一定の時間周期で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る。体節形成の時間周期が、体節前駆体である未分節中胚葉の後端で働く分子時計により決められることが明らかになっているのに対し、体節が括れ切れる位置（分節位置）がいかに決められるかという問題は、体節の分節機構を理解する上で残されている大きな問題の一つであるものの、その詳細な分子機構は未だに十分には解明されていない。

我々は、ゼブラフィッシュとマウスを用いて、体節形成に関わるさまざまな問題について研究を行っている。今年度は特に、ゼブラフィッシュを用いて分節位置の決定機構についての研究を進めた。体節の文節位置の形成に関わることが知られている転写調節因子 **tbx6** に着目し、独自に調整した抗ゼブラフィッシュ **tbx6** 抗体を用いて免疫組織化学による解析を行ったところ、**tbx6** タンパク質の頭部側発現境界が将来の分節位置に対応することを明らかにした。これはマウスを用いた先行研究で明らかにされている結果と基本的には同じであり、分節位置決定のしくみの少なくとも一部が種を超えて保存されていることを示している。**tbx6** タンパク質の頭部側発現境界は、**tbx6** タンパク質の分解により決定されることが示唆されているため、その分子機構を明らかにする目的で、分解に関わる因子の検討を行った。**tbx6** の分解には、遺伝学的解析からすでに **Mesp** と **Ripply** という2つの因子が必要であることが示されているが、それらによりどのように **tbx6** の分解が起きるのかについては明らかにされていない。そこで、ゼブラフィッシュの受精卵を用いてマウスとゼブラフィッシュの **tbx6** に対する **Mesp** と **Ripply** の効果を検討したところ、**Ripply** によって **tbx6** タンパク質の分解が引き起こされることが明らかとなった。この分解には、**Ripply** と **tbx6** の直接の結合が必要であることから、**Ripply** が直接的に **tbx6** タンパク質の分解に関わることが強く示唆された。

一方、最近のゲノム編集技術の革命により、ゼブラフィッシュにおいて任意の遺伝子の変異体を人為的に作出できるようになった。そこでこの技術を利用し、体節の発生に関与することが示唆されるものの遺伝学的解析が行われて来なかったいくつかの遺伝子の変異体の作出を開始した。具体的には **TALEN**(Transcription Activator-Like Effector Nuclease)法による変異体作出を試み、すでに 10 以上の遺伝子において変異導入を確認することに成功している。

b)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、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、上皮培養細胞を用いて、Wnt の分泌と細胞極性の関係について解析した。上皮細胞である MDCK 細胞を用いて、Wnt3a を発現させたところ、頭頂側(apical 側)および基底側(basal 側)からの分泌が観察されたが、Wnt の分泌形態として近年注目を集めているエクソソーム様の分泌は基底側からのみ認められた。また、このエクソソーム様の分泌には不飽和脂肪酸の付加が必要であった。このことは、Wnt の分泌様式に多様性があり、それが細胞の極性により制御されていることを示唆している。

一方、組織内での Wnt タンパク質の時空間的動態を理解するために、マウスの神経管、胸腺、アフリカツメガエル胚上皮をモデル系にして、Wnt タンパク質の空間局在を免疫組織化学やライブイメージングにより解析している。

4) 学術論文

Hisano Y, Ota S, Takada S, Kawahara A. “Functional cooperation of spns2 and fibronectin in cardiac and lower jaw development.” *Biol Open.* 2, 789-794, 2012

Takahashi Y, Yasuhiko Y, Takahashi J, Takada S, Johnson RL, Saga Y, Kanno J. “Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo.” *Dev Biol.* 380, 172-184, 2012

6) 国際会議発表リスト

Takada S. and Yabe T. “Mesogenin causes embryonic mesoderm progenitors to differentiate during development of zebrafish tail somites.” 5th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, Pacific Grove, USA, January 19-23, 2013

Takuma Shinozuka and Shinji Takada “Spatial distribution of Wnt proteins in the developing spinal cord” EMBO Workshop: Morphogen gradient Oxford, UK, June 26-29, 2013

Yusuke Mii, Kenichi Nakazato, Chan-Gi Pack, Yasushi Sako, Atsushi Mochizuki, Shinji Takada, and Masanori Taira “Heparan sulfate nanostructures regulate distribution and signal reception of secreted proteins” EMBO Workshop: Morphogen gradient Oxford, UK, June 26-29, 2013

Chen Q.H., Takada R., and Takada S. “Polarized secretion of Wnt3a via exosome requires lipid modification.” Wnt symposium 2013, Heidelberg, Germany, July 15th, 2013

7) 招待講演

高田慎治「Wnt 分泌経路における脂肪酸修飾」：第 36 回日本分子生物学会(神戸、2013 年 12 月)

8) 学会および社会的活動

トレーニングコース「人工ヌクレアーゼによる小型魚類の遺伝子破壊法（TALEN講習会）」オーガナイザー（高田、矢部）、第47回日本発生生物学会大会準備委員（高田）、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（高田）、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（高田）など

時空間設計研究領域

(心循環シグナル)

西田基宏 (教授)

1) 専門領域：心臓生理学、循環薬理学

2) 研究課題：

- a) TRPC3/6 複合体チャネル形成・解離の分子機構とその生理的意義の解明
- b) 硫黄代謝・循環を基軸とした生体レドックス恒常性制御基盤の構築
- c) 心血管系のストレス適応におけるプリン作動性受容体の役割解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 初代培養心筋細胞・平滑筋細胞を用いた解析から、transient receptor potential canonical (TRPC)チャネル (TRPC3 と TRPC6 のヘテロ 4 量体チャネル) が機械伸展刺激やずり応力により誘発される持続的な Ca^{2+} 応答を制御する仲介分子であることを見出した。そこで、TRPC3 欠損および TRPC6 欠損マウスに大動脈狭窄による圧負荷を施したところ、メカニカルストレスによる代償性の心肥大は全く抑制されないものの、リモデリング (線維化と心機能障害) が TRPC3 または TRPC6 の欠損により強く抑制されることを見出した。また、下肢虚血後の末梢循環に対する TRPC3/6 チャネルの効果を調べるところ、TRPC6 欠損マウスにおいて末梢血流が有意に回復することを見出した。この機序として、TRPC6 が血管成熟を負に制御していること、内皮依存的弛緩因子による TRPC6 のリン酸化が血管平滑筋細胞の筋分化を促進させる (負の制御を解除させる) ことを明らかにした。
- b) 活性酸素によるタンパク質の酸化翻訳後修飾は、秩序だった細胞内のシグナル伝達に揺らぎをもたらす要因となる。我々は、硫化水素 (H_2S) がガスではなく、求核性の高いイオン (HS^-) として内因性および外因性の親電子物質の除去に働く可能性を報告した。しかし実際には、 HS^- はタンパク質のシステインチオール基と反応し、ポリ硫黄鎖 ($-\text{S}_n\text{H}$) を形成することで求核性の高い活性硫黄となることがわかり、心臓でのポリ硫黄蓄積が心筋保護につながる可能性が示されてきた。さらにビオチンラベル化 SH 修飾試薬の特性を利用して、心臓の病態時において特異的にポリ硫黄が枯渇し、不可逆的な親電子修飾がおこるタンパク質の同定に成功した。
- c) P2Y_6 欠損マウスに圧負荷を施したところ、野生型マウスと比べて顕著に突然死の割合が増加した。生き残った P2Y_6 欠損マウスも圧負荷 6 週間後の時点で著しい心機能低下 (心不全) を起こしていた。ラット心筋由来 H9c2 細胞株に P2Y_6 受容体を発現させ、機械的伸展刺激を行ったところ、強い Ca^{2+} 応答が観察された。この Ca^{2+} 応答は、 P2Y_6 受容体の細胞外基質タンパク結合 (RGD) ドメインに変異を与えることで有意に減弱した。

以上の結果から、P2Y₆受容体と細胞外基質タンパク質との相互作用がメカニカルストレスに対する心筋保護（適応）に必要となる可能性が示された。

4) 学術論文

K. Watari, M. Nakaya, M. Nishida, K.M. Kim and H. Kurose, "β-arrestin2 in infiltrated macrophages inhibits excessive inflammation after myocardial infarction" *PLoS One.*, **8(7)**:e68351 (2013).

M. Nakaya, M. Tajima, H. Kosako, T. Nakaya, A. Hashimoto, K. Watari, H. Nishihara, M. Ohba, S. Komiya, N. Tani, M. Nishida, H. Taniguchi, Y. Sato, M. Matsumoto, M. Tsuda, M. Kuroda, K. Inoue and H. Kurose, "GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance" *Nature Commun.*, **4**, 1532 (2013).

W. Chen, H. Oberwinkler, F. Werner, B. Gaßner, H. Nakagawa, R. Feil, F. Hofmann, J. Schlossmann, A. Dietrich, T. Gudermann, M. Nishida, S. Del Galdo, T. Wieland and M. Kuhn, "Atrial natriuretic peptide-mediated inhibition of microcirculatory endothelial Ca²⁺ and permeability response to histamine involves cGMP-dependent protein kinase I and TRPC6 channels" *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **33**, 2121-2129 (2013).

5) 著書、総説

M. Nishida, T. Toyama and T. Akaike, "Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling" *J. Mol. Cell. Cardiol.*, (in press).

T. Sawa, H. Ihara, T. Ida, S. Fujii, M. Nishida and T. Akaike, "Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide" *Nitric Oxide* **34**, 10-18 (2013).

T. Akaike, M. Nishida, S. Fujii, "Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide" *J. Biochem.*, **153**, 131-138 (2013).

西田基宏, 角田将明, 北島直幸, TRP チャネルの生理機能と病態生理 *Clinical Calcium* **23(4)**, 561-568 (2013).

北島直幸, 西田基宏, 硫化水素のケミカルバイオロジー *日薬理誌* **141**, 350-351 (2013).

西田基宏, 澤智裕, 硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用 *生化学* **85**, No.11, 996-999 (2013).

西田基宏 酸化ストレスによるレドックス恒常性異常と心筋リモデリング *医学のあゆみ* **247**, No.9, 875-878 (2013).

西田基宏, 硫化水素のケミカルバイオロジー ～心不全保護効果の新たなメカニズム～ *日本 Shock 学会誌* (in press).

6) 国際会議発表リスト

N. Kitajima, T. Tomita-Numaga and M. Nishida "Role of TRPC3 channels in mechanical

stress-induced cardiac fibrosis" The 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (MEC2013), Oxford (UK), September 2013.

7) 招待講演

M. Nishida, "Role of TRPC channels in mechano-chemo transduction in the heart" The 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (MEC2013), Oxford (UK), September 2013.

西田基宏「創薬研究から見えてきた TRPC チャネルの新たな生理機能」、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013「創薬から学問へ」、熊本、2013年8月。

8) 学会および社会的活動

日本薬学会誌ファルマシア編集委員、日本薬理学会評議委員、日本NO学会評議委員、国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会評議委員、日本薬理学会次世代の会副代表、日本薬学会薬理系若手の会支部代表

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

九州大学大学院薬学研究院創薬産学官連携講座・客員教授

10) 受賞、表彰

該当なし

11) 外部獲得資金

JST さきがけ「疾患代謝」、「硫黄循環・代謝を基軸とした生体レドックス恒常性制御基盤の構築」、西田基宏 (代表) (2013年-2016年)

科研費基盤研究(B)、「TRPC3/6 複合体チャネル形成による心筋ホメオスタシス制御機構の解析」、西田基宏 (代表) (2013年-2015年).

科研費挑戦的萌芽研究、「親電子シグナルを機軸とした心筋レドックス恒常性制御基盤の構築と心不全治療への応用」、西田基宏 (代表) (2013年-2014年)

科研費基盤研究(S)、「環境中親電子物質によるシグナル伝達変動とその制御に関する包括的研究 (代表 熊谷嘉人)」、西田基宏 (分担) (2013年-2017年)

内藤記念財団若手スタートアップ支援助成金、「脂質活性型 TRPC チャネルによる心循環ホメオスタシス制御機構の解明」、西田基宏 (代表) (2012年-2014年)

12) 特許

該当なし

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
- c) 胸びれのリズム運動を司る神経回路の解析

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。今年度は特に、背側脊髄の発生機構を解析した。発生期背側でドメイン様に発現する複数の転写因子に関してトランスジェニックフィッシュを作製し、それぞれのトランスジェニックフィッシュにおける蛍光タンパク質の発現領域を詳細に検討した結果、発生期の背側は6つのドメインが形成されることが明らかとなった。また神経伝達物質特性とリンクして蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュと掛け合わせることで、それぞれのドメインから生じる神経細胞の神経伝達物質特性を明らかにすることに成功した。

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。

c) a, b の項の研究では主に体幹を用いた運動を研究対象としているが、それとともに、胸びれのリズム運動を司る神経回路の解析を本年度より開始した。胸びれのリズム運動は、外転筋、内転筋の左右相互のシンプルな運動からなり、陸上脊椎動物四肢の運動のプロトタイプと考えることができる。このリズム運動を司る神経回路を特定のクラスの神経細胞を可視化したトランスジェニックフィッシュ、および光遺伝学ツールを用いて解析していく。

4) 学術論文

C. Satou, Y. Kimura, H. Hirata, ML. Suster, K. Kawakami, and S. Higashijima, "Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons" *Development* 140, 3927-3931 (2013).

H. Mizuno, T. Sassa, S. Higashijima, H. Okamoto, and A. Miyawaki, "Transgenic zebrafish for ratiometric imaging of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} response in teleost embryo" *Cell Calcium* 56, 236-245 (2013).

R. Hirabayashi, S. Hozumi, S. Higashijima, and Y. Kikuchi (2013). "Ddx46 Is Required for Multi-lineage differentiation of hematopoietic stem cells in zebrafish" *Stem Cells and Development* 22, 2532-2542 (2013).

MM. Reimer, A. Norris, J. Ohnmacht, R. Patani, Z. Zhong, TB. Dias, V. Kuscha, AL. Scott, Y. Chen, S. Rozov, SL. Frazer, C. Wyatt, S. Higashijima, EE. Patton, P. Panula, S. Chandran, T. Becker, and CG, Becker, "Dopamine from the brain promotes spinal motor neuron generation during development and adult regeneration" *Developmental Cell* 25, 478-491 (2013).

T. Aoki, M. Kinoshita, R. Aoki, M. Agetsuma, H. Aizawa, M. Yamazaki, M. Takahoko, R. Amo, A. Arata, S. Higashijima, T. Tsuboi, and H. Okamoto, "Imaging of Neural Ensemble for Retrieval of a Learned Behavioral Program" *Neuron* 78, 881-894 (2013).

Y. Kimura, C. Satou, S. Fujioka, W. Shoji, K. Umeda, T. Ishizuka, H. Yawo, and S. Higashijima, "Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming" *Current Biology* 23, 843-849 (2013).

S. Shimozono, T. Iimura, T. Kitaguchi, S. Higashijima, and A. Miyawaki A. "Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development" *Nature* 496, 363-366 (2013).

5) 著書、総説

木村有希子、東島眞一 "光遺伝学ツールを用いた、ゼブラフィッシュの行動制御" 細胞工学 秀潤社、印刷中 (2014).

6) 国際会議発表リスト

S. Higashijima, "Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish" Jenaia Workshop on Zebrafish Genetics, Transgenesis, and Systems Biology, Ashburn USA, November 2013.

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36回日本分子生物学会大会、神戸、2013年12月.

S. Higashijima, Y. Kimura and C. Satou, "Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish" 第91回日本生理学会大会、鹿児島、2014年3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
名古屋市立大学薬学部客員准教授

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 メゾ神経、「脊椎動物四肢リズム運動形成機構のプロトタイプ
の解析」、東島眞一（代表）（2013-2014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

生命動秩序形成研究領域

(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・分子生物学の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) プロテアソームによるタンパク質分解活性は、プロテアソーム活性化因子 (PA) とよばれるタンパク質複合体により厳密に制御されている。我々は、サブユニット選択的に重水素で標識した PA28 ヘテロ 7 量体を用いた中性子小角散乱実験に基づき、本複合体が 3 つの α サブユニットと 4 つの β サブユニットが互い違いに配置されたリング構造をしていることを明らかにした。また、NMR および分子生物学的手法による解析から、 α サブユニットのループがプロテアソーム内への基質の出入り口を取り囲むように配置し、基質の出入りを抑制するゲートキーパーの役割を演じていることが示唆された。一方、古細菌のプロテアソーム結合タンパク質 PbaB は、ホモ 4 量体を形成した状態で、7 量体構造を有する 20S プロテアソーム α リングと相互作用していることを、X 線結晶構造解析および電子顕微鏡解析によって明らかにした。さらに PbaB は、プロテアソーム活性化能とシャペロン活性を併せ持つユニークなタンパク質であることを突きとめた。また、NMR 解析により、大腸菌の分子シャペロンである GroEL とアンフォールド状態にあるモデル基質タンパク質との相互作用の構造的基盤を明らかにすることに成功した。
- b) 細胞膜に存在する α -ジストログリカン (α DG) 上の糖鎖は、ラミニンなどの細胞外マトリックスタンパク質との相互作用を通じて、細胞膜の構造の維持や細胞間相互作用に重要な役割を果たしている。先天性筋ジストロフィー疾患においては、 α DG 上の糖鎖構造の形成不全が細胞間コミュニケーションの異常をもたらし、これにより重篤な病変が引き起こされる。先天性筋ジストロフィー原因遺伝子の 1 つである AGO61 のノックアウトマウスを作出してその表現型解析を行った結果、AGO61 の欠損に伴い α DG 上のラミニン結合性を示す糖鎖の発現が消失し、脳の層形成の不全が起きることを見出した。さらに、この遺伝子にコードされたタンパク質は、 α DG 上の特定の位置に結合したマンノース残基へ N-アセチルグルコサミンを連結させるはたらきを担っており、これによりラ

ミニン結合性を示す糖鎖が形成される起点となる糖鎖構造を作る重要な酵素であることを明らかにした。

- c) 細胞膜上の糖鎖は、クラスター化することで超分子構造を形成し、動的な分子認識場として機能している。クラスター化した糖鎖がその機能を発現するメカニズムを理解するためには、NMR による精密構造解析を実現するための適切な膜モデルを設計することが有用である。我々は、糖脂質ガングリオシド GM1、GM2 または GM3 を組込んだ小型バイセルを調製した。これらのガングリオシドは単独では水中で巨大な会合体を形成してしまうが、バイセルへ組込むことで、サイズの制御されたクラスターモデルを構築することができた。これらのガングリオシド含有バイセルを用いて α シヌクレイン (α Syn) との相互作用解析を行った結果、 α Syn と糖脂質クラスターとの間に形成される過渡的な複合体を捉えることに成功した。また、グラム陰性菌の細胞膜表層を覆うリポド A を含有したミセルを用いて、抗菌ペプチド ザルコトキシシン IA の相互作用機構の構造基盤を解明した。NMR 解析の結果に基づき、ザルコトキシシン IA は N 末端領域を介してリポド A と結合し、ランダムコイルから α ヘリックス構造へと構造変化することを明らかにした。

4) 学術論文

T. Yamaguchi, T. Uno, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi and K. Kato, “Ganglioside-embedding small bicelles for probing membrane-landing processes of intrinsically disordered proteins,” *Chem. Commun.* **49**, 1235-1237 (2013).

Y. Kamiya, K. Yanagi, T. Kitajima, T. Yamaguchi, Y. Chiba and K. Kato, “Application of metabolic ^{13}C labeling in conjunction with high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy for comparative conformational analysis of high mannose-type oligosaccharides,” *Biomolecules* **3**, 108-123 (2013).

M. Yagi-Utsumi, Y. Yamaguchi, P. Boonsri, T. Iguchi, K. Okemoto, S. Natori and K. Kato, “Stable isotope-assisted NMR characterization of interaction between lipid A and sarcotoxin IA, a cecropin-type antibacterial peptide,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 136-140 (2013).

G. Mondal, H. Yagi, K. Kato and B. P. Chatterjee, “Multidimensional HPLC analysis of N-linked glycans of serum alpha-1-acid glycoprotein in chronic hepatitis B and hepatitis B-induced liver cirrhosis patients,” *Trends in Carbohydrate Research.* **5**, 11-19 (2013).

M. Sugiyama, H. Sahashi, E. Kurimoto, S. Takata, H. Yagi, K. Kanai, E. Sakata, Y. Minami, K. Tanaka and K. Kato, “Spatial arrangement and functional role of α subunits of proteasome activator PA28 in hetero-oligomeric form,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 141-145 (2013).

S. Kitazawa, T. Kameda, M. Yagi-Utsumi, K. Sugase, N. J. Baxter, K. Kato, M. P. Williamson and R. Kitahara, “Solution structure of the Q41N variant of ubiquitin as a model

for the alternatively folded N₂ state of ubiquitin,” *Biochemistry* **52**, 1874-1885 (2013).

K. Kumoi, T. Satoh, K. Murata, T. Hiromoto, T. Mizushima, Y. Kamiya, M. Noda, S. Uchiyama, H. Yagi and K. Kato, “An archaeal homolog of proteasome assembly factor functions as a proteasome activator,” *PLoS ONE* **8**, e60294 (2013).

T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Nagata, K. Kato and N. Hosokawa, “Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded α 1-antitrypsin variant,” *FEBS J.* **8**, 1563-1575 (2013).

M. S. Chandak, T. Nakamura, T. Takenaka, T. K. Chaudhuri, M. Yagi-Utsumi, J. Chen, K. Kato and K. Kuwajima, “The use of spin desalting columns in DMSO-quenched H/D-exchange NMR experiments,” *Protein Sci.* **22**, 486-491 (2013).

T. Yamaguchi, Y. Kamiya, Y.-M. Choo, S. Yamamoto and K. Kato, “Terminal spin labeling of a high-mannose-type oligosaccharide for quantitative NMR analysis of its dynamic conformation,” *Chem. Lett.* **42**, 544-546 (2013).

M. Yagi-Utsumi, T. Kuniyama, T. Nakamura, Y. Uekusa, K. Makabe, K. Kuwajima and K. Kato, “NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid β as a model ligand,” *FEBS Lett.* **587**, 1605-1609 (2013).

S.-J. Yoon, N. Utkina, M. Sadilek, H. Yagi, K. Kato and S. Hakomori, “Self-recognition of high-mannose type glycans mediating adhesion of embryonal fibroblasts,” *Glycoconjugate J.* **30**, 485-496 (2013).

N. Nishida, M. Yagi-Utsumi, F. Motojima, M. Yoshida, I. Shimada and K. Kato, “Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins,” *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 160-164 (2013).

E. Kurimoto, K. Kuroki, Y. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, T. Igaki, T. Iguchi, K. Maenaka and K. Kato, “Structural and functional mosaic nature of MHC class I molecules in their peptide-free form,” *Mol. Immunol.* **55**, 393-399 (2013).

M. S. Chandak, T. Nakamura, K. Makabe, T. Takenaka, A. Mukaiyama, T. K. Chaudhuri, K. Kato and K. Kuwajima, “The H/D-exchange kinetics of the *Escherichia coli* co-chaperonin GroES studied by 2D NMR and DMSO-quenched exchange methods,” *J. Mol. Biol.* **425**, 2541-2560 (2013).

K. Araki, S. Iemura, Y. Kamiya, D. Ron, K. Kato, T. Natsume and K. Nagata, “Ero1- α and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases,” *J. Cell Biol.* **202**, 861-874 (2013).

S. Horimoto, S. Ninagawa, T. Okada, H. Koba, T. Sugimoto, Y. Kamiya, K. Kato, S. Takeda and K. Mori, “The unfolded protein response transducer ATF6 represents a novel transmembrane-type endoplasmic reticulum-associated degradation substrate requiring both mannose trimming and SEL1L protein,” *J. Biol. Chem.* **288**, 31517-31527 (2013).

H. Yagi, N. Nakagawa, T. Saito, H. Kiyonari, T. Abe, T. Toda, S. W. Wu, K. H. Khoo, S.

Oka and K. Kato, “AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan,” *Sci. Rep.* **3**, Article number: 3288 (2013).

5) 著書、総説

矢木宏和, 加藤晃一, 「IgG-Fc と Fc 受容体の複合体形成における糖鎖の役割」, *実験医学*, **31**, 1602-1606 (2013).

加藤晃一, 山口拓実, 「NMR 原理」, *揺らぎ・ダイナミクスと生体機能*, 寺嶋正秀編, 化学同人, pp. 69-79 (2013).

矢木宏和, 加藤晃一, 「神経幹細胞の幹細胞性維持における複合糖質の役割」, *生化学*, **85**, 1012-1016 (2013).

山口拓実, 「ランタニドイオンを活用した常磁性 NMR 法による糖鎖の動的構造解析」, *日本化学会生体機能関連化学部会ニュースレター*, **Vol. 28, No. 2**, 14-17 (2013).

Y. Zhang, T. Yamaguchi and K. Kato, “New NMR tools for characterizing the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides,” *Chem. Lett.* **42**, 1455-1462 (2013).

6) 国際会議発表リスト

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 ^{13}C -labeling technique,” SOKENDAI Asian Winter School "Frontiers in Photo-Molecular Science" Okazaki (Japan), January 2013.

M. Yagi-Utsumi and K. Kato, “NMR spectroscopic characterization of the pathogenic interaction of amyloid β peptide with GM1 clusters,” Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), Chon Buri, (Thailand), January 2013.

T. Yamaguchi, Y. Zhang and K. Kato, “Paramagnetic lanthanide-tagging for NMR conformational characterization of glycolipids,” Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), Chon Buri, (Thailand), January 2013.

P. Boonsri, R. Thammaporn, K. Choowongkomol, K. Kato and S. Hannongbua, “Structural and dynamics properties of HIV-1 reverse transcriptase induced by non-nucleoside inhibitors (NNRTIs) based on molecular docking and NMR studies,” Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), Chon Buri, (Thailand), January 2013.

T. Satoh, Y. Uekusa, T. Hiromoto, H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, Y. Saeki, K. Tanaka and K. Kato, “Structural insights into proteasome orchestration mechanism through a proteasome assembly factor Nas2,” 8th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, Jeju (Korea), May 2013.

T. Yamaguchi, Y. Zhang and K. Kato, “Paramagnetic NMR approaches for revealing conformational dynamics of oligosaccharides,” 8th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, Jeju (Korea), May 2013.

T. Zhu, M. Yagi-Utsumi, H. Yagi, T. Satoh and K. Kato, “Recombinant expression of an ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase,” Korea and Japan joint symposium (Structural and functional studies on biomolecules), Jeju (Korea), May 2013.

R. Thammaporn, M. Yagi-Utsumi, S. Hannongbua and K. Kato, “Investigation of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors binding to HIV-1 reverse transcriptase: NMR analysis and isothermal titration calorimetry,” Korea and Japan joint symposium (Structural and functional studies on biomolecules), Jeju (Korea), May 2013.

T. Satoh, “Structural basis for the proteasome orchestration mechanism by a proteasome assembly chaperone Nas2,” Korea and Japan joint symposium (Structural and functional studies

on biomolecules), Jeju (Korea), May 2013.

Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Yamamoto, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi and K. Kato, “NMR analyses of conformational dynamics and interactions of oligosaccharides by employing paramagnetic probes,” The 22nd International Glycoconjugate Symposium (GLYCO 22), Dalian (China), June 2013.

G. Mondal, Y. K. Chawla, H. Yagi, K. Kato and B. P. Chatterjee, “Glycoproteomics of serum proteins in hepatitis B and hepatitis C induced liver cirrhosis,” The 22nd International Glycoconjugate Symposium (GLYCO 22), Dalian (China), June 2013.

P. Boonsri, M. Yagi-Utsumi, R. Thammaporn, T. Yamaguchi, K. Yanagi, K. Choowongkomol, K. Kato and S. Hannongbua, “Structural analyses of HIV-1 reverse transcriptase induced by non-nucleoside inhibitors, based on NMR studies and molecular dynamic simulations,” EUROMAR 2013, Crete (Greece), July 2013.

Y. Zhang, “Elucidation of the conformational dynamics of oligosaccharides by using NMR,” Seminar in Shanghai University, Shanghai (China), July 2013.

T. Satoh, Y. Uekusa, T. Hiromoto, H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, Y. Saeki, K. Tanaka and K. Kato, “Mechanistic insights into the proteasome orchestration by a proteasome assembly chaperone Nas2,” 7th International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS), Sapporo (Japan), July 2013.

K. Inagaki, Y. Uekusa, Y. Kamiya, T. Satoh and K. Kato, “Structural basis underlying the redox-dependent domain rearrangement of the substrate-binding region of protein disulfide isomerase,” 7th International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS), Sapporo (Japan), July 2013.

E. Kurimoto, K. Kuroki, Y. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, T. Igaki, T. Iguchi, K. Maenaka and K. Kato, “Structural and functional mosaic nature of MHC class I molecules in their peptide-free form,” 7th International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS), Sapporo (Japan), July 2013.

M. Yagi-Utsumi, “Assembly mechanism of hereditary amyloid- β variants upon their specific interactions with gangliosides,” 1st Annual Meeting of the Centre for Misfolding Diseases, Cambridge (UK), November 2013.

T. Yamaguchi, Y. Zhang, Y. Kamiya, Y. Sakae, Y. Okamoto and K. Kato, Paramagnetism-assisted NMR evaluation of molecular dynamics simulations for conformational characterization of oligosaccharides,” Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, Okazaki (Japan), November 2013.

T. Satoh, H. Yagi, Y.-H. Wang, Y. Uekusa, T. Hiromoto, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima and K. Kato, “Structural basis for proteasome formation mediated by assembly chaperone Nas2,” Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, Okazaki (Japan), November 2013.

Y.-H. Wang, T. Satoh, T. Hiromoto, Y. Uekusa, H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, T. Mizushima, Y. Saeki, K. Tanaka and K. Kato, “NMR characterization of the interaction of a proteasome assembly chaperone Nas2 with the proteasome Rpt5 subunit,” SOKENDAI Asian Winter School “Innovations and Challenges in Molecular Science: From Basics to Cutting-edge Researches”, Okazaki (Japan), December 2013.

R. Thammaporn, P. Boonsri, K. Choowongkamon, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, S. Hannongbua and K. Kato, “NMR investigation of non-nucleoside inhibitors binding to HIV-1 reverse transcriptase,” SOKENDAI Asian Winter School “Innovations and Challenges in Molecular Science: From Basics to Cutting-edge Researches”, Okazaki (Japan), December 2013.

P. Padungros, T. Yamaguchi and K. Kato, “Position selective ^{13}C labeling of multi-antennary oligosaccharides for NMR analysis,” SOKENDAI Asian Winter School “Innovations and Challenges in Molecular Science: From Basics to Cutting-edge Researches”, Okazaki (Japan), December 2013.

T. Satoh, K. Suzuki, T. Yamaguchi and K. Kato, “Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36,” Yonsei-IMS Seminars

on Biomolecular Sciences: Protein Structure and Diseases, Busan (Korea), December 2013.

H. Yagi, N. Nakagawa, T. Saito, H. Kiyonari, T. Abe, T. Toda, S.-W. Wu, K.-H. Khoo, S. Oka and K. Kato, “AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan,” Yonsei-IMS Seminars on Biomolecular Sciences: Protein Structure and Diseases, Busan (Korea), December 2013.

Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Yamamoto and K. Kato, “Elucidation of the conformational dynamics of oligosaccharides by using paramagnetism-assisted NMR spectroscopy,” Yonsei-IMS Seminars on Biomolecular Sciences: Protein Structure and Diseases, Busan (Korea), December 2013.

T. Zhu, K. Murata, T. Toshimori, T. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, T. Satoh and K. Kato, “The structural biology study on ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT),” Yonsei-IMS Seminars on Biomolecular Sciences: Protein Structure and Diseases, Busan (Korea), December 2013.

7) 招待講演

K. Kato, “Structural views of carbohydrate-protein interaction systems as potential therapeutic targets,” Kasetsart University Special Seminar, Bangkok (Thailand), January 2013.

T. Yamaguchi and K. Kato, “NMR approaches to the molecular basis of oligosaccharide functions,” 2013 Asian Core Winter School, Busan (Korea), January 2013.

加藤晃一, 「生命分子複合体の動態解明への実験的アプローチ」, 京都大学原子炉実験所特別講演会, 京都, 2013年2月.

K. Kato, “Conformational dynamics and interactions of oligosaccharides in physiological and pathological contexts,” Fifth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, High1 Resort (Korea), February 2013.

M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, Y. Uekusa and K. Kato, “NMR approaches for characterizing molecular recognition process of intrinsically disordered proteins,” Fifth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, High1 Resort (Korea), February 2013.

M. S. Chandak, T. Nakamura, K. Makabe, T. Takenaka, J. Chen, K. Kato and K. Kuwajima, “Structural fluctuations of free GroES and the GroES bound to the single-ring chaperonin SR1 studied by hydrogen/deuterium exchange and 2D NMR,” Fifth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, High1 Resort (Korea), February 2013.

K. Kato, “Molecular and structural basis for N-glycan-dependent determination of glycoprotein fates in cells,” Glycobiology Gordon Research Conference, Ventura (USA), March 2013.

加藤晃一, 「NMRによる糖鎖クラスターのダイナミクスと相互作用の解析」, 糖鎖集合状態の変化による幹細胞近接場制御についての討論会, 岡崎, 2013年3月.

加藤晃一, 「NMRとSANSによるタンパク質の動的構造解析」, 中性子連携研究会, 東京, 2013年3月.

加藤晃一, 「NMRを用いた生体分子のダイナミクスの解析」, 大阪市立大学分子ナノ情報解析センターユーザーズミーティング, 大阪, 2013年4月.

加藤晃一, 「生命分子のダイナミクスと自己組織化」, 国際高等研究所研究プロジェクト

ト「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」第1回研究会, 木津川, 2013年5月.

K. Kato, “Structural glycobiology for biophysical decoding sweet messages,” 8th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, Jeju (Korea), May 2013.

M. Yagi-Utsumi and K. Kato, “NMR approaches for characterizing interactions between GroEL and intrinsically disordered proteins,” 8th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, Jeju (Korea), May 2013.

矢木真穂, 「NMR法を用いたアミロイドβの構造研究」, 第4回「アルツハイマー病診断・治療薬創出に向けた革新的探索系構築に関する研究会」, 大府, 2013年6月.

加藤晃一, 「立体構造からみた糖鎖の不均一性」, 第32回日本糖質学会年会, 大阪, 2013年8月.

山口拓実, 加藤晃一, 「NMRを用いた糖鎖のコンフォメーション揺らぎとクラスター特性の解析」, 国際高等研研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能ネットワークとダイナミクス」の解明」第2回研究会, 木津川, 2013年8月.

加藤晃一, 「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」, 国際高等研研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能ネットワークとダイナミクス」の解明」第2回研究会, 木津川, 2013年8月.

加藤晃一, 「NMRを用いた生命分子のダイナミクス解析」, 第2回立命館大学BKC生体分子ネットワークセミナー, 草津, 2013年8月.

K. Kato, “Dynamic organization of biomolecular systems for promotion of integrative functions,” Summer School 2013 “Bioorganization”, Okazaki (Japan), August 2013.

K. Kato, “Atomic anatomy of antibody as glycoprotein,” World Biopharma Week China Focus 2013, Shanghai (China), September 2013.

加藤晃一, 「バイオ医薬品の構造をみる」, 日本バイオイメージング学会 第22回学術集会, 東京, 2013年9月.

加藤晃一, 「糖鎖が担うタンパク質社会の秩序維持」, 市民公開講座・第99回分子科学フォーラム, 岡崎, 2013年9月.

加藤晃一, 「生命分子の動的秩序形成におけるミクロ-マクロ相関の探査と設計原理の探求」, 新学術領域研究「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」第1回公開シンポジウム, 岡崎, 2013年10月.

山口拓実, 「常磁性効果を活用した糖鎖の立体構造解析-NMRと分子動力学計算によるコンフォメーション空間の探査-」, 日本分光学会NMR分光部会 平成25年度講習会, 名古屋, 2013年10月.

K. Kato, “NMR characterization of dynamic conformational ensembles of oligosaccharides and intermolecular interactions in glycolipid clusters,” 5th Asia-Pacific NMR Symposium 2013, Brisbane (Australia) October 2013.

加藤晃一, 「糖鎖の機能解明を目指したNMRアプローチ」, 第52回NMR討論会, 金

沢, 2013 年 11 月.

加藤晃一, 「タンパク質社会の秩序維持における糖鎖の役割」, お茶の水女子大学 糖鎖科学教育研究センター第 6 回公開シンポジウム, 東京, 2013 年 11 月.

加藤晃一, 「糖鎖を見る: 分子模型からムービーへ」, 生理学研究所研究会「構造の多様性に立脚した糖鎖機能の解明に向けて」, 岡崎, 2013 年 11 月.

山口拓実, 加藤晃一, 「生命分子アッセムブリーにおける分子間相互作用のダイナミクスの精密解析」, 山田研究会・統合バイオサイエンスシンポジウム, 田原, 2013 年 11 月.

K. Kumoi, T. Satoh, K. Murata, T. Hiromoto, T. Mizushima, Y. Kamiya, M. Noda, S. Uchiyama, M. Sugiyama, H. Yagi and K. Kato, “An archaeal homolog of proteasome assembly chaperone forms a homotetramer and functions as proteasome activator,” Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, Okazaki (Japan), November 2013.

K. Kato, “Structural biology of glycoconjugates: Sugar chains as therapeutic targets,” Yonsei-IMS Seminars on Biomolecular Sciences: Protein Structure and Diseases, Busan (Korea), December 2013.

8) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本バイオイメージング学会 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-) 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-).

学会の組織委員等

第 27 回生体系磁気共鳴国際会議(ICMRBS)実行委員 (2013-)

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-).

独立行政法人科学技術振興機構 戦略研究推進部 外部評価委員 (2012-).

経済産業省 第 3 者委員会委員 (2013).

文部科学省研究振興局 委員会評価者 (2013-).

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-).

競争的資金等の領域長等

日本学術振興会科学研究費補助金 新学術領域研究「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」領域代表者 (2013-).

その他

株式会社グライエンス 科学技術顧問 (2004-).

株式会社グライエンス 取締役 (2005-2013).

総合研究大学院大学統合生命科学特別委員会委員長 (2013-).

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, 第15回日本糖質学会ポスター賞 (2013).

Zhang Ying, 糖鎖科学中部拠点奨励賞 (2013).

山口拓実, 第7回バイオ関連化学シンポジウム講演賞 (2013).

11) 外部獲得資金

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-).

科研費新学術領域研究「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」(総括班), 「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現の研究に関する総括」,

加藤晃一（代表）(2013年-).

科研費新学術領域研究「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」（計画研究）, 「生命分子の動的秩序形成におけるミクロ-マクロ相関の探査と設計原理の探求」, 加藤晃一（代表）(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) チトクロームP450によるアルカンの水酸化反応は、ステロイドホルモン合成など多くの生体反応において鍵となる反応である。これらの水酸化反応では、非常に大きい水素-重水素間での速度論的同位体効果が報告されていて、水素原子のトンネル効果によると考えられている。チトクロームP450は、鉄4価オキソポルフィリン π -カチオンラジカル (Compound I) とよばれる反応活性種を用いて反応する。我々は、Compound Iモデル錯体を用いてアルカンの水酸化反応における水素原子トンネル効果の寄与を検討した。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、低温条件ではかなりの水素原子トンネル効果の寄与があること、その寄与の大きさがアルカンのC-H結合の強さやCompound Iモデル錯体の活性度により変化することを見いだした。
- b) 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なぜ高い不斉選択性を示すのかは、多くの研究者が注目している点である。最近我々は、マンガン4価サレン錯体とヨードシルアレンとの反応により、ヨードシルアレン付加体の合成、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、ヨードシルアレ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。本年度我々は、この解明された構造を基に、ヨードシルアレンの構造や錯体の対アニオンが付加錯体の反応性や不斉選択性にどのように影響するかを研究した。また、コバルトサレン錯体の電子構造を研究し、コバルトに配位する軸位配位子と混合原子価状態の関係を解明した。

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、有機溶媒の可溶性次亜塩素塩の合成に成功し、これにより低温中鉄3価ヘムに次亜塩素イオンが配位した錯体の合成、同定、反応性の解明に世界で初めて成功した。

4) 学術論文

T. KURAHASHI, M. HADA, and H. FUJII, “Di- μ -Oxo Dimetal Core of Mn^{IV} and Ti^{IV} as a Linker Between Two Chiral Salen Complexes Leading to the Stereoselective Formation of Different *M*- and *P*-Helical Structure”, *Inorg. Chem.* **53**, 1070-1079 (2014).

T. KURAHASHI and H. FUJII, “Unique Ligand Radical Character of an Activated Cobalt Salen Catalyst that is Generated by Aerobic Oxidation of a Cobalt(II) Salen Complex”, *Inorg. Chem.* **52**, 3908-3919 (2013).

C. WANG, T. KURAHASHI, and H. FUJII, “Oxygen-Atom Transfer from Iodosylarene Adducts of a Manganese(IV) Salen Complex: Effect of Arenes and Anions on I(III) of the Coordinated Iodosylarene”, *Inorg. Chem.* **52**, 9557-9566 (2013).

5) 著書、総説

なし

6) 国際会議発表リスト

H. Fujii, “Synthesis, Characterization, and Reactivity of Hypochlorito-Iron(III) Porphyrin Complexes” 16th International Conference on Bioinorganic Chemistry, Grenoble (France), July 22-26 (2013).

H. Fujii, “Synthesis, Characterization, and Reactivity of Iodosylarene Adducts of a Chiral Manganese Salen Complex” 4th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC 4), Jeju (Korea), November 4-7 (2013).

7) 招待講演

藤井 浩, 「次亜塩素酸イオンおよびヨードソアレン付加金属錯体の電子構造と反応

性」，大阪大学基礎工学研究科研究会「金属新機能場の開発を目指して」（大阪大、大阪府） 2014年2月3- 4日

藤井 浩，「高原子価鉄オキソヘム錯体による酸化反応と反応性制御機構」，第46回酸化反応討論会（筑波大、茨城県） 2013年11月15- 16日

藤井 浩，「高原子価鉄オキソポルフィリン錯体を用いた酵素反応の研究」，山形大学理学部（山形） 2013年8月8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

山形大学大学院理工学専攻物質生命化学研究科，集中講義「物質生命化学特別講義 I」
2013年8月7日～8日

10) 受賞、表彰

なし

11) 外部獲得資金

基盤研究B 「次亜塩素酸錯体の反応性と反応選択性の分子機構の解明及びそれに基づく制御法の開発」， 藤井 浩 （2014年～2017年）

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

12) 特許

なし

生命動秩序形成研究領域

(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 RNG105 のコンディショナルノックアウトマウスの解析
- b) RNA 粒子の集合・分散の分子メカニズムの解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 短期記憶が長期記憶へ強化される際には、神経細胞でタンパク質が新規に合成されることが不可欠である。このタンパク質合成は、記憶形成の過程で入力刺激のあったシナプスに局限した「局所的翻訳」であると考えられており、局所的翻訳のためにはシナプスが存在する樹状突起へ mRNA を輸送することが必要である。この mRNA 輸送・局所的翻訳システムによって、入力刺激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長期記憶が形成されると考えられている。

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 RNA 粒子が mRNA 輸送・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。そこでこの致死性を回避するために、生後の大脳および海馬でノックアウトが起こる CaMKII α -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、成熟個体を得た。RNG105 cKO マウスでは、RNG105 タンパク質の発現レベルが特に海馬で顕著に減少していることを確認した。

RNG105 cKO マウスおよび対象として野生型マウスの海馬を用い、神経樹状突起局在に異常を生じる mRNA の網羅的同定に着手した。海馬の錐体神経細胞は細胞体層と樹状突起層がきれいに分かれて分布しており、その各層を解剖によって切り出し、そ

れぞれから RNA を抽出した。その RNA の定量的 RT-PCR により、樹状突起に局在することが知られているいくつかの mRNA が確かに樹状突起層に多く含まれ、逆に細胞体に留まることが知られている mRNA は樹状突起に少ないことを確認した。今後、RNG105 cKO マウスおよび野生型マウスから抽出した mRNA を次世代シーケンスによって網羅的に比較解析し、RNG105 cKO マウスの神経樹状突起 mRNA 輸送にどのような異常が生じているかを明らかにしていく。

さらに、RNG105 cKO マウスの行動解析をおこなった。その一つとして記憶・学習テストである受動的回避テストをおこなった。このテストでは、マウスは箱の中で電気刺激を受け、その状況を記憶したマウスはその後数日以上その箱に進入しなくなる。RNG105 cKO マウスは電気刺激の 5 分後は箱に進入しなかったが、24 時間後には進入するようになった。この結果は、RNG105 cKO マウスは短期記憶は獲得できるが、長期記憶は獲得できないことを示しており、RNG105 の機能が短期記憶から長期記憶への強化に必要であることを示唆した。また、別の記憶・学習テストとしてモリス水迷路テストをおこなった。このテストでは、数日間かけてプールの水面下に隠れている避難場所を学習、記憶する。RNG105 cKO マウスは、この避難場所を全く覚えることができず、このテストでも RNG105 cKO マウスは学習・記憶に障害があることが明らかになった。

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 は胎仔期の脳で、RNG140 は成体の脳で発現が高い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) 神経細胞の RNA 粒子の過剰凝集は、神経変性疾患と深く関わるということが近年明らかにされつつある。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD) では RNA 粒子が過剰凝集することが観察されており、その原因として RNA 粒子局在タンパク質 FUS/TLS, TDP-43, hnRNPA2B1 等の RNA 粒子への集積が示唆されている。特にそれらタンパク質の天然変性タンパク質領域 (LC/ID 領域) が病態と関連している。一方、通常は RNA 粒子の集合／離散はそれぞれ mRNA 輸送と翻訳抑制／翻訳活性化の役割を担っており、可逆的に制御されている。したがって、RNA 粒子の集合・離散の分子メカニズムを明らかにすることは、神経変性疾患および mRNA 輸送・局所的翻訳制御の理解のための基盤となる。

我々は RNG105 に結合するタンパク質のプロテオミクス解析により、RNA 粒子の集合・離散を制御するタンパク質を新たに見出した。これらは NFAR1 およびその結合タンパク質 NF45 であり、繊維芽培養細胞において NFAR2 の発現は RNA 粒子の集合を

促進し、逆に NF45 の発現は RNA 粒子の離散を引き起こした。

NFAR2はNFAR1と同一遺伝子から転写されるスプライシングバリエーションであるが、両者の機能の違いはこれまで明らかではなかった。我々はNFAR2のみがRNA粒子に局在し、かつRNA粒子の凝集を促進することを見出した。この違いはNFAR2のみがGQSYドメインを持つことに起因し、このドメインがLC/ID領域であり、かつRNG105を含むmRNA-タンパク質(mRNP)複合体に結合することを明らかにした。さらに、GQSYドメインがFUS/TLSのLC/ID領域と機能的に交換可能であることも示した。

NFAR2のもう一つの重要なドメインとしてDZFドメインを同定した。DZFドメインはRNG105 mRNP複合体との結合には関与しないが、RNA粒子の集合を正・負に調節することを見出した。正の調節としてDZFドメインがRNA粒子集合のマスター制御キナーゼであるPKRによってリン酸化されること、負の調節としてDZFドメインがNF45と結合することを明らかにした。

以上の結果から、NFAR2がGQSYドメインとDZFドメインの2つの複合体形成ドメインを介してRNG105 mRNP複合体のコネクターとして機能し、RNA粒子の集合を促進する可能性が考えられた。そのコネクターとしての機能はPKRによるリン酸化によって増強され、逆にNF45の結合によって阻害されると考えられる。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のか、さらに神経変性とどのような関連を持つのかについて、今後解析を進める予定である。

7) 招待講演

椎名伸之「RNA granuleのプロテオミクスから機能解明へ」、2013年度 包括脳ネットワーク夏ワークショップ、名古屋、2013年8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).

科研費基盤研究(C)、「mRNA 輸送・翻訳制御粒子の形成・解体メカニズム」、椎名伸之（代表） (2013年-2015年).

公益財団法人大幸財団研究助成金、「mRNA 輸送と局所的翻訳による高次脳機能制御」、椎名伸之（代表）

オリオン公募研究（公募研究 a）

- 1) 研究課題名 体液恒常性の制御に関わるバイオセンシング機構の解明
(バイオセンシング研究領域)
- 2) 研究代表者 野田昌晴（教授）
基礎生物学研究所、統合神経生物学研究部門
- 3) 研究組織 檜山武史（助教）
松本匡史（博士研究員）

4) 研究概要

体液恒常性は動物の生存に必須であり、脳には体液の Na 濃度と浸透圧を常時モニターする仕組みが存在する。脳内 Na レベルセンサーについては、我々の研究から、感覚性脳室周囲器官に特異的に発現する Na_x チャンネルであることが判明している。脳弓下器官(SFO)の Na_x が感知した情報は、主に塩分摂取行動の制御に関わっていることが明らかになっている。感覚性脳室周囲器官は血液—脳関門を持たず、また脳室に面していることから、体液の監視に適した脳領域である。そのため、浸透圧センサーもここに発現していると考えられる。本研究では、次の2つの課題に取り組む。

第1の課題は、体液 Na レベルのセンシングについて、SFO で感知された体液 Na レベルの情報と塩分摂取行動との間をつなぐ神経回路の解明である。塩分摂取行動の制御を担う SFO の神経細胞を同定し、その情報が伝達される神経核を明らかにすることを目指している。これまでに、塩や水の摂取行動の制御に重要な役割を果たすアンジオテンシン II (AngII) の受容体 AT1a の発現細胞の同定を試みた。また、逆行性・順行性標識と組み合わせて、その投射先を解析した。これらの知見に基づき、SFO の特定の神経細胞に特異的に光活性化型チャンネルを発現し、光刺激により神経活動を制御した際の塩分摂取行動を観察している。これにより、それぞれの神経回路が塩分摂取行動において果たしている役割を検証することを目指す。また Na_x からの「塩分摂取を抑制する指令」と AngII シグナルとの関係を解明する計画である。

第2の課題は、体液の監視に関わる新たなバイオセンサーの探索である。特に、水の摂取量や尿量の調節といった重要な生理機能を担う浸透圧センサー分子の実体解明に挑戦する。現在、体液の浸透圧センサーとして報告されているチャンネル分子 TRPV1 や TRPV4 のノックアウトマウスを独自に解析して、その妥当性について詳細に検討し直している。また、新たな浸透圧センサーを始めとする脳内の種々のセンサー分子の同定を目指し、次世代シーケンサーを用いて、感覚性脳室周囲器官である SFO 及び終板脈管器官(OVLT)の組織のトランスクリプトーム解析を行った。SFO 及び OVLT に特異的に発現する分子を多数同定したので、今後その発現解析と機能解析を進める。

5) 学術論文

なし

6) 著書、総説

M. Noda and H. Sakuta, “Central regulation of body-fluid homeostasis” *Trends Neurosci.* **36**, 661-673 (2013).

6) 国際会議発表リスト

なし

7) 招待講演

なし

8) 受賞、表彰

檜山武史 第3回自然科学研究機構若手研究者賞授賞

9) 特許

なし

オリオン公募研究（公募研究 a）

1) 研究課題名 シナプス反応のデジタル化技術による時空間活性揺らぎの生物学的意義の解明 —記憶を形成するシナプス集団の In vivo 光操作— （生命時空間設計研究領域）

2) 研究代表者 村越秀治（准教授）
生理学研究所、脳機能計測・支援センター、多光子顕微鏡室

3) 研究組織 柴田明裕（博士研究員）

4) 研究概要

シナプスは記憶の最小単位と考えられており、度々ハードディスクの記録素子（0 と 1 のデジタル）に例えられる。しかしながら、シナプスの後端を形成するスパイン内（体積は fL 程度）には、平均的に各種タンパク質分子が 10 分子程度ずつしか存在していないため、必然的に活性や分子数揺らぎを生じるようなシステムとなっている（デジタル的ではない）。すなわち、シナプスのような生体微小素子内では、時空間的にシナプス構成分子の分子数や活性レベルの不均一性が生じており、個々のシナプス反応のみならず、個体レベルにおいても機能に大きく影響を与えていると考えられる。果たして、このような素子単位での揺らぎを内包した記憶システムは生物にとって正の効果をもたらしているのだろうか？この疑問に答えることが目的である。

本研究では、学習によって長期増強を引き起こしたシナプス集団特異的に光応答性 CaMKII を標識し、光照射によってシナプスを再活性化させることで個体マウスの学習時に応答したシナプス選択的に長期増強レベルを限界まで大きくする（個々のシナプスの増強レベルの限界がデジタルの 1 に対応）。現在までに、海馬スライス標本の神経細胞において、2 光子励起によってスパインに可塑的な形態変化を惹起することに成功している。今後は、個体マウスにおいて、記憶形成によって可塑的变化を起こしたシナプス集団を光操作することで、シナプス反応の時空間不均一性が記憶の頑強さや柔軟性とどのように関係しているかを明らかにする。

オリオン公募研究（公募研究 a）

- 1) 研究課題名 動的な微小管がロバストな紡錘体を作る機構の解明（生命動秩序研究領域）
- 2) 研究代表者 村田隆（准教授）
基礎生物学研究所、生物進化研究部門

3) 研究概要

細胞骨格はタンパク質が重合した微細な繊維で、細胞内の骨組みとして配置されることにより、細胞の構成要素が細胞内の空間で秩序だった挙動をすることに働く。細胞骨格の特徴はダイナミックな再編成を繰り返すことである。たとえば、細胞が分裂する時には細胞骨格は崩壊し、再編成して遺伝物質や細胞質の分配に働く。この再編成は細胞骨格タンパク質の脱重合、再重合、繊維間の滑り移動により起こっているが、これらの素過程の空間、時間分布の定量的解析は困難な場合が多いため、素過程と細胞骨格全体の再編成の関係は不明な点が多い。主要な細胞骨格の1つである微小管は、極性を持つ中空繊維で、チューブリンタンパク質が重合してできている。本研究では、微小管再編成の素過程について定量解析し、動的な微小管が集まってロバストな構造体がどのようにして作られるのか理解することを目指す。この目的のため、植物の紡錘体における微小管のダイナミクスを測定し、得られた結果をもとにコンピューターシミュレーションを行って紡錘体構築機構の理解を目指す。本年度は、i) 微小管ダイナミクスの測定のためのプラスミド DNA 構築と安定形質転換体の作製、ii) 2光子スピニングディスク顕微鏡の条件設定、iii) コンピューターシミュレーションのための研究打ち合わせ、を行った。

i) プラスミド DNA 構築と安定形質転換体の作製：これまで使用していた微小管マーカーは光退色に弱いこと、複数のマーカーを同時に形質転換すると微小管形成が異常になることなどが明らかになったので、微小管の立体構造を考慮して、蛍光タンパク質を融合させるタンパク質を α チューブリンから β チューブリンに変更し、微小管伸長端マーカー EB1 の蛍光タンパク質融合部位を N 末端から C 末端に変更した。また、TagRFP チューブリンを光退色に強い TagRFP-T に改変するため、プラスミドの突然変異導入を行った。C 末端融合型の EB1-Citrine（改変 YFP）は安定形質転換体が得られた。他はプラスミド DNA 構築中である。

ii) 2光子スピニングディスク顕微鏡の条件設定：微小管伸長端マーカー EB1 の紡錘体中でのトラッキングのため、北大・根本研との共同研究により、2光子スピニングディスク顕微鏡の観察条件設定を行った。使用する波長を 900 nm から 1040 nm に変更する必要が生じたため、1040 nm で励起可能かつ光退色の少ない EB1-Citrine 標識ライン（詳細は上述）を作製した。

iii) コンピューターシミュレーションのための研究打ち合わせ：EMBL の Nedelec 研究室を訪問し、シミュレーションソフト Cytosim の使用について研究打ち合わせを行った。

4) 国際会議発表リスト

T. Murata, “Intracellular organization: organization of microtubules in the absence of a microtubule organizing center” 4th Multidisciplinary Science Forum, Washington D. C. (U.S.A.) February 2014.

5) 招待講演

村田隆 微小管の定量的な動態解析で明らかになった植物細胞分裂の仕組み 日本顕微鏡学会第38回関東支部講演会、東京、2014年3月

村田隆 光退色法によるタンパク質動態の定量的解析 日本植物生理学会第55回年会、富山、2014年3月

オリオン公募研究（公募研究B）

- 1) 研究課題名 時計タンパク質の離合集散リズムの1分子イメージング（生命動秩序形成研究領域）
- 2) 研究代表者 秋山 修志（教授）
分子科学研究所，協奏分子システム研究センター，
階層分子システム解析研究部門
- 3) 研究組織 向山 厚（助教）
阿部 淳（博士研究員）
檜山 卓也（博士研究員）

4) 研究概要

本課題では液中高速 AFM を用いて、Kai タンパク質時計の離合集散ダイナミクスを1分子ライブイメージングする。基盤に固定された KaiC が本来の機能を損なっていないかどうかについては、十分かつ注意深い検証が必要である。AFM 観察をしないオフラインの状態、基盤固定された KaiC を KaiA や KaiB を含む溶液で覆い、一定時間ごとに KaiC を基盤上から切り離してそのリン酸化状態を調べる。リン酸状態にリズムがでるように、KaiC と基盤の距離やリンカー素材について検討する。

KaiC の最適な固定化条件が決まれば、オンラインで離合集散の1分子イメージングを行う。短周期型、長周期型、リズム消失型の KaiC 変異体についても計測・比較を行い、タンパク質時計の離合集散が動秩序（リズムック）を示すのか、周期がどのようにして決定されているのかについて切り込みたい。

5) 学術論文

Kojima R, Okumura M, Masui S, Kanemura S, Inoue M, Saiki M, Yamaguchi H, Hikima T, Suzuki M, Akiyama S and Inaba K*

Radically Different Thioredoxin Domain Arrangement of ERp46, an Efficient Disulfide Bond Introducer of the Mammalian PDI Family
Structure in press, (2014)

6) 著書、総説

該当なし

6) 国際会議発表リスト

該当なし

7) 招待講演

秋山修志「タンパク質時計のブラックボックスを開く」、大阪大学蛋白質研究所セミナー 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会、岡崎、平成25年11月19日(火)～20日

Shuji Akiyama, “KaiC AS CIRCADIAN PACEMAKER OF CYANOBACTERIAL CIRCADIAN CLOCK”, 6th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, Okazaki Conference Center (Japan), November 2013.

8) 受賞、表彰

該当なし.

9) 特許

該当なし.

オリオン公募研究（公募研究 b）

- 1) 研究課題名 アミノ酸・タンパク質・タンパク質複合体の階層をつなぐ計算分子科学：
アミロイド線維形成を理解するために（生命動秩序形成研究領域）
- 2) 研究代表者 奥村久士（准教授）
分子科学研究所、計算科学研究センター
- 3) 研究組織 伊藤暁（助教）
森義治（特任助教）

4) 研究概要

認知症の1つであるアルツハイマー病はアミロイドベータペプチド(A β)というペプチドが凝集して不溶性のアミロイド線維を形成することで引き起こされると考えられている。一つ一つの A β は特定の構造を取ることなく揺らいでいるが、一旦アミロイド線維が形成されると強固な針状の物質を作る。しかしながらその末端は比較的自由に運動して、そこに A β がさらに結合したり解離したりし、ダイナミックに離合集散している。このようにアミロイド線維は柔軟かつロバストな秩序系である。アミロイド線維形成におけるミクロ・マクロ相関を理解するために、アミノ酸・タンパク質・タンパク質複合体という複数の階層をまたぐ理論研究を推進していく。

今年度はその一つとして、まずキャビテーション（気泡生成）により、どのようにアミロイド線維が破壊されるのか原子レベルでの詳細を明らかにした。圧力が正の時はアミロイドや水の構造に大きな変化は見られないが、負になった時にアミロイドの周りに気泡が生じた。この気泡は膜貫通領域の疎水性残基の周りに生じることが多かった。アミロイドの周りの水がほぼ蒸発し気泡に包まれてもアミロイドは壊れないが、圧力が再び正になり気泡が崩壊し水の液滴がアミロイドにぶつかる時にアミロイドが破壊された。この時、水は主に非膜貫通領域の親水性残基めがけて飛んでくることが分かった。一度気泡が崩壊した後にも直ちに小さい気泡が生成し破壊されるという過程が5回程度見られた。その後、気泡が再び生成する過程は見られなかった。

A β (29-42) 二分子の二量体化の過程を調べるためにクーロンレプリカ置換法を用いた分子動力学シミュレーションも行った。その結果、A β (29-42) 二分子が近づくと分子内構造が増加することが分かった。さらに、分子内ベータシート構造が存在することで分子間ベータシート構造の生成が促進されることが分かった。A β (29-42) のモノマー状態とダイマー状態についてそれぞれの自由エネルギー地形とそのエネルギー極小構造も明らかにした。

5) 国際会議発表リスト

H. Okumura, S. G. Itoh, “Disruption of amyloid fibril by a bubble due to ultrasonic wave to in non-equilibrium molecular dynamics simulations” 58th Annual meeting of biophysical Society, San Francisco (USA), February 2014.

6) 招待講演

H. Okumura, “Replica-permutation method for protein simulation and amyloid disruption by cavitation in non-equilibrium molecular dynamics simulation” Joint IMS-KU workshop on molecular sciences towards green sustainability, Bangkok (Thailand), January 2014.

奥村久士「アミノ酸・タンパク質・タンパク質複合体の階層をつなぐ計算分子科学：アミロイド線維形成を理解するために」、山田研究会・統合バイオサイエンスシンポジウム 次世代バイオサイエンスの可能性 要素から全体へ：ポストゲノム時代における統合的生命科学研究はどうあるべきか？ 愛知、2013年11月.

オリオン公募研究（公募研究 b）

- 1) 研究課題名 脊髄内リズム運動生成回路の発生および機能解析（生命時空間研究領域）
- 2) 研究代表者 東島眞一（准教授）
岡崎統合バイオサイエンスセンター

研究内容等は 2- 4 を参照。