

平成20年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 研究成果報告書

大学院生命科学研究科

研究プロジェクト名 生物の環境適応の分子機構解明に関する総合研究

研究代表者及び分担者

研究室名	職名	氏名	研究の役割分担
細胞機能学	教授・研究科長	山岸明彦	研究統括 班長・分子レベルでの環境応答研究の推進
細胞機能学	助教	赤沼哲史	分子レベルでの環境応答研究の推進
細胞機能学	講師	横堀伸一	細胞レベルでの環境応答研究の推進
環境分子生物学	准教授	太田敏博	細胞レベルでの環境応答研究の推進
分子細胞生物学	教授	多賀谷光男	班長・細胞レベルでの環境応答研究の推進
環境ストレス生理学	准教授	高橋 滋	細胞レベルでの環境応答研究の推進
環境応答生物学	助教	岡田克彦	細胞レベルでの環境応答研究の推進
基礎生命科学	教授	井上英史	班長・個体レベルでの環境応答研究の推進
脳神経機能学	講師	井上雅司	個体レベルでの環境応答研究の推進
分子生化学	助教	福田敏史	個体レベルでの環境応答研究の推進
生物有機化学	准教授	伊藤久央	班長・低分子検出高感度化研究の推進
環境衛生化学	准教授	内田達也	低分子検出高感度化研究の推進
環境衛生化学	助教	熊田英峰	低分子検出高感度化研究の推進
環境衛生化学	助教	青木元秀	低分子検出高感度化研究の推進

研究成果の概要

環境因子の生物に対する影響とそれに対する生物応答を分子、細胞、個体各レベルで研究した。これに、さらに環境中の無機有機低分子化合物の分析感度向上の為の開発研究を行った。環境因子は様々なレベルで異なった影響を生物に対して与える。こうした環境因子の影響とそれに対する生物応答を総合的に検討した。

異なった生物種でそれぞれ最も重要な環境因子に焦点をあて、個体、細胞、分子各レベルで環境応答を総合的に研究した。こうした総合的目標の下で、個々の研究課題の成果は以下の様に何れも当初の目標の進捗を達成した。

個々の課題の成果は以下の様である。

- (1) 耐熱性とセグメントの融合、祖先型の関係を調べた。さらに、超好熱菌由来酵素の実験室内進化による低温高活性化を行った。
- (2) 高々度単離菌 *Deinococcus* の新種記載、紫外線耐性並びに γ 線耐性を検討した。また、*D. radiodurans* の低温および乾燥耐性を検討した。
- (3) *atl*遺伝子の発現様式の解析、*atl*遺伝子破壊株における突然変異誘発頻度の解析を行った。また、AtI タンパク質の DNA 修復活性への関与の解析とヌクレオチド除去修復系との相互作用の検討を行った。
- (4) p31 ノックアウトマウスの作製を行った。そして、p31 ノックアウト細胞における小胞体の構造変化と小胞体ストレスを検討した。さらに、p31 結合タンパク質を同定し機能解析を行った。
- (5) Upf1 の ATF5 mRNA の安定性への関与を検討した。
- (6) 光による解糖系酵素の遺伝子発現制御を検討した。さらに、解糖系酵素遺伝子の調節因子の同定を行った。
- (7) *C. elegans* 薬剤排出トランスポーターの変異体を用いて薬剤に対する感受性を調べた。また、*C. elegans* 高感受性化株の解析を行った。
- (8) 遺伝子欠損マウスを用いて、味細胞・味神経による pH 受容への新規陽イオンチャネルファミリーの寄与についての解析を行った。
- (9) FLJ 遺伝子の mRNA と FLJ 蛋白質の発現解析を行った。さらに、DISC1 遺伝子の mRNA の発現解析を行った。
- (10) 亜鉛イオン識別型蛍光プローブの大量供給法の開発と、亜鉛イオンに対する Kd 値の異なる蛍光プローブの開発を行った。
- (11) 人為的環境ストレスによる藻類脂質成分変化を解析した。また、環境試料中脂質成分に関する分析法の検討を行った。
- (12) ヒトエストロゲン受容体(hER)タンパク質を用いたバイオセンサの構築を行った。

タンパク質と酵素の温度適応化と宇宙環境に対する微生物の生存に関わる応答

山岸 明彦（細胞機能学研究室・教授）

横堀 伸一（細胞機能学研究室・講師）

赤沼 哲史（細胞機能学研究室・助教）

1. 当初の研究目標

A. 生物の特徴の一つに環境の変化に対応した適応進化の能力がある。たとえば、生物は進化の過程において、生育環境における温度の変化に幾度となく直面してきたはずであるが、その都度、変化した温度に適応するための進化を繰り返してきた。生物の温度変化への適応進化は、その生物が持つ生体分子を変化した環境の温度へ適応させることであるので、本研究ではタンパク質の温度適応（低温適応と高温適応の両方）の仕組みを明らかにすることを目的とし、タンパク質の耐熱化と好熱菌由来耐熱性酵素の低温高活性化を行う。タンパク質の耐熱化法としては、タンパク質のオリゴマー化、オリゴマータンパク質のサブユニットの融合、あるいは、我々のグループですでに開発した、アミノ酸配列のアライメントおよび進化系統樹を利用した方法を用いる。好熱菌酵素の低温高活性化には実験室内進化の手法を用い、得られた変異型酵素が持つアミノ酸置換と諸性質とを解析することで、酵素の低温域における高活性化機構を探る。このような研究からタンパク質の温度適応の仕組みを解明すると同時に、生物が体験してきた環境の温度変化の歴史（進化の過程）に関する情報も探る。さらに、天然タンパク質および低温適応型・高温適応型変異タンパク質の安定性と温度との関係についての熱力学的な解析も行う。

B. 宇宙空間は、生物にとって、最も過酷な極限環境の 1 つである。しかし、近年生物の痕跡と考え得るものが火星由来隕石に見いだされたことなどから、生物が宇宙空間を越えて天体間を移動する可能性が真剣に検討されるようになってきた。宇宙空間での微生物の生存可能性を明らかにし、評価するためには、宇宙空間の環境を模擬し、様々な環境因子（真空、乾燥、紫外線、放射線、等）に対する微生物の曝露実験を行うことが必要である。そのために、これまで紫外線／放射線耐性の高いことが知られている *Bacillus* 属の孢子、*Deinococcus radiodurans*、成層圏などの高々度で我々が採取した新種(*Deinococcus aerius* 及び *D. antherius*)の紫外線／放射線耐性菌(*Deinococcus* 属)を用いて、そのような宇宙環境を模擬した条件下での生存率を検討する。このような環境下でも生物が長期にわたって生存可能であることが示されるなら、それは生命の天体間の移動可能性を探る上での重要な基盤となる。紫外線、放射線（ γ 線）、乾燥、真空に対する微生物、特に高々度で我々のグループが単離した新種、の曝露後の生存率を解析する。

2. 研究成果の概要

A. タンパク質の温度適応に関して、ホモダイマータンパク質のサブユニットの融合（モノマー化）によるタンパク質の耐熱化、祖先型アミノ酸配列を持つタンパク質の設

計と合成を行った。さらに、いくつかの好熱菌由来酵素の実験室内進化による低温高活性化、および、低温高活性化型変異体のスクリーニング系の開発を行った。その成果の概要は以下になる。

(1)TIM バレル-half-barrel セグメントの重複と融合による耐熱化

ホモダイマータンパク質のモデルとして、TIM バレル構造を持つ大腸菌 TrpF の $(\beta/\alpha)_{3-6}$ half-barrel セグメントを用いた。このセグメントはホモダイマー構造を持つことが明らかになっている。この half-barrel セグメント 2 分子を融合させた $(\beta/\alpha)_{3-6/3-6}$ を作製した。 $(\beta/\alpha)_{3-6}$ と $(\beta/\alpha)_{3-6/3-6}$ の熱変性解析を行ったところ、 $(\beta/\alpha)_{3-6/3-6}$ は約 7℃ 変性中点温度 (T_m) が上昇しており、これまでもいくつかの例が報告されているオリゴマータンパク質のサブユニットの融合による耐熱化が、大腸菌 TrpF- $(\beta/\alpha)_{3-6}$ half-barrel セグメントにもあてはまることが示された。

(2) 祖先型アミノ酸配列を持つタンパク質の設計と合成

アミノ酸配列のアライメントおよび進化系統樹を用いる手法によって、任意のタンパク質の祖先型アミノ酸配列を推定し、その祖先型配列をコードする遺伝子の合成を行った。

以下に示すタンパク質について、祖先型配列の推定と合成を行った。

- ①ロイシン合成系酵素、3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素
- ②複製系酵素、DNA ジャイレース B サブユニット
- ③代謝系酵素、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ

(3) 実験室内進化による超好熱菌由来酵素の低温高活性化

超好熱性古細菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の 25℃ における触媒活性が上昇した変異型酵素を複数個単離し、アミノ酸置換部位の同定と変異型酵素の酵素活性および耐熱性の解析を行った。その結果、アミノ酸置換部位は立体構造上広く分布していた。また、見つかったアミノ酸置換の多くは、酵素の補酵素 NAD に対する親和性と反応回転数の両方を改善した。耐熱性の測定からは、今回得られたアミノ酸置換は、酵素の耐熱性をいくらか低下させることが示されたが、それでも変異型酵素は十分高い熱安定性を保持していた。

(4) 好熱菌由来ラッカーゼの低温高活性化型変異体のスクリーニング系の開発

低温高活性化型ラッカーゼをスクリーニングするためのシステム作りを行い、96 穴プレートを用いて効率よくスクリーニングを行うことのできる系を開発した。

B. 宇宙空間における微生物の生存適応に関して、平成 20 年度は、上記の目標を実現するため、主として我々が高々度で単離した *Deinococcus aerius* 並びに *Deinococcus antherius* について、新種としての記載とともに、その紫外線並びに γ 線耐性を検討した。また、真空には乾燥が伴う。乾燥に対する耐性について、*Deinococcus radiodurans*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli* との間で比較した。これらの成果について、下に述べる。

- (1) 高々度単離菌 *D. aerius* 並びに *D. antherius* の紫外線耐性並びに γ 線耐性の検討と新種としての記載

D. aerius TR0125 は対流圏最上部、また *D. antherius* ST0316 は成層圏最下部で、

航空機を用いて行った空気中の微生物の採取実験の結果、単離されたものである。分子系統解析、その他の微生物学的な解析により、両者はそれぞれ *Deinococcus* 属の新種であることが明らかとなった。

- (2) 両者の紫外線(UVC 254 nm)に対する耐性を、紫外線耐性菌として知られる *D. radiodurans*、*Bacillus subtilis* 孢子、一般的な真正細菌の代表として *Escherichia coli* と比較した。*D. aerius* (D10: 1000 (500-1500) J/m²)および *D. antherius* (D10: 1200 ± 130 J/m²)は *D. radiodurans* (D10: 870 ± 56 J/m²)よりも高い紫外線耐性を示した。また、 γ 線についての耐性は、*D. aerius* は *D. radiodurans* には若干劣るものの、*D. antherius* は *D. radiodurans* と同等であった。
- (3) *Deinococcus radiodurans* を-70、4、25℃で乾燥条件と高湿度条件下で6週間置き、その生存率を見ると、すべての温度で乾燥条件下の方が生存率が高い結果を得た。特に、25℃では湿潤条件下では *D. radiodurans* の生存率は0%であり、*D. radiodurans* は乾燥耐性が高いことが推定された。一方、*Escherichia coli* は、乾燥条件ではどの温度でも乾燥条件下では生育が確認されず、*Bacillus pulmus* 孢子でも、湿潤条件下の方が25℃並びに4℃では生存率が高い。これらのことは、*D. radiodurans* が乾燥環境に適応していることを示唆する。

3. 研究評価及び今後の研究計画

A. タンパク質の温度適応に関して、ホモダイマータンパク質のサブユニットの融合によるタンパク質の耐熱化例を得ることができた。

次年度、他のタンパク質、特に産業利用において耐熱化が望まれる他のタンパク質への応用の実現が十分期待できるものである。

より具体的には、3種類のタンパク質について祖先型アミノ酸配列の推定と遺伝子の合成を達成した。このことにより次年度、次のステップである実際に合成した遺伝子の発現、祖先型タンパク質の精製へと進むことができる。

また、超好熱菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温高活性化型変異体の単離と解析を行った。このことにより次年度、アミノ酸置換のタンパク質構造、特に活性部位に与える影響についての詳細な解析を可能とし、将来的に好熱菌酵素の低温高活性化のためのガイドラインの確立に向けたさらなる発展を期待できるものである。

さらに、低温高活性化型ラッカーゼのスクリーニング系の開発について達成することができた。このことは次年度、実際にランダム変異導入とスクリーニングによる低温高活性化型ラッカーゼの単離の実現が十分期待できるものである。

B. 微生物の宇宙環境応答に関して、今回の研究により、高々度で採取された *D. aerius* 及び *D. antherius* は、高い紫外線並びに電離放射線 (γ 線) 耐性を持つことが明らかとなった。また、*D. radiodurans* は、孢子形成をしないのにも関わらず、高い乾燥耐性を示した。*D. aerius* 及び *D. antherius* も高い乾燥耐性を示すことから、これら *Deinococcus* 属の各種は、宇宙空間に曝露した場合、*Escherichia coli* 等と比較して、その生存率は極めて高いことが期待される。

今後は、これらの種の真空耐性、各種重粒子線に対する耐性など、宇宙空間で生物の

生存に関わる環境条件を検討し、これらの生物が宇宙空間でも生存可能であるのか検証していく。また、粘土鉱物といった、UV、各種放射線などを遮蔽する効果が期待される物質について、その遮蔽効果によるこれら微生物の生存確率の上昇についても、検討する。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Sasaki, M., Uno, M., Akanuma, S. and Yamagishi A.
Random mutagenesis improves the low-temperature activity of the tetrameric 3-isopropylmalate dehydrogenase from the hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii*.
Protein Eng.Des. Sel. 21, 721-727. (2008).
- (2) Akanuma, S. and Yamagishi, A.
Experimental evidence for the existence of a stable half-barrel subdomain in the (beta/alpha)₈-barrel fold..
J. Mol. Biol. 382, 458-466. (2008).
- (3) Yang, Y.-J., Itahashi, S. Yokobori, S. and Yamagishi, A.
UV-resistant Bacteria isolated at high altitude.
Biol. Sci. Space 22: 18-25 (2008)
- (4) Yang, Y.-J., Yokobori, S. and Yamagishi, A.
Bacterial survival responses to desiccation and high humidity.
Adv, Space Res. (a COSPAR publ.) 43: 1285-1290 (2009)
- (5) Yang, Y.-J., Itoh, T. Yokobori, S. Itahashi, S. Shimada, H. Satoh, K. Ohba, H. Narumi, I. and Yamagishi, A.
Deinococcus aerius sp. nov., isolated from the high atmosphere.
Internatl. J. Syst, Evol. Bacteriol. (in press)

総説・著書等

- (1) 山岸明彦
生命の進化と古細菌
蛋白質核酸酵素 54(2): 108-113 (2009)
- (2) 山岸明彦 渡邊信他編集
微生物の辞典 「好酸性菌」
p.682-685 朝倉書店 (2008)
- (3) 山岸明彦, 矢野創, 小林憲正, 横堀伸一, 橋本博文, 山下雅道
たんぽぽ：宇宙ステーションでの微生物有機物捕獲, 曝露実験
Viva Origino, 37, in press (2008)
- (4) 亀井綾美、山岸明彦
原核生物における細胞骨格の進化
蛋白質核酸酵素 53, 1759-1764 (2008)

国際学会発表

- (1) Yamagishi, A., Yokobori, S., Yang, Y., Fujisaki, K., Hashimoto, Kawai, H., Kobayashi, K., Mita, H., Okudaira, K., Tabata, M., Yano, H., Yamashita, M., Yoshimura, Y. and TANPOPO WG.
Tanpopo: Microbe and Micrometeoroid Capture Experiments on International Space Station.
37th Committee on Space Research (COSPAR) Scientific Assembly, 2008/7, Montreal, Canada
- (2) Yang, Y., Yokobori, S. and Yamagishi, A.
Bacterial survival responses to extreme desiccation and high humidity.
37th Committee on Space Research (COSPAR) Scientific Assembly, 2008/7, Montreal, Canada
- (3) Yokobori, S., Yamagishi, A., Yang, Y., Fujisaki, K., Hashimoto, H., Kawai, H., Kobayashi, K., Mita, H., Okudaira, K., Tabata, M., Yano, H., Yamashita, M., Yoshimura, Y. and TANPOPO WG.
TANPOPO: Astrobiology Exposure and Micrometeoroid Capture Experiments - For Understanding Survival Possibility of Microorganisms in Space.
XV International Conference on the Origin of Life, 2008/8, Florence, Italy
- (4) Kobayashi, K., Hashimoto, H., Kawai, H., Mita, H., Okudaira, K., Yamagishi, A., Yamashita, M., Yano, H., Yokobori, S. and TANPOPO WG.
Capture and Detection of Microorganisms in Space: The Tanpopo mission. CAREX Workshop: Priority for Environment-Specific Technological Developments and Infrastructures, 2008/12, Sant Feliu de Guixoles, Spain

国内学会発表

- (1) 横堀伸一、宇宙環境利用科学委員会研究班WG「たんぽぽ」(代表：山岸明彦)。
微生物衝突実験・曝露実験
日本地球惑星科学連合 2008 年大会、幕張、2008 年 5 月
- (2) 林清香、佐々木道香、赤沼哲史、山岸明彦
2 量体および 4 量体構造を持つ耐熱性イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温高活性化に寄与する変異の比較
第 8 回日本蛋白質科学会年会、2008 年 6 月、東京
- (3) 森寛史、赤沼哲史、山岸明彦
フラグメント化した TIM バレルタンパク質の解析
日本蛋白質科学会第 8 回年会、2008 年 6 月、東京
- (4) 上野絵美、松葉拓、梅田直、赤沼哲史、山岸明彦
高い熱安定性を持つ人工ヘリックス-ターン-ヘリックス LAHTH と 4 ヘリックスバンドル LAFH
日本蛋白質科学会第 8 回年会、2008 年 6 月、東京

- (5) 横井珠希、岩見祥子、金城健太、渡邊英哲、横堀伸一、赤沼哲史、山岸明彦
復元した祖先型 DNA ジャイレースの熱安定性
日本蛋白質科学会第 8 回年会、2008 年 6 月、東京
- (6) 佐々木道香、林清香、宇野真由美、赤沼哲史、山岸明彦
2 種類の耐熱性イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の常温高活性化型異変異体の比較
日本 Archaea 研究会第 21 回講演会、2008 年 7 月、那覇
- (7) 山岸明彦、横堀伸一、矢野創、奥平恭子、橋本博文、山下雅道、小林憲正、田端誠、河合秀幸
宇宙で生命の起原を探る：タンポポは飛ぶ
第 49 回大気環境学会年会、金沢、2008 年 9 月
- (8) 山岸明彦、矢野創、小林憲正、横堀伸一、橋本博文、山下雅道
有機物・微生物の宇宙曝露と宇宙塵・微生物の捕集実験（たんぽぽ）実験計画の概要
日本地球化学会第 55 回年会、東京、2008 年 9 月
- (9) 山岸明彦、小林憲正、矢野創、横堀伸一、橋本博文、河合秀幸、山下雅道
有機物・微生物の宇宙曝露と宇宙塵・微生物の捕集実験（たんぽぽ）：アストロバイオロジーにおけるパンスペルミア仮説検証
第 22 回日本宇宙生物科学会年会、奈良、2008 年 9 月
- (10) 藤崎健太、藪下さやか、Yang Yinjie、奥平恭子、田端誠、河合秀幸、丸茂克美、横堀伸一、矢野創、小林憲正、山岸明彦
模擬宇宙環境下での微生物の生存可能性とその検出方法の検討
第 22 回日本宇宙生物科学会年会、奈良、2008 年 9 月
- (11) 横堀伸一、Yang Yinjie、藤崎健太、河口優子、小林憲正、橋本博文、河合秀幸、三田肇、奥平恭子、田端誠、山下雅道、矢野創、吉村義隆、山岸明彦
有機物・微生物の宇宙曝露と宇宙塵・微生物の捕集実験（たんぽぽ）：パンスペルミア仮説の検証にむけて
極限環境微生物学会年会、池袋、2008 年 11 月
- (12) 赤沼哲史、山岸明彦
TIM-barrel 構造に含まれる安定な half-barrel サブドメインの同定
日本生物物理学会第 46 回年会、2008 年 12 月、福岡
- (13) 岩見祥子、横井珠希、金城健太、渡邊英哲、横堀伸一、赤沼哲史、山岸明彦
祖先型アミノ酸配列から成る DNA ジャイレース B サブユニットの解析
日本分子生物学会第 31 回年会・日本生化学会第 81 回大会合同大会(BMB 2008), 2008 年 12 月、神戸
- (14) 金城健太、赤沼哲史、玉腰雅忠、田之倉優、山岸明彦
超好熱菌由来の他基質アミノトランスフェラーゼ
日本分子生物学会第 31 回年会・日本生化学会第 81 回大会合同大会(BMB 2008), 2008 年 12 月、神戸
- (15) 赤沼哲史、上野絵美、松葉拓、山岸明彦
遺伝子重複と融合によるホモダイマータンパク質の安定化とその意義
日本分子生物学会第 31 回年会・日本生化学会第 81 回大会合同大会(BMB 2008),

2008 年 12 月, 神戸

- (16) 阿部勇理也、間瀬朋子、赤沼哲史、山岸明彦
2 種類の TIM バレル酵素によるキメラ酵素の作製と解析
日本分子生物学会第 31 回年会・日本生化学会第 81 回大会合同大会(BMB 2008),
2008 年 12 月, 神戸
- (17) 林清香、佐々木道香、赤沼哲史、山岸明彦
進化分子工学的的手法により更に低温高活性化した変異酵素の解析
日本分子生物学会第 31 回年会・日本生化学会第 81 回大会合同大会(BMB 2008),
2008 年 12 月, 神戸
- (18) 山岸明彦、小林憲正、矢野創、横堀伸一、橋本博文、河合秀幸、山下雅道
有機物・微生物の宇宙曝露と宇宙塵・微生物の捕集 (たんぼぼ)
第 9 回宇宙科学シンポジウム、相模原、2009 年 1 月
- (19) 山岸明彦、横堀伸一、小林憲正、山下雅道、橋本博文、矢野創、河合秀幸、中嶋
悟、奥平恭子、丸茂克美、癸生川陽子、奈良岡浩、長谷川直、三田肇、藪田ひか
る、田端誠
有機物・微生物の宇宙曝露と宇宙塵・微生物の捕集 (たんぼぼ)
第 25 回宇宙利用シンポジウム、相模原、2009 年 1 月
- (20) 横堀伸一、Yang Yinjie、藤崎健太、河口優子、小林憲正、橋本博文、河合秀幸、
三田肇、鳴海一成、奥平恭子、田端誠、山下雅道、矢野創、吉村義隆、山岸明彦
有機物・微生物の宇宙曝露と宇宙塵・微生物の捕集実験 (たんぼぼ): パンスペル
ミア仮説の検証にむけて
第 34 回生命の起源および進化学会学術講演会、大阪、2009 年 3 月
- (21) 藤崎健太、藪下さやか、山岸明彦、横堀伸一、Yang Yinjie、丸茂克美、小林克己、
吉村義隆、吉田聡、長沼毅、小林憲正
微生物の重粒子線耐性および X 線耐性: たんぼぼ計画の予備実験, たんぼぼ WG,
生命の起源および進化学会第 34 回学術講演会、大阪、2009 年 3 月

DNA 損傷などに対する細胞の適応ネットワーク機構

太田 敏博（環境分子生物学研究室・教授）

1. 当初の研究目標

遺伝子 DNA には温度や酸素などの細胞内要因、化学物質や UV などの外的要因によって様々な損傷が絶え間なく生じている。細胞はこれを修復するため、損傷塩基のタイプに応じて特異的な酵素系が働いている。一方、これらの修復機能に隠れて通常は見えていないマイナーな修復酵素が存在し、主要な修復応答が限界に近いところでは重要なバックアップ機能を果たしていると考えられる。本研究では、この修復システム間のネットワークを解明していくとともに、その機能欠損が及ぼす生体影響について、微生物細胞やミジンコなどの微小甲殻類を用いて調べることを目的とする。これらの研究によって、適応応答経路において従来マイナーな活性しか持たないとされていたタンパクが、異なる適応機構間の橋渡し役として働く重要な機能があることを明らかにすることで、生体防御システムのネットワーク全体像の理解を深める意義がある。手法としては、微生物では遺伝子破壊株の分離、ミジンコ胚においては RNAi を用いる。

初年度は、DNA 塩基のアルキル化損傷に対する修復システムにおいて、アルキル化塩基認識タンパクと、ヌクレオチド除去修復系のタンパクとの相互作用の可能性について主に細菌の変異株を作製して調べる。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のゲノムには、メチル化グアニンの一つである O⁶-methylguanine (O⁶-mG) を修復する酵素 O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (Ogt) は見つかっていない。しかし、アミノ酸配列に高い類似性をもつ Alkyltransferase-like (Atl) タンパクが見ついている。このタンパクでは、Ogt の活性部位に存在するアミノ酸配列 PCHRV モチーフの Cys が Ala に置き換わっているため、メチル基の受容は出来ないと考えられている。このため Atl の機能的役割の詳細は今のところ不明である。まず、Atl タンパクが DNA 修復に何らかの関与をもっているのか、さらに、Ogt 酵素を持たずにメチル化塩基の修復をいかに行っているのか、高度好熱菌の変異株を分離する手法でもって、遺伝生化学的なアプローチで解明することを目標とした。

2. 研究成果の概要

1) *atl* 遺伝子の発現の解析

β -グルコシダーゼ遺伝子(*bgl*)をレポーターに利用して *atl* 遺伝子の発現様式の解析を行った。*atl* 遺伝子と *bgl* 遺伝子を連結した Bgl 発現プラスミド pGLS1199 (*atl'*-*bgl*) を構築した。*T. thermophilus* JOS9 (Δ *bgl*) 株に導入して 70°C で Bgl 活性を測定した。その結果、*atl* 遺伝子単独での発現は検出されなかった。そこで *atl* 遺伝子上流の 5 つの遺伝子についてプラスミドの構築も行い、オペロン様に発現しているかどうかについて調べた。しかし、いずれも明瞭な発現は確認できなかった。さらにアルキル化剤である MNNG で処理してから Bgl 活性を測定したが、発現誘導も検出できなかった。

2) *atl* 遺伝子破壊株における突然変異誘発頻度の解析

Bgl レポーターアッセイの結果からは *atl* 遺伝子の発現が確認できなかったことから、本遺伝子産物が細胞内で機能しているのかどうか不明であった。そこで、*atl* 遺伝子欠損変異株の分離を行って機能解析を行うことにした。Kanamycin 耐性 *htk* 遺伝子を挿入することで *atl* 遺伝子機能を破壊した *atl::htk* プラスミドを構築して、RT30 (*hisD3110*) 株から相同組換えによる形質転換株を分離し、KM20 (*hisD3110, atl::htk*) 株を得た。なお、*hisD3110* 遺伝子座では G:C→A:T の復帰突然変異を測定することができる。KM20 株をアルキル化剤 MNNG で処理したところ、His⁺ 復帰変異コロニーが著しく増加したことから、*atl* 遺伝子産物は *T. thermophilus* において明らかにアルキル化塩基の修復に関与していることが確認された。

3) Atl タンパク質の 109Cys の DNA 修復活性への関与の解析

O⁶-mG を修復する酵素 Ogt には生物間で高度に保存されている PCHRV モチーフの存在が知られていて、この中の Cys がメチル基転移活性においてメチル基を受容する重要なアミノ酸である。*T. thermophilus* の Atl タンパク質は、アルキル化塩基の修復に関与していることが確認されたが、上記のモチーフは PAHRV であり、Cys が存在しない。一方、Atl にはこの PAHRV 配列より N 末端側 6 番目に唯一の 109Cys が存在する。この Cys 残基が活性に関与しているのかどうか調べる目的で、109Ala に置換した変異株 AA20 を作成した。アルキル化剤 MNNG 処理による復帰突然変異を測定した結果、変異の誘発は親株 RT30 と同程度であり、109Cys がメチル基転移活性に関与している可能性は極めて低いと結論された。以上の研究から、Atl は O⁶-mG に結合したとしても、メチルトランスフェラーゼ活性はもたないと考えられた。

4) ヌクレオチド除去修復系との相互作用の検討

Atl はメチルトランスフェラーゼ活性をもたないが、どのようにメチル化塩基の修復に関わっているかについての詳細は不明である。近年、Atl タンパクとヌクレオチド除去修復系に関わるタンパクの一つである UvrA との相互作用を示唆する報告がなされた。これは Atl の結合で認識された O⁶-mG がヌクレオチド除去修復系で修復されるという全く新たなメカニズムを示唆するものである。ヌクレオチド除去修復では、塩基損傷の認識には UvrA タンパクと UvrB タンパクが、また、損傷塩基をもつヌクレオチドの切り出しには UvrC タンパクが関与していることが知られている。これらのタンパクは各々 *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* 遺伝子産物であり、UvrABC エクシヌクレアーゼとして作用する。そこでまず *uvrA* 遺伝子の破壊株の分離を行った。分離した変異株についてメチル化剤 MNNG 処理による突然変異の誘発を測定したところ、*atl* 変異株よりも著しく高い感受性を示した。*T. thermophilus* においては、メチル化塩基の修復にヌクレオチド除去修復が大きく関与していることが判明した。これは大腸菌など Ogt をもつ微生物とは異なる感受性であった。

3. 研究評価及び今後の研究計画 (1,200 字程度)

これまで機能が不明であった *atl* 遺伝子産物は *T. thermophilus* においてアルキル化

塩基の修復に関与していることを明らかにした。また、ヌクレオチド除去修復の欠損株である *uvrA* 変異株もメチル化剤に対して高い感受性を示し、アルキル化塩基の修復に大きく関与していることがわかった。これらの成果から、メチル化損傷塩基である O⁶-mG を AtI が認識して結合し、UvrA タンパクとの相互作用を介してヌクレオチド除去修復系で修復されるというモデルが考えられた。次年度はヌクレオチド除去修復酵素の一つ UvrA タンパクと AtI タンパクが相互作用する可能性について研究を進めたい。

具体的には、まず *atl*, *uvrA* 両遺伝子を破壊した二重変異株を作成する。遺伝子破壊は *atl* 遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子(*htk*)を挿入することで、また、*uvrA* 遺伝子内にハイグロマイシン耐性遺伝子(*hph5*)を挿入することで行う。*atl*, *uvrA* 株を作成して MNNG に対する感受性を調べて、すでに得られている *uvrA* 変異株、*atl* 変異株、親株との比較を行う。今年度はメチル化剤で最も誘発されやすいことが知られている G:C→A:T に注目して研究を行った。次年度はさらに誘発される塩基対置換変異の特異性を解析するための 4 種類の *hisD* 遺伝子マーカーを組み合わせた菌株を作成して MNNG に対する感受性、誘発変異の特性を調べる。すでに分離されている *T. thermophilus* WH11、RT30、RT40 および RT50 株はいずれも His 要求性の変異株で、各々 A:T→G:C、G:C→A:T、G:C→T:A および A:T→T:A 変異を His⁺復帰突然変異で検出することのできる菌株である。これらの菌株由来の *atl* 欠損株と *uvrA* 欠損株を作成する。さらに、*atl*, *uvrA* 二重欠損変異株の分離も行う予定である。分離した変異株についてメチル化剤 MNNG 処理による突然変異の誘発を測定し、アルキル化損傷で生じる塩基対置換変異に対する *atl*, *uvrA* 遺伝子欠損の影響を明らかにする。

UvrA タンパクが相互作用するタンパクには UvrB タンパクのほか、転写修復共役因子 (transcription repair coupling factor) である Mfd タンパクが知られている。UvrB タンパクはその β ドメインと呼ばれる領域で UvrA タンパクと結合していると考えられている。Mfd タンパクと AtI タンパクにも、β ドメインと弱い類似性のあるアミノ酸配列が存在する。この部分を UvrA タンパクと相互作用する部位の候補と考え、部位特異的変異導入によりアミノ酸置換を導入した AtI タンパクを作成する。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Niimi, N., Sassa, A., Katafuchi, A., Gruz, P., Fujimoto, H., Bonala, R., Johnson, F., Ohta, T., and Nohmi, T.

The steric gate amino acid tyrosine 112 is required for efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ .

Biochemistry (印刷中).

国内学会発表

- (1) 小野寺威文, 時下進一, 太田敏博

高度好熱菌の Alkyltransferase-like (AtI) タンパクの機能解析

第 37 回日本環境変異原学会大会、2008 年 12 月、沖縄

- (2) 赤沼三恵、中島大介、山田樹里、角田真澄、太田敏博

Maltol および Ethylmaltol 水溶液への UV 照射で生成する変異原の解析

第 37 回日本環境変異原学会大会、2008 年 12 月、沖縄

- (3) 佐々彰、新見直子、Petr Gruz、太田敏博、能美健彦

ヒト DNA ポリメラーゼ κ における cleft アミノ酸変異の損傷 DNA に対する親和性への影響

第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月、神戸

- (4) 大貫晋平、成戸愛子、時下進一、太田敏博、山形秀夫

オオミジンコにおける Me31B と Pumilio ホモログの発現領域の解析

第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月、神戸

- (5) 米倉温、諏訪真紀子、時下進一、太田敏博、山形秀夫

オオミジンコ CPEB 遺伝子群の解析

第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月、神戸

- (6) 川城知子、時下進一、太田敏博、山形秀夫

オオミジンコ BOULE 相同遺伝子の発現解析

第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月、神戸

- (7) 福村美渚、時下進一、太田敏博、山形秀夫

オオミジンコのヘモグロビン遺伝子クラスター内にコードされる non-coding RNA 遺伝子の発現

第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月、神戸

- (8) 竹田悠見子、太田敏博、玉腰雅忠、森屋利幸、大島泰郎

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における Deoxyhypusine synthase-like (Dsl) タンパクのポリアミン生合成経路への関与

日本ポリアミン研究会第 23 回研究発表会、2009 年 1 月、大阪

環境変化に対する小胞体の応答と形態変化：Syntaxin18 複合体を中心として

多賀谷光男（分子細胞生物学研究室・教授）

1. 当初の研究目標

動物細胞の小胞体（endoplasmic reticulum: ER）は、核近傍から細胞の周辺へと放射状に広がる膜構造体であり、分泌系タンパク質や脂質の合成、毒物代謝、カルシウムの貯蔵、アポトーシスなどの多種多様な機能を有している。合成された分泌系タンパク質は、小胞体内でシャペロン等の働きで立体構造が形成されてからゴルジ体へ輸送されるが、立体構造形成に失敗したタンパク質は小胞体からサイトゾルへと運ばれて分解される（品質管理機構または ER-associated degradation）。小胞体は融合と分裂を繰り返すダイナミックなオルガネラであるが、種々のサブドメイン構造を有しており、それらのサブドメインが連携を保ちながらも固有の機能を発揮することで、小胞体の多様な機能が調和して営まれている。例えば、粗面小胞体にはリボソームが付着しており、ここで分泌系タンパク質が合成される。合成されて立体構造の形成されたタンパク質は、小胞体出芽部位（ER exit site）で形成される輸送小胞（ゴルジ体へ向う）に取り込まれる。滑面小胞体は毒物代謝に関与するとともに、脂質合成やカルシウムの貯蔵に関係している。

小胞体の構造は組織・臓器ごとに異なっており、それは組織・臓器に要求される異なった機能を反映している。例えば、膵臓の腺房細胞ではアミラーゼ等の分泌消化酵素が大量に作られており、タンパク質の合成と分泌のために働く粗面小胞体や小胞体出芽部位の構造がよく発達している。一方、毒物代謝に関与する肝臓では滑面小胞体がよく発達している。小胞体の構造は外部の環境によって大きく変化し、毒物投与によってシトクロム P450 が誘導される時には、滑面小胞体が顕著に増加する。また、白血球 B 細胞が活性化されると、免疫グロブリンを分泌するために小胞体が著しく発達する。また、最近、ストレス応答に関連する転写因子が脂質合成と小胞体量の調節にも関与していることが報告されている。環境変化に伴う小胞体構造のこのような変化を理解するためには、小胞体の構築原理を分子レベルで解明することが重要と思われる。

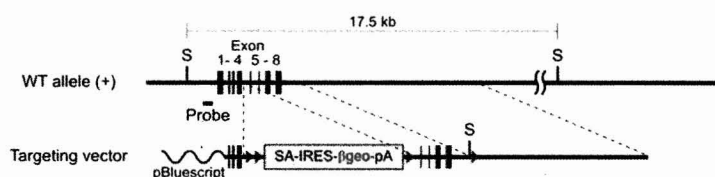
SNARE は膜融合に関与するタンパク質であり、 α -ヘリックス構造と、それに引き続く膜貫通ドメインをその C 末端に有する。小胞側に存在する v (vesicle) -SNARE とターゲット膜側に存在する t (target) -SNARE がその α -ヘリックス構造（v-SNARE は 1 本、t-SNARE は 3 本の α -ヘリックスを供給）を介して強固に結合することで膜融合が引き起こされる。Syntaxin18 は小胞体膜に存在する t-SNARE であり、他の小胞体 SNARE（BNIP1 や p31/Use1p）と複合体を形成して小胞体膜の融合（小胞体膜同士の融合および小胞体膜とゴルジ体から小胞体への逆行輸送小胞との融合）に関与する。本研究では、syntaxin18 複合体の解析を中心として小胞体およびそのサブドメインの形成機構を明らかにし、さらに細胞分化（形質細胞形成）および外界からのストレス（薬物投与や酸化ストレスなど）に応じた小胞体膜の構造の変化におけるこれらのタンパク質の役割を解明する。

2. 研究成果の概要

（1）p31 ノックアウトマウスの解析

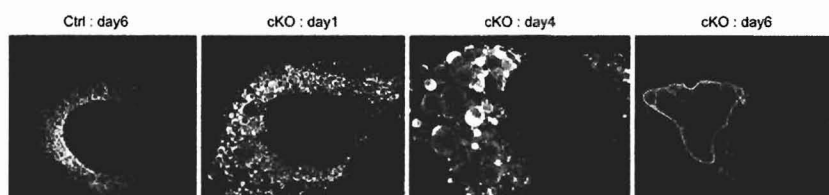
①p31 ノックアウトマウスの作製

p31は syntaxin18 複合体のサブユニットとして発見され、その酵母オルソログは Use1p/Slt1p である。p31 のノックアウトマウスを作製するために、129Sv/J 種マウスの p31 遺伝子を用いて図のようなターゲティングベクターを構築した。常法に従い組換え ES 細胞を得た後、サザンブロッティングによって *geo*+/+ の遺伝子型を確認した。ヘテロマウスを交配してホモ p31 欠損マウスを得ようとしたが、ホモマウスは胎生 8.5 日以前で死亡していた。そこで、フリップパーゼを発現しているマウスとの交配によって、Flp 組換え部位（2 つの赤三角印）で囲まれた領域を除き、コンディショナルマウスを得た。プルキンエ細胞選択的に p31 をノックアウトすると、生後 10 週後にプルキンエ細胞は死滅していた。また脳選択的にノックアウトを行うと、生後 1 日目に死亡し、脳内には大きな空洞と多数のアポトーシス細胞が観察された。以上の結果から、p31 は細胞増殖に必須であることが判明した。



②p31 ノックアウト細胞における小胞体の構造変化

p31 欠損に伴う小胞体構造の変化を調べるために、p31 コンディショナルノックアウトマウスからマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を調製し、これに Cre リコンビナーゼを発現しているアデノウイルスを感染させた。図に示すように、アデノウイルス感染後に小胞体の構造は、最初小胞化（感染後 1〜3 日）し、引き続いて空胞化した（4〜6 日）。一方、ゴルジ体構造にはほとんど変化が認められなかった。これらの結果は、電子顕微鏡による解析によっても確認した。小胞体が空胞化する時には多くの細胞でアポトーシスが引き起こされていた。



③p31 ノックアウトによる小胞体ストレスの誘起

p31 の欠損によってなぜアポトーシスが引き起こされるのかを解明するために、小胞体ストレス応答とアポトーシス誘導に関する転写因子 CHOP の発現と局在を調べた。その結果、小胞体ストレスが引き起こされる時に観察されるように、CHOP の発現は増加し、核へと移行していた。また、小胞体ストレス時に起こる PERK や IRE1 α のリン酸化、転写因子 ATF6 の切断、転写因子 XBP-1 の mRNA の選択的スプライシングが認められた。これらの結果は、p31 欠損によるアポトーシスの誘導は小胞体ストレスに由来することを示唆している。

(2) p31 結合タンパク質の同定

抗 p31 モノクローナル抗体による免疫沈降によって同定した NAG (neuroblastoma-amplified gene) タンパク質の機能解析を行った。NAG の発現を RNAi で抑制すると、ゴルジ体と小胞体の間をリサイクリングしているゴルジ局在タンパク質が細胞全体に分散した。ジギトニンで細胞膜に孔をあけてサイトゾルおよび細胞構造物に強く結合していない成分を細胞外へと洗い流すと、NAG 発現抑制細胞ではリサイクリングタンパク質は細胞外へと流出した。一方、このような現象はコントロール細胞では見られなかった。これらの結果は、NAG 発現抑制細胞ではリサイクリングタンパク質を含む膜は細胞構造物に強く結合していないことを示唆している。リサイ

クリングタンパク質の分散は、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送が阻害された結果かどうかを調べるために、VSVG-KDEL 受容体というモデルタンパク質を用いて、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を調べた。その結果、NAG 発現抑制細胞では逆行輸送が損なわれていることが判明した。

3. 研究評価及び今後の研究計画

本年度予定していた、p31 のノックアウト細胞における小胞体の変化と p31 結合タンパク質の同定はほぼ予定どおり進行した。今年度は、syntaxin18 複合体のもう一つの t-SNARE である BNIP1 についても、そのノックアウト細胞において解析を進める予定であったが、ノックアウトマウスまでは作製できたが、細胞レベルでの実験を行うことができなかった。BNIP1 については来年度の研究において解析を進めたいと思っている。

p31 結合タンパク質として NAG を同定したが、このタンパク質は酵母の Ufe1p (syntaxin18 のオルソログ) 複合体に含まれる Dsl3p/Sec39p と相同性 (相当する領域間で約 17% のアミノ酸が同一) を示すことから、Dsl3p/Sec39p のオルソログであると考えられる。表に示すように、哺乳類細胞と酵母細胞の小胞体膜融合装置は、そのサブユニット組成が完全に保存されている。しかしながら、サブユニットのアミノ酸の同一性は、Sly1p と Sec22p を除けば (これらはゴルジ体に存在する syntaxin5 に主に結合している)、いずれも 10-20% と極めて低く、これは哺乳類細胞と酵母細胞の小胞体における機能の違いを反映しているのかもしれない。

種類	哺乳類	酵母
t-SNARE	Syn18	Ufe1p
t-SNARE	p31	Use1p
t-SNARE	BNIP1	Sec20p
v-SNARE	Sec22b	Sec22p
膜表在性	Sly1p	Sly1p
膜表在性	ZW10	Dsl1p
膜表在性	RINT-1	Tip20p
膜表在性	NAG	Dsl3p

小胞体には syntaxin18 以外に syntaxin17 が存在し、後者の分子種は滑面小胞体の多く存在する臓器で多く発現しているという報告がある。来年度は、2 つのタンパク質の機能の違いを解明するとともに、両者のキメラを作製・解析して、その役割分担の分子的基盤の解明を進める。

4. 研究成果の公表

原著論文

- (1) Aoki, T., Ichimura, S., Itoh, A., Kuramoto, M., Shinkawa, T., Isobe, T., and Tagaya, M. Identification of the neuroblastoma-amplified gene (NAG) product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2639-2649 (2009).
- (2) Uemura, T., Sato, T., Aoki, T., Yamamoto, A., Okada, T., Hirai, R., Harada, R., Mori, K., Tagaya, M., and Harada, A. p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1869-1881 (2009).

国際学会発表

(1)Aoki, T., Ichimura, S., Shinkawa, S., Isobe,T., and Tagaya, M.

NAG is a new component of the syntaxin 18 complex, which links between the ER-SNARE p31 and RINT-1/ZW10. The Golgi Meeting: Membrane trafficking in global cellular responses, 2008/9, Pavia, Italy

国内学会発表

(1)土性梨香、植田晃大、多賀谷光男

積み荷受容体である p23 は小胞体 t-SNARE である BNIP1 と相互作用する

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、 2008 年 12 月、神戸

(2)青木健洋、市村セラ、多賀谷光男

小胞体に局在する Neuroblastoma Amplified Gene タンパク質の役割

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、 2008 年 12 月、神戸

細胞レベルでの環境応答研究の推進

高橋 滋（環境ストレス生理学研究室・准教授）

1. 当初の研究目標

申請者は、ラット胎児肺線維芽細胞において高濃度酸素暴露により mRNA の発現が誘導される転写因子として、ATF5 を同定した。近年のマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析により、アポトーシス、細胞分化、細胞周期等の過程で発現が変動する遺伝子として ATF5 があげられている。様々なストレスにより、その発現量が調節される転写因子であることから、ATF5 は生体のストレス応答におけるキーレギュレーターであり、環境ストレスによる ATF5 の発現変動が引き起こすその標的遺伝子の発現変動が生体のストレス応答に重要な役割を持っていることが考えられる。そこで、ストレス応答性転写因子 ATF5 の遺伝子発現調節機構の解明およびストレス応答時の ATF5 の機能解析を行う事を目的とする。本研究により、生体の環境ストレスに対する恒常性維持のメカニズム解明や、環境ストレスへの不適応が引き起こす様々な病的状態の成因解明への突破口が開かれる事が期待できる。

2. 研究成果の概要

申請者は動物細胞においてストレスにより ATF5 mRNA の安定性が上昇し、その結果 ATF5 mRNA 量が増加することを見い出している。ATF5 mRNA が環境ストレスにより安定化するメカニズムを解明する。特に、NMD 経路において中心的な役割を果たす制御因子 Upf1 の ATF5 mRNA の安定性への関与を以下のように調べる。NMD 経路において中心的な役割を果たす制御因子としては、Upf1, Upf2, Upf3 が知られており、これら因子の変異はナンセンス変異を有する mRNA を特異的に安定化する事が知られている。ATF5 mRNA の安定性に NMD が関与している事を調べるために、動物培養細胞へ Upf1 の発現ベクターを導入し、Upf1 を強制発現することによって細胞内の ATF5 mRNA の不安定化が促進するかどうかを調べる。また、Upf1 の SiRNA を細胞へ導入し ATF5 mRNA の安定化が起るかどうかを調べる。これらの結果から ATF5 mRNA の発現に NMD 経路経路が関与しているかどうかを解析する。また、ストレス刺激による NMD からの解放が起るかどうかを以下のように調べる。細胞をストレス刺激した場合に mRNA の分解が抑制されるかどうかを調べる。ストレス刺激によって、5'UTR 内の uORF からの翻訳開始点が下流に存在する本来の翻訳開始点へシフトする事が予想される。その場合はエキソンーエキソン連結部位よりも下流に存在する正常な翻訳終止で翻訳が終結するために mRNA は NMD のターゲットとはならず、安定性が増加すると予想される。その成果の概要は以下ようになる。

(1) Upf1 の ATF5 mRNA の安定性への関与

ATF5 の exon1α および exon2 を intron を除いた形で連結した ATF5 の mini gene を作製し、Upf1 または、Upf2 の SiRNA とともに培養細胞へ導入した。その後、Upf1 または、Upf2 のノックダウンにより ATF5 mRNA の安定化が起るかどうかを調べたところ、ATF5 mRNA の安定化がみられた。これにより ATF5 mRNA の安定性が NMD により行わ

れている事が示唆された。

(2) NMD による ATF5 mRNA 分解からのストレス刺激による解放

内在性の ATF5 mRNA 発現を定量的 PCR 法等で検討中であるが、現在までその定量的検出方法の条件を検討中である。検出条件決定後速やかに内在性の ATF5 mRNA 発現のストレスによる変動と Upf の内在性の ATF5 mRNA 発現への関与を調べる予定である。

3. 研究評価及び今後の研究計画

ATF5 mRNA の安定性が NMD によって制御されていることを示唆することができた。

今後の研究計画

今までに、ATF5 タンパク質は、カドミウムやヒ素暴露によって、その安定性が上昇し、細胞内での存在量が増加すること。ATF5 はユビキチン・プロテアソーム系で分解制御されているが、カドミウム暴露を行っても細胞内における ATF5 のユビキチン化の程度には変化が見られない事を見いだしている。今年度は、この様なユビキチン非依存性のストレスによる ATF5 タンパク質安定化がどのようなメカニズムによって引き起こされているのかを調べる。まず、ストレス非負荷時においてユビキチン化した ATF5 を認識し ATF5 のプロテアソームによる分解を促進するタンパク質を同定するために yeast-two hybrid system により ATF5 と相互作用するタンパク質を検索する。そして、これら同定したタンパク質の中から ATF5 タンパク質の分解制御に関与するタンパク質を同定する。そして実際に同定したタンパク質が、ストレス応答性の ATF5 タンパク質の安定化に関与しているのかどうかについて検討し、ATF5 タンパク質がストレスにより安定化するメカニズムを探る。

このことから次年度、ATF5 タンパク質の安定性が、ストレスによって上昇するメカニズムの解明の実現が十分期待できるものである。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Uekusa, H., Namimatsu M., Hiwatashi Y., Akimoto T., Nishida T., Takahashi S., Takahashi Y., Cadmium interferes with the degradation of ATF5 via a post-ubiquitination step of the proteasome degradation pathway
Biochemical and Biophysical Research Communications **380**, 673-678 (2009)

国内学会発表

- (1) Takahashi, S., Takeda, H., Umemura, M., Kimura, N., Utsuki, K., Watatani, Y., Nakanishi, N. Ichikawa, K., Okuyama, R., Takahashi, Y.
5'-untranslated region modulates the stability of ATF5 mRNA in response to oxidative stress
第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学大会合同大会、シンポジウム「ストレス応答と転写因子」、2008 年 12 月、神戸
- (2) 山崎高志、大味麻子、加藤研司、車谷春香、山本宙享、高橋滋、高橋勇二
ストレス応答性転写因子 ATF5 による AARE 配列を介した CHOP 遺伝子の転写活性化
第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学大会合同大会 2008 年 12 月、神戸

原核生物の光環境への応答の解析

岡田 克彦 ((環境応答生物学研究室)・助教)

1. 当初の研究目標

光は光合成を行う生物にとって最も重要な環境因子であり、光への適切な応答反応はこれらの生物が自然界で光を効率的にエネルギー源として利用するために重要な過程である。本研究では、光合成生物のモデル生物としてシアノバクテリア・*Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) を用いて、原核光合成生物の光への応答を調べる。特に、光による遺伝子発現調節の分子機構の解析に重点を置き、研究を行う。さらに、遺伝子発現調節に関わる遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目指す。

Synechocystis はグルコースを炭素源とした従属栄養的な生育が可能であるが、完全な暗所では生育できず、生育には光が必要で、一日 5 分間の光照射で従属栄養的な生育が可能になる。まず、この光要求生の原因を探り、光が光合成生物の生育過程を調節している例を解析する。この現象の解析を通じて、原核生物における光への応答の実態を明らかにすることを目指す。光の生育過程への影響の解析は、生理学的な解析と対応させて生化学的な解析も行う。光照射の前後での、細胞のタンパク質組成の変化を解析し、光照射による制御を受けるタンパク質の同定を目指す。

予備的な解析で、解糖系の代謝が、この従属栄養的な生育への光要求生に関係があることが分かってきており、さらに、*Synechocystis* の解糖系遺伝子フルクトース 1, 6-ビスリン酸アルドラーゼ (*fbaA*) の遺伝子発現が光照射により誘導される事が示唆されていた。そこで、本研究では、グルコースや光照射による解糖系遺伝子 *fbaA* の遺伝子発現の調節を解析することを目指した。さらに、グルコースの感知機構と光信号の伝達機構との相互作用や統合・調節の仕組みの解析、信号伝達成分をコードする遺伝子の同定を目指す。調節因子の同定と機能解析を行うことにより、光照射による遺伝子発現調節を解析し、シアノバクテリアの光への応答過程の実態を明らかにすることを目指す。

2. 研究成果の概要

(1) 光による解糖系酵素の遺伝子発現制御

Synechocystis はグルコースを炭素源として従属栄養的に生育できるが、その際に光が必要である。光の作用に関しては青色の光が有効であることが知られていたが、光の作用の実体に関してはほとんど報告が無く、不明である。そこで、この従属栄養的な生育過程への光照射の影響を解析した結果、複数の解糖系酵素の遺伝子発現が光により活性化することを見いだした。

解糖系酵素の中でも特に fructose 1,6-bisphosphate aldolase をコードする遺伝子 *fbaA* の発現がグルコース存在下でのパルス光照射により大きく誘導される事を見出した。*fbaA* 遺伝子の発現は、細胞を暗所に 1 日置くことで大きく低下し、短時間の光照射で大きく誘導されることが分かった。パルス光が *fbaA* の発現を誘導する効果は、グルコース非存在下では小さく短時間で消失したが、グルコースが存在すると光の効果は長時間にわたって安定化することが見出され、グルコースと光が相乗的に発現を誘導する

事が分かった。一方、グルコースの非存在下でも照射光が連続光ならば、*fbaA* の発現は大きく誘導された。このことから、光の発現促進効果はグルコース存在下でのパルス光照射による経路、連続光による経路の2つある事が示唆された。

(2) 解糖系酵素遺伝子の調節因子の同定

さらに、DNA 結合モチーフを持つレスポンスレギュレーターをコードすると推定される遺伝子 (*sll1330*) の破壊株を調べると、*sll1330* の破壊株ではパルス光による発現誘導効果だけが失われていた。このことから、*sll1330* は二つある *fbaA* の発現誘導の経路のうち、グルコース存在下でのパルス光により活性化される経路にのみ関与していると推定される。

sll1330 はレスポンスレギュレーターと予想され、二成分制御系では対をなす未知のヒスチジンキナーゼにより光環境の変化に応じてリン酸化され、遺伝子発現を抑制・誘導する機能を持っていると推定される。さらに、同じく他のレスポンスレギュレーターをコードすると予想される ORF(*sll0921*)を破壊した株も同様な表現型を示した。興味深いことに *sll0921* の遺伝子発現は *sll1330* によって調節されることが分かった。このことは *fbaA* の遺伝子発現が光情報伝達の遺伝子発現のネットワークにより調節されていることを推定させる。

解糖系の各遺伝子の発現調節は、一様ではなく、大きく二つに分かれた。グルコースの有無と光の有無によって調節を受ける遺伝子群と、主にグルコースの有無が発現制御に関わり光の影響を受けない遺伝子群があることが分かった。さらに、光で発現が誘導される解糖系遺伝子のなかに、*sll1330* を破壊すると誘導効果が抑えられるものが見つかった。その解糖系遺伝子をリストアップしたところ5つの解糖系遺伝子からなるグループが見出された。興味深い事にそれらのヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、アルドラーゼ(*fbaA*)、ホスホグリセリンムターゼ、ピルビン酸キナーゼといった酵素は、どれもそれぞれアイソザイムが存在し、一方のみが *sll1330* による制御を受けていた。これらの遺伝子がレギュロンを形成する理由は不明であるが、他生物由来の遺伝子セットが外部から取り込まれた可能性も考えられ、進化的にも興味深い。

3. 研究評価及び今後の研究計画

Synechocystis のグルコースを炭素源とした従属栄養的な生育での光要求生の原因の一つとして、解糖系遺伝子が光により発現調節を受ける事が関係している可能性を見出し、調節に関係する遺伝子の同定も達成することができた。このことは次年度、原核生物の光環境の変化への応答を解析する上で重要な知見となることが期待できるものである。

今後の研究計画としては、以下の計画を予定している。

解糖系遺伝子、特に *fbaA* の遺伝子発現調節を中心に、光応答遺伝子の発現調節に光情報伝達系とグルコースの関知機構がどのように関連しているかを調べる。特に、この光情報伝達系で中心的な働きをしていると推定される *sll1330* の同定に成功しているので、この遺伝子を中心に光情報伝達を整理することを目指す。

○レスポンスレギュレーターと推定される *sll1330* 遺伝子の機能解析

現在、得られている *fbaA* 遺伝子発現の調節遺伝子の候補 *sll1330* は、転写因子モチー

フを持ったレスポンスレギュレーターと推定され、その破壊株はパルス光照射の効果が低下している。レスポンスレギュレーターの情報伝達では、情報伝達時のレスポンスレギュレーター存在量およびその増減とリン酸化を受けている分子の割合が重要なパラメーターとなる。そこで、*sll1330* の抗体を用いて、*sll1330* の細胞あたりの存在量とその時間変化を調べる。もしリン酸化の状態を SDS-PAGE 下での分子量のシフトから検出できれば、ウェスタンブロッティング法を用いて光環境によるレスポンスレギュレーターのリン酸化・脱リン酸化を解析する。分子量の変化からのリン酸化状態の解析が困難であれば、免疫沈降や放射能ラベルしたリン酸などを用いて解析する。

さらに、大量発現した *sll1330* を用いて、それらとシアノバクテリアの粗抽出液を作用させて生化学的に試験管内でのリン酸化・脱リン酸化反応を起こさせる事を試みる。

平行して、免疫沈降法などでこのレスポンスレギュレーターと結合能力を持ち相互作用するタンパク質の検出・同定を試みる。同定できた場合その遺伝子破壊の表現型の解析などを行い機能を推定する。もし、そのタンパク質がヒスチジンキナーゼならば、リン酸化の仕組みについても解析する。

○ *fbaA* 遺伝子の発現調節とプロモーター配列の解析

fbaA の遺伝子発現も他の遺伝子と同様に遺伝子上流のプロモーター部分の塩基配列とプロモーターを認識する因子によって調節されていると推定される。そこで、*fbaA* の上流の部分の配列の役割についても解析を進める。配列の特徴の解析や、上流のプロモーター部分の DNA に結合するタンパク質の探索も行う。

4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Tabei Y., Okada K., Makita N., Tsuzuki M.

Light-induced gene expression of fructose 1,6-bisphosphate aldolase during heterotrophic growth in a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803.
FEBS J., 276(1): 187-198. (2009)

国内学会発表

(1) 堀井瑛介, 岡田克彦, 酒井勉, 都筑幹夫

Synechocystis sp. PCC6803 におけるグルコース代謝関連遺伝子群の発現調節
日本植物生理学会 第 50 回年会, 2009 年 3 月, 名古屋

線虫 *C.elegans* をモデルとした個体レベルでの研究

井上 英史（基礎生命科学研究室・教授）

1. 当初の研究目標

線虫（*C. elegans*）は実験モデル生物として様々な利点を持ち、しばしば生物学領域の研究の端緒を切るパイオニア的な役割を果たしている。特に、個体レベルの応答と遺伝子レベルでの現象を結びつける上で、最も有効な実験モデル多細胞生物であると言える。この課題では、実験モデル生物としての線虫の利点を活かして、環境適応の分子機構解明にアプローチする。まずは、環境因子として種々の低分子有機化合物、ヒ素化合物を対象とし、生物（線虫）個体の発生、形態・器官形成、行動、生殖、寿命等に与える影響を検討する。次に適当な化合物に標的を絞り、順遺伝学・逆遺伝学の方法を用いて環境応答に関与する因子（遺伝子、タンパク質）を同定する。さらにその因子が他の因子とどのように関連して環境応答に寄与するか、そのメカニズムを分子レベルで明らかにする。また、このプロジェクトの他の研究者の課題の中で、線虫（*C. elegans*）の系を活用できるものに関して、共同研究によりサポートする。

環境因子（化学物質）との相互作用を解析するにあたり、感受性の高い変異株を用いることは実験の感度を上げる上でメリットがあり、また、その環境因子と生物個体の相互作用を理解するヒントが得られることも期待される。薬剤排出トランスポーターの変異は、様々な化学物質に対して個体が高感受性化する可能性が考えられるので、不特定多数の化合物を対象とした解析に有効であると考えられる。そこで、平成20年度は、*C.elegans* の種々の薬剤排出トランスポーター遺伝子を欠失した変異体について、環境因子として代表的なもの（有機ヒ素化合物など）に対する応答性の違いを解析し、高感受性化しているものがないか検討する。また、本研究室で保有している様々な変異株や、RNAi法を用いて、高感受性化するものを検索する。有意に高感受性化した変異株が見つかったら、その薬剤排出トランスポーター遺伝子の発現パターンとの関連を解析し、分子的な基盤を明らかにする。高感受性株の特性を明らかにし、平成21年度以降の研究にどの変異株を用いると有効であるかを検討する。平成20年度内は、作用が知られている化合物を用いて実験系を構築すること、いくつかの変異株で効果を比較することが主となる。

2. 研究成果の概要

上記の観点から、薬剤排出トランスポーターの変異体を用いて薬剤に対する感受性を調べた。既に行った予備的な実験の結果から次の4つの変異株に絞り、野生型線虫を含め、薬剤の効果を比較した。用いた株は次のとおりである。

NL130 *pgp-1(pk17)IV; pgp-3(pk18)X*

NL152 *pgp-1(pk17) IV; pgp-3(pk18) X; mrp-1(pk89)*

VC26 *pgp-12(gk19) X*

RB894 *pgp-13(ok747) X*

これらの株は、寒天培地上でのアッセイにおいて、次の薬物で感受性に差が見られた。

すなわち、

○テトラミゾールでは、他の株が 25μM 以上で運動障害や筋収縮が見られたのに対し、VC26

株と RB894 株では 2.5 μ M で観察された。

○1-(2-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-2,2-ジクロロエタンはいずれの株においても 2.5 μ M 以上で成長遅延が見えたが, NL130 および NL152 株では 25 μ M 以上の濃度で成虫 (P0) 致死, 幼虫致死, 幼虫アレストが観察された。

○ S,S',S''-トリブチルホスフォロトリチオエートでは, いずれも 1.5 μ M 以上で産卵障害, 頭部の運動障害や胚致死が観察されたが, さらに NL152 株では 25 μ M で成虫 (P0) 致死が見られた。

これらの結果をまとめると, NL152 株は, 1-(2-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-2,2-ジクロロエタンや S,S',S''-トリブチルホスフォロトリチオエートによる致死において高感受性, NL130 株は 1-(2-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-2,2-ジクロロエタンによる致死において高感受性, VC26 株と RB894 株は, テトラミゾールによる運動障害において高感受性ということになる。

そこで, さらに薬剤に対する感受性の違いを検証する目的で, 液体培地中における薬剤の作用を検討した。用いた薬剤は, ゲンチアンバイオレット, 1-(2-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-2,2-ジクロロエタン, スクロチジル, イベルメクチン, テトラミゾールの 5 種である。その結果, ゲンチアンバイオレット, 1-(2-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-2,2-ジクロロエタン, スクロチジル, イベルメクチンでは効果に差を見ることができなかった。寒天培地では, NL152 株は, 1-(2-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-2,2-ジクロロエタンにより致死が見られていたにも関わらず, 液体培地では影響が観察されなかった。この理由は明らかでない。一方, テトラミゾールでは, VC26 株と RB894 株で野生株に比べて強度な運動障害が見られた。より定量的に影響を評価するために, 運動障害が半数の個体で観察される薬剤濃度 EC50 を比較したところ, 野生株では 55 μ M であるのに対し, RB894 では 35 μ M であった。1.6 倍程度の差に過ぎないが, t 検定では有意差が示された。しかしながら, VC26 株では野生株との差が見られなかった。テトラミゾールは神経のアセチルコリン受容体に作用して麻痺を起こさせることが知られており, また, RB894 株で欠損している *pgp-13* 遺伝子は, 腸管, および頭部の感覚神経であるので, 頭部感覚神経からのテトラミゾールの取込みを *pgp-13* が阻害している可能性が考えられる。

またこれとは別に, 研究室で解析を行って来た *C. elegans* 変異体のうち, 環境因子により高感受性化していると実験的に推測されるものについて詳細な解析を行った。すなわち, *duo-1* 遺伝子は脱ユビキチン化酵素の異なるファミリーである USP と OTU の両方の触媒ドメインを併せ持つユニークな構造をもったタンパク質をコードしているが, その生理機能についてはまったく不明であった。この遺伝子の欠失変異体は, 幼虫期から体の中に液胞が生じ 85% の個体が死に至る。この表現型が *rod-like-larval lethality* と呼ばれる表現型に類似していることから, 浸透圧ストレスに対する耐性を調べたところ, 高感受性化していることが明らかになった。この表現型には *excretory cells* と呼ばれる細胞の機能が関わっていると考えられる。この細胞は, 哺乳類では腎臓に相当するような機能を有すると推測されているが, その詳細は明らかでない。排出系は環境との関連性が高い可能性が考えられ, 今後, この系をこのプロジェクトの対象範囲に加えることは意義があると考えられる。

3. 研究評価及び今後の研究計画

液体培地における感受性の差は、寒天培地を用いたときに比べ小さなものであったが、本質的な結果には大きな違いはなかった。すなわち、神経系に作用する薬剤をスクリーニングする場合には、野生株を用いるよりも **RB894** 株を用いる方が良いと考えられる。ただし、その感受性の差は大きなものではなかった。野生株を用いるよりは **RB894** 株を用いる方が高感度に化学ストレスを検知したり、生理活性物質を見つけたりすることが有利な場合がありうるが、その有効性が発揮される頻度は高くないと考えられる。検討した薬剤の種類が十分に多いとは言えない段階ではあるが、今後は、戦略に修正を加える方が良いと考えられる。

すなわち、これまでは様々な化学物質に対して高感受性化するために薬剤取込み過程の改善を試みていたが、その下流の応答における高感度化ももう一つの戦略となりうる。つまり、様々な刺激に高感受性化あるいは高感度に応答すると考えられる変異線虫株やトランスジェニック線虫株を用いて、様々な化合物の影響を評価する系の構築を行う。

まず第一は、熱ショック応答性遺伝子と **GFP** レポーターの融合遺伝子を組み込んだ線虫株を利用する。これは、**ER** やミトコンドリアにおけるタンパク質変性等のストレスや酸化ストレスを感受する。

第二に、酸化ストレスに応答する **SOD** 遺伝子などの発現をマーカーとする系である。

第三に、インシュリンシグナル系や **Ras** シグナル伝達系の下流で応答する遺伝子を利用したシグナル感受性線虫株を利用する。これらを用いることにより、エネルギー代謝や発生、器官形成の調節系に影響する因子をスクリーニングすることができる。エネルギー代謝系は寿命や老化とも密接に関係すると考えられ、その調節機構の一端を明らかにする化学的ツールを得ることを目標に、種々の化合物の活性を測定する。

これらのことを平成 21 年度には検討を行う予定である。また、これらの系と平成 20 年度までに検討した薬剤排出トランスポーター欠損変異体を掛け合わせにより多重化した株を用いることも検討する価値があると思われる。

新たに検討を加える変異株からいくつかを選択し、それに **RB894** 株と **NL152** 株を加えて、アッセイのための線虫株の組み合わせを設定したいと考えている。その上で、様々な環境因子や化学物質による応答性の研究にシフトする計画である。

また、**excretory system** は環境適応に重要な役割を担っていると考えられるが、我々は、**duo-1** という機能未知の遺伝子がこの組織の機能に重要であることを示唆する結果を得た。平成 20 年度は薬剤排出トランスポーターに主な焦点をおいたが、今後は、**duo-1** のように環境適応に何らかの関与をすると想定される機能未知の遺伝子の解析も視野に入れて行きたいと考える。

4. 研究成果の発表

国内学会発表

(1) 齋藤聡美, 鈴木弓仁, 井上保志, 井上英史

線虫 *C. elegans* におけるエプシンの機能解析

BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会, 第 81 回日本生化学会大会合同大会), 2008 年 12 月, 神戸

(2) 角 陽介, 草野美喜子, 田沢真吾, 田中弘文, 井上英史

DUO-1 機能喪失変異体は浸透圧ストレスに高感受性である

BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会, 第 81 回日本生化学会大会合同大会), 2008 年 12 月, 神戸

(3) 柳 侑希, 池田絵理, 藤武千晶, 井上英史

生物リズムにおけるユビキチン系の関与

BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会, 第 81 回日本生化学会大会合同大会), 2008 年 12 月, 神戸

哺乳類の個体レベルでの、温度、pH 変化への応答の研究

井上雅司（脳神経機能学研究室・講師）

1. 当初の研究目標

遺伝子欠損マウスを用いて、味細胞・味神経による pH 受容への新規陽イオンチャネルファミリーの寄与についての解析を行う。具体的には Pkd113 チャネルに着目する。Pkd113 (Polycystic kidney disease)チャネルは、TRP チャネルファミリーに属し、味細胞および脊髄に多く発現し、Pkd211 とヘテロダイマーを形成して、生体内の pH 検知に関与すると考えられている。味細胞・味神経による pH 受容の寄与についての解析を、Pkd113 遺伝子欠損マウスを用いて行う。気生理学的研究は、Pkd113 遺伝子欠損マウスの鼓索神経または舌咽神経の活動電位の発生頻度を記録することで行う。口腔内に、塩酸、クエン酸、食塩、ショ糖溶液などを滴下し、口腔内の pH の変化と神経応答の相関を調べる。行動学的研究は、48 時間 2 瓶選択法で行う。Pkd113 遺伝子欠損マウスに、蒸留水およびクエン酸溶液などの呈味溶液を自由に選択させ、その嗜好性を評価する。Pkd113 が口腔内の pH 検知に重要な役割を果たしている場合、上記電気生理学的研究および行動学的研究によって、野生型（対照）マウスとの違いが観察されると期待している。

2. 研究成果の概要

上記の観点から、Pkd113 遺伝子欠損マウスを用いて、その pH 応答性について、野生型マウスと比較した。その成果の概要は以下のとおり。

(1)Pkd113 遺伝子欠損マウスの味神経応答

マウスを麻酔し、舌前半部の味蕾を支配する鼓索神経を露出し、塩酸、クエン酸などの味溶液の口腔内滴下に対する応答を記録した。その結果、Pkd113 遺伝子欠損マウスの鼓索神経応答および舌咽神経応答は野生型のそれと同一であった。

(2)Pkd113 遺伝子欠損マウスの味溶液嗜好性

4 8 時間の 2 瓶法溶液選択試験を行った。遺伝子欠損マウスは、野生型マウスと同様に塩酸溶液 1 mM 以上、クエン酸溶液 3mM 以上で、酸味溶液を忌避し、両グループの溶液摂取量、嗜好性は同一であった。

(3)イオンチャネル阻害剤を用いた純系マウスの味神経応答の解析

TRP チャネルの阻害剤である、La および Al イオンで舌表面を処理し、酸味に対する鼓索神経の応答を記録し、コントロール条件と比較した。これらの阻害剤の影響はなかった。

以上のことから、Pkd113 チャネルはマウスの *in vivo* において、口腔内の pH を検知している可能性が少ないことがわかった。

3. 研究評価及び今後の研究計画

口腔内の pH 受容機構については、*in vitro* の培養細胞を用いた実験結果に基づいて、Pkd113 が Pkd211 とヘテロダイマーを形成し、酸味受容体を形成しているという説が最近唱えられている。今回の研究は、この通説に疑問を投げかけた。また、広範囲の TRP チ

チャネルに効果を持つ阻害剤で、酸味溶液に対する味神経応答が、変化しなかったことから、TRP チャネルに依存しない pH 検知機構が存在する可能性をしめした。

これらの事実をふまえ、哺乳類における口腔内の pH 受容機構について、TRP チャネル以外の pH 感受性チャネルの関与の可能性についても、遺伝学的手法を用いて検討する予定である。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Wang, H., Iguchi, N., Rong, Q., Zhou, M., Ogunkorode, M., Inoue, M., Pribitkin, E. A., Bachmanov, A. A., Margolskee, R. F., Pfeifer K., and Huang, L.
Expression of the voltage-gated potassium channel KCNQ1 in mammalian taste bud cells and the effect of its null-mutation on taste preferences.
Journal of Comparative Neurology **512**, 384-398 (2009).
- (2) Bachmanov, A. A., Inoue, M., Ji, H., Murata, Y., Tordoff, M. G., and Beauchamp, G. K.
Glutamate taste and appetite in laboratory mice: physiological and genetic analyses.
American Journal of Clinical Nutrition (in press) (2009).
- (3) Nelson, T. M., Jimenez, N. D. L., Tessarollo, L., Inoue, M., McCaughey, S. A., Bachmanov, A. A., and Sullivan, S. L.
Taste Function in *PKD1L3* knockout mice. (submitted)

国際学会発表

- (1) Nelson, T. M., Jimenez, N. D. L., Tessarollo, L., Inoue, M., McCaughey, S. A., Bachmanov, A. A., and Sullivan, S. L.
Taste function in *PKD1L3* knockout mice.
15th International Symposium on Olfaction and Taste, 2008/7, San Francisco, USA.

遺伝的・環境的ストレスによる統合失調症の発症メカニズムの解明

福田 敏史（分子生化学研究室・助教）

1. 当初の研究目標

統合失調症は、人口の 1%が罹患すると言われる精神疾患である。その要因としては遺伝子の変異に伴う異常蛋白質の発現によるストレスと、環境因子によるストレスとの相互作用によって発症すると考えられている。我々は、統合失調症関連蛋白質 DISC1 と相互作用する新規蛋白質 FLJ を同定した。この遺伝子の発現異常や発現阻害阻害を培養細胞において確認し、その成果をマウスにおいて解析する。このことにより、遺伝的要因と環境的要因による両ストレスと統合失調症の発症メカニズムとの関連について細胞・個体レベルで明らかにすることを目的としている。統合失調症による医療費などを含む社会的損失は 2 兆円に達するという報告もある。また、FLJ 遺伝子の存在している染色体領域は自閉症の患者で見つかっている原因領域の一つでもある。本研究の成果を応用することで、未だ根本的な治療法のない統合失調症や自閉症といった精神疾患の治療標的分子の同定を期待できる可能性があると考えられる。

FLJ 遺伝子は、本研究により見いだされた新規遺伝子であり、胎児から成体に至る過程における FLJ 遺伝子の様子は全く明らかでない。統合失調症では鬱（うつ）や躁（そう）、妄想、記憶障害などの症状が見られる。また、遺伝や環境要因による影響を受けて発症することから、発生期における大脳皮質の層構造形成異常や成体新神経細胞の機能的な成熟異常が示唆される。そこで平成 20 年度では、二つの目標を掲げた。まず第一に、発生期の大脳皮質や成体での海馬などにおける FLJ 遺伝子の発現解析に重点を置いて解析を行うことを目標とした。第二に FLJ 蛋白質は DISC1 蛋白質との結合が見られることから、DISC1 遺伝子の発現の時期や部位との比較検討を行い FLJ と DISC1 の結合の意味が発生期において見い出されるのかどうか、の点について検討を行うことを目標とした。これらを研究することは、病態における要因を解析するために重要である。また、個体レベルでノックアウトマウスを解析する際にも、発現の時期、部位をあらかじめ解析しておくことでその後の解析の手がかりとなり得る。これらのように今後の研究に重要な情報を与えることから、本年度の研究には大きな意義があるものと考えられる。

2. 研究成果の概要

上記の観点から、FLJ 遺伝子の mRNA の発現解析を in situ ハイブリダイゼーション法を用いて行った。また、FLJ 遺伝子産物に対する抗体を作成し、FLJ 蛋白質の発現時期・部位を解析した。いずれの解析もマウス凍結切片を用いて行った。また、マウス DISC1 遺伝子のクローニングを並行して行い、プローブ作製、in situ ハイブリダイゼーション法による発現解析を行った。その成果の概要は以下のようになる。

(1) FLJ 遺伝子の mRNA の発現解析

マウス胎児（胎生 10, 12, 14, 16, 18 日胚）、生後 0, 2, 21 日目および成体における FLJ 遺伝子の発現を mRNA に対する in situ ハイブリダイゼーション法を用いて解析を行った。まず大脳皮質において、胎生 12 日胚に弱い発現が脳室帯(VZ)に認められた。胎生 14, 16 日胚におい

て脳室中間帯（IZ）に存在する細胞に強い発現が認められた。胎生 18 日胚においては IZ に加えて将来の脳皮質 6 層構造を形成する領域（CP）に発現を認めた。また、胎生 18 日胚以降の海馬歯状回の顆粒細胞および、CA1 – CA3 に存在する錐体細胞に発現が認められた。さらに生後 2 日目以降の小脳内顆粒層の細胞にも発現が認められた。

(2) FLJ 蛋白質の発現解析

FLJ 遺伝子は本研究室において見出された新規遺伝子であるので市販されている抗体は存在しない。そこで、FLJ 蛋白質の配列を元に設計した合成ペプチドを作製し、FLJ 蛋白質に対するポリクローナル抗体を作製した。その抗体を用いてウェスタンブロット法による基質特異性を確認したところ、FLJ 蛋白質に対して特異性のある抗体を得ることができた。次にその抗体を用いて、マウス組織切片に対する免疫抗体染色を行った。脳皮質において、胎生 14, 16 日胚において脳室中間帯（IZ）に存在する細胞に強い発現が認められた。胎生 18 日胚においては IZ に加えて将来の脳皮質 6 層構造を形成する領域（CP）に発現を認めた。また、胎生 18 日胚以降の海馬歯状回の顆粒細胞および、CA1 – CA3 に存在する錐体細胞に発現が認められた。さらに生後 2 日目以降の小脳内顆粒層の細胞にも発現が認められた。これらの結果は、(1) FLJ 遺伝子の mRNA の発現解析で得られた結果の発現領域ならびに時期と一致していた。

(3) DISC1 遺伝子の mRNA の発現解析

まず、PCR を用いてマウス DISC1 遺伝子のクローニングを行った。次に、プローブ作製の作製後、in situ ハイブリダイゼーション法による発現解析を行った。その結果、ほぼ FLJ 遺伝子の発現時期・部位とも一致した結果を得た。

脳皮質神経細胞は、VZ において神経前駆細胞の非対称分裂によって生じる。その後 IZ に移動し、多極性の細胞の時期を経て CP へ移動して行くことが知られている。これらのことから FLJ 遺伝子は、DISC1 遺伝子と相互作用することで脳皮質神経細胞の移動および 6 層構造の形成に関与している可能性が示唆された。本研究により、FLJ と DISC1 が共に胎児発生期の脳皮質、海馬、小脳などで同一時期に発現していることが確認された。脳皮質のみならず、海馬や小脳での FLJ と DISC1 との協調作用があるのかどうか検討する余地が示された。

3. 研究評価及び今後の研究計画

本年度は、FLJ 遺伝子の mRNA と蛋白質の発現時期・部位を解析した。さらに DISC1 遺伝子の発現解析を行った。その結果、FLJ, DISC1 とともに脳皮質形成時期において、神経細胞の移動や層構造形成に関与する部位の細胞において発現していることを見出した。これらの結果は、新規 DISC1 結合蛋白質である FLJ が、胎児発生中の脳をはじめとする脳形成に重要な役割を担っていることを示す。統合失調症、または特に自閉症は幼い年齢（3 歳くらいまでに）で診断がつくという脳の発達障害が原因であることが示唆されている。さらに、IQ や記憶などの障害とも密接に関係している。その点においても、FLJ が DISC1 とともに脳皮質や海馬で共発現している事実が明らかになったのは興味深い。これらのことは次年度、神経細胞移動への関与を検討することで FLJ 遺伝子の機能解明、さらには統合失調症や自閉症と言った精神疾患の病因に迫れる可能性を期待できる成果である。

これらの結果を踏まえて次年度ではまず、変異型 **FLJ** 遺伝子の作製を行う。国際 HapMap プロジェクトにより見出されたヒトの **FLJ** 蛋白質の一塩基多型が遺伝的ストレス(異常蛋白質)を与えるか、更には環境ストレスによる細胞機能の変化を解析する。ここでは通常用いられる変異プライマーを用いた **PCR** による作製を行う。次に、野生型と変異型の **FLJ** との間における性質の違いを見い出す。特に統合失調症との関連で考えられることとしては、神経細胞の移動様式、突起伸張などへの影響を詳細に検討する。統合失調症では鬱(うつ)や躁(そう)、妄想、記憶障害などの症状が見られる。また、遺伝や環境要因による影響を受けて発症することから、発生期における層構造形成異常や成体新神経細胞の機能的な成熟異常が示唆される。本年度の研究から **FLJ** 蛋白質がこれらの機能に十分関与し得る結果を得ている。よって、発生期の脳皮質や成体での海馬などにおける機能的相違について検討を行う。また、変異による細胞内局在への影響についても検討する。次に、**FLJ** 蛋白質に結合する蛋白質のスクリーニングを行う。**FLJ** が **DISC1** 結合蛋白質として得られたことで、機能未知の **FLJ** 蛋白質の機能が予測され現在研究を行っている。このことと同様に、さらに **FLJ** 蛋白質の機能を解明するために、新規結合蛋白質の同定を目的としてスクリーニングを行う。具体的には、**FLJ** 蛋白質の各機能ドメインをベイトにして酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを開始する予定である。

4. 研究成果の発表

国内学会発表

- (1) 長島 駿、窪田有花、寅嶋 崇、平井宏和、稲留涼子、福田敏史、柳 茂

CRAG によるポリグルタミン病原因タンパクの分解機構

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008 年 12 月, 神戸

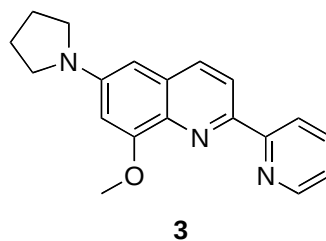
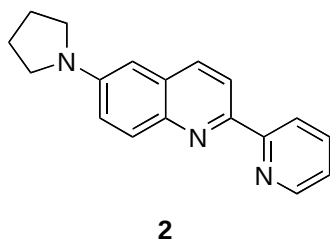
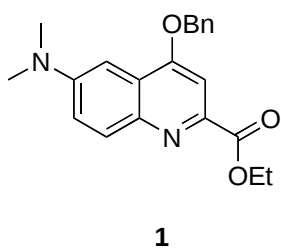
環境ストレス因子の生体組織内での動態解明を目的とした 蛍光プローブの創製

伊藤 久央 （生物有機化学研究室・教授）

1. 当初の研究目標

金属イオンは、生物の環境応答に密接に関与している因子である．なかでも亜鉛イオンは、生体内において酵素活性やアポトーシスに関係している重要な金属イオンである．これらの金属の生体内における動態が解析できれば、生物応答における分子機構解明に役立つと考えられる．本共同研究ではこの点に着目し、金属イオンを始めとする機能性小分子の可視化解析を可能とする蛍光分子の開発に関して研究を遂行し、最終的に分子生物学分野、環境計測分野への広い応用の可能性について検証する．

我々のグループでは、亜鉛イオンに特異的に結合して二波長性の応答を示す蛍光プローブ **1-3** の開発にすでに成功している．これらの分子は、キノリン環の2位の単結合が、キノリン環上の窒素原子とキノリン環の2位に結合する極性官能基（化合物 **1** はエトキシカルボニル基、化合物 **2** と **3** はピリジニル基）の存在に基づき、下記の二点の因子が自由回転を規制することによって、励起、蛍光ともに二波長性を示す．まず第1の因子は双極子反発であり、第2はルイス酸である金属イオンへの配位である．



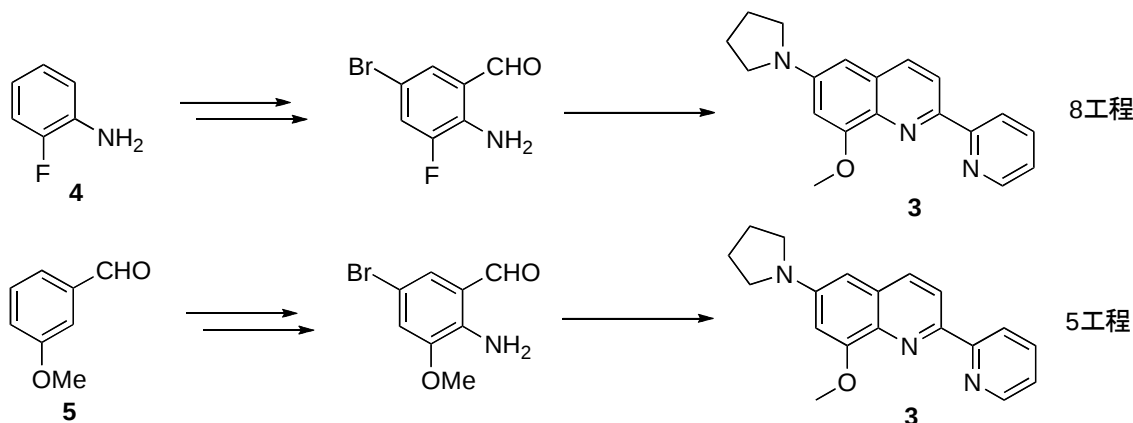
上記の蛍光分子の二波長性発現機構を基に金属イオンに加えて、種々の生体機能性小分子をターゲットとした蛍光分子の開発について検討を行う．具体的には、まず第1に K_d 値の異なる亜鉛イオン選択的二波長性蛍光プローブの開発を行う．さらに他の金属イオン、とりわけ環境応答に関与するマグネシウムイオンやナトリウムイオンに対し二波長性の応答を示す蛍光プローブの創製を目指して検討を行う．

2. 研究成果の概要

平成20年度における研究成果の概略を以下に示す。まず、平成20年度の検討課題として、1)既に開発に成功している亜鉛イオン識別型蛍光プローブの大量供給法の開発と、2)亜鉛イオンに対する K_d 値の異なる蛍光プローブの開発、さらに3)マグネシウムイオンに対し応答する蛍光プローブ開発のための初期検討を行った。以下に詳細を示す。

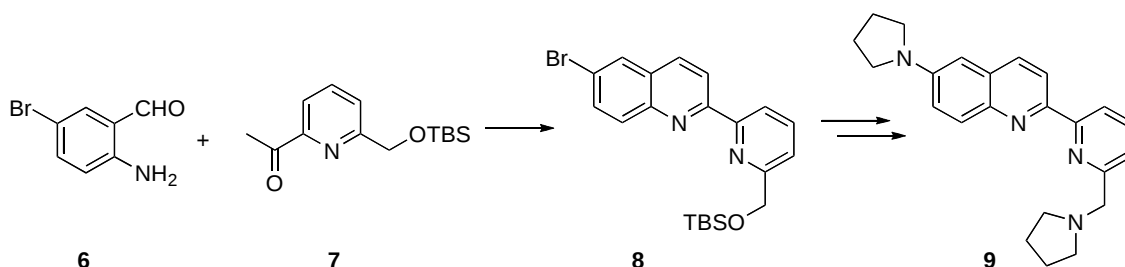
(1) 亜鉛イオン識別型蛍光プローブの大量供給法の開発

我々が亜鉛識別型新規蛍光プローブ **3** を開発した際に、種々の誘導体が簡便に合成可能なフレキシブルな官能基をキノリン環上に有した化合物を中間体とした合成経路を採用していた。このキノリン環上の官能基をメトキシ基として固定すれば、安価な原料を出発物質として、さらに工程数を大幅に短縮し、効率的な蛍光プローブ合成法となると考え以下の検討を行った。すなわち、従来法ではキノリン環上のメトキシ基の位置に、蛍光分子合成の最終段階でメトキシ基以外の種々の酸素官能基の置換反応による導入が検討可能なフッ素原子を導入したものを中間体としていた。このフッ素体を中間体とすると、化合物 **3** を合成するために市販の2-フルオロアニリンから8工程を要していた。このフッ素原子をメトキシ基としたところ、メタアニスアルデヒドより安価な試薬を用いて化合物 **3** を5工程で合成でき、大量合成が可能な効率的合成法の確立に成功した。

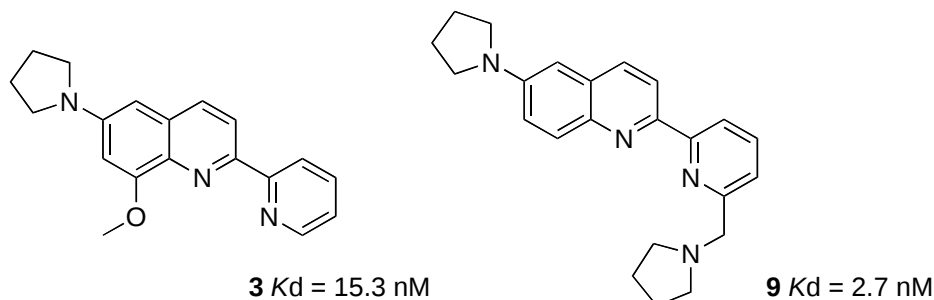


(2) 亜鉛イオンに対する K_d 値の異なる蛍光プローブの開発

亜鉛イオンに対する蛍光分子の K_d 値は、亜鉛イオンが取り込まれるイオノフォア、すなわち二つの芳香環上の窒素原子の周辺の官能基に依存している。そこで、ピリジン環上に金属に対する配位能を有するルイス塩基であるピロリジンを導入し、 K_d 値に与える効果について検討した。ピリジン環上にピロリジンを導入する蛍光分子 **9** は以下のように合成した。すなわち、化合物 **6** とアルコキシメチル基を有するアセチルピリジン体 **7** との縮合反応により、ピリジン環上にピロリジン導入の足がかりとなる置換基を有する化合物 **8** を合成した。次に化合物 **8** にピロリジン部位を導入し化合物 **9** を得ることに成功した。

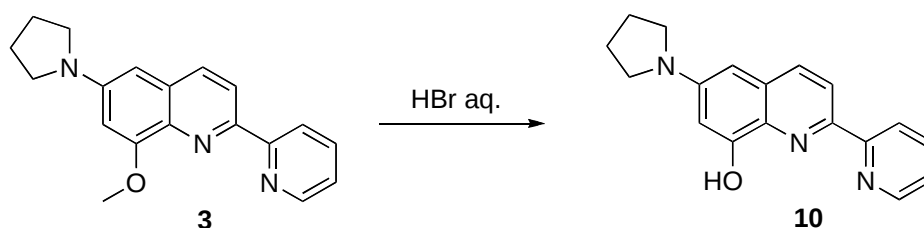


化合物 **9** の亜鉛イオンに対する K_d 値を求めたところ、以下のような値となり化合物 **3** と比較して亜鉛イオンへの結合能の向上に成功した。すなわち、ピリジン環への金属配位能を有する官能基の導入は、 K_d 値の向上に有効であることを明らかとした。



(3) マグネシウムイオンに対し応答する蛍光プローブ開発のための初期検討

マグネシウムはアルカリ土類金属であり、マグネシウムイオンは亜鉛イオンと比較して硬い酸である。よって HSAB 理論により硬い塩基である酸素官能基との高い親和性が予想される。そこで、キノリン環上のメトキシ基を水酸基に変更すれば、マグネシウムイオンに対する親和性の向上が期待できると考え、以下の化合物 **10** をデザインした。化合物 **10** は、化合物 **3** の臭化水素水での処理により簡便に合成可能であった。ここで得た化合物 **10** について、マグネシウムイオンに対する応答を検討したところ、二波長性の応答を示すことが明らかとなった。



3. 研究評価及び今後の研究計画

平成 20 年度は先に説明したように、まず亜鉛イオン識別型蛍光プローブの大量供給法の開発について検討を行った。その結果、蛍光プローブ **3** の合成において工程数の大幅削減に成功し、また安価な試薬を用いていることから化合物 **3** の大量合成が可能となった。次に、化合物 **3** を基に亜鉛イオンに対する K_d 値の異なる蛍光プローブの開発について検討を行った。蛍光物質のピリジン環上へ、金属配位点としてのピロリジンの導入を行ったところ、化合物 **3** と比較して K_d 値が低くなった、すなわち亜鉛に対する結合能が向上した新規蛍光プローブ **9** の開発に成功した。これにより、亜鉛に対する K_d 値の異なる三種の蛍光プローブ **2, 3** そして **9** の創製に成功した。さらに、亜鉛イオン識別型二波長性蛍光プローブの原理を利用し、マグネシウムイオンに対する親和性を持たせた蛍光プローブの開発を目指した初期検討を行った。その結果、亜鉛イオンに反応する蛍光プローブ **3** の、キノリン環上に存在するメトキシ基を水酸基へと変換することにより、マグネシウムイオンに対する二波長性蛍光プローブ開発のための初期検討に成功した。以上のように、平成 20 年度に検討すべき事項に関し、当初の目的を達成することができた。平成 20 年度の結果を踏まえ、平成 21 年度には以下の点について検討を行いたい。まず、マグネシウム

イオンへの選択性の向上を目指し，蛍光分子に対しマグネシウムイオンに親和性が高いと考えられる官能基のさらなる導入を行う．さらに，アルカリ金属，とりわけナトリウムイオンの検出を可能とするような蛍光分子の開発に向けた初期検討を行う．次に，環境ストレス因子となりうるリンやヒ素などの15族元素の化合物に対し，二波長性の応答を示す蛍光プローブの開発を目指し，その初期検討を行う．

化学物質に対するに生体分子の応答ダイナミクスおよび 人為的環境ストレスに対する細胞膜脂質構成成分変化の定量化

内田達也 (環境衛生化学研究室・准教授)

熊田英峰 (環境衛生化学研究室・助教)

青木元秀 (環境衛生化学研究室・助教)

1. 当初の研究目標

化学物質などの人為的環境ストレスが生命体に及ぼす影響を正確に把握し、その分子機序を明らかにすることは人類に課せられた喫緊の課題である。当研究グループでは、化学物質の影響によって生体内に見いだされる膜脂質成分の種類や組成を探索し、これをバイオマーカーとして土壌・環境水試料中での濃度を高感度に定量することで、化学物質が自然環境中で生命に与える影響を評価する。また、化学物質が生体を構成する分子にどのような速度あるいは強さで結合するのかを新規バイオセンサを構築することで明らかにし、化学物質が生命体に及ぼす分子機序の一端を解明する。

上記を効率よく遂行するために、組織的連携をとりつつ以下の三つのアプローチにおいて個々の目標を設定し、同時に研究を展開することとした。

(1) 人為的環境ストレスによる脂質成分変化の探索

化石燃料などの燃焼生成物である多環式芳香族炭化水素類(PAHs)を環境ストレスとし、対象生物として水圏生態系の第一次生産者である植物プランクトン(藻類)を用いる。生体膜脂質成分について、質量分析計にオンラインで接続可能な高性能高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による一斉分離分析条件を分離モード、溶媒組成について検討する。試料は、PAHsを負荷して生育した藻類から溶媒抽出した脂溶性成分とする。

(2) 環境試料中脂質成分に関する分析法の検討

土壌／水界中の藻類やバクテリア／古細菌あるいは陸上高等植物が産生する膜脂質構成成分の種類・組成に及ぼす、人為的環境ストレスの影響を定量的に評価することを目的とする。環境水試料中に存在する脂質成分の効果的なサンプリング方法の検討、および山岳域の森林大気エアロゾル中の脂質成分のスペシエーションを行う。

(3) ヒトエストロゲン受容体(hER)タンパク質を用いたバイオセンサの構築

バイオセンサ構築の基礎を検討する。マルトース結合タンパク(MBP)を融合させた hERα サブユニット(MBP-hERα-LBD)のセンサ表面への固定化方法を最適化する。第一段階では、センサ表面に形成する自己組織化単分子膜(SAM)の化学構造および組成比を検討し、第二段階で SAM を活性化してアミノカップリング法による固定化を試みる。特に、タンパク質の非特異的吸着を抑制しつつ、MBP-hERα-LBD を高密度に固定化できる条件を模索する。

2. 研究成果の概要

上記三つのアプローチに対してそれぞれの成果概要を記す。

(1) 人為的環境ストレスによる脂質成分変化の探索

藻類から溶媒抽出した脂溶性成分について、化学物質組成プロファイルを明らかにするための各種クロマトグラフィーを用いた分離・定量分析方法をについて条件検討を行った。藻類に負荷するストレス物質には、当初に予定した PAHs に加えて、重金属類も対象とした。

① 薄層クロマトグラフィー (TLC) およびガスクロマトグラフィー (GC) による脂質主成分組成分析条件

試料を、TLC プレートシリカゲル 60 (メルク) を用いて、溶媒 1 [アセトン:ベンゼン:メタノール:水 (8:3:2:1)] および溶媒 2 [クロロホルム:メタノール:濃アンモニア水 (13:7:1)] にて 2 次元展開を行うと藻類の主要な生体膜脂質成分を一斉に分離できることを確認した。さらに、分離された各生体膜脂質をメチルエステル化処理後、分析カラムに HR-Thermon-3000B (信和化工) を用いて GC 昇温分析を行うと、15 分間の分析時間で膜脂質が脂肪酸メチルエステルとして再現性よく定量できることが判明した。これにより主要膜脂質成分の定量法が決定された。

② 抽出試料中 PAHs の HPLC による一斉分離分析条件

分析カラムに Mightysil RP-18GP (関東化学)、移動相に 80%アセトニトリルを用いた逆相モードにて、254nm の吸光または励起波長 240 nm における 378 nm の蛍光を検出することで PAHs を 1 時間以内に一斉にかつ数十 ppb のオーダーで分析する条件を確立した。

上述の分析法を用いてストレス負荷試料を分析した結果、低 pH 条件でクロレラに Cr(III) を曝露すると糖脂質含量が減少する、ラン藻に 2.0 μM のタリウムを曝露すると細胞体積あたりの総脂質量が約 43% 減少する、環境ストレス物質による藻類の細胞毒性と細胞膜脂質成分組成変化に相関関係が認められることがわかった。

(2) 環境試料中脂質成分に関する分析法の検討

① 環境水試料中に存在する脂質成分の効果的なサンプリング方法

平均孔径 5~10 μm (CF1) および孔径 1.0 μm (CF2) のカートリッジフィルターと孔径 0.2 μm の PTFE メンブレンフィルターを組み合わせた多段濾過システムを本研究のために構築した。このシステムを用いて天然水 (河川水) 中の懸濁粒子を分級捕集すると、C16, C18 を始めとする脂肪酸類やスクアレノ等、生物起源脂質バイオマーカーを微細粒子画分 (0.2~1.0 μm) に、多環芳香族炭化水素 (PAHs) など燃焼由来の人間源汚染物質を 1.0~5 μm および >5 μm 画分に、それぞれ捕集されることがわかった。脂肪酸類は >5 μm 画分にも存在したが、これらは微細粒子画分中の脂肪酸類とは存在状態や発生起源が異なる可能性があるため、今後さらに解析していく必要がある。

② 森林大気エアロゾル中の脂質成分のスペシエーション

落葉広葉樹林内で地表からの高度をかえて 2006 年の非冠雪期に採取されたエアロゾル試料に含まれる中性の脂質成分を測定したところ、高等植物由来の n-alkane が 0.12~3.97 ng/m³ の範囲で変動していることが分かった。

また UCM ($0.27\sim5.87\text{ng/m}^3$) や Hopane ($0.001\sim0.197\text{ng/m}^3$) などの化石燃料燃焼由来のマーカークラスが検出され、森林大気でも人為起源の有機物の影響があることがわかった。また、地表、樹冠下部(地上 4m)、樹冠上(10m)と高度を変えて採取したサンプルの測定結果の比較から、樹冠で採取したものでは燃焼起源物質の影響が強く認められた。このことから、森林生態系内の脂質成分の挙動を調べるための試料としては、地表あるいは樹冠下部で採取した試料が適していることがわかった。

(3) ヒトエストロゲン受容体(hER)タンパク質を用いたバイオセンサの構築

センサの検出原理として、水晶振動子マイクロバランス法(QCM)と表面プラズモン共鳴法(SPR)の両方を比較検討して最適な検出方法を選択することとした。どちらの検出法もセンサ基板表面は金薄膜であるため、金表面に対する hER 融合タンパク質の固定化方法を検討した。その固定化量は QCM によって評価した。

① 自己組織化単分子膜によるタンパク質の固定化

ピランハ溶液によって清浄化した金表面に対して、末端にカルボキシル基を有する直鎖アルカンチオールを化学吸着させて自己組織化単分子膜(SAM)を形成した。この SAM と hER 融合タンパク質をアミノカップリングによって固定化を試みたところ、 200ng/cm^2 程度の目的タンパク質を金表面に固定化することに初期的に成功した。但し、本研究のアナライズであるエストロゲン類は水に対して難溶性であることから、アナライズが SAM に対して非特異的に吸着する可能性が高いと予想されるため、より親水性の高い SAM を介した固定化を指向した。末端にカルボキシル基を有してポリエチレングリコール鎖で構成されたチオール(C-PEG)と末端にヒドロキシ基を有して C-PEG より鎖長が短いチオール(H-PEG)を混在させた SAM を作製した。その結果、前述の SAM と同程度のタンパク質固定化に成功した。

② QCM と SPR の比較

アナライズとしてエストラジオールを用いて、可能な限り同一の条件で両方法による検出を試みた。QCM では、微弱ながらエストラジオールの結合らしきシグナルを得ることができたが、バックグラウンドの変動に埋もれてしまい、解離に至るまでの全過程を観測するに至らなかった。一方、SPR では微弱ながらも結合から解離に至るまでの全過程を捉えることができた。しかしながら、速度論的解析に耐えうるほどのシグナルではなかった。QCM および SPR の双方において、受容体タンパク質と内分泌攪乱物質の相互作用を様々な環境下で調査するにはシグナル量を数十倍以上増大させる必要があることが示唆された。

3. 研究評価及び今後の研究計画

三つのアプローチそれぞれに重要な進展があり、当初の目標に対して一定の成果を収めることができた。以下に各アプローチの評価と今後の研究計画を示す。

(1) 人為的環境ストレスによる脂質成分変化の探索

脂溶性成分一斉分離分析条件について、その基礎となる分析条件を設定するこ

とができた。藻類の細胞膜脂質成分がストレス負荷によりダイナミックに変化することが明らかになった。このことは次年度、細胞膜脂質構成成分の環境ストレス応答の詳細がさらに明らかになることが十分期待できるものである。

今後は、引続きモデル生物として主として緑藻クロレラおよびラン藻を用い、多環式芳香族炭化水素類および重金属ストレス条件下における生体膜脂質の挙動の解明を目指す。具体的には、今回確立した分析手法を生体膜脂質中の微量成分をも検出可能な再現性に優れた標準分析法へ発展させる。この標準分析法を用いて、5種類程度の環境ストレス物質への生体応答プロファイルを明らかにし、ストレス同定に有用なバイオマーカー候補を探索する。見出された環境指標脂質バイオマーカー候補に関して、その検出特異性と感度観点から評価し、選抜する。これら候補に関して可能な限り同定も試みる。

(2) 環境試料中脂質成分に関する分析法の検討

当初計画していた環境水のサンプリング方法、山岳大気エアロゾルでのバックグラウンド情報の取得については一定の成果を得ることができた。一方、土壌試料の分析、バクテリア由来膜脂質グリセロールジアルキルグリセロールテトラエーテル (GDGTs) の分析方法については十分に検討を終えることができなかった。土壌試料に含まれるエステル脂質の解析については2年度目に実施できる見込みである。分析方法の詳細な条件を検討／確立するために GDGTs の標準品が必要なので、環境試料（土壌および堆積物）から標準品として使うための GDGTs の大量抽出・精製に着手する。人為的環境ストレス下にある都市域およびそのバックグラウンドと目される都市近郊の森林土壌の時系列サンプリングを行う。土壌試料と本学（東京都八王子市）構内の樹冠レベルで採取したエアロゾルのアーカイブ試料（2006～2007年）について細胞膜脂質（エステル脂質）を測定し、濃度と組成の季節変動を明らかにする。

(3) ヒトエストロゲン受容体(hER)タンパク質を用いたバイオセンサの構築

親水性の強い自己組織化単分子膜を介し、受容体タンパク質を金表面に固定化することに成功した。このセンサ基板を用いて微弱ながらも、受容体タンパクとエストラジオールの結合を観測することに成功した。この結果からセンサ表面に数十倍のタンパク質を固定化する必要性が示唆され、次年度の研究計画における重要な指針を得た。

タンパク質の固定化量を劇的に増大させる方法として、センサ表面上の三次元空間を活用することが考えられる。次年度においては、センサ表面に糖鎖高分子による三次元網目構造を作製し、この網目構造にタンパク質を固定化することで、シグナル量の劇的な増大を図る。

4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Fujiwara, K., Matsumoto, Y., Kawakami, H., Aoki, M., and Tuzuki, M.

Evaluation of Metal Toxicity in *Chlorella kessleri* from the Perspective of the Periodic Table.

Bull. Chem. Soc. Jp., 81(4), 478-488(2008).

- (2) 内田昌男, 内田雅己, 熊田英峰, 高橋善幸, 大塚俊之, 内海真生, 近藤美由紀, 中坪孝之, 柴田康行,
気候変動と高緯度北極土壌圏—土壌有機炭素リザーバーへの温暖化影響—,
月刊地球, 30, 216-229 (2008).
- (3) Otagiri, D., Fujimori, C., Sasaki, A., Wakai, Y., Uchida, T., Hozumi, Kentaro;
Kikkawa, Yamato; Nomizu, Motoyoshi,
Peptide-chitosan matrices using laminin-111 peptides,
Peptide Science, 45, 81-84(2009).

国内学会発表

- (1) 藤原祺多夫、青木元秀
自己相関蛍光法を用いる淡水産藻類の測定の試み
日本工業用水協会第 44 回研究発表会 2009 年 3 月、東京
- (2) 青木元秀、笹本勝紀、江田歩美、熊田英峰、藤原祺多夫
緑藻クロレラの生体膜脂質組成におよぼす重金属ストレスの影響解析
日本分析化学会第 57 年会 2008 年 9 月、福岡
- (3) 菊池明人、青木元秀、竹中一貴、熊田英峰、藤原祺多夫
ラン藻六価クロムトランスポートの機能解析
日本分析化学会第 57 年会 2008 年 9 月、福岡
- (4) 高橋龍矢、青木元秀、佐藤和也、熊田英峰、藤原祺多夫
二次元ポリアクリルアミド電気泳動法によるラン藻のタリウムストレス応答タンパク質の探索
日本分析化学会第 57 年会 2008 年 9 月、福岡
- (5) 印藤大昭、熊田英峰、藤原祺多夫、都筑幹夫、内田達也
水晶振動子型ナノチャンネルセンサによる高湿度環境における揮発性芳香族炭化水素ガスの高感度測定 ～室内における ppb レベルのオンサイトモニタリング～
日本分析化学会第 57 年会 2008 年 9 月、福岡
- (6) 内田達也、秋山潤、印藤大昭、鈴木篤史
半導体型ナノチャンネルセンサの開発と高湿度環境における揮発性有機化合物ガスの超高感度リアルタイム測定
日本分析化学会第 57 年会 2008 年 9 月、福岡
- (7) 若井優妃、増渕拓未、田邊洋祐、新井祥人、都筑幹夫、内田達也
生体分子間反応が可能な新規メソポーラスシリカ薄膜による高感度・高速イムノアッセイの実現
日本分析化学会第 57 年会 2008 年 9 月、福岡
- (8) 根田礼子、田中龍、内田達也
分子間相互作用の速度論的解析を可能とするフロー型水晶振動子マイクロバランス測定装置の開発 —表面プラズモン共鳴法への挑戦—
日本分析化学会第 57 年会 2008 年 9 月、福岡