個体レベルの新規分子イメージング技術の開発 とその有効性の検証 (S1201037)

(平成 24 年度~平成 28 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

平成 29 年 5 月

学校法人名 関西文理総合学園

大学名 長浜バイオ大学

研究組織名 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

研究代表者 永井 信夫

はしがき

私ども、長浜バイオ大学バイオサイエンス学部の研究グループは、文部科学省からの支援を受け 「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」のプロジェクトを平成 24 年度より5年かにわたって進めて参りました。この間、研究代表者としてプロジェクトを指揮された 山本章嗣先生が入院の後ご逝去され、大変困難な状況ではありましたが、研究に参加して頂いた 皆様、プロジェクトの事務的業務を支えてご協力を頂きました皆様の努力により研究を遂行するこ とが出来ましたことを深く感謝申し上げます。

この 5 年間の成果は、論文は42件、著書は8件、学会発表は51件、さらにその他のメディアが 2件におよび、研究成果が社会に対して大きく発信されました。このプロジェクトの成果が、今後の 研究の進展に貢献できることを期待いたします。

最後に、山本章嗣先生のご冥福を心よりお祈り申し上げますとともに、プロジェクトに参加して頂 いた先生、研究者、学生諸君の今後益々のご活躍を願います。

永井 信夫

研究成果報告書概要 中間評価報告書	4 0 2
山本 章嗣 テーマ1 :「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」 免疫金法を用いた特定タンパク分子の分布イメージング (腸粘膜における IgA の分布のイメージングと機能解析) ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	4
新蔵 礼子 テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」 免疫金法を用いた特定タンパク分子の分布イメージング (腸粘膜における IgA の分布のイメージングと機能解析) ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
蔡 晃植 テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」 セリウム塩法による活性酸素種発生のイメージング ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5 9 2
野村 慎太郎 テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」 個体レベルでの新たな遺伝子発現イメージング・マウス頭蓋骨における力学的付加応答遺伝子の経時的 発現パターンモニタリング系の確立、個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージング・・・・・・6 テーマ3:「X線CTイメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」 サブトラクション法により組織構造の変化を解析するシステムの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	64 8
山本 博章 テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」 CT 血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5

次

目

テーマ3:「X線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」 低粘性造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上 ・・・・・・・・・・82

永井 信夫

テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」 蛍光タンパク質を用いた特定タンパク質の組織・個体レベルにおける空間的イメージング ・・・・・・・89

河内 浩行

テーマ3:「X 線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」	
ビワマス筋肉内の脂肪分布・含有率の測定技術の確立とその応用	106

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

平成 24 年度~平成 28 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」 研究成果報告書概要

- 1 学校法人名 関西文理総合学園 2 大学名 長浜バイオ大学
- 3 研究組織名 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部
- 4 プロジェクト所在地 滋賀県長浜市田村町 1266 番地
- 5 研究プロジェクト名 個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証
- 6 研究観点 研究拠点を形成する研究
- 7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
永井信夫	バイオサイエンス学部	教授

- 8 プロジェクト参加研究者数 <u>7</u>名
- 9 該当審査区分 <u>理工·情報</u> <u>O生物·医歯</u> <u>人文·社会</u>
- 10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属·職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
山本章嗣	バイオサイ エンス学部・ 教授	走査電子顕微鏡による個体レ ベルの分子イメージング技術の 開発	走査電顕分子イメージング 法の開発
新藏礼子	バイオサイ エンス学部・ 教授	走査電子顕微鏡による個体レ ベルの分子イメージング技術の 開発	腸管粘膜表面における IgA 機能の走査電顕的解析
蔡晃植	バイオサイ エンス学部・ 教授	生体イメージング装置を用いた 新規蛍光・発光イメージング法 の開発とその有効性の実証	新規蛍光・発光イメージン グ法の開発とイネ自然免 疫研究への応用
野村慎太郎	バイオサイ エンス学部・ 教授	生体イメージング装置を用いた 新規蛍光・発光イメージング法 の開発とその有効性の実証	カ学的ストレス応答のイメ ージング
山本博章	バイオサイ エンス学部・ 教授	生体イメージング装置を用いた 新規蛍光・発光イメージング法 の開発とその有効性の実証	マウス毛周期と血管のイメ ージング
永井信夫	バイオサイ エンス学部・ 教授	X 線 CT イメージング技術の開 発・改良とその有効性の検証	X 線 CT イメージングの開 発・改良
河内浩行	バイオサイ エンス学部・ 准教授	X 線 CT イメージング技術の開 発・改良とその有効性の検証	魚類筋・脂肪組織の X 線 CT イメージングの開発

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属·職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
走査電子顕微鏡による個 体レベルの分子イメージ ング技術の開発	バイオサイエンス 学部・教授	山本章嗣	走査電顕分子イメージング 法の開発
(変更の時期:平成28年	9月30日)		
走査電子顕微鏡による個 体レベルの分子イメージ ング技術の開発	バイオサイエンス 学部・教授	新蔵礼子	腸管粘膜表面における IgA 機能の走査電顕的解析
(変更の時期:平成27年	4月1日)		
X 線 CT イメージング技術 の開発・改良とその有効 性の検証	バイオサイエンス 学部・教授	永井信夫	X 線 CT イメージングの開 発・改良
(亦再の時期, 亚成 20 年	10 8 1 8 1		

(変更の時期:平成 28 年 10 月 1 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所 属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
X 線 CT イメージング技術 の開発・改良とその有効 性の検証	バイオサイエン ス学部·教授(研究 代表者)	永井信夫	走査電顕分子イメージ ング法の開発、 X線 CT イメージングの 開発・改良

研究の概要(<u>※ 項目全体を10枚以内で作成</u>)

(1)研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

本プロジェクトは、"個体レベル"の分子イメージング技術を新たに開発し、その有効性を検証する研究拠点を 形成することを目的としている。このため、1)走査電子顕微鏡法、2)生体イメージング装置を用いた蛍光・発光 イメージング、3)X線CTの3技術を用いた新規分子イメージング技術を重点的に開発し、その技術を確立する。 さらに、これら3種の技術および既存の分子イメージング技術を有機的に組み合わせることによって、新しい個 体生物学の方法論を創出し、本学で分子生物学的研究が進められている環境応答などの研究に導入すること によって、この分野の発展を推し進めるとともに、その有効性を検証することを目的としている。

テーマ1「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」では、免疫金法を用いて走査電 顕下で特定タンパク分子の分布を画像化する技術を開発し、腸粘膜における IgA や植物細胞壁、細胞膜におけ るタンパク質の分布のイメージングを行う。走査電顕によるセリウム塩法による活性酸素発生のイメージングや CT 血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発も行う。

テーマ2「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」では、生体イメージング装置を用いた組織・個体レベルでの新しいイメージング技術を確立する。このため、1)蛍光タン パク質を用いた特定タンパク質の組織・個体レベルにおける空間的イメージング、2)個体レベルでの新たな遺 伝子発現イメージング、3)個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージングを開発する。

テーマ3「X線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」では、1)サブトラクション法により組織構 造の変化を解析するシステムの開発、2)造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上、 3)筋肉内の脂肪分布・含有率の測定技術の確立を行う。

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

(2)研究組織			
研究代表者の山本章嗣は全体を統括	生体イメージング装置を用い	た。 去本世ス顕然	焼に上る公子イメージング
する。山本章、蔡、永井は各テーマの	蛍光・発光イメージング	山木東、東	f藏、蔡、山本博
責任者として研究のとりまとめを行う。	鏖、野村、山本博,永井		<u> </u>
但し、山本章嗣の逝去により28年度		検証システム	検証実験系(提供研究者) 開始計算の店(にお)
10月より研究代表者は永井に変更。		 3 種のイメーシンジ 技術を相互に用い 	扁官和膜光反(新亂) 癌細胞転移(野村、永井)
参加研究者数は7名。PD、3名。研		検証	タバコ、イネの免疫応答(薬)
空補助者1名,大学院生20名, RA,	X腺CTイメージング	7	(小本市) (山本博) 血管(永井、山本博)
5名。研究チーム間の連携は密である。	水井、町村、山本博、河内	\perp \sim	脂肪組織(河内)
学内では 研究推進機構事務室上り直	接支援奏受	从航程伍委員	
けている。他大学などとの共同研究も	間である。	滋賀医科大学、3	藍山 育夫教授
(3)研究施設・設備等			
	· 考勒 会后位(宝融家·新)	·	57 夕(研1数) 実験付
明光に使用した明光施設の面積と使用 屋抜設・動物金約160 平平 120 名()	11 X0 中田昭(天歌王·秋) 廷人数) 佘小館(宋陰家・秋	(王) 約 040 千木 (6昌安) 約 080 平	¥ 05 名(延大数)。天秋时
また研究装置の名称及れその利用時間	医大致/。叩和語(天秋王···· 問題	(與主/約000平	A . 00 11 (EAM/)
土本電子顕微鏡 日立 S-3400N(FDX	ー カライオシステム装善) 2	100時間	
生体イメージング装置 日本ローパー計量	Lumazone 1200 時間	ion ad int	
小動物 X 線 CT 撮影装置、リガク社製	RmCT2 1.600 時間		
クロマトグラフィーシステム GE ヘルス	なアジャパン社製 200 時間		
生理活性反応測定装置、バイオエックス	x社製 AMIS-101X 100 時		
(4)研究成単の概要 ※下記 13	及び14に対応する成果に	は下線及び*を付	はこと。
テーマ1「未本雪子顕微鏡に上入側体	レベルの公子イメージング	まちの開発し	17 0
1)免疫金法を用いた結定なンパク分子	の分布イメージング、場料	葉における IrA の	分布のイメージングと機能
解析。近年、腸内細菌叢の異常(dysbid	usis)が炎症性腸疾患だけで	はなく多くの疾患の)発症に関連すると報告さ
れており、腸内細菌叢を改善することは	健康維持に重要である。腸	内細菌叢は腸管に	分泌される IgA 抗体によ
って認識し制御されていることが知られ	ているが、各 lgA 抗体が常	在細菌の何を認識し	て常在細菌叢にどのよう
な変化を与えるのか、などその詳細は明らかではない。*私たちはマウス小腸由来 IgA 産生細胞からモノクロー			
ナル IgA 抗体をクローニングし、各クローンが認識する細菌由来分子を探索し、単離した IgA 抗体の中で、多く			
の種類の細菌に最も強く結合する能力	を持つ W27 抗体に着目し	<u>と。W27 抗体が強く</u>	結合するのは大腸菌など
<u>腸炎の原因菌であり、乳酸菌やビフィン</u>	ズス菌といったブロバイオテ	イクスに利用される	いわゆる善玉菌に対して
の結合は弱かった。W27 抗体は多	くの細菌が共通に待つス	(勝国の代謝酵素	(Serine hydroxymethyl-
trashferase)中の47ミノ酸の違いを顕 増殖を加制した。一支で W27 技体は自	別しており、この特定のアミ	/ 阪能列を認識し(お古りることで大陽圏の
酒畑を抑制した。一方でW21 抗体は5 ス 会体として良い葉が癌位にたる課は	2018の増増を知りないの	<u>に、マリスへ W2/1</u> 目にわた W27 拉枝	小学校日気子を11つたとこ
つい上体として良い困い夜世になる場内	の結果腸炎が抑制された	じ トの結果から	
白沢子りのと、踊り福岡度が変化し、	性を示すことができた。この	分泌型 lgA の腸内	分布および腸内細菌と結
合を明らかにする為、走査電額による	gA の分子イメージングを行	ote	IN THE OWNER AND CAN
①金標識による細胞分子の検出。一	次抗体、金標識二次抗体。	と反応後、金増感	反応を行い、EDX(Energy
Dispersive X-ray Spectroscop、エネル	ギー分散型 X 線分光法)に	より抗原を金シグナ	トルとして走査電顕下で検
出する方法を開発し、培養細胞ミトコン	ドリアのイメージングに成功	した。	
②マウス腸管における内在性分泌型 I	gA の検出。①の方法を用い	いてマウス腸内在性	ElgA の検出を試み、EDX
による金標識二次抗体の検出に成功し	た。しかし金分子の明確な	像を得る子が出来	ず、空間分布を明瞭なイメ
ージングには至らなかった。			
③W27 抗体と培養腸内細菌との結合の	0イメージング。培養した大服	島菌に、W27 抗体、	金ラベル 2 次抗体を反応
させ、金増感法により金粒子径を増加さ	させた後、走査電顕で観察し	、W27 抗体が細菌	表面に結合していることを
明瞭に示すことに成功した。しかし、ED	X による金元素の同定には	至らなかった。	
④菌、細胞表面の抗体のイメージング。	②および③において、EDX	による金元素の空	間分布および同定が出来
なかったのは、金粒子の大きさが十分で	でないことに起因する。そこ	で、金標識抗体の金	2粒子を50nm以上に成長
させる新規の方法を確立し、Staphyloc	occus Aureusを用いて菌表	面の金標識抗体の	空間分布およびEDXによ
る金元素同定に成功した。さらに培養	細胞を用いた検討でも表面	抗原に対する一次	抗体と金標識二次抗体に
よる EDX による金元素の同定と空間分	布イメージングに成功した。		
2)低真空クライオ走査電顕法による	E体試料観察。琵琶湖産の	カビ臭を産生する	豊葉の1つに Phormidium
tenue がある。この P. tenue には、カビ	臭を発生する緑色のものと	産生しない褐色の	ものが存在するとされてい
た。そこで、 <u>*緑色および褐色の P. ten</u>	ue の形態を走査電顕で比	反した。*低真空クラ	イオ走査電顕法で両者を
比較したところ、緑色種が細胞の周囲	こ鞘を持たないのに対して	8色種が鞘を持つ;	こと、および細胞形態や細

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

<u>胞内顆粒に違いが見られることから、これらの藍藻は異なる種であることが示された。さらに EDX による細胞内</u> 顆粒の元素分析にも成功し、緑色種がより大きなポリリン酸顆粒を持つことが示された。

3) セリウム塩法による活性酸素種発生のイメージング。イネは、イネ褐条病細菌 Acidovorax avenae のイネ非 親和性 N1141 菌株を認識して免疫反応の一つである活性酸素種の発生を誘導する。そこで、このときの活性酸 素種発生を時空間的に解析できる系の構築を行った。塩化セリウム(CeCl₃)は、過酸化水素と反応すると直ち にセリウム水酸化物(Ce(OH)₂OOH)の沈殿を生じ、沈着する。この反応産物は有機溶媒にも不溶で電子線を透 過しないことから、活性酸素種の発生部位を詳細に解析するうえで有用であると思われる。

①セリウム塩のイメージング。イネ非親和性N1141菌株をイネ培養細胞に接種した後、この細胞をセリウム溶液で処理し、低真空走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、非親和性菌株接種後3時間のイネ培養細胞では、表面に点状のコントラストの高い部分を持つ細胞が全細胞数の約5%で見られ、この部位は接種後6時間でさらに広がった。このような高コントラスト部位は、親和性菌株を接種した細胞や蒸留水を処理したコントロール細胞ではほとんど見られなかった。この高コントラスト部位にはセリウムが局在していることがX線分析で明らかになったことから、非親和性菌株の接種によりイネ培養細胞で認められる活性酸素種の発生は一部の細胞で認められ、さらにこの産生部位は細胞表面で局所的であることが示された。

②細胞表面の構造と活性酸素種の発生部位との関連の検証。イネ培養細胞の表面構造と活性酸素種の発生 部位との関連を明らかにするために、反応産物の集積部位を透過型電子顕微鏡により観察した。その結果、非 親和性菌株接種後 6 時間では、菌体が付着している培養細胞の表層部分にイネ細胞膜の陥入が見られ、セリ ウム反応産物の著しい蓄積が細胞壁と細胞膜外側で認められた。また陥入した細胞膜部分や細胞内のベシク ル内でも反応産物が見られた。以上のように、活性酸素種の発生部位を細胞レベル、サブオルガネラレベルで 調べることができる系を確立した。

4) CT 血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発。*微細血管 X 線 CT イメージングに適した樹脂として 見いだした Microfil(テーマ3参照)を充填した脈管系の周囲組織を溶かしてレプリカを作製し、走査型電顕での 観察を試みたものの、本樹脂で置換された脈管系のうち特に微小な毛細血管において途切れる箇所のあること が判明した。そこで、Mercoxの商品名で販売されている超低粘度の樹脂を用いてレプリカを作製し、脈絡膜と内 耳の血管網の抽出を行った。この手法では、周囲の組織を溶解後、コートを施した試料を走査型電顕で観察で きる。なおそのままでは Mercox レプリカの高次構造解析に X 線 CT 装置は利用できない。これら Microfil と Mercox の両者を用いた脈絡膜脈管系の解析法を確立し、その知見を論文に投稿中である。内耳蝸牛のより細 い脈管系については、Mercox 同等の低粘度で、造影効果のある分子を含む新たな造影剤の開発が必要であ る。

テーマ2「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」 1)蛍光タンパク質を用いた特定タンパク質の組織・個体レベルにおける空間的イメージング。

①GFP 発現植物病原性細菌の植物内における経時的分布変化モニタリング系の確立。病原性細菌が植物に 感染後にどのように分布するのかを時空間的に解析できる系の構築を試みた。まず、検定に用いる菌株と宿主 植物を選定するためにいくつかの菌株をそれぞれの植物に接種し、病徴発現を観察したところ、タバコ野火病菌 である Pseudomonas syringae pv. tabaci 6606 株をタバコ (Nicotiana benthamiana)に接種したときには病徴が認 められず、病害抵抗性反応の一つである過敏感細胞死が認められたことから、この病原細菌株とタバコは非親 和性関係にあると結論づけられた。一方、トマト Solanum lycopersicum (Money Maker)に斑点病菌である Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (PstDC3000) 株を接種したところ明瞭な病徴が観察されたことか ら、この病原性細菌とトマトは親和性関係にあることが示された。そこで、PstDC3000 をトマトに接種したときの 時空間的分布を解析する系を構築するため、まず、カナマイシン耐性遺伝子のプロモーターに GFP を連結させ た pPNptGreen ベクターを PstDC3000 に導入した。作成した組換え PstDC3000 は明瞭な GFP 蛍光を有してい たので、この菌をトマトに接種し、生体イメージング装置で観察した。その結果、接種 1 日後には接種部位全体 で弱い GFP 蛍光が認められ、接種 3 日後では、GFP 蛍光は主に葉脈で認められた。さらに詳細に PstDC3000 の存在部位を明らかにするために、GFP 蛍光が消失しない状態で植物を脱色することが出来る Clear See 脱色 液を用いてトマト葉を脱色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、PstDC3000は葉脈と葉全体の細胞間隙 に多数存在していることが明らかになった。このとき病徴は、葉全体で認められたことから、病斑の形成と菌株 の増加は時空間的に一致していることが初めて明らかになった。次に、PstDC3000 と N. benthamiana を用いて 非親和性関係における病原菌の時空間的分布についても調べた PstDC3000 を N. benthamiana に接種すると、 接種1日後に過敏感細胞死斑が認められ、7 日後まで変化がなかった。この時の GFP 蛍光を観察したところ、 接種直後はほとんど GFP 蛍光が認められなかったが、接種後1日目から接種部位で GFP 蛍光が認められた。 この蛍光は7日経っても接種部位より外に広がることはなかった。またこのときの菌体数についても調べてみた ところ、接種3日目に80倍に上昇したものの7日目では接種時と同程度まで減少していた。このことから、非親 和性関係においては、病原菌が接種部位で若干増加するものの、それ以上その存在部位が広がることがなく、 接種部位に限局することが明らかとなった。

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

②がん化細胞のマウス皮膚下における増殖の経時的モニタリング系の確立とその応用。EGFP を導入した 3T3-Ras 細胞(3T3Ras-GFP)を皮下移植したマウスを生体イメージング装置で解析したところ、腫瘍形成に伴う 蛍光イメージの経時的な拡大を認め、皮下のがん化細胞の増殖を可視化することに成功した。また、より長波 長の DeRed を蛍光ブローブとして用いることで皮下のより深部における画像化が可能なこと、しかし、陽など生 体の深部では難しいことが明らかになった。次に、ブロテアーゼ蛍光発色基質による腫瘍イメージングを行っ た。ヌードマウス皮下に 3T3Ras-GFP を移植した結果、GFP 陽性の腫瘍塊の内部および周囲において PROsense680 および MMPsense680 の蛍光が観察された。これらの結果より、ヌードマウスを用いた特定タンパ ク質の空間的分布イメージング系を確立することができた。<u>*そのシステムを用いて、AktSer473 のリン酸化活性 を有する膜貫通タンパク質である dynAP ががん遺伝子であり、本遺伝子の導入により癌化した細胞の形成する 腫瘍が、H-ras 依存性の腫瘍より血管に富む腫瘍を形成することを明らかにした。さらに、*脳梗塞モデルにお いて、PROsense680 と MMPsense680 と血管透過性亢進マーカーである FITC-デキストリン(蛍光波長 510nm) の多重イメージングのシステムを確立した。また長波長蛍光観察システムの導入により、組織/細胞レベルでの イメージング法を確立し、Lumazone との併用による個体から組織/細胞までの連続した観察を可能にした。</u>

③個体レベルでの活性酸素種発生のイメージング。*活性酸素種を Dihydroethidium(DHE)酸化物(蛍光波長 510-630nm)の蛍光を指標とし、血管透過性亢進マーカーである Cy5-デキストリン(蛍光波長 510-630nm)との 多重イメージングのシステムを確立した。このシステムを脳梗塞モデルに用いて、脳血管閉塞後の血管透過性 亢進に伴い、活性酸素種産生が誘導されることを認め、血管透過性に伴う活性酸素種産生が神経ネットワーク の変性を誘導して脳梗塞を増悪する可能性を示した。以上のように、活性酸素の発生部位を個体レベルで調べ ることができる系を確立した。

④生体イメージング装置を用いた血管造影法。上記②、③の研究において血管透過性のイメージング成功していた。さらに Tomato-Lectin(TL)を用いてマウス血管のイメージング法を確立した。TL は強い糖鎖結合性を有し、灌流により血管表面に結合するため、血管のイメージングが可能である。本法により、血管およびその透過性のイメージングを血管の機能的をイメージングする技術が確立したと言える。

2)個体レベルでの新たな遺伝子発現イメージング。マウス頭蓋骨における力学的付加応答遺伝子の経時的発現パターンモニタリング系の確立。骨組織に力学的負荷を加えると圧迫力が加わった部分の骨細胞にオステオポンチン(OPN)が発現する。OPN発現細胞の分布を立体画像で可視化する試みを行った。

① 圧力を加えた頭蓋骨における発現。OPN 遺伝子の上流部に GFP 遺伝子を連結した DNA 断片を染色体に挿入したトランスジェニックマウスを作成し、頭蓋骨に圧迫力と牽引力を加えて 24 時間後に骨組織を摘出し、脱灰後に CLARITY 法による透明化、蛍光免疫染色法による染色、さらに Scale 法による再透明化を行い、実体蛍光 顕微鏡にて蛍光を観察した。その結果、圧迫力が加わった部位の骨組織に蛍光を検出した。

②マウス尿閉塞モデル。尿道の縫合による尿閉症モデルを作成した。本モデルでは術後24時間で膀胱重量は 排尿後の約10倍となり、膀胱内圧の著しい上昇を示す。また、膀胱被覆上皮細胞は円柱上皮細胞から重層扁 平上皮細胞への形態変化が観察された。本モデルの膀胱組織を摘出し、CLARITY法による透明化、OPNおよ びマイクロアレイ法による検討で遺伝子発現上昇が確認されたケラチン6およびケラチン10の蛍光免疫染色法 による染色、さらに Scale 法による再透明化を行い、実体蛍光顕微鏡にて蛍光を観察した。その結果尿管ロ付 近の上皮組織に明確な蛍光の存在を認めた。これらの検討より、個体レベルの遺伝子発現イメージング法が確 立できたが、生体イメージング装置を用いた検討には蛍光が微弱であり、本装置による可視化と立体構築を行 うには手法のさらなる改善が必要であった。

3)個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージング。

①大腸菌を用いたBiFC 法によるタンパク質間相互作用の新しいイメージング系の確立。キナーゼのような酵素 の基質分子を探索することを目的とし、一過的な相互作用でも検出することが出来る検定系を Bimolecular Fluorescent Complementaion (BiFC) 法を用いて構築した。BiFC 法は GFP などの蛍光タンパク質を分割し、そ の分割した蛍光タンパク質同士が再会合することによって再び蛍光を発するようになるということを利用した方 法である。この検定系の評価分子には、一般的によく知られているキナーゼである MAPK を用いることにした。 これまでに、イネの MAPK の一つである OsMAP1 は MAPKK である OsMEK1 と相互作用し、OsMAP2 や OsMAP3 とは相互作用しないことが明らかになっている。まず、OsMEK1 と OsMAP1 との特異的な相互作用が BiFC 法に よって観察出来るかどうかをイネプロプラストで確認した。OsMEK1 と OsMAP1 - Vo、OsMAP2-Vo だけを発現 させたプロトプラストは、BiFC 由来の蛍光が観察されなかった。次に、相互作用が確認されている OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vo を発現させたところ、核と細胞質で BiFC 由来の蛍光が観察された。一方、相互作用しないことが 明らかとなっている OsMEK1-Vn と OsMAP2-Vo を発現させたプロトプラストでは BiFC 由来の蛍光は観察されな かった。以上のことから、BiFC 法によって OsMEK1 と OsMAP1 の特異的な相互作用を検出することが可能であ ること明らかになった。

次に、<u>*相互作用タンパク質を簡便にスクリーニング可能な検出系を構築するために、大腸菌 Rosetta-gamiB</u> 内でも OsMEK1 と OsMAP1 の特異的な相互作用が BiFC 法で観察されるかを検討した。各組み合わせで遺伝 子導入した Rosetta-gamiB に IPTG を添加し、BiFC 由来の蛍光を検出したところ、IPTG 添加後、3 時間から

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

OsMEK1-VnとOsMAP1-Voを発現させたRosetta-gamiBでBiFC由来の蛍光が認められた。このような蛍光は、 相互作用しないことが報告されているタンパク質間では認められないことも明らかとなり、本検定系はキナーゼ と基質の特異的な相互作用を検出出来ることが示された。

<u>この構築した検定系を用いて、植物の情報伝達に非常に重要であるカルシウム依存性ブロテインキナーゼ、</u> OsCPK8 の基質分子をスクリーニングした。その結果、Enolase 1、Guanine-nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor GTPase (ARF-GEF)、Peptidyl prolyl isomerase (PPIase)を同定することができた。これ らタンパク質は実際にイネ細胞内で OsCPK8 と相互作用することが確認されたことから、構築したスクリーニン グ系で酵素基質反応のような一過的に相互作用するタンパク質を同定することが出来ることが示された。

②毛周期に関わるβカテニンと LEF/TCF の時空間的相互作用のモニタリング。毛周期の進行を Split luciferase complementation assay 法をベースとした検定系で調べるために、毛周期に関わるβーカテニン、およびコアクチベーターの LEF/TCF に luciferase のN 末端側半分とC 末端側半分とをそれぞれ融合させたタンパク 質をメラノサイトで特異的に発現させる系の構築を試みた。しかし、構築しようとした系ではメラノサイト内に基質 を供給することが非常に困難であることが危惧されたので、別法として、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)を利用したマウスの作製を目指し、必要な1コンストラクトの作製を残すまで到達した。

テーマ3「X線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」

1)サブトラクション法により組織構造の変化を解析するシステムの開発。①卵巣摘出によるエストロゲン低下に 伴う骨吸収促進モデル、②大腿骨の股関節、膝関節の固定による骨拘縮モデルを確立し、その結果おこる経時 的な微細骨形態変化をサブトラクション法により解析する技法を確立した。さらに、新たに導入したソフトウェア による骨密度変化の経時的な測定にも成功した。その結果、卵巣摘出モデルでは大腿骨等の骨梁で、骨拘縮 モデルでは大腿骨の皮質骨、海綿骨に経時的な減少を認めた。また、骨形態の変化部位において前者では骨 代謝回転速度が上昇するが、後者では骨密度の変化を生じず骨強度も変化しない事が示唆された。

2)造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上。

①脈絡膜内血管造影法の開発。 *組織学的手法での解析が困難な眼球脈絡膜内の微細血管構造の解析に 活用できる造影剤の探索と撮影技術の確立を行い、色素細胞欠損マウスの血管形成異常を検証した。そのため、Fenestra、ExiTron nano 12000、ヨウ素系造影剤、Microfil (樹脂状造影剤)などの血管造影剤を検討し、 Microfil がマウス眼球脈絡膜内の血管造影に適することが示された。しかし、極微小な血管網の抽出には課題 が残ることが判明した。

②微細血管造影法の開発。血管の造影に適した造影法の検討のため、二酸化チタンの検討を行った。マウスの左心室より二酸化チタンを大動脈にペリスタポンプで灌流し動脈を主体とする血管造影を行った。造影剤の担体を検討したところ、メチルセルロースおよびグリセリンが有効であった。造影剤の凝集が問題となったので分散剤を併用した。0.5%メチルセルロース/5%二酸化チタン、あるいは 50%グリセリン/3%二酸化チタンという組成の造影液の灌流により直径 10 µmの血管の造影に成功した。これは最も小さい細動脈の直径に匹敵することから、本法により「抵抗血管」とよばれる血圧をコントロールする血管の動向を探ることが可能となった。さらに、結節性動脈周囲炎、播種性血管内凝固症候群、バージャー病など細動脈に変化が現れる病変を小動物で再現し、評価する手法が開発されたと考えられる。

3)ビワマス筋肉内の脂肪分布・含有率の測定技術の確立とその応用。ビワマスなど脂の乗りが高く評価される 食用動物では筋肉に入り込んだ脂肪組織の比率の評価が重要となる。しかしながら、現在までにこの比率を評 価する方法は確立されていない。また、ウシでは筋肉内にいつ脂肪が入るのか分かっているため、その時期に 脂肪が入りやすい肥育用飼料に切り替え効率よく肥育管理が行われているが、ビワマスではいつ筋肉内に脂 肪が入るのかは明らかにされていない。CT は、X線の吸収量が組織の種類により異なることを利用して生体内 部の3次元構造を非侵襲的に可視化する技術であり、脂肪のX線吸収値(CT 値)は筋肉組織より低いことを利 用して、CT によるビワマス筋肉組織中の脂肪含有量の測定を検討した。

①脂肪含有量比率の測定法の確立。*初めにビワマスより他の組織が混じらないように摘出した筋肉および脂肪組織を用いてこれまで知られていなかったビワマスの筋肉および脂肪組織の CT 値を決定した。次に、これらの CT 値を基に筋組織内脂肪含有値を測定した。同時に生化学的手法である Bligh&Dyer 法(BD 法)による脂肪含有値を測定し、CT による測定値との比較を行った。魚類の脂は頭部、中央部、尾部の順に多く、背側より腹側で多いが、CT の解析結果はこの傾向に一致した。BD 法では、体長 300mm 以上ではこの傾向に一致しない個体が認められる上に測定値のばらつきが大きく、ビワマス個体の脂肪含有量定量にはX線 CT 法が BD 法より有用であることを示した。さらに、電気抵抗値を利用して CT よりも簡便かつ安価に魚類の脂肪率の測定が可能である Fish Analyzer 法との比較を行ったところ、本法は CT で得られたビワマスの脂肪含有量との相関がある結果が得られず、ビワマスには適用できないことを明らかにした。

②筋肉内に脂が入る時期の測定法の確立。*養殖ビワマスの効率の良い肥育管理を目的として筋組織の CT2 値化画像による観察で筋肉内に脂が入る時期を検討し、体重 250 g で筋間に脂が入り出すことを認めた。さら に、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである転写因子 PPAR γ のアゴニスト活性を有する醤油油飼料を

法人番号	251002	
プロジェクト番号	S1201037	

体重約350gに給与しても筋内に脂は入らず、内臓に脂肪が蓄積することを認め、ビワマスにおいては、皮下脂 防一内臓脂肪-筋間脂肪-筋肉内脂肪の順で脂肪が入り、ウシやブタで言われている内臓脂肪-筋間脂肪 一皮下脂肪-筋肉内脂肪という順とは異なることが示された。この結果より、今後は体重約550g、体長約370 mmまでは、通常のニジマス用飼料を与え、その後醤油油等のPPARアアゴニストを含む飼料に切り替えて与え ることで、内臓脂肪量をできるだけ抑えいラスの部分にのみ脂の乗る効率の良い肥育管理が可能であることが 明らかとなった。現在、これらの知見をもとに醤油油等のPPARアアゴニストを含む飼料の開発中であり、本研 究により確立された CT による脂肪量および分布測定法を用いて、飼料の有用性を確認する。

<優れた成果が上がった点>

テーマ1「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」

1) 腸粘膜における IgA の分布のイメージング。腸内細菌に反応し強い結合力を持つモノクローナル IgA 抗体 (W27 抗体)を作製し、それを腸炎自然発症マウスへ経口投与することによって腸炎の改善がみられたことは、 将来、ヒトにおける潰瘍性大腸炎などの腸疾患の治療につながる重要な研究結果といえる。また、W27 抗体が 腸内細菌表面に結合している様子を今回開発した免疫走査電顕法を用いてイメージング化することができ、腸 管分泌型 IgA がどのように腸内細菌を認識し、制御しているかを明らかにすることが可能になった。さらに、ま た、コマーシャルで入手可能な金標識抗体では EDX による評価が困難であったが、金標識を試料上で成長させ て金元素を同定する方向を確立し、これまで不可能であった同標識の EDX 分析法を確立した。本法は様々なタ ンパク質分子の分布の可視化を可能にする有用な技術である。

2)低真空クライオ走査電顕法。本法によって、琵琶湖のカビ臭の原因となる藍藻の形態学的解析を行い、含有 色素の異なる2株が違う種に属することを示すことができた。このことは、リボソーム RNA の解析からも追認さ れている。この知見は、近畿圏の上水道の管理においても重要なものとなる。

3)セリウム塩法による活性酸素発生のイメージング。活性酸素の発生部位を細胞レベル、サブオルガネラレベルおよび個体・組織レベルで調べることができる系を確立した。今回セリウム塩法によってイメージングした過酸化水素は生体に大きな影響を及ぼすが短寿命な分子であり、その分布の微細評価を可能にした本技術の確立は重要な成果と言える。

4)CT 血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発。X線 CT(テーマ3)法に対応させることが出来る SEM 用樹脂の適用条件を開発した。これらにより、両技術の組み合わせによる階層的測定法の確立に成功した。これは血管の構造及び機能の新規の評価を可能にする重要な成果である。

テーマ2「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」

1) 蛍光タンパク質を用いた特定タンパク質の組織・個体レベルにおける空間的イメージング。GFP 発現植物病 原性細菌の植物内における経時的分布変化モニタリング系を確立し、病斑の形成と菌株の増加は時空間的に 一致することを明らかにした。この知見は病原菌の時空的拡大と病態形成の関連をイメージングにより解明す る優れた知見である。がん化細胞のマウス皮膚下における増殖の経時的モニタリング系の確立では、GFP 標 識やプロテアーゼ蛍光発色基質によって、がん細胞がどのように広がっていくのかをリアルタイムで観察するこ とが可能になり、がん研究の進展に大きく貢献できる。その応用として新規がん遺伝子 dynAP 導入細胞により 形成された腫瘍の特徴を明らかにすることに成功した。dynAP は新規に見いだされたがん遺伝子で、ヒト腫瘍に も広く発現が確認されていることから、この知見は将来がんの治療にも貢献できると考えらえる。また、生体イメ ージング装置による血管のイメージングは走査電顕(テーマ1)および X 線 CT(テーマ3)の技術を補完する技術 である。

3)個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージング。大腸菌を用いた BiFC 法によるタンパク質間相 互作用の新しいイメージング系の確立が特に優れた研究成果といえる。本方法の開発によって、酵素−基質反応のような一過的な相互作用を個体レベルで解析することが可能になった。今後、様々なタンパク質相互作用研究においてブレークスルーをもたらすと考えられる。

テーマ3「X 線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」

1)サブトラクション法により組織構造の変化を解析するシステムの開発では、3次元構築した CT 画像を任意の 方向から薄切する技法を確立し、経時的な微細骨形態変化をサブトラクション法により解析することに成功した。この手法は、CT 画像の経時的変化を計測する新規の基盤技術となる。

2)造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上では、眼球脈絡膜の血管の微細構造の イメージ化に適する2種の血管鋳型の作製を可能にする樹脂の使用条件の開発に成功した。このうち Microfil はX線 CT とともに走査電顕でのイメージング(テーマ1)にも対応させることが出来、両技術の階層的な利用を 可能にする成果である。二酸化チタンは安価で高解像度の微小血管造影が得られる有望な造影剤である。
3)ビワマス筋肉内の脂肪分布・含有率の測定技術の確立とその応用においては、CT を用いたビワマスの個体 レベルの脂肪比率および筋内脂肪量の新規の信頼度の高い測定法が確立された。これまでの方法は一部の 組織の脂肪量の定量にとどまり、個体レベルの評価は不可能であった。本法は個体レベルの評価を可能にした

法人番号	251002	
プロジェクト番号	S1201037	

実用性の高い優れた方法である。この方法をもとに、ビワマスの効率の良い肥育管理が可能となる飼料の開発 中である。また、これらの成果によりCTイメージングの活用法が大きく広がった。

<課題となった点>

本プロジェクトの研究代表者であった山本章嗣先生が研究期間途中で逝去されたため、研究の遂行に著しい影響が出かねない状況であった。そのため、中間報告書に対する講評への対応(3テーマの統一的な研究の展開)が遅れ、十分な成果を得られなかった。しかし、個々の研究においては、研究者の相互の協力により、効果的な遂行が継続され、成果を得ることが出来た。

テーマ1「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」では、既存の金粒子増強法が EDX の評価と空間分布イメージングには不十分であり、新規の金粒子増強法の開発に迫られた。多くの時間を 費やして本法の確立に成功したものの、目的である腸内 IgA のイメージングが今後の課題として残された。

テーマ2「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」では既 存の蛍光タンパク質でイメージングに必要な強度の蛍光が得られないことが明らかとなり、当初計画していた 種々のタンパク質のイメージング法の確立に至らなかった。

テーマ3「X 線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」では、造影剤の開発において技術的 に困難な点が数多く表面化したものの、担当の研究者間の話し合いにより新規の技術の開発につなげることが 出来た。

<自己評価の実施結果と対応状況>

2012 年 8 月 9 日 (木曜日)15:00-17:00 に長浜バイオ大学命江館 1 階小会議室にてキックオフミーティングを、 2014 年 9 月 8 日 (月曜日)16:50-18:20 に長浜バイオ大学命江館 1 階小会議室にて中間報告会を、2017 年 4 月 20 日 (火曜日)19:00-19:30 に成果報告に関する連絡会を開催した。また、逐次、研究者間でお互いに現状 を報告し、問題点を指摘し、議論することによって、満足できる方向に研究を進めた。

<外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

滋賀医科大学・神経難病研究センター・センター長の遠山育夫教授に本プロジェクトの研究成果について外部 からの評価を依頼し、別添のような評価を得ている(添付書類1、添付書類2)。

<研究期間終了後の展望>

テーマ1「走査電顕による個体レベルの分子イメージング技術の開発」

本研究により確立した、標識抗体を用いた細胞表面のタンパク質の空間分布のイメージングとEDX 解析の手法 は汎用性が高く、今後様々な細胞表面タンパク質の空間分布の解析を行う予定である。

血管の造影はテーマ2およびテーマ3で確立された技術と併せて、色素細胞欠損マウスの血管の特徴の研 究をさらに進める予定である。

テーマ2「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」

植物における細菌の感染プロセスのイメージングに成功したことから、感染に伴う植物の免疫反応誘導のイメージングおよびその制御メカニズムの研究を進める予定である。

本研究で確立した血管、プロテアーゼ活性、活性酸素のイメージング法を用いて、脳梗塞に伴う血管機能の 変化に伴うプロテアーゼ活性の誘導メカニズム、および血管透過性に伴う性酸素発生のメカニズムを明らかに する研究を進める予定である。

テーマ3「X線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」

本研究により確立した Microfil による極微小血管造影法と Mercox による脈管系鋳型作製法の併用により、X 線 CT と走査電顕の階層的な研究の展開が可能となった。さらに生体イメージング装置によるイメージングにより血 管透過性等の機能的な造影が可能となり、形態と機能の関連を検討する研究を展開する。

また、二酸化チタンによる細動脈より細い血管の造影技術を結節性動脈周囲炎、播種性血管内凝固症候群、 バージャー病の動物病態モデルに用いて、それらの病態形成メカニズムの解明を試みる。

さらに、確立した魚類の脂肪計測法を用いて、ビワマスの効率の良い肥育管理が可能となる飼料の開発を行う。

<研究成果の副次的効果>

テーマ1「走査電顕による個体レベルの分子イメージング技術の開発」

本テーマにおいて作製された IgA 抗体は、特許(用途、潰瘍性大腸炎治療薬など)を取得し、現在民間企業との 創薬共同研究中である。カビ臭産生藍藻の形態学的分類は、水処理学生物学会誌、論文賞を受賞した。本研

法人番号	251002	
プロジェクト番号	S1201037	

究は関西医科大学、立命館大学、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターとの共同研究として進展している。 テーマ2「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」 本研究で確立した、大腸菌を用いた BiFC 法は、タンパク質間相互作用の新しいイメージング系の実用化への 道を開いた。論文発表の関係で、特許の取得には至っていないが、本法を用いたモニタリング系の使用申し込 みがいくつかの大学から来ており、共同研究の体制が整った。また、がん化細胞のマウス皮膚下における増殖 の経時的モニタリング系の確立の副次的効果として、がん組織のリモデリング、血管新生、転移浸潤に寄与す るMMPなどのプロテアーゼ活性の分布を明らかにする手法が確立され、新規断遺伝子のdynAPの誘導するが んの特徴の解析につながった。本遺伝子はいくつかのヒトのガンで発現上昇が確認されており、癌治療の新規 ターゲットとなる可能性がある。

テーマ3「X 線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」

CTイメージングによる血管の解析により、色素細胞欠損マウスでは野生型マウスに比べ眼球脈絡および皮膚 脈管系の発達が不全であり、これまで知られていなかった脈管形成における色素細胞の重要性が明らかとなっ た。ビワマスの脂肪組織比率の信頼度の高い測定法の確立により、ビワマスの脂肪の乗りを高める食餌の開 発が可能となった。現在この食餌の有効性の確認を、本測定法を用いて進行中である。また、本測定法は多く の魚類に応用が可能であり、養殖漁業における応用が期待できる。

- 12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してくださ い。)
 - (1) 走査電顕
 - (4) 蛍光イメージング
 - (7) BiFC 法
- (2) 生体イメージング装置(3) X線CT (5) 免疫金法 (8) 血管

 - (6) IgA
- 13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。) 上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには*を付すこと。

<雑誌論文>

山本章嗣

- 1) Ole1, fatty acid desaturase, is required for Atg9 delivery and isolation membrane expansion during autophagy in Saccharomyces cerevisiae. Ogasawara Y, Kira S, Mukai Y, Noda T, Yamamoto A. Biol Open. 2017 Jan 15:6(1):35-40. 査読有
- Ehrlichia secretes Etf-1 to induce autophagy and capture nutrients for its growth through RAB5 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. Lin M, Liu H, Xiong Q, Niu H, Cheng Z, Yamamoto A, Rikihisa Y. Autophagy. 2016 Nov;12(11):2145-2166. 査読有
- 3) The Ankrd13 Family of Ubiquitin-interacting Motif-bearing Proteins Regulates Valosin-containing Protein/p97 Protein-mediated Lysosomal Trafficking of Caveolin 1. Burana D, Yoshihara H, Tanno H, Yamamoto A, Saeki Y, Tanaka K, Komada M. J Biol Chem. 2016 Mar 18:291(12):6218-31. 査読有
- 4) The drs tumor suppressor regulates glucose metabolism via lactate dehydrogenase-B. Tambe Y. Hasebe M. Kim CJ, Yamamoto A, Inoue H. Mol Carcinog. 2016 Jan;55(1):52-63. 査読有
- γ-SNAP stimulates disassembly of endosomal SNARE complexes and regulates endocytic trafficking pathways. Inoue H, Matsuzaki Y, Tanaka A, Hosoi K, Ichimura K, Arasaki K, Wakana Y, Asano K, Tanaka M, Okuzaki D, Yamamoto A, Tani K, Tagaya M. J Cell Sci. 2015 Aug 1;128(15):2781-94. 査読有
- 6) GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. Ishida R, Yamamoto A, Nakayama K, Sohda M, Misumi Y, Yasunaga T, Nakamura N. FEBS J. 2015 Jun;282(11):2232-44. 査読有
- 7) Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. Soonthornsit J, Yamaguchi Y, Tamura D, Ishida R, Nakakoji Y, Osako S, Yamamoto A, Nakamura N. Exp Cell Res. 2014 Nov 1:328(2):325-39. 査読有
- Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Uneyama H, Takayanagi R, Yamamoto A. Omote H. Nomura M. Moriyama Y. Sci Rep. 2014 Oct 21:4:6689. 査読有
- Stearoyl-CoA desaturase 1 activity is required for autophagosome formation. Ogasawara Y, Itakura E, Kono N, Mizushima N, Arai H, Nara A, Mizukami T, Yamamoto A. J Biol Chem. 2014 Aug

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

22;289(34):23938-50. 査読有

- Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. Physiol Rep. 2014 Jun 6;2(6). pii: e12034. 査読有
- *11) 琵琶湖産の糸状カビ臭産生藍藻 Phormidium tenueの細胞内微細構造観察:軟X線顕微鏡と透過型電子 顕微鏡および低真空クライオ走査型電子顕微鏡を用いた比較観察。竹本邦子、山本章嗣、水田鋼、一瀬 諭、吉村真史、難波秀利、木原裕。日本水処理生物学会誌 48,157-163,2012. 査読有

新戴礼子

*1) Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. Nat Microbiol. 2016 1(9):16103. 查読有

蔡晃植

- Frameshift Mutation Confers Function as Virulence Factor to Leucine-Rich Repeat Protein from Acidovorax avenae. Kondo M, Hirai H, Furukawa T, Yoshida Y, Suzuki A, Kawaguchi T, Che FS. Front Plant Sci. 4, 7, 1988. 2017. 査読有
- IREN, a novel EF-hand motif-containing nuclease, functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice. Ootsubo Y, Hibino T, Wakazono T, Mukai Y, Che FS. Biosci Biotechnol Biochem., 80(4), 748-60, 2016. 査読有
- *3) BiFCを基盤とした大腸菌を用いた新規相互作用検定法。神村麻友、蔡晃植。植物の生長調節51, 1, 52-55, 2016年
- CD2-1, the C-Terminal Region of Flagellin, Modulates the Induction of Immune Responses in Rice. Katsuragi Y, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T, Che FS. Mol Plant Microbe Interact., 28(6)648-58, 2015 査読有
- *5) Identification of interacting proteins for calcium dependent protein kinase 8 by a novel screening system based on bimolecular fluorescence complementation. Kamimura, M., Han, Y., Kito, N. Che, F. S. Biosci, Biotech. Biochem., 78, 438-447, 2014. 査読有
- Glycan moiety of flagellin in Acidovorax avenae K1 prevents the recognition by rice that causes the induction of immune responses. Hirai H, Takai R, Kondo M, Furukawa T, Hishiki T, Takayama S, Che FS. Plant Signal Behav., 9,11, 2014. 査読有
- 7) Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and Arabidopsis. Furukawa, T., Inagaki, H., Takai, R., Hirai, H., Che, F. S. Mol. Plant Microb. Interact., 27,113-124, 2014. 査読有

野村慎太郎

- Sputum Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein as a Marker of Airway Inflammation in Asthma.Honda H, Fujimoto M, Miyamoto S, Ishikawa N, Serada S, Hattori N, Nomura S, Kohno N, Yokoyama A, Naka T. PLoS One. 11:e0162672 (2016). 査読有
- 2) Human Dynactin-associated protein transforms NIH3T3 cells to generate highly vascularized tumors with weak cell-cell interaction. Kunoh T, Wang W, Kobayashi H, Tog Y, Tokuyama M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, Nagai N, Nakamura T, Nomura S, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T. PLos One. 10: e1035836 (2015). 査読 有
- CTLA4-Ig suppresses development of experimental autoimmune uveitis in the induction and effector phases: comparison with blockade of interleukin-6. Iwaashi C, Fujimoto M, Nomura S, Serada S, Nakai K, Ohguro N, Nishida K, Naka T. Exp Eye Res. 140:53-64. (2015). 査読有
- 4) Leucine-rich α-2-glycoprotein promotes TGF β 1-mediated growth suppression in the Lewis lung carcinoma cell lines. Takemoto N, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Ohkawara T, Takahashi T, Nomura S, Inohara H, Naka T. Oncotarget. 10:11009-22. (2015). 査読有
- Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modificating the Melanoma Microenvironment. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, Naka T. Pigment Cell Melanoma Res. 27:630-9. (2014). 査読有
- 6) Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells. Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, Iwahori K, Tachibana I, Takahashi T, Kumanogoh A, Kishimoto T, Naka T. Cancer Sci. 104:1483-91. (2013). 査読有
- 7) Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Ripley B, Nomura S, Mizuguchi H, Shimada K, Takahashi T, Kawase I,

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

Kishimoto T, Naka T. SOCS-1 gene delivery cooperates with cisplatin plus pemetrexed to exhibit preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. Int J Cancer. 132, 459-71. (2013). 査読有

 Chean T, Konnno T, Egashira M, Bai R, Nmoura N, Nomura S, Sakurai T, Imakawa K. Estrogen-dependent uterine secretion of osteopontin activates blastocyst. adhesion competence. PLoS One 7(11), e48933. (2012). 査読有

山本博章

- Melanocytes support the vasculature of the choroid. Shibuya, H., Watanabe, R., Maeno, A., Ichimura, K., Tamura, M., Wakana, S., Shiroishi, T., Ohba, K., Takeda, K., Shibahara, S. and Yamamoto, H. (submitted)
- Microphthalmia-associated transcription factor ensures the elongation of axons and dendrites in the mouse frontal cortex. Ohba, K., Takeda, K., Furuse, T., Suzuki, T., Wakana, S., Suzuki, T., Yamamoto, H. and Shibahara, S. Genes Cells 21, 1365-1379, 2016. 査読有
- Regional Fluctuation in the Functional Consequence of LINE-1 Insertion in the Mitf Gene: The Black Spotting Phenotype Arisen from the Mitfmi-bw Mouse Lacking Melanocytes. Takeda K, Hozumi H, Ohba K., Yamamoto H, Shibahara S. PLoS One 11(3), e0150228 (23 pages), 2016. 査読有
- Microphthalmia-associated transcription factor is expressed in projection neurons of the mouse olfactory bulb. Ohba K, Takeda K, Yamamoto H, Shibahara S. Genes Cells. 20(12), 1088-1102, 2015. 査読有
- 5) Insertion of long interspersed element-1 in the Mitf gene is associated with altered neurobehavior of the black-eyed white Mitf(mi-bw) mouse. Genes Cells. 19, 126-140, 2014. 査読有
- 6) A subpopulation of smooth muscle cells, derived from melanocyte-competent precursors, prevents patent ductus arteriosus. Yajima, I., Colombo, S., Puig, I., Champeval, D., Kumasaka, M., Belloir, E., Bonaventure, J., Mark, M., Yamamoto, H., Taketo, M. M., Choquet, P., Etchevers, H. C., Beermann, F., Delmas, V., Monassier, L. and Larue, L. PLOS ONE 8(1), e53183 (13 pages), 2013. 査読有
- 7) Otx2 is involved in the regional specification of the developing retinal pigment epithelium by preventing the expression of Sox2 and Fgf8, factors that induce neural retina differentiation. Nishihara, D., Yajima, I., Tabata, H., Nakai, M., Tsukiji, N., Katahira, T., Takeda, K., Shibahara, S., Nakamura, H. and Yamamoto, H. PLOS ONE 7 (11), e48879 (12 pages), 2012. 査読有
- Impaired development of melanoblasts in the black-eyed white Mitfmi-bw mouse, a model for auditory-pigmentary disorders. Hozumi, H, Takeda, K., Yoshida-Amano, Y., Takemoto, Y, Kusumi, R, Urara Fukuzaki-Dohi, U., Higashitani, A., Yamamoto, H. and Shibahara, S. Genes to Cells 17, 494~508, 2012. 査 読有

永井信夫

- Suzuki Y, Nagai N, Umemura K. Front Cell Neurosci A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. Front Cell Neurosci. 25:10:2. 2016. 査読有
- Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Muranaka Y, Hokamura K, Umemura K. Recombinant tissue-type plasminogen activator transiently enhances blood-brain barrier permeability during cerebral ischemia through vascular endothelial growth factor-mediated endothelial endocytosis in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 35: 2021-31. 2015. 査読有
- *3) Kunoh T, Wang W, Kobayashi H, Matsuzaki D, Togo Y, Tokuyama M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, Nagai N, Nakamura T, Nomura S, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T. Human Dynactin-Associated Protein Transforms NIH3T3 Cells to Generate Highly Vascularized Tumors with Weak Cell-Cell Interaction. PLoS One. 10: e0135836. 2015. 査読有
- 4) Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhisa T, Matsuo O. Lack of both α2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. Life Sci. 93:89-95. 2013. 査読有

河内浩行

- *1) <u>4',6-dimethoxyisoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist that stimulates adipocyte differentiation. M Sanada, R Hayashi, Y Imai, F Nakamura, T Inoue, S Ohta and H Kawachi Animal Science Journal. 86, 1347 頁~1351 頁 2016 年 11 月 1日 査読有</u>
- *2) Effects of dietary soy sauce oil supplementation on growth performance and sensory characteristics of Biwa salmon Oncorhynchus S Sugiura, Y Tonoyama, H Kawachi, M Tsukada, G Oka, Y Imai, M Sanada, Y Shimizu, T Kawase, N Hori and N Shimizu. Aquaculture Science. 63, 291 頁~297 頁 2015 年 9 月 1 日査 読有

法人番号	251002	
プロジェクト番号	S1201037	

- Bmp4 expressed in preadipocytes is required for the onset of adipocyte differentiation. M Suenaga, N Kurosawa, H Asano, Y Kanamori, T Umemoto, H Yoshida, M Murakami, H Kawachi, T Matsui and M Funaba Cytokine. 64, 138 頁~145 頁 2013 年 8 月 1 日 査読有
- *4) ノダフジ(Wisteria floribunda)種子に含まれる抗糖尿病因子の探索 井上朋世・菊永竜太郎・山田敬博・太田伸二・河内浩行 微量栄養素研究. 29, 36 頁~40 頁 2012 年 12 月 1 日 査読有

<図書>

山本章嗣

- *1) Yamamoto A, Masaki R. Pre-embedding Nanogold Silver and Gold Intensification. in High-Resolution Imaging of Cellular Proteins, Methods Mol Biol. 2016;1474:269-7
- 2)オートファジー 生命を支える細胞の自己分解システム 水島昇、吉森保編、電子顕微鏡を用いたオート ファジー解析。山本章嗣、西野-林美都子、小笠原裕太。187-200、化学同人、京都、230ページ 2012年

野村慎太郎

1) マウス解剖イラストレイテッド、1-105 頁、秀潤社、2013 年

山本博章

- 皮膚以外に存在するメラノサイトの機能。 矢嶋伊知朗、大神信孝、山本博章、加藤昌志 色素細胞第 2 版-基礎から臨床へ―(伊藤祥輔、柴原茂樹、錦織千佳子 監修 慶応大学出版会) pp223-235、2015.
- 2) ネズミの毛色発現に関与する遺伝子。庫本高志、山本博章 色素細胞第2版-基礎から臨床へ―(伊藤 祥輔、柴原茂樹、錦織千佳子 監修 慶応大学出版会) pp71-86、2015.
- 3) 色素細胞の多様な機能発現について。山本博章 Fragrance Journal 11、37-40, 2012.

永井信夫

- 1) バイオテクノロジー入門、建帛社、1-157 頁、2016 年
- マウス解剖イラストレイテッド、1-105 頁、秀潤社、2013 年

河内浩行

- 1) バイオテクノロジー入門 建帛社 1-157 頁 2016 年
- 2) ペット栄養管理学テキストブック アドスリー 44 頁~55 頁 2013 年

<学会発表>

山木章嗣

- *1) Microscopy methods applied to research on musty odor producing filamentous cyanobacteria. Takemoto K, Yoshimura M, Yamamoto A, Ichise S, Namba H, Kihara H. 第 12 回 X 線顕微鏡国際会議 (XRM2014)、メル ボルン、2014 年
- *2) <u>Phormidium tenue とされている琵琶湖産糸状藍藻の微細構造観察</u> XM, TEM, 低真空クライオ SEM IC <u>る — 竹本邦子</u>, 山本章嗣, 一瀬 論、吉村真史, 塩野正道, 西村雅子, 水田 剛, 難波秀利, 木原 裕。 第50回日本水処理生物学会、神戸、2013 年

新戴礼子

- 1) 腸内細菌制御における腸管 IgA 抗体体細胞突然変異の役割。新蔵礼子。第18回腸内細菌学会、特別講演(招待講演)2014年。
- 2) 腸管 IgA 抗体は多種類の腸内細菌の同一タンパク質を認識し制御している。臼井文人、岡井晋作、長谷 川慎、山本和也、西山依里、森宙史、山田拓司、黒川顕、新蔵礼子。第37回日本分子生物学会、パシフィ コ横浜 2014年。
- *3) 腸炎モデルマウスに対する腸管IgA抗体の作用機序の解明。同井晋作、臼井文人、野村慎太郎、中村肇 伸、山本和也、西山依里、森宙史、山田拓司、黒川顕、加藤保、大野博司、新蔵礼子。第37回日本分子生 物学会、パシフィコ横浜 2014 年。
- *4) Oral administration of dimeric monoclonal IgA antibody as a candidate therapeutic approach for spontaneous colitis in mice. Shinkura R. 第22回日本消化器関連学会週間(招待講演)神戸国際展示場 2014 年。
- *5) Oral administration of poly-reactive high-affinity IgA monoclonal antibody against intestinal microbiota improved inflammatory colitis in mice (invited). Okai S., Horii Y, Shiraki,Y, Matsumoto S, Naitoh, T, Nanno M, Nomura S, Shinkura R.13th International Congress of Immunology, Milan, Italy, 2013

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

- Monoclonal intestinal IgAs are poly-reactive against commensal bacteria but recognize a single protein expressed by multiple bacteria. Usui F, Shinsaku Okai, Hasegawa M, Shinkura R. 13th International Congress of Immunology, Milan, Italy, 2013
- *7) Oral administration of poly-reactive high-affinity IgA monoclonal antibody against intestinal microbiota improved inflammatory colitis in mice.. Okai S., Horii Y, Shiraki,Y, Matsumoto S, Naitoh, T, Nanno M, Nomura S, Kurokawa K, Yamamoto K, Mori,H, Yamada T, Shinkura R. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張、2013.
- Monoclonal intestinal IgAs are poly-reactive against commensal bacteria but recognize a single protein expressed by multiple bacteria. Usui F, Shinsaku Okai, Hasegawa M, Shinkura R. 第42回日本免疫学会学 術集会、幕張、2013.

蔡晃植

- イネとシロイヌナズナに存在する異なるフラジェリン認識機構のキメラ受容体を用いた分子解析。片山貴 等、村上貴彦、河合美咲、高井亮太、蔡晃植。農芸化学会2016年度大会、北海道、2016年
- 2) イネの Ca^{3*}依存性エンドヌクレアーゼである IREN は過敏感細胞死において認められる DNA 断片化の実行 因子である。若園貴仁、大坪由佳、日比野孝紀、向由起夫、蔡見植。日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年
- 3) イネの病害抵抗性に関与する PR7 と PR8 遺伝子の転写を制御する新規 NAC 転写因子の同定。奥山愛 梨、平井洋行、宇野雄太、寺沢勇治、堀家史哉、久保健一、仲下英雄、蔡晃植。第 38 回日本分子生物学 会、神戸、2015 年
- *4) Ca² 依存性プロテインキナーゼ 8 を介したイネの病原菌認識情報伝達機構。鬼頭信貴、上坂有矢、韓宇 龍、神村麻友、蔡晃植、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年
- 5) カルシウム依存性プロテインキナーゼ 12 を介したイネの病原菌認識情報伝達機構。神村麻友、韓宇龍、 鬼頭信貴、蔡晃植。第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年
- 6) イネにおける植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの受容とその情報伝達機構の解析。桂木雄也、 小栗章成、森本匠、片山貴等、村上貴彦、高井亮太、蔡晃植。第55回日本植物生理学会年会、富山、 2014年
- 7) イネにおける植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの受容機構解析。桂木雄也、小栗章成、森本 匠、片山貴等、村上貴彦、高井亮太、蔡晃植。第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年
- 8) Ca^{2*}依存性プロテインキナーゼ 12 を介したイネの病原菌認識情報伝達機構。神村麻友、韓宇龍、千坂麻美、鬼頭信貴、黎芷瑜、蔡 晃植。第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年
- 9) イネにおける鞭毛タンパク質フラジェリン認識後の情報伝達機構の解析。桂木雄也、小栗章成、森本匠、 高井亮太、蔡 晃植。第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年
- *10) Ca²依存性プロテインキナーゼ8を介した病原菌認識情報の伝達機構。神村麻友、韓 宇龍、上坂有矢、蔡 晃植。第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年
- イネ過敏感細胞死誘導における転写因子OsNAC3の役割。大坪由佳、青木友里、四井翔太、蔡 晃植。第 54回日本植物生理学会年会。岡山、2013年
- 12)植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンのイネにおける認識と免疫反応誘導機構。桂木雄也、小栗章 成、森本匠、高井亮太、蔡晃植。第35回日本分子生物学会、福岡、2012年
- 13) イネの免疫反応を誘導する病原細菌由来タンパク質の同定とその認識機構。古川岳人、平井洋行、近藤 真千子、蔡晃植。第35回日本分子生物学会、福岡、2012年
- 14)植物免疫反応である活性酸素発生のCa2+依存性プロテインキナーゼによる制御機構。神村麻友、韓宇龍、千坂麻美、蔡晃植。第35回日本分子生物学会、福岡、2012年

山本博章

- *1) マウス Mitf 変異体を用いた眼球脈絡膜構造の解析。 澁谷仁寿、市村薫、前野哲輝、上田明弘、田村勝、 若菜茂晴、城石俊彦、山本章嗣、山本博章 2016/09/07-2016/09/09 日本遺伝学会第 88 回大会 日本 大学国際関係学部(三島)
- *2) メラノサイトが関わる蝸牛血管条形成過程の発生遺伝学的解析。 澁谷仁寿、渡辺隆太郎、前野哲輝、田 村勝、若菜茂晴、城石俊彦、山本博章 2015/09/24-2015/09/26 日本遺伝学会第 87 回大会 東北大学
- *3) 眼球と内耳メラノサイトハビタットにおける血管構造の解析。 溢谷仁寿 山本博章 2014/9/17~9/19 日 本遺伝学会第 86 回大会 長浜バイオ大学
- 4) How is regionalization of the chicken developing eye primordium regulated? Tabata, H. and Yamamoto, H. XXII International Pigment Cell Conference (IPCC) Singapore
- *5) Do melanocytes contribute to the structure of their niches? Shibuya, H. and Yamamoto, H. XXII International Pigment Cell Conference, Singapore, 2014.

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

- *6) Functional divergence of mammalian melanocytes. (Invited) Yamamoto, H. XXII International Pigment Cell Conference, Singapore, 2014.
 *7) Functional divergence of mammalian melanin pigment cells (in dimly lit organs) (Invited) Yamamoto, H., Uehara, S. and Shibuya, H. 日本実験動物科学技術さっぽろ 2014.(札幌)
 8) Involvement of Pax6 in the retinal pigment epithelium development. Nishihara, D., Kawasaki-Nishihara, A., Nakamura, H. and Yamamoto, H. 第 24 回日本色素細胞学会学術大会(長浜) 2012 年 11 月 24 日~25 日
 9) 色素細胞の発生と機能発現機構、環境ストレス緩和(招待講演)。山本 博章 日本香粧品学会(東京) 2012 年 6 月 7 日~8 日
 *1) 第 94 回日本生理学会大会、Yasuki Matano, Kumiko Takayama, Ryosuke Ohi, Nobuo Nagai. Reactive oxygen species generation and neural network rearrangement is associated with the increase in vascular permeability after ischemic stroke. 浜松, 2017 年 3 月。
 2) 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、永井 信夫、木村 七海、長谷川 慎. 血管内皮細胞上のプラスミン の新規の基質の同定。奈良、2016 年 6 月。
 3) 第 93 回日本生理学会大会、Yusuke Sakai, Chiemi Omori, Yasuhiro Suzuki, Kazuo Umemura, Nagai Nobuo
 - 3) 第 93 回日本生理字会大会、Yusuke Sakai, Chiemi Omori, Yasuhiro Suzuki, Kazuo Umemura, Nagai Nobuo Role of tissue plasminogen activator/ plasmin system on the functional recovery and histological repair in ischemic stroke in mice. 札幌、2016 年 3 月
 - 4) 第 93 回日本生理学会大会、Nanami Kimura, Makoto Hasegawa, Nobuo Nagai. Identification of novel substrates of plasmin on endothelial cell. 札幌、2016 年 3 月
 - 5) 第 93 回日本生理学会大会、Miyabi Ono, Nobuo Nagai Effect of high-fat diet on alpha・2-antiplasmin knock out mice. 札幌、2016 年 3 月
 - 6)第37回日本血栓止血学会学術集会、酒井祐輔、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫 組織型プラスミノーゲン 活性化因子(tPA)の脳梗塞後の組織学的回復への関与の検討、山梨、2015年5月
 - 7)第92回日本生理学会大会、永井信夫、酒井祐輔、脳梗塞後の修復におけるtPAの関与、神戸、2015年3月
 - 8)第36回日本血栓止血学会学術集会、高島里美、岩前拓志、永井信夫 血管内皮細胞での Tie-1 および Tie-2の発現における tPA の作用 第36回日本血栓止血学会学術集会、大阪、2014年5月
 - 9)第36回日本血栓止血学会学術集会、大森智恵美、高島里美、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫、脳梗塞後の神経機能制御におけるプラスミノーゲンの寄与の検討、大阪、2014年5月
- 10)第36回日本血栓止血学会学術集会、酒井祐輔、森田真弘、大森智恵美、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫、脳梗塞における組織型プラスミノーゲン活性化因子(tPA)による神経機能障害の回復への関与の検討、大阪、2014年5月
- *11) 第 36 回日本血栓止血学会学術集会湯川直人、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫、脳梗塞に伴う傷害部位 周辺での血管透過性の亢進におけるプラスミンの関与、大阪、2014 年 5 月
- 12) 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、木村七海、長谷川慎、永井信夫、血管内皮細胞表面のプラスミンの 基質の検討、大阪、2014 年 5 月
- 13)第90回日本生理学会大会、山田雅香、永井信夫、脳傷害修復プロセスにおける α2アンチプラスミンの役割、東京、2013年3月。

河内浩行

- *1) <u>17th AAAP Animal Science Congress</u> Y Imai, Y Yamada, M Sanada, F Nakamura, T Hayashi, S Ohta, H Kawachi Fractionation and identification of 5-nonadecylresorcinol as an agonist of PPAR γ in soy sauce oil 九州大学 2016 年 8 月 23 日
- *2) アクアゲノム研究会 殿山泰弘、今井良政、塚田匡輝 真田的貴、岡郷平、河内浩行、杉浦省三、堀伸明、 清水淑子、清水信義メダカを用いた脂肪細胞分化に影響を与える物質の評価系の開発 東京海洋大学 2015 年 5 月 30 日
- *3) 第 16 回日本ペット栄養学会大会日本獣医生命科学大学 眞田的貴、鈴木美里、河内浩行 ノダフジ (Wisteria floribunda)種子に含まれる Wistin の抗肥満作用 2014 年 7 月 19 日
- *4) 第14回日本ペット栄養学会大会 ヤマザキ学園大学 山田敬博、井上朋世、太田伸二、河内浩行 醤油 約中に含まれる PPAR y 活性化因子の探索 2012 年 7 月 22 日
- 5) 第29回日本微量栄養素学会学術集会 京都リサーチパーク 菊永竜太郎、井上朋世、山田敬博、太田伸 ニ、河内浩行 ノダフジ(Wisteria floribunda)種子に含まれる抗糖尿病活性物質 2012 年 6 月 2 日

法人番号	251002	
プロジェクト番号	S1201037	

<研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

HP を作成し、報告書の詳細を掲載する。

http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/?p=14635

<これから実施する予定のもの> 該当なし

14 その他の研究成果等

*1) 淡海の宝石ビワマス 市民広報誌「ながはま」8月号 長浜 2014年

*2) ビワマス特集 インターネット放送局 STUDIO こほく 長浜 2014 年

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項> 該当なし

<「選定時」に付された留意事項への対応> 該当なし

<「中間評価時」に付された留意事項>

中間報告の評価の総合所見として、以下の意見を頂いた。

- 1. 個別研究の寄せ集め感があるので、焦点を絞って研究を推進してもらいたい。
- 既存の一般的なイメージング技術を用いた個別研究における成果はありますが、3技術を有機的に組み合わせた観察に関しての展望が見えません。3技術をどのように組み合わせ、対象を何にして、どのような情報を得ることが新規分子イメージング技術となりえるか、対象を絞って道筋を明確化して頂きたいと思います。

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

中間評価に対する総合所見にある「対象を絞って3技術を組み合わせた研究の推進」への対応として、①血管 のイメージングと②活性酸素種のイメージングにおいて統合的な技術の確立を試みた。

①血管イメージングではX線CTによる微小血管造影技術においてMicrofilおよび二酸化チタンを用いた2つの 新規技術の確立に成功した。また、Microfilを用いた血管の走査電顕イメージングにも成功しており、両者の技 術のシームレスで階層が接続可能な技術が確立された。また、生体イメージング装置による血管の機能的差異 のイメージングに成功し、本技術を用いて3つの技術をお互いに補完し研究を遂行することが可能となった。

②活性酸素種のイメージングでは、生体内で発生した過酸化水素をセリウム水酸化物として沈殿させ、セリウム反応物が沈着した細胞を走査型電顕及び透過型電顕で観察する系を確立し、活性酸素種の発生部位を細胞レベルあるいはサブオルガネラレベルで調べることに成功にした。さらに、DHEを用いた生体イメージング装置による個体、組織レベルのイメージング法を確立し、生体における活性酸素種発生の階層的なイメージング法の基盤を確立した。

他の研究テーマについても、多くの研究成果が期待されたため、中間評価後も研究を継続した。

中間評価報告書

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

山本 章嗣 殿

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター

センター長・教授 遠山 育夫

私学戦略研究拠点形成支援事業「個体レベルの新規分子イメージング技術の 開発とその有効性の検証」につきまして、下記の通り中間報告書を作成いたし ましたので、お送り致します。

総括評価 計画どおりの取組であり、順調に成果をあげている。現行の努力 を継続することによって本事業の目的を達成することが期待できる。

評価内容

本プロジェクトは、"個体レベル"の分子イメージング技術を新たに開発し、 その有効性を検証する研究拠点を形成することを目的としている。このため、 1) 走査電子顕微鏡(走査電顕)、2)生体イメージング装置を用いた蛍光・ 発光イメージング、3) X線CT という3つのイメージング技術に重点を置 き、新しい分子イメージング技術の開発と応用を目指す計画である。さらに、 これらの3種の技術および既存の分子イメージング技術を有機的に組み合わせ ることによって、新しい個体生物学の方法論を創出し、長浜バイオ大学で分子 生物学的研究が進められている環境応答などの研究に導入することによって、 この分野の発展を推し進めることを目的としている。

この目的に沿って、全学から実績のある優秀な研究者を結集して研究組織を 立ち上げ、計画通りに研究を進めている。中でも以下の点が、優れた業績とし て評価できる。

走査電子顕微鏡(走査電顕)によるイメージングでは、新しい IgA 抗体(W27 抗体)を作成し、金標識2次抗体と組み合わせ、W27 抗体の腸内細菌への結合 を可視化することに成功した。また、低真空クライオ走査電顕法により、琵琶 湖産のカビ臭産生、藍藻を観察し、カビ臭を発生する緑色のものと産生しない 褐色のものとの微細構造の違いを明らかにしたことも評価できる。 生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光法の開発では、植物病原細菌 の感染後の変化の蛍光観察、腫瘍細胞の増殖のモニタリング法の開発、力学的 応用遺伝子の蛍光観察、タンパク質問相互作用の新しいイメージング系など、 新しい蛍光・発光イメージングシステムを開発している。

X線 CT では、立体構築したCT画像を任意の方向から薄切する技術を確立 し、微細骨形態変化をサブトラクション法により解析することに成功した に成 功した。また、眼球脈絡膜結果の微細構造のイメージングやビワマスの個体レ ベルの脂肪組織比率の測定で成果をあげている。

イメージングの研究成果は、免疫、腫瘍、環境など、周辺分野を巻き込んだ 研究に発展しており、波及効果も認められる。

今後の課題としては、これらの成果を積極的に論文発表していくことが望ま れる。また、イメージングの研究拠点として、学内外の研究者との間で活発な 共同研究を更に展開されることを期待する。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業外部評価 最終評価報告書

課題番号	\$1201037
研究課題名	個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証
研究代表者	永井信夫(バイオサイエンス学部・教授)
研究期間	平成24年度~平成28年度
研究概要	本プロジェクトは、"個体レベル"の分子イメージング技術を新たに開発し、その有効性を検証する研究拠点を形成すること を目的としている。このため、1) 走査電子顕微鏡法、2) 生体イメージング装置を用いた蛍光・発光イメージング、3) X線CT の3技術を用いた新規分子イメージング技術を重点的に開発し、その技術を確立する。さらに、これら3種の技術および既存 の分子イメージング技術を有機的に組み合わせることによって、新しい個体生物学の方法論を創出し、本学で分子生物学 的研究が進められている環境応答などの研究に導入することによって、この分野の発展を推し進めるとともに、その有効性 を検証することを目的としている。
	テーマ1「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」では、免疫金法を用いて走査電顕下で特定タンパク分子の分布を画像化する技術を開発し、講點膜におけるIgAや植物細胞壁、細胞膜におけるタンパク質の分布のイメージングを行う。走査電顕によるセリウム塩法による活性酸素発生のイメージングやCT血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発も行う。
	テーマ2「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」では、生体イメージン グ装置を用いた組織・個体レベルでの新しいイメージング技術を確立する。このため、1)蛍光タンパク質を用いた特定タン パク質の組織・個体レベルにおける空間的イメージング、2)個体レベルでの新たな遺伝子発現イメージング、3)個体レベル での時空間的タンパク質相互作用イメージングを開発する。
	テーマ3「X線CTイメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」では、1)サプトラクション法により組織構造の変化を 解析するシステムの開発、2)造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上、3)筋肉内の脂肪分布・ 含有率の測定技術の確立を行う。
外部評価委員	温賀医科大学・神経難病研究センター センター長・教授 遠山 育夫

評価項目	親点	偶別評価		コメント	
研究プロジェクト の目的・意義及び 計画の概要	研究ブロジェクトの当初の 目的・意義をどの程度達 成しているか。	A 大いに達成している	в	本プロジェクトは、"個体レベル"の分子イメージング技 術を新たに開発し、その有効性を検証する研究拠点を 形成することを目的としている。このため、1) 走査電子 顕微鏡法、2) 生体イメージング装置を用いた蛍光・発 光イメージング、3) X線CTの3技術を用いた新規分子 イメージング技術を重点的に開発することと、これら3 種の技術および既存分子イメージングを有機的に組み 合わせることで、新しい個体生物学の方法論を創出す ることを目的としている。3技術それぞれにおいて、優 れた新規分子イメージング技術を開発している点は高 く評価できる。一方で、3種の技術を組み合わせた新し い個体生物学の方法論の創出は、血管造影CTと走査 電子顕微鏡法の組み合わせなど、まだ開発途上にあ ると考えられる。以上を総合してBと判定した。	
		B かなり達成している			
		C 達成している			
		D あまり達成していない			
		E 達成していない			
研究組織	研究組織は当初計画と合 致しているか。 研究代表者の役割、各研 究者の役割分担は明確に 定められているか。 責任体制は明確に定めら れているか。	A 大いに合致している		研究計画の途中で、研究代表者であり、「走査電子顕 微鏡法を用いた研究開発」テーマのリーダーでもあっ た山本章嗣教授の逝去という困難があった。しかし、 永井信夫教授が研究代表者および「走査電子顕微鏡 法を用いた研究開発」テーマのリーダーに就任し、計 画通りの研究組織を維持し、研究を進行できたと評価 する。	
		B かなり合致している	в		
		C 合致している			
		D あまり合致していない			
		E 合致していない			
研究施設・設備	研究施設・設備は当初計 面の見込みどおり進んで いるか。	A 大いに進んでいる	A	予定していた走査顕微鏡システム、生理活性反応測 定装置、タンパク質用クロマトグラフィーシステムをす べて購入・設置し、いずれの機器も多くの時間活用さ れている。その他、学内施設を有効に用いて研究を進 めており、研究施設・設備は当初計画の見込み以上に 進んでいると評価できる。	
		B かなり進んでいる			
		C 進んでいる			
		D あまり進んでいない			
		E 進んでいない			

評価項目	観点	観点		_	イント	
研究成果の概要	優れた成果があがった 点、あるいは問題点につ いて言及されているか。	A	十分に説明・言及がされ ている	A	テーマ1のlgA分布のイメージング、低真空クライオ走 査電顕法、セリウム塩法による活性酸素イメージン グ、テーマ2の蛍光タンパク賞を用いた特定タンパク賞 の個体イメージング、がん細胞の増殖過程のイメージ ング、BFC法によるタンパク賞間相互作用イメージン グ、テーマ3のCTサプトラクション法の新しい技術の関 発、新しい血管造影剤の開発、ビワマス筋肉内の脂肪 分布・含有率の新しい測定法の開発など、優れた成果 があがった点について、それぞれのテーマごとに詳細 に記載されている。問題点についても、研究代表者の 研究漁上での遊去による遅れや、3つの技術を組み合 わせた新技術の創出の遅れなど、誠実に記載されて いる。	
		в	かなり説明・言及されて いる			
		с	説明・言及されている			
		D	あまり説明・言及されて いない			
		E	説明・賞及されていない			
中間評価時に付さ れた留意事項とそ れへの対応	留意事項について十分に 対応しているか。	٨	十分対応している	c	3テーマの統一した研究の展開という留意事項に対し て、血管造影CTと走査電顕法の組み合わせなどの対 応をしている。しかしながら、まだ成果を上げるには 至っておらず、まだ開発途上にあると考えられる。	
		в	かなり対応している			
		c	対応している			
		D	あまり対応していない			
		Ε	対応していない			

*プロジェクトは、"個体レベル"の分子イメージング技術を新たに開発し、その有効性を検証する研究拠点を形成することを目的としている。このため、1)走査電子顕微鏡法、2)生体イメージング装置を用いた蛍光・発光イメージング、3)X線CT の3技術を用いた新規分子イメージング技術を重点的に開発することと、これら3種の技術および既存分子イメージングを有機的に組み合わせることで、新しい個体生物学の方法論を創出することを目的としている。テーマ1の講転頃における&A分布のイメージング、低真空クライオ走査電顕法、セリウム塩法による活性酸素イメージング、テーマ2の蛍光タンパク質を用いた特定タンパク質の個体イメージング、がん細胞の増殖過程のイメージング、BFC法によるタンパク質間相互作用イメージング、テーマ3のCTサブトラクション法の新しい技術の開発、新しい血管造影剤の開発、ビワマス筋肉内の脂肪分布・含有率の新しい測定法の開発など、3技術それぞれにおいて、優れた新規分子イメージング技術を開発している点は高く評価できる。一方で、3種の技術を組み合わせた新しい個体生物学の方法論の創出は、血管造影CTと走査電顕法の組み合わせなど、まだ開発途上にあると考えられる。研究施設・設備は予定していた走査顕微微鏡システム、生理活性反応測定装置、タンパク質用クロマトグラフィーシステムをすべて設置し、いずれの機器も多くの時間活用されている。その他、学内施設を有効に用いて研究を進めており、研究施設・設備は当初計画の見込み以上に進んでいると評価できる。以上を総合すると、研究組織は、研究代表者の研究途中での逝去という困難があったものの、的確に対応してほぼ計画通りに研究が進められている。研究設備の整備、各研究テーマごとの新しいイメージング技術の開発で優れた点が見られる。その一方で、3種の技術を組み合わせた新しい個体生物学の方法論の割出は、まだ開発途上にあると考えられる。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」

(平成 24 年度~平成 28 年度)

研究成果報告書

テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」

研究課題:免疫金法を用いた特定タンパク分子の分布イメージング(腸粘膜における IgA の分布のイメージング と機能解析)

研究課題:低真空クライオ走査電顕法による生体試料観察

研究機関・研究室名:バイオサイエンス研究科・細胞組織構造学研究室 担当者職名・氏名:教授・山本 章嗣 研究協力者:ポストドクター・市村 薫

研究課題: 免疫金法を用いた特定タンパク分子の分布イメージング(腸粘膜における IgA の分布のイメージン グと機能解析)

1. 研究目的

新蔵らは、結合力の低い IgA 抗体しか産生できないマウスでは腸炎を自然発症することを発見し、野生型マウス 腸管 IgA 産生細胞由来のハイブリドーマのスクリーニングより、多種類の腸内細菌に強い結合力を持つモノクロ ーナル IgA 抗体(W27 抗体)と細菌にほとんど反応しない W2 抗体を得た。結合力の強い W27 IgA 抗体を腸炎マ ウスに経口投与すると、腸内細菌叢が変化し腸炎が改善した。W2 抗体投与ではこれらの効果は見られなかっ た。つまり、腸内細菌叢を制御し炎症性腸疾患などの病気を防ぐためには細菌に対して結合力の高い IgA が必 要であることを我々は明らかにした(Okai S. et.a.l Nat Microbiol. 2016;1(9):16103)。

本研究では、この分泌型IgAがどのように腸内に分布し腸内細菌と結合しているのかを明らかにする為、走査 電顕によるIgAの分子イメージングを行った。

①金標識による細胞表面分子の検出

我々は一次抗体、金標識 2 次抗体と反応後、金増感反応を行い電子顕微鏡下で検出する方法を確立している (Ymamoto and Masak。Methods Mol Biol. 2010; 657: 225-35.)本方法では、小胞体に局在する microsomal aldehyde dehydrogenase (mADH)あるいは Heat shock protein 47 (HSP47)の C 末端に GFP を結合したタンパ ク質を発現した COS-1 細胞を、固定し抗 GFP 抗体および金標識 2 次抗体で反応した後、エポキシレジン樹脂に 包埋し超薄切片を作成し、透過電子顕微鏡で観察する。標識の金粒子は 1.4nm である。本法により、これらのタ ンパク質が小胞体に分布することを金粒子の空間分布により示すことを可能とする(図1)。



図1. 金標識法による細胞内タンパク質分布の同定 固定した細胞を包埋前に一次抗体、金標識二次抗体で標識し、樹脂 包埋後透過電顕で観察した。抗mADH抗体で処理した細胞の光学顕 微鏡(a、矢印)と電顕写真(b、矢印が金粒子)、および抗HSP47抗体 で処理した細胞電顕写真(C、矢印が金粒子陽性の小胞体)。Mはミト コンドリアを示す。バーは1µm。

この方法は、多くのタンパク質を電子顕微鏡で可視化することが可能であり、以下の実験に応用を試みた。

②マウス腸管における内在性分泌型 IgA の検出

①の金標識法を応用し、マウス腸内在性 IgA の検出を試みた。IgA は腸管内に分泌される免疫グロブリンであり、 腸内にその存在が確認できる可能性が強く示唆される。そこで、摘出後固定したマウス大腸を IgA 抗体および金 標識抗 Fab フラグメントで処理し金増感を行った後、走査電顕で観察した。標識の金粒子は 1.4nm であり、金増 感法は Nanoprobes 社の方法(kit 2113)に従った。その結果、明瞭な金粒子の空間分布イメージを得ることはで きなかったものの、EDX のスペクトラム解析により金元素の検出に成功した。(図2)。



図2. マウス大腸におけるIgA分布の測定 マウス大腸の組織に抗IgA抗体、金標識抗Fabフラグメントを反応させ、増感 反応後に測定を行った。観察では明確な金粒子は認められなかった(a)も のの、スペクトラム解析では明瞭な金粒子を認めた(b、矢印)。バーは1µm。

以上の結果より、IgA は腸管壁に存在するものの、本法における金標識抗体および金増感法では走査電子顕微 鏡および EDX での解析に十分な大きさの金粒子が得られないことが示唆された。

③W27 抗体と培養腸内細菌との結合のイメージング

次に、多種類の腸内細菌に強い結合力を持つモノクローナル IgA 抗体 W27 抗体が細菌に結合する可能性を検討した。

培養した大腸菌に W27 抗体、抗 IgA 抗体、金標識 Fab2 フラグメントを処理し、金増感法により金粒子径を増加させた後、走査電顕で観察した。金増感法は②と同様金増感法は Nanoprobes 社の方法(kit 2113)によった。 その結果、細菌表面への W27 抗体が結合を示すことに成功した(図3、図4)。



図3. 大腸菌に対するIgA(W27)の結合 透過電子顕微鏡下の菌体の分布(a)と一致する金粒子の分布(b)が 認められた。また、生体分子である酸素(c)も菌体の分布と一致した。 dはこれらのイメージの重ね合わせ。



図4. 大腸菌に対するIgA(W27)の結合とEDX
 透過電子顕微鏡下の菌体と一致する金粒子(矢印)の分布が認められた(a)。
 一方、EDXのスペクトラムでは金と考えられる粒子の存在を確認できた。しかし、
 画像から得られ面積比(約5%)に対応する強度は得られなかった(b)。

これらの結果より、W27 抗体が腸内細菌表面に結合している様子を今回開発した免疫走査電顕法を用いてイ メージング化することができ、腸管分泌型 IgA がどのように腸内細菌を認識し、制御しているかを明らかにするこ とが可能になった。一方、しかし、EDX による金元素の同定には至らなかった。特に、図4で示すように、画像上 の粒子径とEDX スペクトラムの解離が認められ、金粒子の増感がうまくいっていない可能性が強く示唆された。

④菌、細胞表面の抗体のイメージング

②および③において、EDX による金元素の同定が出来なかったのは、金増感法による金粒子径の増大が十分 でないことに起因する。そこで、金標識抗体の金粒子を成長させる方法を、Staphylococcus Auleus を用いて検 討した。その結、菌表面の金標識抗体の EDX による金元素同定に成功した。。さらに培養細胞系を用いた評価 でも表面抗原に対する一次抗体と金標識二次抗体による EDX のイメージングと金元素の同定に成功した。ただ し、画像化にはさらなる成長が必要であった。これらの方法により、EDX による評価が困難な金標識抗体の金標 識を試料上で成長させて金元素を同定する方法を確立し、同標識の EDX 分析法の基盤を確立した。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

今後は本方法に預金粒子の成長方法を検討して、腸管内の IgA の分布および W27 抗体の細菌への結合の EDX 解析を検討する予定である。

研究課題:低真空クライオ走査電顕法による生体試料観察

1. 研究目的

琵琶湖産のカビ臭産生、藍藻の1つに Phormidium tenue がある。P. tenue には、カビ臭を発生する緑色のものと 産生しない褐色のものが存在するとされていた(図 5)。



図5. 2種のPhormidium tenue 琵琶湖産のカビ臭産生藍藻 P. tenuelこ は、緑(左)と茶(右)の色の異なる2種 が存在する。

これらの違いの理由は明らかになっておらず、カビ臭の除去のためにはその違い系を明確にする必要があった。 そこで、両者の比較を、低真空クライオ走査電顕法を用いて行った。 2. 研究成果

SEM で観察を行った結果、緑色種が細胞の周囲に鞘を持たないのに対して褐色種が鞘を持つことが明らかとなった(図6)。



図6. 低真空クライオ走査電顕法による2種のP. tenueの観察 緑色種(a, b)は細胞の周囲に鞘を持たない連鎖型の形態を示す(a, b) のに対し、褐色種(c, d)は鞘を持つことが観察された。バーは、aでは5 Omm、bではb、dでは10nm、cでは100nmを示す。

さらに EDX による細胞内顆粒の元素分析を行ったところ、緑色種はポリリン酸顆粒を持つことが示された (図7)。



図7. 藻類におけるEDX解析

緑色種の藻類においてEDXによる元素解析を行った結果、細胞内顆粒 に(a)リン酸の陽性スペクトラム(b)を確認した。この構造褐色種には認 められなかった。 以上のように、細胞形態や細胞内顆粒に違いが見られることから、両者は異なる種であることが示された。この違いは、リボソーム RNA の解析からも追認されている。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

琵琶湖は近畿圏に広く水道水を供給しており、その水質の管理は極めて大切な課題である。Phormidium tenue には、カビ臭を発生する緑色のものと産生しない褐色のものが存在するとされていたが、これらは異なる 種であることが明らかとなった。これらの知見は今後の琵琶湖の水質管理において重要な知見であると考える。

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

- 1) Ole1, fatty acid desaturase, is required for Atg9 delivery and isolation membrane expansion during autophagy in Saccharomyces cerevisiae. Ogasawara Y, Kira S, Mukai Y, Noda T, Yamamoto A. Biol Open. 2017 Jan 15;6(1):35-40. 査読有
- 2) Ehrlichia secretes Etf-1 to induce autophagy and capture nutrients for its growth through RAB5 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. Lin M, Liu H, Xiong Q, Niu H, Cheng Z, Yamamoto A, Rikihisa Y. Autophagy. 2016 Nov;12(11):2145-2166. 査読有
- 3) The Ankrd13 Family of Ubiquitin-interacting Motif-bearing Proteins Regulates Valosin-containing Protein/p97 Protein-mediated Lysosomal Trafficking of Caveolin 1. Burana D, Yoshihara H, Tanno H, Yamamoto A, Saeki Y, Tanaka K, Komada M. J Biol Chem. 2016 Mar 18;291(12):6218-31. 査読有
- 4) The drs tumor suppressor regulates glucose metabolism via lactate dehydrogenase-B. Tambe Y, Hasebe M, Kim CJ, Yamamoto A, Inoue H. Mol Carcinog. 2016 Jan;55(1):52-63. 査読有
- 5) γ-SNAP stimulates disassembly of endosomal SNARE complexes and regulates endocytic trafficking pathways. Inoue H, Matsuzaki Y, Tanaka A, Hosoi K, Ichimura K, Arasaki K, Wakana Y, Asano K, Tanaka M, Okuzaki D, Yamamoto A, Tani K, Tagaya M. J Cell Sci. 2015 Aug 1;128(15):2781-94. 査読有
- 6) GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. Ishida R, Yamamoto A, Nakayama K, Sohda M, Misumi Y, Yasunaga T, Nakamura N. FEBS J. 2015 Jun;282(11):2232-44. 査読有
- 7) Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. Soonthornsit J, Yamaguchi Y, Tamura D, Ishida R, Nakakoji Y, Osako S, Yamamoto A, Nakamura N. Exp Cell Res. 2014 Nov 1;328(2):325-39. 査読有
- 8) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Uneyama H, Takayanagi R, Yamamoto A, Omote H, Nomura M, Moriyama Y. Sci Rep. 2014 Oct 21;4:6689. 査読有
- 9) Stearoyl-CoA desaturase 1 activity is required for autophagosome formation. Ogasawara Y, Itakura E, Kono N, Mizushima N, Arai H, Nara A, Mizukami T, Yamamoto A. J Biol Chem. 2014 Aug 22;289(34):23938-50. 査読有
- 10) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets.

Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. Physiol Rep. 2014 Jun 6;2(6). pii: e12034. 査 読有

*11) <u>琵琶湖産の糸状カビ臭産生藍藻 Phormidium tenue</u>の細胞内微細構造観察: 軟 X 線顕微鏡と透過型電子顕微 鏡および低真空クライオ走査型電子顕微鏡を用いた比較観察。竹本邦子、山本章嗣、水田鋼、一瀬諭、吉村真 史、難波秀利、木原裕。日本水処理生物学会誌 48, 157-163, 2012. 査読有

<図書>

- *1) Yamamoto A, Masaki R. Pre-embedding Nanogold Silver and Gold Intensification. in High-Resolution Imaging of Cellular Proteins, Methods Mol Biol. 2016;1474:269-7
- 2) オートファジー 生命を支える細胞の自己分解システム 水島昇、吉森保編、電子顕微鏡を用いたオートファジー 解析。山本章嗣、西野-林美都子、小笠原裕太。187-200、化学同人、京都、230 ページ 2012 年

<学会発表>

- *1) <u>Microscopy methods applied to research on musty odor producing filamentous cyanobacteria. Takemoto K,</u> Yoshimura M, Yamamoto A, Ichise S, Namba H, Kihara H. 第 12 回 X 線顕微鏡国際会議 (XRM2014)、メルボルン、 <u>2014 年</u>
- *2) Phormidium tenue とされている琵琶湖産糸状藍藻の微細構造観察 XM, TEM, 低真空クライオ SEM にる 竹本邦子, 山本章嗣, 一瀬 諭、吉村真史, 塩野正道, 西村雅子, 水田 剛, 難波秀利, 木原 裕。 第50回日本 水処理生物学会、神戸、2013 年

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」

(平成 24 年度~平成 28 年度)

研究成果報告書

テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」

研究課題:免疫金法を用いた特定タンパク分子の分布イメージング(腸粘膜における IgA の分布のイメージング と機能解析)

研究機関・研究室名:バイオサイエンス研究科・生体応答学研究室

(現·奈良先端科学技術大学院大学)

担当者職名·氏名:教授·新蔵 礼子

研究協力者:岡井 晋作、臼井 文人

1. 研究目的

近年、腸内細菌叢の異常(dysbiosis)が炎症性腸疾患だけではなく多くの疾患の発症に関連すると報告されて おり、腸内細菌叢を改善することは健康維持に重要である。腸内細菌叢は腸管に分泌される IgA 抗体によって 認識し制御されていることが知られている。しかし、各 IgA 抗体が常在細菌の何を認識して常在細菌叢にどのよ うな変化を与えるのか、などその詳細は明らかではない。

2. 研究成果

私たちはマウス小腸由来 IgA 産生細胞からモノクローナル IgA 抗体をクローニングし、各クローンが認識する細 菌由来分子を探索した。まず、単離した IgA 抗体の中で、多くの種類の細菌に最も強く結合する能力を持つ W27 抗体に着目した。W27抗体が強く結合するのは大腸菌など腸炎の原因菌であり、乳酸菌やビフィズス菌といっ たプロバイオティクスに利用されるいわゆる善玉菌に対しての結合は弱かった。W27 抗体は多くの細菌が共通 に持つ大腸菌の代謝酵素(sserine hydroxymethyltrasnferase)中の4アミノ酸の違いを識別しており、この特定 のアミノ酸配列を認識して結合することで大腸菌の増殖を抑制した。一方で W27 抗体は良い菌の増殖を妨げな いので、マウスへ W27 抗体経口投与を行ったところ、全体として良い菌が優位になる腸内環境へと変化する効 果が見られた。W27 抗体を腸炎モデルマウスに経口投与すると、腸内細菌叢が変化し、その結果腸炎が抑制さ れた。以上の結果から、IgA 抗体の経口投与が腸内細菌叢改善薬として応用できる可能性を示すことができた。 詳しい内容については添付の論文を参照にされたい。 nature microbiology

ARTICLES PUBLISHED: 4 JULY 2016 | ARTICLE NUMBER: NATURAL DOI: 10.1038/JMARCROBIOL.2016.103

High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice

Shinsaku Okaiⁿⁱ, Fumihito Usuiⁿⁱ, Shuhei Yokota¹, Yusaku Hori-i¹, Makoto Hasegawa², Toshinobu Nakamura³, Manabu Kurosawa⁴, Seiji Okada⁵, Kazuya Yamamoto⁶, Eri Nishiyama⁶, Hiroshi Mori⁶, Takuji Yamada⁶, Ken Kurokawa⁷, Satoshi Matsumoto⁸, Masanobu Nanno⁸, Tomoaki Naito⁸, Yohei Watanabe⁸, Tamotsu Kato⁹, Eiji Miyauchi⁹, Hiroshi Ohno^{930,11} and Reiko Shinkura^{132+*}

Immunoglobulin A (IgA) is the main antibody isotype secreted into the intestinal lumen. IgA plays a critical role in the defence against pathogens and in the maintenance of intestinal homeostasis. However, how secreted IgA regulates gut microbiota is not completely understood. In this study, we isolated monoclonal IgA antibodies from the small intestine of healthy mouse. As a candidate for an efficient gut microbiota modulator, we selected a W27 IgA, which binds to multiple bacteria, but not beneficial ones such as Loctobacillus casel. W27 could suppress the cell growth of Excherichie coll but not L casel in vitro, indicating an ability to improve the intestinal environment. Indeed W27 oral treatment could modulate gut microbiota composition and have a therapeutic effect on both lymphoproliferative disease and colitis models in mice. Thus, W27 IgA oral treatment is a potential remedy for inflammatory bowel disease, acting through restoration of host-microbial symbiosis.

publicities of gut microbiota disrupts intestinal homeostasis and clauses inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease and ulcenative colitis (UC). Hence, restoration of gut microbiota symbiosis is key to the prevention and treatment of IBD¹⁻². One promising agent that has been shown to shape the gut microbiota community is intestinal IgA⁴⁻⁷. Intestinal IgA is thought to comprise two types: (1) high-affinity IgA, which is produced by a sematic hypermutation (SHM) process in germinal centre (GC) B cells and neacts specifically to pathogens and their toxins in a Fab-dependent manner; (2) poly-reactive IgA, which is produced by a GC-independent process and recognizes a variety of commensal bacteria, probably in a Fab-independent manner^{4,5,3}. IgA coating of commensal bacteria was originally discovered as early as 1968 (ref. 9). A recent study infocused on IgA coating and suggested that intestinal IgA selectively cost diseaseassociated commensal bacterial taxa^{1,10}, although how IgA can specifically select colitogenic bacteria has remained unclear.

Our previous studies revealed that, even in the absence of pathogena, mice that lack whole IgA (activation-induced cytidine deaminase (AID) deficient mice) and mice that lack only high-affinity IgA due to an SHM defect (AID^{G238}—glycine to serine at the 23rd amino acid—mutant mice) developed immune hyperactivation and dysbiosis-associated lymphoproliferative disease^{11,21}. These data demonstrate that only high-affinity IgA, not loss-affinity IgA, plays a crucial role in the control of continensal gat microbiota as well as of pathogens. Because gat microbiota contain a huge number of varied species, we thought that only polyneactive IgA could shape and maintain the microbial community in a steady state. We thus hypothesized that high-affinity polyneactive IgA could be a useful gut commensal modulator to restore symbiosis.

In this study, we isolated monoclonal IgA antibodies and identified their target bacterial epitopes. Interestingly, more than 90% of monoclonal IgAs derived from the small intestine of mice recognized an epitope that represented four amino acids (EEHI) expressed in a bacterial enzyme, serine hydroxymethyltransferase (SHMT). Among these IgAs, we selected a high-affinity polyreactive W27 IgA as the best candidate for an efficient gat microbiota modulator and showed that W27 oral treatment modulated gat microbiota composition and had a thempeutic effect on both lymphoproliferative disease and colitis models in mice.

Results

Establishment of IgA monoclonal antibodies and selection of high-affinity polyreactive IgA W27. We believed that the best commensal microbial modulator, high-affinity polyreactive IgA, must be produced via an intact SHM process in wild-type mice. We therefore generated hybridomas from intestinal lamina propria (LP)-derived IgA-secreting cells of unimmunized wildtype (CS7BU/6) mice kept under specific pathogen-free (SPF) conditions. We isolated 16 monoclonal IgAs, each carrying an

Department of Immunology, Nagahama Institute of Bioscience and Technology, Nagahama, Shiga 526-0829, Japan. "Department of Protein Function Analysis, Nagahama Institute of Bioscience and Technology, Nagahama, Shiga 526-0829, Japan. "Department of Epigenetics, Nagahama Institute of Eisocience and Technology, Nagahama, Shiga 526-0829, Japan. "Department of Diagnostic Pathology, Ryote University Hospital, Ryote 606-8501, Japan. "Division of Hematopians", Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto BOO DBT, Japan. "Graduate School of Bioscience and Elostonnoisgy, Tekyo Institute of Technology, Tokyo 152-8550, Japan. "Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152-8550, Japan." "Akait Central Institute, Tokyo 186-8650, Japan. "BOEN Center for Lifegrative Medical Sciences DMS), Kanagawa 230-0045, Japan. "Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, Japan." "Breact Ecolo of Medical Life Sciences, Notshama City University, Kanagawa 230-0045, Japan." "PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saltama 352 0002, Japan. "Present address: Applied Immunology, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology Agency, Saltama 352 0002, Japan. "Present address: Applied Immunology, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology Agency, Saltama 352 0002, Japan. "Present address: Applied Immunology, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology Agency, Saltama 352 0002, Japan." These authors contributed equality to this work. "e-mail: Institute and Science and Technology Agency Japan Science Researce Academic Science Science Institute of Science and Technology Agency, Saltama 352 0002, Japan." These authors contributed equality to this work.

NATURE ARCROBIOLOGY | VOL1 | SEPTEMBER 2016 | www.untura.com/indurericonkinings

1

© 2016 Macmilian Publishers Limited, part of Springer Halumi. All rights reserved,

ARTICLES

NATURE MICROBIOLOGY DOL HEROID NEWSCHOROL 2016. 103



Figure 1 | LP-derived monoclonal W27 antibody is identified as a high-affinity polyreactive IgA. a: The reactivities of 16 monoclonal IgA antibodies against M offerent bacterial strains were evaluated by ELEA assay. Each monoclonal IgA (concentration of 14 µg m⁻¹) was applied to ELEA plates coated with each strain of bacteria. The positive binding was determined by an optical density (OD) of >0.3. Shaded cells, positive binding open cells, no binding ND, not determined. "Included bacteria from mouse favours **b**, The initiative binding ability of each IgA clone was analysed by ELEA assay with serially diuted monoclonal IgA antibodies. All data in **a** and **b** are representative of at least three independent biological experiments. **c**, Left: Representative, flarescence activated bacterial cell sorting resists of pre-solited, sorted W27 binding and sorted W27 remolecting populations from mixed gut centents of four AID⁻¹⁷ mixe (2) weeks of age). Right: Mean relative abandance of operational taxonomic units classified at the family level for each gopulation. Data were obtained from file technical replicated sorting and source procedures. Source data are provided torting (see "Accession codes").

unrelated sequence of a variable region gene in the immunoglobulin heavy chain (V₁₀ Supplementary Table 1). We tested their binding ability against 14 different cultivable commensal bacterial strains with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All 16 monoclonal IgAs recognized at least three different bacterial strains at an antibody concentration of 1.4 ug m¹⁻⁴ (Fig. 1a).

We selected four clones (W2, W27, W34 and W43) producing antibodies in relatively high amounts and tested their relative binding ability against 14 different strains with a dose-dependent ELISA assay. Of the four, W27 had the most potent reactivity against 12 of the 14 bacterial strains (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1). Interestingly, W27 bound to each bacterial strain with variable binding strength. The relative reactivities of W27 to Escherichia coli, Stophylococcus lentus and Pseudomonas fulna were about 100 times higher than those of W2, while the reactivities of W27 to Bijidobacterium bifulom and Blautia cocorides (previously classified as Clouridium (C.) cocoides, one of the beneficial bacteria that induces FoxP3' regulatory T cells)²⁶ were only ten times higher than those of W2. W27 had very weak reactivity, if any, to Lactobacillio caser (a species of genus Lactobacillor generally considered to be probiotic) (Fig. 1b). We assumed that W27 is the best candidate for a commensal microbiota regulator, because it selectively binds to a series of commensal bacteria (including a

2

NATURE NECEDIMOLOGY | VOL1 | SPTEMBER 20% | amountainance/valametischintep-

45 2016 Macmilian Publishers Limited, part of Springer Nations, All rights residents.

NATURE MICROBIOLOGY DOI 10 1038/14MICROBIOL 2018.103

potentially colliogenic one) rather than to beneficial ones such as B. b(fidum, B. coccoides and L. casei.

High-throsoghput analysis of W27-binding bacteria. We also analysed the selective binding ability of W27 by IgA-seq of sorted W27-binding and W27-non-binding gut bacteria from the gut contents of IgA-null AID⁻¹¹ mice (Fig. 1c). Family-level analysis identified Porphyromonadaceae, Prevoteflaceae and Lactobaciflaceae as W27-binding bacteria and Lachnospiraceae and Reminococcaceae as W27-binding bacteria (Fig. 1c). A previous study² has demonstrated that a high IgA coating identifies colltogenic bacteria in a mouse colitis model as well as in IBD patients. In that study² and in another report¹⁴, Lactobaciflaceae and Prevoteflaceae appeared as potentially colltogenic commensal bacteria, whereas Lachnospiraceae and Reminococcaceae were recognized as beneficial bacteria, for ecample, as Trogs inducers^{12,15}. These findings suggested that W27 could adjust the gut microbiota to achieve symbiotic balance, through selective binding to collogenic bacteria

Mouse intestinal IgAs recognize an E. coli enzyme SHMT. We also tried to identify the target molecule of IgA clones through western blot analysis with comparable amounts of cell lysate from seven different bacterial strains, including a commercially available E. coli strain (DH5a), a mouse cell line (NS-1) and a human cell line (293T). Four IgA monoclonal antibodies (W27, W2, W34 and W43) revealed visible target bands for DH5a, E. coll (a strain isolated from mouse facors) and P. foloa. In contrast, none of the IgAs recognized any protein in S. lentus, L. casel, B. coccoides, B. bifidum, NS-1 and 293T cells, except for ambiguous bands for B. coccoides on the W27 blot (Fig. 2a and Supplementary Fig. 6). This suggests that the specific target protein of the four IgAs is most probably a common melecule expressed by E. coli and P. fulva (Fig. 2a and Supplementary Fig. 6). We performed mass spectrometry analysis of a target protein from the DHI5a cell lysate and found that the target molecule of W27 is the enzyme serine hydroxymethyltransferase (SHMT). Interestingly, the other independent IgA clones (W2, W34 and W43) also recognized Myc-tagged cloned E. coli SHMT as well as endogenous SHMT (Fig. 2b and Sepplementary Fig. 6). SHMT is an important metabolic enzyme that catalyses the reversible methylation reaction of serine and tetrahydrofolate (THF) to glycine and 5,10-methylene THF. In previous studies, SHMT was detected in the periplasm fraction of E coll^{16 38}, suggesting that IgA could recognize SHMT on the surface of E coll.

Epitope of SHMT recognized by W27. According to our database search, the gene encoding SHMT, glyA, is not found in the genome of B. bifidom, but a wide range of bacteria have the gene. To check whether W27 also recognizes the SHMT proteins in other bacterial species, we doned the full-length glyA gene encoding SHMT from P. foloa, S. lentus, L. casel and B. exceeded, as well as the human SHMT. We then overexpressed their Myc-tagged SHMT proteins in 293T cells. As shown in Fig. 2c and Supplementary Fig. 6, W27 recognizes the SHMT of P. fultu as well as of E. coli, but not other bacterial or human SHMT proteins. This saggests that W27 each distinguish differences in the amino acid (AA) sequences of each distinct bacterial SHMT.

A further epitope mapping study of E. coli SHMT revealed that W27 specifically recognized the peptide SHMT-P1 (AA25–AA45 of E. coli SHMT; Fig. 2d and Supplementary Fig. 6). Through alignment of the amino acid sequences of SHMT from different species, we found the highly conserved motif (RQ-XXXX-ELIASEN) in the N-terminal region of SHMT and further identified four amino acids (EEHI) in the middle of the conserved motif (RQ-XXXX-ELIASEN) as a critical determinant of W27 binding, which is shared by E. coli and P. fubra (Fig. 2d and Supplementary Fig. 6). To ensure that the EEHI residues were the core epitope sequence, we generated and overexpressed mutant E. coli SHMT protein (replacing EEHI with EHNI) and mutant I. case: SHMT, replaced reciprocally in 293T cells. Western blot analysis clearly showed that W27 specifically recognized EEHI but not EHNI in SHMT (Fig. 2e and Supplementary Fig. 6), indicating that EEHI is a critical target sequence for W27.

With a dose-dependent binding assay, we further confirmed that W27 had the most potent reactivity to SHMT-P1 of the four IgA clones (Fig. 2f). Interestingly, the other IgA antibodies (W2, W34 and W43) also recognized the same SHMT-P1, but myeloma-derived mouse IgA (mIgA) did not recognize it at all (Fig. 2f), suggesting that SHMT-P1 is a common bacterial target for intestinal IgA. Indeed, 42 out of 44 monoclonal IgAs, including the 16 clones shown in Fig. 1a and additional monoclonal IgAs derived from other mice, could bind to the peptide containing the EEHI sequence (Supplementary Fig. 2). According to our database search, *E. coli* shares the EEHI amino acid sequence not only with *P.* folva (Fig. 2d) but also with a range of pathogenic bacteria, including Haemophilus influenzae, Klehniella pneumoniae, Legionella pneumophila, Solmonella paratyphi A, Solmovella typhimuriom and Shigella flexmeri (Supplementary Table 2). It is reasonable to conclude that most intestinal IgAs recognize the EEHI sequence as an element of macosal defence.

Bacterial growth suppression by W27 IgA. Our hypothesis agrees with the idea that IgA-binding of colitogenic bacteria may improve dysbiosis^{6,7}. However, its mechanism is unknown. One possibility is that a high-affinity IgA such as W27 may inhibit bacterial cell growth by binding, but does not affect the cell growth of nonbinding beneficial bacteria, leading to the establishment of hostmicrobiota symbiosis. To prove this hypothesis, we tested whether W27 binding could have any effect on bacterial cell growth. For in vitro growth assay, we purified W27 by affinity chromatography against SHMT-P1 peptide. The purified fraction of W27 mainly consisted of oligomers (Supplementary Fig. 3). Co-culture of affinity-purified W27 and DH5a cells significantly inhibited their cell growth in a dose-dependent manner (Fig. 3a), whereas nonbinding mlgA (derived from myeloma cells, Fig. 3b) did not affect. It at all (Fig. 3a). By contrast, the cell growth of L. case/ that were not bound by W27 (Figs 1b and 3b) was not altered by W27. These results suggest that binding of bacteria by W27 can suppresa their cell growth.

It has been demonstrated that IgAs bind to bacteria in a Fabindependent, non-specific manner⁴ ^{6A,9}. To investigate this we took advantage of SHMT-deficient *E. coli* (JW2535) (Fig. 3e and Supplementary Fig. 6)¹⁹. Because SHMT is one of the key ensymes for one-carbon metabolism, JW2535 cells exhibits growth retardation (Fig. 3c), as reported previously²⁰. W27 suppressed only wild-type (ME9062) cell growth significantly, and did not affect SHMTdeficient cell (JW2535) growth (Fig. 3c), although W27 bound to both strains equally (Fig. 3c). Our results indicate that W27 has an inhibitory effect on *E. coli* cell growth via SHMT recognition.

Oral treatment of W27 improves lymphoproliferative disease and associated pathological crypt damage in AID⁶²²⁶ mice. We reasoned that the proposed role of W27 in modulating intestinal microbiota, leading to symbiosis, needed to be confirmed in an in vivo model lacking high-affinity IgA antibodies. Carrently, AID⁶²⁰⁸ knock-in mice ase the best candidate mice for this²². We examined whether oral supplementation of W27 could prevent hymphoproliferation in AID⁶²⁰¹ mice. W27 (partially partified via ammonlum sulfate precipitation, Supplementary Fig. 3) was given to AID⁶²⁰⁸ mice in their drinking water at a concentration of 25 up ml⁻¹ for four weeks. As a control treatment, low-affinity polyteactive IgA (W2, Figs 1b and 2f) was given to AID⁶²¹⁰ mice in the same

1

ARTICLES

NATURE MICROBIOLOGY DOL 10.1038/ MMICROBIOL2014.103



Figure 2 | W27 IgA recognizes an epilope of the enzyme SHMT to selectively target a set of bacteria, a moute 8 cell fine (VS-R) and a human cell line (2931) SDS-PAGE gels were applied to either western biot with antibody (W27, W2, W2, W44 and W42) or Coornecte brilliant blue (CBR) staining to confirm that comparable amounts of each protein were loaded **b**. Four IgAs recognized a single molecule (SHMT) in DHSs. Overexpressed Alvo targed E real SHMT in DHSs wild detected, as well as entropress SHMT. Note that the total DHSs lipide amounts loaded on to each gel were not identified e. Myc targed E real SHMT in DHSs wild detected, as well as entropress SHMT. Note that the total DHSs lipide amounts loaded onto each gel were not identified e. Myc targed cloned SHMT proteins derived from five bacteria and human eere overexpressed in 2931 cells to confirm binding by W27 **d**. Amino acid sequences of three synthetized peptides (SHMT-R)–P30. Conserved and variant amino acid sequences are shown in black and red, respectively. Underlined red residues are the core optice for W27 **e**. Myc targed matter SHMT proteins (E cell SHMT^{mat theory} and L casel SHMT^{mat theory} and L casel SHMT^{mat theory} and L casel SHMT^{mat theory} and L case SHMT^{mat theory} and sequences in 2931 cells to entitle of two or three independent hiological experiments. Entite gels and blots are provided in Supplementary Fig. 6a-e.

manner, These IgA antibodies consisted of both monomer and oligomer forms and were stable in the drinking water for at least seven days (Supplementary Fig. 3). They were delivered through the whole intestine and could be recovered from faeces (Supplementary Fig. 4).

Compared to untreased AID⁶²⁰⁹ mice suffering from GC 8 cdl hyperplasia, GC B cdl numbers in Peyer's patches (PPs) of W27-treated AID⁶²⁰⁹ mice were significantly decreased (P < 0.01) down to the level of those of wild-type mice (Fig. 4a). On the other

.

band, W2 treatment did not affect it significantly (Fig. 4a). Furthermore, 30 µg of W27 (affinity-purified) was given by gavage treke a week to IgA-null AID⁻¹⁻ mice suffering more prominent GC hyperplasia than AID^{G238} mice. Oral W27 treatment for four weeks significantly decreased GC B cell numbers in the PPs of AID⁻¹⁻ mice (Fig. 4b). In addition, diffuse crypt atrophic damage found in eight (>30% of total colonic length) and two (5-30% of total colonic length) out of thirty AID^{G238} mice at 12-16 weeks of age was not observed in any of the thirteen W27-treated AID^{G238}

NATURE NECEDIMOLOGY | VOL 1 | SEPTEMBER 20% | announcementation and have received

45-2016 Macmilian Publishers Limited, part of Springer Nation, All Ashda mianoul,


Figure 3 | W27 suppressed E, coll cell growth via SHMT-specific recognition. a, Between 300 and 500 cells of DH5e and L rate/were incubated with affinity our fled WZ7 or control recise IgA (wilgA) at the designated concentration for 3 h at 37 °C. The DHDe and J, cose calls were then viculated with prowth medium at 37 °C for an additional 7 and 45 h, respectively, until the numbers of cells were comparable. **P<0.01, *P<0.05. Analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Bankeroni. Helm post hac tests for multiple companions. It, lipA surface staining of E. milland 2, casel 4, E. coli cells (0.8 × 10⁴ to 1.2 × 10⁴ cells) were incubated with affinity partiald W27 or control mouse lipA (milpA) at designated concentration for 3 n at 37 °C. The samples were then incubated for an additional 3 in with growth medium at 37 °C 11P < 0.001 version without W27. Statistical analysis was performed by tw sided Mann-Whitney test. ME9062, SHMT-proficient E. coll: JW2525, SHMT-deficient E. coll: Each dot represents the mean of three technical replicates (a.c). In a and a, data were collected from three to nine independent biological experiments, and all data are expressed as medians 4 range d, IgA surface staining of ME9062 and JW2535. Open histograms in b and d unstained cells. e. Western blot analysis confirmed the SHMT deficiency of JW2535. The entire get and blot are provided in Supplementary Fig. 6. CEB, Coomassie brilliant blue. 1, Reactivities of W27 and migA antibodies against two different bacterial strains mainted by EUSA assay. Data are representative of three independent biological experiments. (b,d+f)

mice (Fig. 4c,d). We concluded that W27 oral supplementation could composition. Through bacterial 165 rRNA meta sequencing, we prevent lymphoproliferative disease and the associated crypt damage found that W27 oral administration to AID⁶²¹⁰⁰ mice induced a prevent lymphoproliferative disease and the associated crypt damage in AID⁽²³⁾ and AID^(*) mice.

significant change in the relative abundance of 12 different bacterial families (Fig. 4c). The relative abundance of Lachnospiraceae and Oral W27 treatment changes gut microbiota composition. We Ruminscoccaccae were significantly increased after W27 oral questioned whether W27 IgA directly affects gut microbiota treatment (Fig. 4c). These bacterial species are generally considered

.

NATURE ARCROBIOLOGY | VOL 1 | SEPTEMBER 2016 | www.

15, 2016 Macmillan Publishers (immed, part of Springer Values, All rights retained,

ARTICLES

NATURE MICROBIOLOGY DOL 10.1018/1984CROBIOL2010.101



Figure 4 | W27 and treatment prevents pathological coloric phonotype and modulates gut microbial composition in ALD⁶¹⁰⁰ mice. a, Total number of GC 8 cells (9220'PNA^(N)) in PPs from mice. Data are from two to five independent biological experiments, except for W2 treatment (one experiment) (pA antibodies (W27, W2) were analy administened to ARD⁶²⁰⁰ mice in their driving water at a concentration of 25 µg m⁻¹ for A weres. All data are expressed as means * s.e.m. "P<GOL ANDWA was performed, followed by Bonterna-Holm post-hoc tests for multiple comparisons. It PP GC E cell numbers by W27 and treatment by garage in ARD⁻¹ mice. Data are tests there independent biological experiments, and all data are expressed as medians * s.e.m. "P<GOL ANDWA was performed, followed by Bonterna-Holm post-hoc tests for multiple comparisons. It PP GC E cell numbers by W27 and treatment by garage in ARD⁻¹ mice. Data are tests three independent biological experiments, and all data are expressed as medians. * range: "P<GOL Statistical analysis was performed using a two-sided Mann-Whitney test. c. Resententative harmatovylin and eosin OHSE staining of colors by W27 and treatment (right) ALD⁵²⁰⁰ mice. Scale bars, 500 µm. d. The severity of coloric crypt damage was examined on HSE stained color sections based on the percentage of affected area of the fail length of the color. e. Maan relative abundance was changed significantly by W27 and treatment in ALD⁵²⁰⁰ mice (right 0, Beccolor, 6, Maan relative abundance was changed significantly by W27 and treatment in ALD⁵²⁰⁰ mice (right 0, Beccolor, 6, Maan relative abundance was changed significantly by W27 and treatment. M1 to M4 are individual mice. P<0.05 Source data for e and **f** are provided online (see 'Accession codes').

to be beneficial Tregs inducers^{13,13}. On the other hand, Prevotellaceae and Lactobacillaceae, plausible colitogenic bacteria^{7,14}, decreased in relative abundance in response to W27 treatment (Fig. 4c). In good agreement with our W27 IgA-seq data (Fig. 1c), the numbers of bacteria bound strongly by W27, such as Lactobacillacese and Prevotellacese, decreased in faeces after W27 oral treatment, while numbers of bacteria bound weakly by W27, such as Lachnospiraceae and Ruminococcaceae, increased in faces after W27 oral treatment (Figs 1c and 4c). In addition, quantitative PCR analysis²¹ revealed that W27 oral treatment significantly increased the absolute numbers of the B. cocoider group (corresponding to Lachnospiracore in 165 rRNA analysis) and the Clostridium leptum group (corresponding to Ruminococcaceae in 165 rENA analysis) (Supplementary Fig. 5, left, half, and Sopplementary Table 3), whereas W2 (low-affinity IgA) oral treatment did not change them, except for a slight decrease in Prevotella (Supplementary Fig. 5, right half). The significant shift in composition of the microbiota after W27 onal treatment was further confirmed at the individual mouse level (P<0.05) (Fig. 4f). Thus, as expacted from its beneficial effect on lympboproliferative disease, W27 oral treatment modulated gat microbiota composition towards symbiosis.

W27 oral treatment has a beneficial effect on experimental colitis in mice by modulating gut microbiota. We next addressed the question of whether W27 oral treatment could prevent colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS). As shown previously, when dyshiosis was induced in wild-type mice by co-housing them with colltogenic mice or by exposing them to colltogenic bacteria, the mice showed more severe body weight loss than untreated wild-type mice in DSS-induced colitis experiments". As W27 targets dysbiosis, but not inflammation itself, we assume that W27 supplementation may ameliorate the severity of DSS-induced collitis in mice suffering from dysbiosis. To induce dysbiosis in wild-type mice, we repeatedly administered DSS in their drinking water, with intervals with supplementation of W27 in the water or water only (Fig. 5a). W27 oral treatment significantly reduced the bodyweight loss and the increase in disease activity index²⁷ (Fig. 5a,b). A previous study' has shown that the IgA-binding proportion of intestinal bacteria is significantly increased in IBD patients and in a mouse model of colitis. At the end of the experiment, in W27-treated mice, the IgA-binding proportion of faecal bacteria was significantly decreased compared to that in control mice (Fig. 5c), suggesting an improvement in gat microbial composition by W27. Indeed 165 rRNA analysis

NATURE MICROBIOLOGY | VOL 1 | SEPTEMBER 2016 | www.nature.com/indurenite/biology

© 2016 Macmillan Publishers Umilad, part of Springer Nation, All rights reserved.

NATURE MICROBIOLOGY DOI: 10.1038/14MICROBIOL.2018.103

ARTICLES





revealed a significant difference in the microbial composition between W27-treated and untreated mice (Fig. 5d).

Finally, we tested whether W27 could prevent another colitis model induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{hugh} T cells in Rag1⁻¹⁺ mice in another independent animal facility. W27 treatment clearly ameliorated the waiting disease (Fig. 5c) associated with chronic colitis²⁰ (Fig. 5f.g). We confirmed that the microbiota compositions in W27-treated and untreated mice were significantly different three weeks after T cell transfer (Fig. 5b). Because the microbial conditions in each animal facility were not identical, additional studies are required to define the dyabiosis condition that W27 can target. However, our data suggest that W27 oral treatment can have a beneficial effect on colitis originating from different mechanisms, but is associated with dyabiosis.

Discussion

In this study we have isolated a monoclonal IgA antibody, W27, that has a strong binding ability against a variety of bacteria and suppresses the cell growth of E. coll via an epitope-specific binding, but neither binds to nor suppresses L. case in vitro. In gat lumen, orally given W27 modulates commensal microbiota composition

NATURE ARCROBIOLOGY | VOL1 | SEPTEMBER 2016 | www.indum.com/indumericobicitige

© 2016 Macmilian Publishers Limited, part of Springer Nature, All rights reserved.

ARTICLES

NATURE MICROBIOLOGY DOL 10.1038/1488C ROBIOL2016.101

towards symbiotic balance, resulting in beneficial effects on several dysbiosis-associated disease models in mice.

Recent studies have shown that secreted intestinal IgA can recogniae and bind to a subset of commensal bacteria that preferentially affect IBD susceptibility in mice and human patients^{7,10}. This subset of bacteria may vary depending on the environment, such as the mouse facilities, and it is difficult to identify a disease-causing bacterium in each human patient. A new approach based on targeted microbial modulation such as W27 oral treatment may overcome this difficulty and contribute to the cure of IBD patients, because W27 selectively binds preferably to multiple colitogenic bacteria through epitope-specific recognition. However, several questions of critical importance have never been solved.

We have demonstrated that simple IgA coating of the bacteria did not always inhibit bacterial growth. Our findings agree with an early paper published in 1968 demonstrating that certain bacteria continue to grow despite being IgA-coated*. Thereafter, non-specific binding was thought to occur via carbohydrates on the bacterial cell surface and IgA molecule⁸. Recently, Mathias and colleagues have demonstrated the significant difference between IgA binding on the cell surface in E. coli strains and in Lactobacillus²⁶. Their results show that the interaction of three tested Gram-negative bacteria (E. coll strains) with deglycosylated or native IgA proteins results in similar high-level binding, while the interaction of Gram-positive bacteria such as Lactobacillus and Bifidobacterium was lost by deglycosylated IgA, suggesting a selective role of carbohydrates in the binding of Gram-positive bacteria. In good agreement with these findings, we observed equal levels of surface binding of W27 to E. coli strains ME9062 and JW2535 (Fig. 3d,f), indicating epitope (SHMT)-independent binding on E. coli by W27 IgA. A future study is required to determine the unknown molecular patterns involved in IgA binding to E. coli.

We also addressed the question of what type of molecule W27 IgA recognizes to control the diverse commensal bacteria. We identified the epitope of W27 at the amino acid residue level. W27 recognizes the EEHI sequence of SHMT in highly specific manner (Fig. 2d,e). To understand the physiological importance of the EEHI motif in SHMT, we searched the bacterial species that share EEHI in SHMT among 2,739 strains whose genome sequences were available. They mostly belong to Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria, including many pathogens (Supplementary Table 2). Because we generated IgA-producing hybridomas from unimmunited mice kept under SPF conditions, the mice had never been exposed to the pathogens listed in Supplementary Table 2. The intestinal IgA that reacted with the EEHI sequence seemed to be preferentially selected in vivo (Supplementary Fig. 2). From our database search, we found that the bacterial species that do not have a glot gene encoding SHMT included several betteficial problectic bacteria such as 8. bifularer BGN4 and Faecal/bacterium prosenitzii L2-6 (and similar). Thus, for both macosal defence and the maintenance of symbiosis, the EEHI sequence that we identified can be a key sequence for bacterial selection by IgA in mice. We believe it is worth identifying the corresponding target sequence in humans.

Methods

Animal experiments. Unless specifically mentioned, mise were kept and bend under SFF conditions at Nagalama Institute of Bioscience and Technology. The Animal Research Consultations of Nagalama Institute of Bioscience and Technology. Yakalt Created Institute and DdS-BCA2 approved all animal Research Consultation of technology for the sector equal transform of male and fermine BALB/c background mice were used for all montest studies. All mice were between 8 and Dd werks old, merget for the mice root on Fig. 1c. No statistical methods were used to predictoration sample sizes. Animals were not medicationed, and the data collected were not Niloded. The investigators were not Niloded to allocation during experiments and estrome assessment encept for the experiments in Fig. 34. Hybridowna generation, Small intertines were collected and opened longitudinally, weaked with, PIS to remove all huminal contrain and shaken in PIS containing 5 mM 1572A for 20 min at 37 °C. Epifoldial cells were removed, and lamina proprin layers were rat into small pieces and incubated with SPMID640 containing 2% data bodies serues, 0.5 erg ml⁻¹ collapenas and 0.5 mg ml⁻¹ dispare for 1 h at 57 °C with shaking. After for remaining timors were removed, isolated lamina propris cells were walked with PIS and fourd with NS-1 cells using polyrithram given. The cell faxion and subclosing method followed the manufactures's protocol (ConstCell-NY Hybridowna Goming KB, STEMCELL Technologies), igA secreting hybridowna were selected by stundard analysis ELSA with gust arit mesas igA (Southers Biotech) and alkaline phosphatase compagated gost anti-mesas igA (Southers Biotech).

IgA preparation for E235A and oral treatment of solar. The antites from EAG2⁻¹¹ JuS7⁻¹² mine²¹ injected interpretationelly with JpA producing hybridizens or enhance supermutants of JpA producing hybridizens were collected and filtered. An equal volcarie of statusticit association unlifter solution was added to precipitate the JpA antihodies. After involution at 4 °C for 24 h, samples were centriliged for 20 min at 10.000g and 4 °C. The prifer was reconstituted with 59% astronomers solidite volutions and centriliged again. Finally, the prifer was reconstituted with 75%, followed by buffer change to 75% on a 7D-10 column (GE Healthcare).

IgA affinity-partification for interamobilat analysis, bucterial growth inhibition assay and flow optionstry. Antibody solutions precipitited with summerican within solution, as abow, were forther partified by affanity characterized with column (GE Hockknest) conjugated with SHMT-P1-BKA for W22 or HITrop column (GE Hockknest) conjugated with SHMT-P1-BKA for W22 or HITrop column conjugated with guid arti-mouse IgA antibody (Southern Bistech) for W2, W34 and W43. Standard ELISA was used to determine the concentration of each particle IgA antibody. For bacterial growth inhibition samp, perified means IgA partness down temasology Consultants Laboratory was applied onto a PD-18 column to dominate solution and/e and incubited with DHSto offs.

ELISA for binding away against bacteria. All bacteria were collected at 37 %C investight in appropriate media, in shown in Supplementary Table 4, sander masserolo: concellations (DON N₂, 1096 CO₂) in an anaerolo: concellation (DON N₂, 1096 CO₂) in an anaerolo: constrained or in an aerolo: chamber, The colo were constrained, without strip [265 and suppredict in 0.055 M Na₂CO₂ buffer to cost the platma (NUNC Mexico) at a concentration of -1×10^6 cells per well, tracept for B, occorder and B, lefdaw (-1×10^6 cells per well). The relative binding ability of [26 and deficient of the strip [200] and deficient of the strip [200] and deficient of the strip [200] and deficient with alkahim plangingtum conjugated goal anti-ensure [26, Oscothere Biotech]. ELISA plates were included at 4 %C secondigit, then optical density (OCD) values were transmission.

E235A for binding assay against synthesized paptides. Synthesized paptides (SEMT-71-75) contegated with E5A were obtained from Sigma and were suspended in 80.05 M Na₂OD₂ Suffer at 1 µg rel⁻¹ to out the plates. The relative binding ublittes of partified monoclosed EgA antibodies were manured as described down, OD values were estimated after incohorison at 25 °C for 50 relia.

Immunoblet analysis for bacturia and minimulan calls. All incircle were cultured ander appropriate conditions as described above. NS 1 and 2007 cells were cultured in RDMI1660 and DMIM medium, respectively, supplemented with 10% fetal calf structs, 2-ME and gentumycin. The bacterial cells were centrifuged and scapended in PDS containing 1% NP 40 and a proteinase inhibitor excitation (Nacaian). For 5. Jorna, J. ME and gentumycin. The bacterial cells were contributed and scapended in PDS containing 1% NP 40 and a proteinase inhibitor excitation (Nacaian). For 5. Jorna, J. Conv, B. convolute and B. Hijdhow, prospectre (0.2 ang ml⁻¹ v Wike) was added in PDS, then sociated and investment for 30 min on ion. Total Systems were denatored for SDS-DAGE, Macmutolian relis were creatifuged, sushed with PDS red scaperabil directly in SDS bacterial conditions. After electrophoresis, all proteins were transferred notes a situate Glav. The filter was included with blocking baffer (12-COR) followed by 2 µg ml⁻¹ each of partified non-colonal 1gA. To direct the bound 1gA, goat anti-scose IgA (Southern Bottech) and TB200contegrated unit goat 1gG (21-COR) were ment. The situation of market due to Object scatter (12-COR), to assess the account of budied bacterial protein, file deplicated SDS-DAGE goar anti-scose IgA (Southern Bottech) and TB200contegrated unit spet 1gG (21-COR). To assess the account of budied bacterial protein, file deplicated SDS-DAGE goar anti-scose and account of budied bacterial protein, file deplicated SDS-DAGE goar anti-scose Age (2009) (MIL, close PL14) and TB200terior conjugeted anti-school account of bacterial protein, file deplicated SDS-DAGE goar anti-scose and were score.

Bacterial call growth is basis minoire broth (Fuka Analytics) and Diano Larmbachi MRS broth (EO) at 32 °C overnight, respectively. They were then centrifuger), washed twice with 795, and dilated to -300-300 colls per 25 pl in 225 supplicemented with 10% (ort/vol) 05A and 20% microal at service and incohering for 3 h at 37 °C (with an without particle) W27 EpA or mIpA (repriorate derived rescore IpA particles) for an incohering for an additional 7 and 45 h at 37 °C in each proved median for growth suppression many (in Fig. 3). For Tig. 30, MEMMA2 and FWS and L caset were included for an additional 7 and 45 h at 37 °C in each proved median for growth suppression many (in Fig. 3). For Tig. 30, MEMMA2 and FWS and W2535 colls were exclused in 1.2 broth at 37 °C correspondent to -0.01 to 1.2×10^{2} erils per 25 pl in 2956 supplicemented with 15% (ort/wit) 78A and 20% merma rat servers. The colls were incohered with the dissignated (p), antibodies at 37 °C for 51 h and fatter incohered at 37 °C for 5 h with 1.20 broth (final conceptention, v0.05).

.

NATURE MICROBIOLOGY | VOL1 | SEPTEMBER 2016 | www.volum.com/volumenticablology

D 2018 Macmilian Publishers Limited, part of Springer Nation, All rights reserved.

ARTICLES

The ordin were them based in builder A (30 mM Trin-HOI (pH A.0), M0 mM NaC, 1 mM BDTA (pH A.0), 0.2% 6D56 on Beal Smash (TOMP) and incohord in the presence of proteinance K (0.2 mg ml⁻¹). Nacalal secondary of the Star C DEA was induced by phenolychlowedean estimation and perceptioned by efficient. Finally DNA was disolved in TE builter DNA was subjected to quantitative PCR with KAPA STRT TAST qUCR KK Optimized for lightCycler 440 (KAPAKDOSYNTEMS) with DDHSa specific primers (p. 5° - ACCITOGGGCCTOTTGGC - 5° and R: 5° -TIOCITOCOCCTGTAAAGTAC - 9° and L samit specific primers (0.5° TOGCGCAAGCTACOGCTTTT - 5° and L 5° - COCOGGACAAGCAGTACTGCT-5°) to measure cell samilars. DNA samples putified from the corresponding surchers of DDDs and L case of a size were used as qRCR standard to obtain the cell sampler.

Isolation: of bacterial strains from ensure factors. Firsh factor from wild-type mine larget in the SPP area of Nagabara Isotitute were surpended in PBS on Bead Senah (COMV). Dictord factors with PBS were seeded onto biological ager plates. The plates were incubated under another or anametics, conditions at 37 °C for two or from days, and individual colonies on the plates were picked up for PCR to identify factors were incubated under another or anametics, conditions at 37 °C for two or from days, and individual colonies on the plates were picked up for PCR to identify the 164 cROA grant sequences. Primore for PCR were as follower 277 (3' GGAGIOCITTGATYHEIGGYTCAG-3') and 1490K (5' GGGBTA/CITTGITA/OGA CITI-9). The resulting sequences were compared with sequences in the transmiscose species/strains. fibertified colonies were calclared independently and stored for subsequent experiments. For IgA Scheling screening, we used 14 strains of Instruction, ethich included air isolated strains from measure factors and eight closes purchased from ACC.

Mass spectrometry analysis, Immunopercipitatel proteins with W27 antibody from DEDa cell lysate were electrophoresed on two-dimensional SDS-PAGE gal. The W27-bound spot was separated and subjected to standard mass spectrometry. Briefly, the sample was loaded notes a name LC exploped with ProoPrit column (New Objection) directly coupled to a namesproy the of an high performance liquid chromotograph ion-trap time-of-flight mass spectrometer system (Risinadro).

Genetraction of SIBMT expression vector. The full-length gloA gene encoding SEME of DEISo was amplified with the following princers SEME-NotEE (9-OCGOEGCOCCCATGETEAAGCETEAAA-3*) and SEME-NotEE (9-AGACCEGCOCCCATGETEAAGCETEAAA-3*) where underland separates represent the recognition sites for NotE. NCE: frequent was closed into pCDNAA1 (+) (Institution) with SX Mye log at its 3' end. Other primers for closing of different bacterial status are shown in Sepplementary Table 5.

The printing and for managements were on follows: É. ord SEMT multi (Y-CAGGAMCACAACATGGAACTGGATGGOC-Y), E. ord SEMT multi (Y-GATGTGGGTGGTGCTGAOGTACTTTTTC-Y), L. ordet SEMT multi (Y-CGTCAGGAGGAGCATCGGAACTCATGGC-Y) and L. ordet SEMT multi (Y-TTGGATATGCTCCTCTGACGCTCTTC-Y).

Bacterial flow cytometry and sorting of W27 binding and mon-binding bacteria. The got contents of small intentine, concent and large intention from four male $A2D^{-1}$, mice [21] werks of age] were collected and suspended in 50 at P35. Increased and and add sorting were performed according to a previous report with minor readifications. Briefly, washed bacteria were suspended in 100 µJ P35 containing them status with 200 µJ bindies containing 250 µp ml⁻¹ of W27 for 30 min on ice, Samples were worked three times and them status with P5 compagated antireadifications, or the status of the status of the status of the status of the status (according to the status of the cytometry (Fig. 3), performed as described above. For bacterial working from gat with anti-F2 MACS baseds (Mdheeyt Boster) according to the none-facturer's instructions. After MACS superstation, the W27 binding and W27 tend-binding fractions were facture particle on a status (FACS) according to the status of the status of status of the status of the status of the status of the status of status of the status of status of the status of status of the status of status of the status of status of the status of status of the status

165 rRNA genu sequencing and analysis for W27 binding and new-binding bacterial DNA was isolated and perified according to the literature¹⁹ with minor modifications. In brief, bacterial samples were incubited with 15 mg ml⁻¹ (postyrm: (Walas) at 37 °C for 1 h, followed by incubition with perified antroemopepticles (2,000 tasks per ml, Walas) at 37 °C for 30 min. The samples were three incubated with 15s sedaces deductly suffare and 1 mg ml⁻¹ proteinance K (Marti) at 35 °C for 1 h. DNA was putified by plantificitorial incompt alcohol extraction and polyothylene given perificitors.

and providey-size gipton proceedings. The V's watable regions of the 165 rfRXA gyrae was simplified by PCR with deal burcoded primars as described previously?, PCR simplicons were purified by AMPare XP mapnetic particulation basils (Beckman Goober) and quantified using the Quart 4T Proofferen ds DNA Away Kit Cale Technologies lapse). The pooled simplicons were sequenced on a MSSeq (Classina, 2×220 bp paired-red reals) seconding to the manufacturer's instructions. The 165 rfRXA reals were processed, with Mathar Killweing the motion MSSeq (Classina, 2×200 bp paired-red reals) Mileq, SOP). In brief, the assemblied mode were screened to dimension reads constaining ambiguous bases and then aligned to the SUXA 165 rfRXA sequence database. UCHIME²⁰ was used to remove chickneric sequences. The remaining reads were choicerd into 97% identity operational transactic units (OTUs) and then assigned transmuty using the RDP database (trainset).032062.pcb). OTUs of less than 0.01% relative abundance were eliminated and the resulting OTU table was randing to 15,000 reads per samples.

Histology and immunohistochemistry. Perskly toolated colons were storp-functor embedded in optimum cutting temperature compound (Schum) in a Swim roll and stored at -40 °C Cryotat sections (6 µm) were Eard in architect at -20 °C for 3 min and stored with hierarchemistry, and its and with Alstan blue (Wide) and Nucleer Park Rol. For interarchistochemistry, solidit anti-mouse IgA was prachased from Rockland Antibodes R Assept and Alexa Toor 568 port cut-solved TyG was prachased from Life Technologies, Conconstructions matched intype control antibelit gat was prachased from Life Technologies, Conconstructions matched intype control antibelity of antibelity.

W2D seal treatment of make. For sE and frontinents of W27 except for that reported in Fig. 50, W27 (precipitude) with ammonium sulfate) was administered in driving water (kep scales) to mice ad librium. Drivining water with or without W27 was renewed (one a week. In the experiment in Fig. 56, 30 pg of affaity-penified W27 in 926 was administered to AED⁺¹ relate with a gustric table twice a week ad librium.

Flow cytometry analysis for germinal centre B calls. Peyo's patches were excluded from the small intention. Single coll surpressions were extined with the following antibodies (ellisaciones): PL-OyT-labeled anti-conserfination (CSISBI (S120)-(SAS-602), APC-labeled strupturidis. Biotiseplated pearant aggletissis was obtained from Vector Laboratories. Dead orth were excluded by propidium isolide. The statived samples were analysed on a BD Accent C6 (SD Bioscience) and with Kalana software (Deckman Cambro).

Bacterial cell members analysis for W22 and treatment, Incherial genomic DNA was instand, as described previously¹⁶. In brief, facul samples were suppresded in extraction buller (100 mM Tris FIC), 40 mM EDTA (pH 9.0) and 10% SDS). Gines beads (discorter, 0.1 min TOMY) and buller saturated piteroil were then added to the facul assperation. The suppressions were mixed suppression around the probability instrument (EO IDI, Vista). After contributions, the supervatants were collected, and DNA was extracted with physical/chlorodorm. Fundly, DNA was retractioned in TE-buller, qPCB amplifications and detection were preformed in NH-well optical plans on an A32 292087 29000T sequence detection system (Applied Dissystems) with griup specific primers for B. accorder group C. liptum subgroup, Mapoham chatry, Bacterials and Enterobacterianus (Sepplementary Table 3)⁹⁶⁻¹⁰, DNA samples

Lachduchta and Interoducterature (Sepportmetry Teller 19⁴¹). DNA samples parified from the corresponding number of cells derived from each type strain of eight bacterial groups were used as qPCR standard to obtain the numbers of each bacterial group.

We confirmed the uniqueness of amplification for the sight group-specific primer pairs by calculating the presentage of matched rENA grees sequences in each greens from the 52.07 detailsness (misses 11, updet at 14, used for 146 r-82NA green)²⁰ and the SELVA Large Solumit Ref database (misses) 117, used for 235 rENA green)²⁰ within one missestch with the 22.07 ProbeMatch (https://wip.ema.new.refut probematch/search.doy) and SELVA TestPrime programs (http://www.ach-ulini.do/ orachchedpetum). The results are provided in Supplementary Table 3.

DNA entraction for sequencing of 165 rRNA genue. Hences samples were incrindeted overrigid, Dwente-dried fasters were breaken with 33 mm streaded bands in a Shalar Matter (Distancial) Sciences). Then milliprotes of fasters were asoppended in 200 µl of 10% SDS/TE buffer, Bacherial cells in buffer were breaken weth 0.1 mm increativities breaks (StoSpec Products) by sugarous sizaking for 5 min et 1,000 space. The extracted DNA was postfield in plened/chlaredonenyls devided (25/24:1) solutions, proviptionel by adding refused and 3 M sodium acetate, and atoms of 20 °C.

Sequencing of 165 rRNA game. The effects of W27 oral treatment for mice get microbiots were analysed by two-reperiments, *Tirek*, comparison of the mean relative abundances of each family of microbiots before and after W27 oral treatment was conducted using a 454 GS RUNIOR sequencer-based 166 rRNA game sequencing analyse. Second, comparison of 97% signify OTU abundances of microbiots, between W27 and water oral treatment to wide type and AD⁻¹⁷ mice in D58 induced column annotacient assign an Elements MSeq sequencer-based 165 rRNA games samplected using an Elements MSeq sequencer-based 165 rRNA games samplected using an Elements MSeq sequencer-based 165 rRNA games samplected using an Element to wide type and AD⁻¹⁷ mice in D58 induced columns an medicetic using an Element to wide type and both reperiments, 3189 (5° -ACTOCICACGGAGGGAGGCAGCAGCA'')²⁷ and 8002 (5° -GGACIACCAGGGGTAGTACTA'')²⁷ princes were serve and to sample yield the 168 rRNA games of get microbiots. The mixed samples were prepared by pooling approximately require announce of 17CR amplicous fract, sample and were then understand to the 454 GS RUNDOR and Elements MSeq sequencer. In the 454 GS RUNDOR and Elements MSeq sequencer.

In the 434 GG [UNDOR sequences based analysis we obtained high-quality reads after erraneal of this reads that (1) contained anti-ignous reachestics, (2) constants of 150 or 1560 nt and (3) were associated with zero average Printed-like quality score of less than 25 as calculated by the 454 GB JUNDOR sequences. Both

KATURE ARCROBIOLOGY | VOL1 | SEPTEMBER 2016 | seekundurustancholumentohilinger

@ 2018 Maperillen Publishers Limited, part of Springer Nature, All rights reserved.

ARTICLES

NATURE MICROBIOLOGY DOE KO. KOMIC ROMOL 2016. 10

for forward and reverse primer sequences sere removed by a TogGeneer (remion 0.12) search with three allowed spleradders¹⁰. Sequence clustering of the high-quality 454 multi was conducted using UGLUST (remion 0.0307) with blentby: 97%, and query and reference coverage 100% (ref. 20). Chinaetic OTUS were detected and removed if the OTUS were assigned to chinaetic both of the following methods (1) a UCHIME (remion 0.0.307)²⁰ reference mode search against the reference gold database (http://docs.com/uniteerspiil.03) and (1) a UCHIME document and the search control of the shift of the (2) a UCHIME & rows made search. Texonomic assignment of the high-qual (54 mode was performed by a RDP MuDiClassifier (version 1.1) search with bootstrap value (4.5 (ref. 37).

In the Illumius Miller sequencer based analysis, we discarded much that (1) contained ambiguous nucleotides and (2) serve mapped to the PlaX genome sequence by a Bowlie 2 (version 2.1.0) search with default parameters¹⁰. Each Revenuel and serverse and for the paired send livery was then merged by a USEAAC(2) (version 6.8.307) with fasts, transqual 7 parameter. Both forward and reverse princer sequences were removed by a TagCasane search with three allowed minimum between the second by a TagCasane removed of the reads that (1) contained (250 or >650 at and (2) were associated with an average Pherol-Kee quality score of less than 25 as calculated by the Election MiSeq sequences. The 97% shorthy OTU clustering and chicasen Electing serve performal in the same way for the 454 GS RENIOR sequence based 165 rENA genes amplicon sequencing analysis. Gompositional differences of the 97% identity OTUs among mice with different treatments were visualized by bierosthical chatering analysis with the Imp-Cartis dissimilarity index and statistically analysed by a percentational multivariate and placed variance (PERMANOVA) in the regan library of the Rauffsoure.

D58-induced colitis. D58 (MP Biomedicals, Mg = 36,000-50,000), at designated renormations in the drinking water, (typechlorous acid) sources, in oraginated renormations in the drinking water, (typechlorous acid) source) was administered to unless all librium. The mice that dial before the end of the experiments (we water-treated mice and one W27-treated mouse in Fig. 5a) were excluded. Disease activity index was sourced based on criteria¹¹ (Supplementary Table 6) in a non-bladed fashion. The experiments were performed at Yalach Central Institute.

Celitis induced by adoptive transfer of CD4°CD4323^{54,0} T cells. Colum induced in Rag1⁻⁺ mile (CSTEL6) by adoption transfer of CD4 (CD4552)²⁴ T cells (CSTEL6), so described previously²⁶. Elistological access was determined as shown in Supplementary Table 7 (sef. 23) in a blinded fashian. Experiments were performed of IMS-RCAL

Statistics. Statistical analyses were performed by designated procedures as described. in such figure legend. P < 0.05 was considered significant

Accession codes. The nucleotide sequences determined in this study were deposited in the DOBJ Sequence Read Archive under DDBJ BioProject. ID no. PREDERZOT.

Received 5 February 2016; accepted 31 May 2016; published 4 July 2016

References

10

- Hooper, L. V., Littmin, D. R. & Macphenon, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. Science 336, 1268–1273 (2012). 2
- Hartenbuwer, G., Kostie, A. D. & Xavier, R. J. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbioms. *Instrumenty* 40, 843–854 (2014). х.
- Rossel, J. L. & Mazmussian, S. K. The got microbiota shapes intestinal intercon-responses during handli and illusine. Nature Rev. Journand. 9, 313–323 (2009), Branching, P. Socrettery 'ght designed for anti-microbial defense. Front Journanol. 4, 222 (2013). 4.
- 5. Marpherson, A. J. & McGoy, K. D. Independence day for IgA. Immunity 43, 414-418 (2015). 6. Pelsa, O. New concepts in the generation and functions of IgA. Nature Rec.
- of \$3, \$31-852 (2012)
- n A coating identifies collingenic bucteria in ź. Pales, N. W. et al. Imerschools
- Yohn, N., H. et al. anticology relation of containg internation comparison protocols inflammaturely bosonic diseases. *Cell* **1988**, 1000–1010 (2014).
 Mantin, N. J., Bol, N. & Gostharen, B. Serawhury IgA's complex roles in immune and mucessal hormovitasis in the get. *Massead Internated*. **4**, 603–611 (2011).
 Iterardinang, P., Fjellunger, I. & Goreldsen, S. T. Advorptions of immune A or oral bacteria in viro. *J. Stachested*. **96**, 242–249 (1968).
- 10. Kas, A. L. et al. Punctional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from
- undernourbled Makestan children that produce diet-dependent enteropathy. Sci. Transf. Med. 7, 276x224 (2015). 11. Tagaresan, S. et al. Critical roles of activation induced cyticline deamin
- Intersections of gut Gora. Science 299, 1424-1427 (2002). 12. Web, M. et al. Mice carrying a knock investation of Akida read/ing in a defect in
- somatic hypermetation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. Nature Increased. 12, 264–270 (2011).
- Aturabis, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Classical strains from the human microbiots. Nature 500, 212–236 (2013).

- 14. Gevers, D. et al. The treatment-naive scicrobiogie in new coast Groba's disease Gell Hest Microbe 15, 392-392 (2014).
- Andoh, A., et al. Multicenter analysis of focal microbiota profiles in Jap patients with Cosins's churze. J. Gastrowstevel. 47, 1296–1307 (2012).
 Lasarre, J. 7. et al. A complementic study of Eulerichia oil using her-tering patients. 2018; 2019.
- discensional Star native/SZ6 polyacrylazzkie pd electrophornia. Biotrophor 27, 3306–3321 (2006).
- Link, A. J., Bubbion, K. & Church, G. M. Comparing the predicted and a properties of proteins encoded in the genome of Eicherichia and K-12. Electrophoweris 18, 1259–1313 (1997). 18, Weiner, J. H. & Li, L. Protocene of the Eicherichie soft new
- technological challenges in membrane proteome analysis. Rochim. Biophon. Leta 1778, 1698-1713 (2008).
- Bobs, T. et al. Constructions of Eulowishia cell K-12 in frame, single grave intecloset metastas the Kein collection. *Mol. Syst. Rol.* **2**, 200610001 (2006).
 Nichola, B. I. et al. Physicipic insolucity of a bacterial cell. Gell 144, architecture interview.
- 143-156 (2011)
- Matsuki, T. et al. Quantitative PCR with 165 eIDNA-gene targeted species-specific primers for analysis of human intentinal billebutteria. Appl. Environ. Microbiol. 70, 167–173 (2004).
- Gooper, H. S., Murthy, S. N., Shuh, R. S. & Solorgran, D. I. Clinicopologic study of destrue solidar solium experimental murine colitis. Lab Josef. 49, 1 238-249 (1999).
- Associate, C., Manze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powyle, F. An essent
- Ono, A. et al. Goopparative study of human homotopoietic cell engedhesent into DALD/c and CSPEL/6 strain of sug-2/silo double-deficient mice. J. Biomed.
- Biotechnol. 2011, 530748 (2011). 26. Morita, H. et al. An improved DNA instation method for metagers andysis of the microbial flora of the human intestine. Microber Division, 22, 214-222 (2007).
- 27. Kenich, J. J., Westcott, S. L., Baster, N. T., Highlander, S. K. & Schloss, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing sampleon sequence data on the Miller Illustics sequencing plotform. Appl. Environ. Marabiol. 79, 5112–5120 (2013).
- 26. Edgist, R. C., Hais, B. I., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves usualizing and speed of chimers detection. Disinformatics 27, 2194-2200 (2011)
- 29. Matoda, K., Tanji, H., Audura, T., Kado, Y. & Nomoto, K. Sewittve quantitat detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse manacription PCR, Appl. Environ. Microbiol. 73, 32–39 (2007).
 Mathold, T., Watanalon, K., Fejimote, J., Talaada, T. & Tanaka, R. Use of 165
- rRNA gene-largeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacterin in human feers. Appl. Environs. Microbiol. 70, 7220-7228 (2004). 11. Rinttin, T., Kassissen, A., Malinen, B., Krogius, I., & Palva, A. Development of an
- extensive set of 165 rDNA targeted petroses for quantification of pathogenic and indigenous burteria in fascal samples by real-time PCR. J. Appl. Microbiol. 97, 1166-1177 (2004).
- 32. Gale, J. R. et al. Réposonnal Database Project: data and tools for high throughput (SNA analysis, Nuclei: Acid: Res. 42, D603-D612 (2014).
- 33. Quark, C. et al. The SLVA ribusonial XNA gener database pr hworeni tries data processing and web-based toxis. Nucleic Acids Res. 41, D1990-D1996 (2013). 34. Walter, L et al. Detection and identification of gustraintestinal Lactobusillar
- species by using destituting gradient gil distrophorenia and species specific PCR primers. Appl. Environ. Microbiol. 66, 297–303 (2000).
 Osek, I. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shign train-producing Endoerichia and station and their reajor virulence factor genes.
- J. Appl. Microbiol. 95, 1217–1225 (2003). M. Schmieder, R., Lim, Y. W., Robwer, F. & Edwards, R. TagGesser: identifica and retrieval of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. BMC Bioinformatics 11, 341 (2018).
- 37. Wang, Q., Garrity, G. M., Tirdje, J. M. & Gaie, J. R. Naber Beyesian classifier for repii intigratient of 100CA sequences into the new Interfal transacty. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5261–5267 (2007).
- 34. Langer Langmand, B. & Salaberg, S. L. Fast gapped and alignment with Bowtie 2. Nature Methods 9, 357–359 (2012).
- Paresaves, Y. et al. Concernenal excepte derived betyrate induces the differentiation of colonic regulatory T orl. Nature 304, 446–450 (2013).

Acknowledgements

he authors thank T. Honio for prevaling AID¹²⁰¹ and AID¹⁰¹ mixe, Dr H. Nika for revaling E. cell strains MI30012 and P072135.5. Noncata and M. Ofra for technical help, ad T. Nakano, K. Asoh and V. Statvaro- for cettical reading. This work was supported by

NATURE MICRORICE.OGV | VOL11SEPTEMBER 2016 | www.nature.ctvr/scharenit.eduloge

@ 2016 Macmilian Publishers Limited, part of Springer Nation. All rights reserved.

NATURE MICROBIOLOGY DOI: 10.1038/14MIC ROMOL.2014.103

ARTICLES

guests from the Japan Science and Technology Agency, INFS KAKENHE 215154232, Yakah Bio-Science Promoticion, Natio Memorial Frankrism, Semilain Medical Basearch Frankrism and Antilai Frankrism for Breazerch on Metabolic Disorders (in E.S.) and also by AMED-CREST, AMED and RIKEN Promoving Project Thilogy of Symbiosia (in EQ.).

Author contributions

Scotas, EU, and RS, designed and performed supermosts, analysed data and were the poper. SChai, S.Y., YJL, TS, and MJE, performed pathological analyses. SM, MJN, TS, and Y.W. previded live anamolic bacteria and performed bacterial qPCR analysis. MJR, performed mass spectrosectry. SCNai, RS, SM, RM, and EO, were involved in induced cultiti supersectors. EM, and HO, performed WIP building bacterial sectors and related sectors. bioinfromatics analyses, T.K., H.O., K.Y., E.N., K.M., T.Y. and K.K. performed ackyrobiomer bioinfromatics analyses for ancibody-transfol mice. SOkida pre-shed suscerial networks, 8.Okia, E.C., R.S., S.M., H.O., K.K., H.M., K.M. and T.K. were involved in data discussions.

Additional information

Explorements y information is available online. Reprints and permanants information is adultic online a over-station contreposition. Correspondence and exposets for materials double be addressed to R.S.

Competing interests

The suffices declare no competing financial increases.

NATURE ARCROBIOLOGY | VOL1 (SEPTEMBER 2016) www.antura.ters/informitorbinings

11

ID 2016 Macmillan Publishers Limited, paid of Springer Nation, All rights reserved.

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

IgA 抗体と腸内細菌との相互作用は、まだ未知の部分が多く、今後のさらなる基礎研究が必要である。そのために目的として掲げていたイメージング技術の完成は必須と考えられ、今後も継続して開発につなげたい。

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

*1) Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. Nat Microbiol. 2016 1(9):16103. 査読有

<学会報告>

- 1)腸内細菌制御における腸管 IgA 抗体体細胞突然変異の役割。新蔵礼子。第18回腸内細菌学会、特別講演(招 待講演)2014年。
- 8 IgA 抗体は多種類の腸内細菌の同一タンパク質を認識し制御している。臼井文人、岡井晋作、長谷川慎、山本和也、西山依里、森宙史、山田拓司、黒川顕、新蔵礼子。第37回日本分子生物学会、パシフィコ横浜2014年。
- *3) <u>腸炎モデルマウスに対する腸管IgA抗体の作用機序の解明。岡井晋作、臼井文人、野村慎太郎、中村肇伸、山本和也、西山依里、森宙史、山田拓司、黒川顕、加藤保、大野博司、新蔵礼子。第37回日本分子生物学会、パシフィコ横浜2014年。</u>
- *4) Oral administration of dimeric monoclonal IgA antibody as a candidate therapeutic approach for spontaneous colitis in mice. Shinkura R. 第22回日本消化器関連学会週間(招待講演)神戸国際展示場 2014 年。
- *5) Oral administration of poly-reactive high-affinity IgA monoclonal antibody against intestinal microbiota improved inflammatory colitis in mice (invited).. Okai S., Horii Y, Shiraki,Y, Matsumoto S, Naitoh, T, Nanno M, Nomura S, Shinkura R.13th International Congress of Immunology, Milan, Italy, 2013
- 6) Monoclonal intestinal IgAs are poly-reactive against commensal bacteria but recognize a single protein expressed by multiple bacteria. Usui F, Shinsaku Okai, Hasegawa M, Shinkura R. 13th International Congress of Immunology, Milan, Italy, 2013
- *7) <u>Oral administration of poly-reactive high-affinity IgA monoclonal antibody against intestinal microbiota</u> improved inflammatory colitis in mice.. Okai S., Horii Y, Shiraki,Y, Matsumoto S, Naitoh, T, Nanno M, Nomura S, Kurokawa K, Yamamoto K, Mori,H, Yamada T, Shinkura R. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張、2013.
- 8) Monoclonal intestinal IgAs are poly-reactive against commensal bacteria but recognize a single protein expressed by multiple bacteria. Usui F, Shinsaku Okai, Hasegawa M, Shinkura R. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張、2013.

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」

(平成 24 年度~平成 28 年度)

研究成果報告書

テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」

テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」

研究機関・研究室名:バイオサイエンス研究科・植物分子環境生理学研究室 担当者職名・氏名:教授・蔡 晃植 研究協力者:神村 麻友、上坂 有矢、金谷 俊明、鬼頭 信貴、奥坂 綾太、 高橋 弘輝、韓 宇龍、木村 誠、千坂 麻美

1. 研究目的

植物は病原菌を認識すると、一過的な細胞内の Ca²⁺濃度の上昇やキナーゼの活性化などが認められ、それ に引き続き活性酸素種の発生、免疫応答遺伝子の発現誘導、過敏感細胞死の誘導などの様々な免疫反応を 誘導することが知られている。しかし、これら病原菌認識情報の細胞内伝達機構や免疫反応の誘導機構につい てはまだ未知の部分が多い。近年、光学機器の発展や蛍光イメージングの技術革新により、今までは観察出来 なかった分子の挙動を非破壊で観察することが可能になりつつある。そこで、生体イメージング装置を用いて植 物免疫反応の誘導機構を解析できる新たな蛍光イメージング技術の開発を試みた。このような蛍光イメージン グ技術を用いることで、免疫反応誘導時における植物体内での分子の挙動を可視化し、より俯瞰的に病原菌認 識機構や免疫反応の誘導機構を解析することが可能となる。本プロジェクトでは、走査電子顕微鏡を用いて細 胞レベルでの活性酸素種発生のイメージングし、細胞内のどの部分から活性酸素種が発生しているのかを明ら かにする。また、蛍光タンパク質を用いて細胞内 Ca²⁺濃度の変化を時空間的にイメージングし、植物の病原菌認 識における Ca²⁺濃度変化の役割について知見を得る。さらに、大腸菌を用いたタンパク質相互作用の新しいイメ ージング系を確立し、酵素基質反応のような一過的な相互作用を個体レベルで解析しうる検定系を構築し、構 築した検定系の有効性について検証する。

2. 研究内容

1)テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」

①セリウム塩法による活性酸素種発生のイメージング

イネは、イネ褐条病細菌 Acidovorax avenae のイネに対して非病原性の N1141 菌株を認識して免疫反応の一 つである活性酸素種の発生を誘導する。そこで、このときの活性酸素種発生を時空間的に解析できる系の構築 を行った。塩化セリウム(CeCl₃)は、過酸化水素と反応すると直ちにセリウム水酸化物(Ce(OH)₂OOH)の沈殿を 生じ、沈着する。この反応産物は有機溶媒にも不溶で電子線を透過しないことから、活性酸素種の発生部位を 詳細に解析するうえで有用であると思われる。イネ非病原性 N1141 菌株をイネ培養細胞に接種した後、この細 胞をセリウム溶液で処理し、低真空走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、非病原性菌株接種後 3 時間のイ ネ培養細胞では、表面に点状のコントラストの高い部分を持つ細胞が全細胞数の約 5%で見られ、この部位は 接種後6時間でさらに広がった(図 1)。このような高コントラスト部位は、イネに対して免疫反応を誘導しない非病 原性 H8201 菌株を接種した細胞や蒸留水を処理したコントロール細胞ではほとんど見られなかった。



図 1. A. avenae 非病原性 N1141 菌株または病原性 H8201 菌株接種後のイネ培養細胞における過酸化水素発 生部位の低真空 SEM による検出

(a)非病原性の N1141 菌株接種後、3 時間のイネ培養細胞。矢印はセリウム反応物が反射電子像として白く見られる。(b)*A. avenae* N1141 菌株接種後、6 時間のイネ培養細胞。四角1、2 はX 線解析を行った部位を表している。(c)病原性の H8201 菌株接種後、6 時間のイネ培養細胞。(d)滅菌水処理したイネ培養細胞。バーは5 µm を示す。 このセリウムと過酸化水素の反応物がコントラストの高い部分に存在することを確かめるために、X 線解析を行ったところ、高コントラスト部位では Ce-Lα、Ce-Lβによるピークが認められたのに対し、周りの部位ではそのようなピークは検出されなかったことから、この高コントラスト部位にはセリウムが局在していることが確かめられた (図 2)。以上のことから、非病原性菌株の接種によりイネ培養細胞で認められる活性酸素の発生は一部の細胞で認められ、さらにこの産生部位は細胞表面で局所的であることが示された。



図 2. 非病原性 N1141 菌株接種後のイネ培養細胞における X 線スペクトラム 図 1(b)の(1)枠 1 部分、(2)2 枠部分の X 線解析し、Ce-L α と Ce-L β を検出した。ピークは高い方から Ce-L α、 Ce-L β 1、Ce-L β 2 を示す。

さらにイネ培養細胞での過酸化水素発生部位における菌体への影響を観察するために、セリウム反応物の沈 着部位について詳細に観察した。反射電子像により確認されたセリム反応物の沈着部位を拡大すると、高コント ラスト部位の近傍に存在する非病原性 N1141 菌株はセリウム沈着物質に一部覆われていることが観察された (図 3)。これらのことから、非病原性 N1141 菌株によって誘導された過酸化水素は菌体の付着している細胞表面 側へと拡散し、その結果、菌体の周囲では高濃度の過酸化水素が存在し、菌体の増殖抑制に関与していること を示唆している。



図 3. A. avenae N1141 菌株接種により誘導される過酸化水素発生部位の検出 (a) 塩化セリウム処理をしたイネ培養細胞の反射電子像 (b)同じ細胞の二次電子像(c)(b)拡大像。白の矢印は 細胞表面の非親和性菌はセリウム反応物によって覆われている。バーは(a)(b)=5 µm、(c)=1 µm

次に、イネ培養細胞の表面構造と過酸化水素の発生部位との関連を明らかにするために、反応産物の集積 部位を透過型電子顕微鏡により観察した。その結果、非病原性菌株接種後6時間では、菌体が付着している培 養細胞の表層部分にイネ細胞膜の陥入が見られ、セリウム反応産物の著しい蓄積が細胞壁と細胞膜外側で認 められた(図 4)。また陥入した細胞膜部分や細胞内のベシクル内でも反応産物が見られた。以上のように、活性 酸素の発生部位を細胞レベルで、サブオルガネラレベルで調べることができるイメージング系を確立することが 出来た。



図4. イネ培養細胞への非病原性N1141菌株接種により誘導される過酸化水素発生部位の透過型電子顕微鏡 による検出

(a) セリウム反応物(CD)は細胞壁(W)、細胞膜、細胞内ベシクル(矢印)と細胞表面の菌体周囲で認められる。 ER: 小胞体、MVB: multivesicular body、P: パピラを表す。バーは 0.5 μm を示す。 2)テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」 ①YC3.6 を用いたカルシウムイメージング系の確立

植物細胞において、環境応答、ホルモン応答、病害応答などの様々な刺激により細胞外やオルガネラから細 胞質中へ Ca²⁺の流入が誘導され、セカンドメッセンジャーとして細胞内シグナル伝達系において重要な役割を果 たしている。特に、この Ca²⁺の流入はそれぞれの刺激特有の時間的・空間的なパターンがあり、このパターンの 違いによって情報が識別されていると考えられている。そこで、細胞内 Ca²⁺シグナルを可視化し、Ca²⁺動態の解 析をモニターする系の構築することを目的とした。Ca²⁺動態の解析には、Yellow cameleon 3.6 (YC 3.6)という、 ECFP、Calmodulin、M13、EYFP からなる Ca²⁺センサータンパク質を用いた。YC 3.6 は、Ca²⁺存在下で Calmodulin が活性化されて構造変化を生じ、励起された ECFP (Donor) から EYFP (Acceptor) に蛍光エネルギーの共鳴移 動 FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) が起こり、ECFP の強度が減少し、EYFP の強度が上昇する。 この ECFP と EYFP の蛍光強度比 (Ratio) をモニターすることで、細胞内の Ca²⁺の変動を可視化することが出来 る(図 5)。



図 5. YC3.6 が Ca²⁺を認識するメカニズム

植物病原細菌 A. avenae のイネに対して非病原性 N1141 菌株の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンがイネ 免疫反応を誘導するが、病原性 K1 菌株のフラジェリンは免疫反応を誘導しないことが明らかになっている。そこ で、YC3.6を用いて、N1141 菌株及び K1 菌株のフラジェリン処理後のイネ培養細胞内の Ca²⁺動態の解析を試み た。植物の過剰発現プロモーターである Ubiquitin プロモーター下に制御された YC 3.6 遺伝子をパーティクルボ ンバードメント法によりイネ培養細胞に導入し、約 12 時間静置培養した後、イネ培養細胞に N1141 菌株のフラジ ェリンまたは K1 菌株のフラジェリンを処理し、その直後より共焦点レーザー蛍光顕微鏡 FV-1000を用いて FRET の測定を開始した。その結果、N1141 菌株フラジェリン処理では、測定開始約 20 秒後から細胞内 Ca²⁺濃度の上 昇が認められ、処理 3 分後には 2.5 倍まで上昇することが明らかとなった。また、Ratio 値の強度を擬似カラーで 表示したところ、この Ca²⁺濃度の上昇はイネ培養細胞内に均一に広がり、また細胞全体で上昇していることが明 らかになった。この細胞内 Ca²⁺濃度の上昇は測定を終了した 6 分後まで続いたが、病原性 K1 菌株のフラジェリ ン処理では、このような細胞内 Ca²⁺濃度上昇は認められなかった(図 6)。このことから、イネ培養細胞は N1141 菌株のフラジェリンを認識し、特異的に細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こしていることが示された。



図 6. N1141 菌株または K1 菌株のフラジェリンを処理した後の Ca²⁺濃度の動態 YC3.6を一過的に発現させたイネ培養細胞に精製フラジェリンを処理後、細胞内の Ca²⁺濃度の動態をモニターし た。YC3.6 発現培養細胞から得られた EYFP/ECFP の Ratio 画像を3×3 pixel で平均化し、Ratio 値の強度を256 階調の擬似カラーで表示した。

さらに非病原性N1141菌株フラジェリンによって特異的に引き起こされるCa²⁺濃度の上昇はフラジェリンの濃度 依存的に認められるのかを明らかにするために、フラジェリン終濃度 10~50 μg/ml となるようにイネ培養細胞に 処理し、Ca²⁺濃度の動態を観察した。その結果、K1 フラジェリンではどの濃度においても Ca²⁺濃度の上昇は認め られなかったのに対して、N1141 菌株のフラジェリンではフラジェリン濃度依存的な Ca²⁺濃度の上昇が認められ た(図 7)。



図 7. N1141 菌株または K1 菌株のフラジェリンを処理した後の Ca²⁺濃度の動態 YC3.6を一過的に発現させたイネ培養細胞に精製フラジェリンを処理後、細胞内の Ca²⁺濃度の動態をモニターし た。

次に、このような N1141 菌株フラジェリン特異的な細胞内 Ca²⁺濃度上昇へのカルシウム阻害剤が及ぼす影響に ついて調べた。カルシウム阻害剤としては、10 mM EGTA、1 mM nifedipine、5 mM LaCl₃、1 mM GdCl₃を用いるこ ととした。非病原性である N1141 菌株の精製フラジェリンをイネ培養細胞に処理し、Ca²⁺動態を解析したところ、 10 mM EGTA、および 1 mM nifedipine 存在下では N1141 菌株フラジェリン処理による一過的で強い Ca²⁺濃度上 昇は完全に抑制されていることが明らかになった。一方、5 mM LaCl₃、および 1 mM GdCl₃存在下では N1141 菌 株フラジェリン処理により中程度の Ca²⁺濃度上昇が認められることが明らかとなった(図 8)。これらのことから、 N1141 菌株のフラジェリン処理によって誘導される一過的な細胞内 Ca²⁺濃度上昇は、細胞外から細胞内への Ca²⁺流入によることを示している。

以上のことから、YC3.6 を用いて細胞内 Ca²⁺濃度の動態をイメージングする系が確立できたと言える。さらに、 このイメージング系はフラジェリン処理濃度依存的な Ca²⁺濃度の変化についてもモニタリングすることが可能で あり、非常に詳細に Ca²⁺濃度の動態をモニターできることが示された。



図 8. YC3.6 発現イネ培養細胞を用いたカルシウム阻害剤の細胞内 Ca²⁺動態への影響

YC3.6 を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、N1141 菌株の精製フラジェリン処理後の細胞内 Ca²⁺濃 度の動態へのカルシウム阻害剤の影響を調べた。(A) 10 mM EGTA、(B) 1 mM nifedipine、(C) 5 mM LaCl₃、(D) 1 mM GdCl₃を加え、終濃度 25 μ g/ml の N1141 菌株の精製フラジェリンをイネ細胞内に処理し Ca²⁺濃度の変動を モニターした。

②大腸菌を用いた BiFC 法によるタンパク質間相互作用の検定系確立

キナーゼのような酵素の基質分子を探索することを目的とし、一過的な相互作用でも検出することが出来る検 定系を Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC) 法を用いて構築した。BiFC 法は GFP などの蛍光タン パク質を分割し、その分割した蛍光タンパク質同士が再会合することによって再び蛍光を発するようになるという ことを利用した方法である。この検定系の評価分子には、一般的によく知られているキナーゼである MAPK を用 いることにした。これまでに、イネの MAPK の一つである OsMAP1 は MAPKK である OsMEK1 と相互作用し、 OsMAP2 や OsMAP3 とは相互作用しないことが明らかになっている。まず、OsMEK1 と OsMAP1 との特異的な相 互作用が BiFC 法によって観察出来るかどうかをイネプロプラストで確認した。OsMEK1-Vn、OsMAP1-Vc、 OsMAP2-Vc だけを発現させたプロトプラストは、BiFC 由来の蛍光が観察されなかった。次に、相互作用が確認 されている OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc を発現させたところ、核と細胞質で BiFC 由来の蛍光が観察された。一 方、相互作用しないことが明らかとなっている OsMEK1-Vn と OsMAP2-Vc を発現させたプロトプラストでは BiFC 由来の蛍光は観察されなかった。以上のことから、BiFC 法によって OsMEK1 と OsMAP1 の特異的な相互作用を 検出することが可能であると明らかになった(図 9)。



図 9. イネプロトプラストにおける BiFC 法を用いた OsMEK1 と OsMAP1、OsMAP2 のタンパク質間相互作用の解 析

OsMEK1-Vn、OsMAP1-Vc、OsMAP2-Vc のそれぞれ単体と、OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc、OsMEK1-Vn と OsMAP2-Vc の組み合わせでイネ培養細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光を観察した。これら のプロトプラストには全て形質転換を確認するために DsRed を発現させている。バーは 10 µmを示す。

次に、相互作用タンパク質を簡便にスクリーニング可能な検出系を構築するために、大腸菌 Rosetta-gamiB 内でも OsMEK1 と OsMAP1 の特異的な相互作用が BiFC 法で観察出来るかを検討した。各組み合わせで遺伝 子導入した Rosetta-gamiB に IPTG を添加し、BiFC 由来の蛍光を検出したところ、IPTG 添加後、3 時間から OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc を発現させた Rosetta-gamiB で BiFC 由来の蛍光が認められた(図 10)。このような 蛍光は、相互作用しないことが報告されているタンパク質間では認められないことも明らかとなり、本検定系は キナーゼと基質の特異的な相互作用を検出出来ることが示された。



図 10. 大腸菌 Rosetta-gamiB を用いた BiFC 法による特異的な相互作用の検出

(A) LB 寒天培地(スペクチノマイシン終濃度 50 µg/ml、トリメトプリム終濃度 50 µg/ml)に画線した大腸菌 Rosetta-gamiB の BiFC 蛍光を検出した。それぞれのベクター(1: *Venus/pETTp*、2: *Vn/pETTp* と *OsMAP1-Vc/pCDF*、3: *OsMEK1-Vn/pETTp* と *OsMAP1-Vc/pCDF*、4: *OsMEK1-Vn/pETTp* と *OsMAP2-Vc/pCDF*、5: *OsMEK1-Vn/pETTp*と*OsMAP3-Vc/pCD*F、6: *OsMEK1-Vn/pETTp*と*GUS-Vc/pCDF*) を大腸菌 Rosetta-gamiB にエレクトロポレーション法で共導入し、生育してきたコロニーを掻き取り、LB 寒天培 地上に乗せたナイロンメンブレンに画線した。37°C、16 時間培養後、メンブレンを持ち上げ、その下の培地に 1 mM IPTG 溶液 500 µl を添加し、遮光して 25°C、6 時間静置後、蛍光イメージング装置 FLA-3000 で BiFC 由来 の蛍光を観察した。(B) 形質転換した Rosetta-gamiB 内で目的タンパク質が発現しているかを抗 GFP 抗体で確 認した。*は非特異的なバンドである。 この構築した検定系を用いて、植物の情報伝達に非常に重要であるカルシウム依存性プロテインキナーゼ、 OsCPK8の基質分子をスクリーニングしたところ、OsCPK8と相互作用を示す分子として CS-1、CS-2、CS-3の3 つを同定することが出来た(図 11)。これらはそれぞれ Enolase 1、Guanine-nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor GTPase (ARF-GEF)、Peptidyl prolyl isomerase (PPIase)をコードすることが明らかにな った。これらタンパク質は実際にイネ細胞内でもOsCPK8と相互作用することが確認されたことから(図 12)、構築 したスクリーニング系で酵素基質反応のような一過的に相互作用するタンパク質を同定することが出来ることが 示された。



図 11. 大腸菌 Rosetta-gamiB を用いたスクリーニング

大腸菌 Rosetta-gamiB 内で OsCPK8-Vn と相互作用を示す CS-1、CS-2、CS-3 の BiFC 蛍光を蛍光イメージン グ装置 FLA-3000 で観察した。



図 12. イネプロトプラストにおける OsCPK8, CS1, CS2, CS3 の細胞内局在性の解析とタンパク質間相互作 用の解析

(A) OsCPK8-Venus、CS1-Venus、CS2-Venus、CS3-Venus を発現させた細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、それぞれのタンパク質の細胞内局在を確認した。(B) 各 Vn 融合タンパク質 CS1-Vn、CS2-Vn、CS3-Vn と OsCPK8-Vc との相互作用を確認した。B. F.: Bright field

③GFP 発現植物病原性細菌の植物内における経時的分布変化モニタリング系の確立

病原性細菌が植物に感染後にどのように分布するのかを非破壊で時空間的に解析できる系の構築を試みた。 まず、検定に用いる菌株と宿主植物を選定するためにいくつかの菌株をそれぞれの植物に接種し、病徴発現を 観察したところ、タバコ野火病菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6606 株をタバコ(*Nicotiana* benthamiana)に接種した時には病徴が認められず、病害抵抗性反応の一つである過敏感細胞死が認められた ことから、この病原細菌株とタバコは非親和性関係にあると結論づけられた(図 13)。



接種直後

9日日

図 13. P. syringae pv. tabaci 6606 株を接種したタバコ葉の経時的変化 1×10⁸cfu/µlとなるように調製した P. syringae pv. tabaci 6606 株を播種 3 週間後のタバコの葉にインフィルトレ ーションし、接種後2日目と9日目を観察した。

一方、トマト Solanum lycopersicum (Money Maker)に斑点病菌である Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (PstDC3000)株を接種したところ、明瞭な病徴が観察されたことから、この病原性細菌とトマトは親和性関係に あることが示された(図14)。



図 14. PstDC3000 を接種したトマトの葉の経時的変化

1×10⁸cfu/mlとなるように調製した PstDC3000 を播種 3 週間後のトマトの葉にインフィルトレーションし、接種後 4日目を観察した。

次に、PstDC3000 をトマトに接種したときの時空間的分布を解析する系を構築するため、まず、カナマイシン耐 性遺伝子のプロモーターに GFP を連結させた *pPNptGreen* ベクターを PstDC3000 に導入した。作製した組換え PstDC3000 は明瞭な GFP 蛍光を有していたので、この菌をトマトに接種し、生体イメージング装置 Lumazon で観 察した。その結果、接種 1 日後には接種部位全体で GFP 蛍光が認められ、接種 2 日後から徐々に葉全体へ GFP 蛍光が広がることが認められた(図 15)。





図 15. GFP を発現した PstDC3000 を接種したトマトの葉における経時的な蛍光画像

1×10⁸ cfu/ml となるように調製した GFP 発現 PstDC3000 を播種 3 週間後のトマトの葉にインフィルトレーション し、接種後 1~7 日目のトマトの葉を、蛍光イメージング装置 Lumazon を用いて GFP 蛍光を観察した。白矢印は 接種部位を示す。 さらに、この葉を実体蛍光顕微鏡で観察したところ、接種1日後には GFP 蛍光が認められ、その GFP 蛍光は葉脈に沿ってドット状に認められることが示された。また接種後2日目からは接種部位以外でも病斑が認められ、 その蛍光は徐々に病斑全体に広がっていくことが観察された(図16)。



図 16. GFP を発現した PstDC3000 を接種したトマトの葉を実体顕微鏡で観察したときの明視野像(上段)と蛍光像(下段)

1×10⁸cfu/mlとなるように調製した GFP 発現 PstDC3000 を播種 3 週間後のトマトの葉にインフィルトレーション し、接種後 1~7 日目のトマトの葉を実体顕微鏡により経時的に観察した。

さらに詳細に PstDC3000 の存在部位を明らかにするために、GFP 蛍光が消失しない状態で植物を脱色するこ とが出来る Clear See 脱色液を用いてトマト葉を脱色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、PstDC3000 は葉脈と葉全体の細胞間隙に多数存在していることが明らかになった(図 17)。また、このときの菌体数を測定し たところ、接種後 7 日目で 100 倍程度増加していることが認められた(図 18)。以上のことをまとめると、 PstDC3000 の病徴は経時的に葉全体へ広がり、このときの病斑形、病斑の形成と菌株の増加は時空間的に一 致していることが初めて明らかになった。



図 17. GFP 発現 PstDC3000 を接種したトマトの葉の内部構造

1×10⁸cfu/ml となるように調製した GFP 発現 PstDC3000 を接種 3 週間後のトマトの葉にインフィルトレーション し、接種後 7 日目のトマトの葉を ClearSee 脱色液で脱色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP 蛍光の観察 を行った。(A)接種部位、(B)病徴が認められた部位。 バーは 10 μm を示す。



図 18. トマトの葉における GFP 発現 PstDC3000 の菌体数の推移 生育3週間目のトマトの葉に GFP 発現 PstDC3000 が1×10⁶cfuとなるようにインフィルトレーションし、接種後0、 1、3、5、7 日目の葉をすり潰し、菌体数を測定した。t-test(*: p<0.05) 次に、PstDC3000 と N. benthamiana を用いて非親和性関係における病原菌の時空間的分布についても調べた。GFP を発現した PstDC3000 を N. benthamiana に接種すると、接種1日後に過敏感細胞死斑が認められ、7日後まで変化がなかった(図 19)。この時の GFP 蛍光を観察したところ、接種直後はほとんど GFP 蛍光が認められなかったが、接種後1日目から接種部位で GFP 蛍光が認められた。この GFP 蛍光は7日経っても接種部位より外に広がることはなく、その蛍光は徐々に弱くなることが示された(図 20)。





図 19. GFP を発現した PstDC3000 を接種したタバコの葉の明視野像(上段)と蛍光像(下段) 1×10⁸cfu/ml となるように調製した GFP 発現 PstDC3000 を播種 3 週間後のタバコの葉にインフィルトレーショ ンし、接種後 1~7 日目のタバコの葉を、蛍光イメージング装置 Lumazon を用いて明視野像と GFP 蛍光像の観 察を行った。白矢印は接種部位を示す。





図 20. GFP を発現した PstDC3000 を接種したタバコの葉の明視野像(上段)と蛍光像(下段) 1×10⁸cfu/ml となるように調製した GFP 発現 PstDC3000 を播種 3 週間後のタバコの葉にインフィルトレーショ ンし、接種後 1~7 日目のタバコの葉を実体顕微鏡により経時的に観察した。



図 21. タバコの葉における GFP 発現 PstDC3000 の菌体数の推移

生育 3 週間目のタバコの葉に GFP 発現 PstDC3000 が 1 × 10⁶cfu となるようにインフィルトレーションし、接種後 0、1、3、5、7 日目の葉をすり潰し、菌体数を測定した。t-test(*: p<0.05)

またこのときの菌体数についても調べてみたところ、接種3日目に80倍に上昇したものの7日目では接種時と 同程度まで減少していた(図21)。この増減は、GFP 蛍光像を観察したときにも同様に認められており、GFP 蛍光 の強さは菌体数と比例していることが示された。このことから、非親和性関係においては、病原菌が接種部位で 若干増加するものの、それ以上その存在部位が広がることがなく、接種部位に限局することが明らかとなった。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

本プロジェクト研究において、活性酸素種をセリウム反応物として沈着させ、可視化することに成功した。これ により、活性酸素は局所的に発生することで、部分部分では非常に高濃度になっていること、実際に活性酸素 発生部位には正常な菌体は存在せず、その周辺の菌体も大きなダメージを受けていることがこの研究で明らか になった。この研究結果は、植物の免疫反応によって誘導される活性酸素種の濃度では病原菌は死滅しないこ とから、活性酸素が直接的に病原菌の生育を抑制していないのではないかという長い間の論争に終止符を打つ ことになった。今後はこのような活性酸素種の発生の直接的な分子を特定し、どのようなメカニズムで活性酸素 が発生しているのかより詳細に研究を進めていく必要があるだろう。

また、YC3.6 を用いた細胞内の Ca²⁺濃度の動態のイメージング系では、病原菌認識に関与する Ca²⁺濃度の動態を非破壊で、連続的に明らかにすることが出来た。他にも植物の様々な環境応答における Ca²⁺の動態を調べていくことにより、Ca²⁺のセカンドメッセンジャーとしての役割を明らかにすることが出来ると考えられる。

また、大腸菌を用いた BiFC 法は、タンパク質間相互作用の新しいイメージング系として、酵素基質反応のよう な一過的なタンパク質相互作用の解析をより簡便に行うことが出来る系である。本法は、酵母 Two-hybrid 法で は解析不可能であった自立活性を有している転写因子の相互作用解析にも有用であると思われる。本技術は 植物だけにとどまらず動物においても十分に応用可能な技術であり、今後様々なところで使用されることが期待 される。

4. 研究発表の状況

く雑誌論文>

- Identification of interacting proteins for calcium dependent protein kinase 8 by a novel screening system based on bimolecular fluorescence complementation. Kamimura, M., Han, Y., Kito, N. Che, F. S. Biosci. Biotech. Biochem., 78, 438-447, 2014.
- Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and Arabidopsis. Furukawa, T., Inagaki, H., Takai, R., Hirai, H., Che, F. S. Mol. Plant Microb. Interact., 27,113–124,2014.
- Glycan moiety of flagellin in *Acidovorax avenae* K1 prevents the recognition by rice that causes the induction of immune responses. Hirai H, Takai R, Kondo M, Furukawa T, Hishiki T, Takayama S, Che FS. Plant Signal Behav., 9,11, 2014
- CD2-1, the C-Terminal Region of Flagellin, Modulates the Induction of Immune Responses in Rice. Katsuragi Y, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T, Che FS. Mol Plant Microbe Interact., 28(6)

648-58, 2015

- IREN, a novel EF-hand motif-containing nuclease, functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice. Ootsubo Y, Hibino T, Wakazono T, Mukai Y, Che FS. Biosci Biotechnol Biochem., 80(4), 748-60, 2016.
- Frameshift Mutation Confers Function as Virulence Factor to Leucine-Rich Repeat Protein from *Acidovorax avenae*. Kondo M, Hirai H, Furukawa T, Yoshida Y, Suzuki A, Kawaguchi T, Che FS. Front Plant Sci. 4, 7, 1988.
 2017.

<総説>

1) BiFC を基盤とした大腸菌を用いた新規相互作用検定法。神村麻友、蔡晃植。植物の生長調節 51, 1, 52-55, 2016 年

く学会発表>

- 1) イネとシロイヌナズナに存在する異なるフラジェリン認識機構のキメラ受容体を用いた分子解析。片山貴等、村 上貴彦、河合美咲、高井亮太、蔡晃植。農芸化学会 2016 年度大会、北海道、2016 年
- 2) イネの Ca²⁺依存性エンドヌクレアーゼである IREN は過敏感細胞死において認められる DNA 断片化の実行因子 である。若園貴仁、大坪由佳、日比野孝紀、向由起夫、蔡晃植。日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年
- イネの病害抵抗性に関与する PR7 と PR8 遺伝子の転写を制御する新規 NAC 転写因子の同定。奥山愛梨、平 井洋行、宇野雄太、寺沢勇治、堀家史哉、久保健一、仲下英雄、蔡晃植。第38回日本分子生物学会、神戸、 2015 年
- 4) Ca²⁺依存性プロテインキナーゼ 8 を介したイネの病原菌認識情報伝達機構。鬼頭信貴、上坂有矢、韓宇龍、神 村麻友、蔡晃植、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年
- 5) カルシウム依存性プロテインキナーゼ12を介したイネの病原菌認識情報伝達機構。神村麻友、韓宇龍、鬼頭信 貴、蔡晃植。第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年
- 6) イネにおける植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの受容とその情報伝達機構の解析。桂木雄也、小栗 章成、森本匠、片山貴等、村上貴彦、高井亮太、蔡晃植。第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年
- 7) イネにおける植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの受容機構解析。桂木雄也、小栗章成、森本匠、片山 貴等、村上貴彦、高井亮太、蔡晃植。第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年
- 8) Ca²⁺依存性プロテインキナーゼ 12 を介したイネの病原菌認識情報伝達機構。神村麻友、韓宇龍、千坂麻美、鬼 頭信貴、黎芷瑜、蔡晃植。第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年
- 9) イネにおける鞭毛タンパク質フラジェリン認識後の情報伝達機構の解析。桂木雄也、小栗章成、森本匠、高井亮太、蔡晃植。第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年
- 10) Ca²⁺依存性プロテインキナーゼ 8 を介した病原菌認識情報の伝達機構。神村麻友、韓宇龍、上坂有矢、蔡晃植。 第 54 回日本植物生理学会年会、岡山、2013 年
- 11) イネ過敏感細胞死誘導における転写因子 OsNAC3 の役割。大坪由佳、青木友里、四井翔太、蔡晃植。第54回 日本植物生理学会年会、岡山、2013 年
- 12) 植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンのイネにおける認識と免疫反応誘導機構。桂木雄也、小栗章成、 森本匠、高井亮太、蔡晃植。第35回日本分子生物学会、福岡、2012年

- 13) イネの免疫反応を誘導する病原細菌由来タンパク質の同定とその認識機構。古川岳人、平井洋行、近藤真千子、蔡晃植。第35回日本分子生物学会、福岡、2012年
- 14) 植物免疫反応である活性酸素発生の Ca2+依存性プロテインキナーゼによる制御機構。神村麻友、韓宇龍、千 坂麻美、蔡晃植。第35回日本分子生物学会、福岡、2012年

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」

(平成 24 年度~平成 28 年度)

研究成果報告書

テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」

研究課題:個体レベルでの新たな遺伝子発現イメージング・マウス頭蓋骨における力学的負荷応答遺伝子の経 時的発現パターンモニタリング系の確立

研究課題:個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージング

テーマ3:「X 線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」

研究課題:サブトラクション法により組織構造の変化を解析するシステムの開発

研究課題:新規造影剤を用いた精度の高い血管撮影技術の開発

研究機関・研究室:バイオサイエンス研究科・時空動物学研究室 担当者職名・氏名:教授・野村 慎太郎 研究協力者:契約研究員・増元 文子

1. テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」

1)研究課題:個体レベルでの新たな遺伝子発現イメージング・マウス頭蓋骨における力学的付加応答遺伝子 の経時的発現パターンモニタリング系の確立

研究課題:個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージング

①研究目的

個体は外部環境に対して生理学的、解剖学的変化をもって対応することが知られており、長い生物学の歴史 はこの過程の解明に充てられてきた。現在最も研究の余地が残されている分野は力学的負荷に対応した解剖 学的変化、つまり形態変化の分子機構解明である。その主たる原因は細胞レベルと個体レベルの形態変化を つなぐ手法が限定されていたことであると考えられる。生体イメージングとCT装置を駆使して力学的負荷と形態 変化をつなぐ分子としてオステオポンチン(OPN)を設定し、OPN 発現細胞の分布をプロモータートランスジェニッ クマウスの骨組織と膀胱において可視化することを試みた。 ②研究成果

骨拘縮モデルおよび尿閉症モデルにおいて、遺伝子発現イメージングを試みた。

(1)骨拘縮モデル

カ学的負荷に対応して発現上昇が認められるオステオポンチン遺伝子プロモーターにおけるカ学負荷対応 領域を決定し、この配列に GFP cDNA を結合させた遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに骨拘縮モデル により骨形態変化を起こし、経時的に得た骨組織を脱灰、透明化し、GFP の発現を可視化した。

骨拘縮モデルは、大腿骨の股関節最大伸展位、膝関節最大屈曲位での固定により骨拘縮を誘導するモデル である。この骨拘縮モデルマウスでは、後ろ足を背中側に持ち上げ、足に負荷がかからない状態になるようテー プで固定した。背中側に持ち上げることにより、動物は当該領域に力を加えることができなくなる。この状態を持 続することにより大腿骨に骨拘縮が起こる。



上記の方法で標本から微弱な蛍光を検出することに成功した。



以下に示す図は画像処理を行い、蛍光強度を補足する感度を最大限に増強したものである。

イメージアナライザーによる OPN 発現細胞の分布。赤で表示された領域は骨吸収の盛んな部位であり、骨吸収 に OPN が関わっていることを示している。しかしながら生きた個体における生体イメージングを成功させることは 現時点で困難であるという結果を得た。

(2)尿閉症モデル

マウスの尿道を縫合糸で結索し、尿閉症モデルを作成した。膀胱内の尿圧は著しく上昇し、術後 24 時間におい て膀胱は排尿後の約 10 倍の重量を示した。膀胱被覆上皮細胞は円柱上皮細胞から重層扁平上皮細胞への形 態変化が観察された。膀胱上皮が尿圧の上昇による力学的負荷を感受した結果であるマイクロアレイ法による 解析で、Keratin 6,Keratin 14 の遺伝子発現が劇的に上昇していることが示された。

Gene symbol	bScaleSig	eScaleSig [*]	Log2Ratio
Prss27	520.9	8870.2	4.1
Col17a1	207.8	3217.1	4.0
Thbs1	601.6	8938.0	3.9
Omp	360.4	3944.3	3.5
Slc16a3	689.1	8990.6	3.7
S100a2	124.4	1526.9	3.6
Ch25h	136.8	2596.2	4.2
Ctgf	793.1	23070.3	4.8
Pole	134.7	1542.9	3.5
Hba-ps4	141.9	1479.2	3.4
Saa1	690.2	11821.0	4.1
Etv4	120.5	2287.6	4.2
Ltb4r1	246.6	3191.1	3.7
Il1rn	127.4	1868.6	3.9
Srgn	1306.2	12308.5	3.2
Timp1	1577.8	32616.0	4.4
Uhrf1	295.1	5414.9	4.2
Serpine1	395.1	19231.0	5.6
Adam8	511.3	9298.1	4.2
Ceacam1	168.3	3616.1	4.4
Ceacam2	198.7	3924.7	4.3
Krt14	215.8	22812.9	6.7
Zdhhc22	443.2	4785.5	3.4
Krt6a	352.3	48484.0	7.1
D17H6S56E-5	217.6	3398.1	4.0
Reg3g	171.3	14922.1	6.4
Tnfrsf23	345.4	4827.6	3.8
S100a3	149.4	1814.0	3.6
Itga3	490.1	5863.1	3.6
Lcn2	150.5	3561.4	4.5
Ripk3	365.5	3917.1	3.4
Ccne1	184.6	2301.8	3.6
DUSP5	275.3	2785.1	3.3
Saa3	1356.4	49662.1	5.2
Plat	678.9	10189.3	3.9
Galnt3	544.8	5356.7	3.3

解析結果から krt6aでは手術群で対照群の約139倍の遺伝子発現が認められた。また krt14では手術群で対照 群の約101倍の遺伝子発現を認めた。

keratin は細胞の形態保持に必要不可欠な細胞骨格であり、酸性を示す type I と、塩基性~中性を示す type I に分類されている。大部分の keratin 分子は type I keratin のポリペプチド鎖 2 本と type I keratin のポリペプチド鎖 2 本が重合した 4 量体として存在する。*krt6a* にコードされる Keratin 6 は分子量約 56 kDa の type I

keratin であり、Keratin 16と4量体を形成し、正常細胞では主に増殖期の扁平上皮細胞に発現していることが報告されている。*krt14* にコードされる Keratin 14 は分子量約 50 kDa の type I keratin であり、Keratin 5と4 量体を形成し、正常細胞では主に基底細胞、筋上皮細胞、中皮細胞に発現していることが報告されている。

マイクロアレイの結果は膀胱組織全体に存在する RNA 量のなかで特定の遺伝子にコードされる mRNA の量 的変動を示している。また、特定遺伝子の mRNA において発現の増減が認められた場合でも翻訳されているか どうかの情報を含んでいない。手術によって我々が観察した上皮組織細胞構成成分のダイナミックな変化と Keratin 6 と Keratin 14 の発現状況に相関を求めることを目的として、術後 8 時間、16 時間、24 時間に摘出した 膀胱と、対照の膀胱より作成した厚さ 3 µm のパラフィン切片の免疫染色を Keratin 6 と Keratin 14 に対する特異 的な抗体を用いて行った。

これらの遺伝子産物は免疫染色によって上皮細胞に特異的な発現を示していた。膀胱組織を摘出後 CLARITY 法にて透明化を行い、オステオポンチン、Keratin 6,Keratin 14 抗体と4 日間反応させ、さらに Scale 法にて再度 透明化を10 日間行い、実態蛍光顕微鏡にて尿管口付近の上皮組織に明確な蛍光の存在を認めた。しかしなが らイメージアナライザーによる蛍光の検出は困難であった。

本研究において生体イメージングの効果を充分に得ることには困難が伴うことが予想されるが、力学的負荷 による個体の生体反応を非破壊的に検出するシステムの構築は今後重要な課題となることが予想されるので 引き続き検討を行う。 2. テーマ3:「X線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」

1)研究課題:サブトラクション法により組織構造の変化を解析するシステムの開発

①研究目的

X線 CT 装置を用いて得られた情報と組織化学的手法によって得られた情報の間に存在する解像度の差異という質的な差異をつなぐ方法の開発を主眼とし、新たに非侵襲骨拘縮モデルを開発し、その評価を四次元的に行うことを検討した。

②研究成果

1)卵巣摘出によるエストロゲン低下に伴う骨代謝速度亢進および骨吸収促進モデル

2) 大腿骨の股関節最大伸展位、膝関節最大屈曲位での固定による骨拘縮モデル

において経時的にX線CT装置により骨組織の立体構築したCT画像を任意の方向からスライスし、骨の内部を 透視する技法を開発し、骨の立体的な形態が経時的に変化する過程を可視化することに成功した。

(1)卵巣摘出によるエストロゲン低下に伴う骨代謝速度亢進および骨吸収促進モデル

において腰椎は L3 を中心に解析を行った。この部位は骨形態計測によく使われる領域であり、ホルモンの影響 を大きく受けることが知られているからである。また大腿骨は骨盤と接する骨頭から膝関節を経て腓骨脛骨の中 間部を摘出し測定に用いた。

画像取得領域において組織学的に骨吸収が起こっていることを確認した。



卵巣摘除後、経時的な石灰化領域の比較を行い、どの部分において骨吸収が起こったかを正確に表示すること に成功した。

卵巣摘出後の大腿骨の骨構造変化



卵巣摘出後の第三腰椎の骨構造の変化



同一個体において骨の微細構造を詳細に検討することができた最初の例となる。

(2)大腿骨の股関節最大伸展位、膝関節最大屈曲位での固定による骨拘縮モデル

前述の大腿骨の股関節最大伸展位、膝関節最大屈曲位での固定による骨拘縮モデルにおいても当該骨石 灰化領域の経時的変化を測定した。

テーピング固定後の大腿骨の骨構造の変化



テーピング 24 日後において最も大きな骨構造の変化が認められたのは骨端線の領域である。この部分を拡 大し、比較検討を行った。



さらに骨密度測定ソフトウェアを新たに導入し、卵巣摘除、あるいは骨拘縮処置を行ったマウスにおける骨密 度変化を経時的に測定し、定量化を行った。その結果、卵巣摘除によって骨の代謝回転速度が上昇するが、カ 学的負荷は圧迫、牽引いずれの部位においても骨密度の変化を生ぜず、結果的には骨強度にも変化を与えな いということが示された。

2)研究課題:造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上

①研究目的

血管内皮に対して負荷される圧力、つまり血圧を決定する抵抗血管の走行性とサイズをCT装置によって可視 化する技術を開発するため、実験動物における小動脈(直径 20 µm)を高解像度で造影する技術の開発を行っ た。

②研究内容

CT 装置による実験動物血管造影法の開発を行った。動脈系の血管造影はマウスの左心室より、静脈から肺動 脈にかけては尾静脈より造影剤の注入を行った。造影剤としてとして CT で明確に検出できる二酸化チタンを使 用した。担体としてメチルセルロース、あるいはグリセロールが有効であった。しばしば造影剤の凝集、担体に生 じる気泡が問題となったので分散剤と消泡剤を併用した。造影すべき臓器、血管のサイズによって造影剤の組 成を変更することによって対応した。一般的に 0.1%メチルセルロース – 2.5%二酸化チタンという組成の造影剤 に分散、消泡剤(SN デスパーサント SN デフォーマー265 など(サンノブコ社))を加えたものが下図に示すように 高い造影効果をあらわした。



頭部(左)および腹部(右)の動脈系血管造影

担体としてグリセリンを用いた場合、分散、消泡剤の選択の幅が広く造影も容易であった。以下に示す図は 50% グリセロール – 2.5%二酸化チタンを造影剤として用いたときの血管造影像である。



頭部(左)および腹部(右)の動脈系血管造影

このような組成の造影剤を用いて造影される血管の最小直径を計測した。0.2%メチルセルロース – 2.5%二酸 化チタンを造影剤として用いている。



腎臓における造影。左図赤枠内を右に拡大した。計測の結果、矢印で示された血管の直径は 25 µmであった。 また、グリセロールを担体として用いた場合にも同様の計測を行った。下図は以下に示す図は 50%グリセロール - 2.5%二酸化チタンを造影剤として用いたときの血管造影像である。


計測の結果、矢印で示された血管の直径は20 μmであった。

上記の結果は本学に設置されている CT 装置(R_mCT2)を用いて得られたものである。現在より高い解像度を有 する CT 装置が販売されており、さらに解像度の高い造影像を得ることが期待される。よって我々の得た結果は CT 装置によってさらに改善する可能性が高い。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

我々は実験動物に適した新規組成の造影液を開発することによって直径最小 20 μmの血管の造影に成功した。 これは最も小さい細動脈の直径に匹敵する。この方法を用いて「抵抗血管」とよばれる血圧をコントロールする 血管の動向を探ることができるようになっただけでなく、結節性動脈周囲炎、播種性血管内凝固症候群、バージ ャー病など細動脈に変化が現れる病変を小動物で再現し、評価する手法が開発されたと考えられる。

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

- 1) Sputum Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein as a Marker of Airway Inflammation in Asthma.Honda H, Fujimoto M, Miyamoto S, Ishikawa N, Serada S, Hattori N, Nomura S, Kohno N, Yokoyama A, Naka T. PLoS One. 11:e0162672 (2016). 査読有
- 2) Human Dynactin-associated protein transforms NIH3T3 cells to generate highly vascularized tumors with weak cell-cell interaction. Kunoh T, Wang W, Kobayashi H, Tog Y, Tokuyama M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, Nagai N, Nakamura T, Nomura S, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T. PLos One. 10: e1035836 (2015). 査読有
- 3) CTLA4-Ig suppresses development of experimental autoimmune uveitis in the induction and effector phases: comparison with blockade of interleukin-6. Iwaashi C, Fujimoto M, Nomura S, Serada S, Nakai K, Ohguro N, Nishida K, Naka T. Exp Eye Res. 140:53-64. (2015). 査読有

- 4) Leucine-rich α-2-glycoprotein promotes TGF β 1-mediated growth suppression in the Lewis lung carcinoma cell lines. Takemoto N, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Ohkawara T, Takahashi T, Nomura S, Inohara H, Naka T. Oncotarget. 10:11009-22. (2015). 査読有
- 5) Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modificating the Melanoma Microenvironment. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, Naka T. Pigment Cell Melanoma Res. 27:630-9. (2014). 査読有
- 6) Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells. Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, Iwahori K, Tachibana I, Takahashi T, Kumanogoh A, Kishimoto T, Naka T. Cancer Sci. 104:1483-91. (2013). 査読有
- 7) Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Ripley B, Nomura S, Mizuguchi H, Shimada K, Takahashi T, Kawase I, Kishimoto T, Naka T. SOCS-1 gene delivery cooperates with cisplatin plus pemetrexed to exhibit preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. Int J Cancer. 132, 459-71. (2013). 査読有
- 8) Chean T, Konnno T, Egashira M, Bai R, Nmoura N, Nomura S, Sakurai T, Imakawa K. Estrogen-dependent uterine secretion of osteopontin activates blastocyst. adhesion competence. PLoS One 7(11), e48933. (2012). 査読有

<図書>

1) マウス解剖イラストレイテッド、1-105 頁、秀潤社、2013 年

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」

(平成 24 年度~平成 28 年度)

研究成果報告書

テーマ1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」 研究課題:CT 血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発

テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」 研究課題:蛍光タンパク質を用いた特定タンパク質の組織・個体レベルにおける空間的イメージング 研究課題:個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージング

テーマ3:「X 線 CT イメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」 研究課題:造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上

> 研究機関・研究室名:バイオサイエンス研究科・環境応答遺伝学研究室 担当者職名・氏名:教授・山本 博章 研究協力者:澁谷 仁寿、渡邊 隆太郎、田端 裕正、小乾 彰紘、 福井 達也、浦野 愛理

テーマ1:走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発 研究課題:CT 血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発

1. 研究目的

ごく微小な血管網が発達した組織の構造を、当該脈管系に着目して解析するためには、低粘度の造影剤を用いた非侵襲的な CT 観察により、3 次元の再構築像の取得ができれば有利である。

本目的は、通常の CT 解像度を超えて、より詳細な組織構造を比較的容易に観察できるように、脈管系を対象 として開発した CT 血管造影法により得られた3次元再構築像と対応可能で、より詳細な高次構造観察を可能に する SEM 像の取得を目指した。

2. 研究内容

テーマ3において、マウス眼球の脈絡膜脈管系の微細血管 X線 CT イメージングに適した樹脂として Microfil

(テーマ3参照)を見出したが、この樹脂を充填した脈管系の周囲組織を溶かしてレプリカを作製し、走査型電顕 での観察を試みようと計画したものの、本樹脂で置換された脈管系のうち特に微小な毛細血管において血管像 が途切れる箇所のあることが判明した(図 1)。

図 1 は野生型マウスを用いて、血管造影剤 Microfil(黄色)を心臓からの還流により脈管系に満たして固化後、 眼球を摘出し、視神経側から(脳に近い側から)実体顕微鏡により観察したものである。野生型マウスでは、脈絡 膜血管はメラニン色素細胞・メラノサイトに覆われていて、その全容を見ることができない(図1A)。そこで過酸化 水素を利用してメラニンを漂白したものが図 1B である。



図 1. 野生型マウス脈絡膜血管の可視化

現れてきた脈管系をよく見ると、CT で観察するまでもなく、細い毛細血管の所々が不連続になっていることがわかる(図1B)。

そこで、Mercox の商品名で販売されている超低粘度の樹脂を用いてレプリカを作製し、脈絡膜と内耳の血管 網の抽出を行った。まず還流固定後、2 ml/min の流速で Mercox を 20 ml 還流し、50°Cにて 12 時間重合させた。 眼球を摘出後、30%の KOH で 7 日間、周囲の組織を溶解・除去した。水で洗浄後、凍結乾燥処理を行い、常法で SEM 観察を行った(図2、図 3)。還流時の流速条件は、Microfil を用いて見出した条件と同じである(テーマ3参 照)。



図 2. Mercox による脈絡膜脈管系の SEM 像



図3. Mercox による脈絡膜脈管系の SEM 像

この手法により、脈絡膜脈管系を広視野でまた通常の CT 像より高解像度で観察できることができた。なお、 血管鋳型標本の作成ステップとしては、上述のように、1.樹脂の還流、2.組織の溶解、3.走査型電子顕微鏡によ る観察である。特に 2 のステップは重要であり、組織溶解の条件検討に苦労を重ねてきた。幸い眼球脈絡膜に ついてはほぼ満足な結果が得られるようになった。内耳血管条についてはさらなる条件検討を重ねる必要があ る。

MercoxとMicrofil(テーマ3参照)を用いた眼球脈絡膜の高次構造解析は、論文として投稿できるまでの再現性を得ることができるようになった。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

以上のように、走査型電子顕微鏡用の血管鋳型標本試料作製時の組織溶解は、鋳型の損傷を抑えて、再現 性良く像を得ることが要点であるが、マイクロ CT 用試料作製にはこの操作を必要とせず、現時点ではその再現 性が高い状況である。しかしながら、微小領域の血管の超微細構造については、走査型電子顕微鏡の観察像 の方が、解像度の点で良い像が得られる。なお Mercox レプリカの高次構造解析に、そのままでは X線 CT 装置 は利用できない。Microfil やヨウ素系造影剤と Mercox の混液を利用できるようにする案等、今後の課題が明ら かになったことは大きな収穫である。

4. 研究成果の発表

章末に記載

テーマ2:生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証 研究課題:個体レベルでの時空間的タンパク質相互作用イメージング

毛周期に関わるβカテニンと LEF/TCF の時空間的相互作用のモニタリング

1. 研究目的

研究目的:周期性を持つ生命現象とその機構の解明は古くから研究者の興味を惹きつけてきた。本課題では、 とりわけ長い周期をもつ毛周期の進行を可視化できる系を構築し、その分子機序の解明に資することを目指 す。

意義:毛周期機構の分子機序の解明に大きな貢献となる。特に、方法論的に重要な点は、各毛穴の毛周期の 判定(一毛周期中のどの段階にあるか)を、非侵襲的に行うことが容易になることである。現在、これを判定する には、生検試料を得ることが必須である。その際、試料の取り出し(切り出し)操作そのものにより、新たな毛周期 を誘導することが問題である。例えば抜毛のみでも、その毛のもとの毛包に、新たな毛周期への移行を促し(てし まい)、一毛周期中の特定の段階にある毛穴を得るには、勢い広範囲の皮膚試料を必要としてきた。この点につ いて、今回の手法が使用できるようになれば、非侵襲的に「容易に」、特定のステージにある毛包を同定、解析 できるようになる。

2. 研究内容

毛周期に関わる Wnt シグナル系の重要な因子である β-カテニン、および核内移行してこの因子と複合体を 形成するコアクチベーターの LEF/TCF に N-luciferase と C-luciferase をそれぞれ融合させたタンパク質をメラノ サイトで特異的に発現させる系を構築することにより、Split luciferase complementation assay 法によるタンパク 質相互作用を、マウスの個体レベルで検出できる新たな蛍光・発光イメージング技術の開発に繋げることを目論 んだ(図1)。



図1 Split luciferase complementation assay用ベクター

当時、生体におけるこの手法の適用はまだ黎明期にあり、まずこのシステムを、どのように本学で構築するか、 が課題となった。まずはluciferaseをコードする配列を持つプラスミドで、比較的利用しやすく加工されたものを探 すことにした。報告者が関わる別の共同研究プロジェクトの研究者の示唆により、海外のグループが構築したプ ラスミドが加工しやすいことを見出した。さらに利用するプロモーターについては、神経冠(堤)由来の色素細胞で あるメラノサイトの系譜内で発現し、上記毛周期で発現する遺伝子のプロモーターを利用すべきであるが、当初 は上記因子をコードする遺伝子の当該配列を利用しようとした。この計画を策定したところで、当該手法に代わ る FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) マウスの作製が着目されるようになり、加えて、前述の手法では問題となる基質の供給の問題もあり、FRETを利用することに変更した。新学術領域「生体蛍光イメージング」の研究で作出され、供給もされている YPet と ECFP の利用を決め、その基礎となるプラスミドの情報の解析を行った。 すなわち、YPet-EV linker- β -catenin を一方に、他方に LEF/TCF-EV linker-ECFP を持つ 2 種のトランスジェニックマウスを作製する計画を立てた(図 2)。



図2 FRETベクターを用いたコンストラクト

懸案のプロモーターは、当初の計画では、相同組換えにより内在性のプロモーターを用いる(内在性のプロモ ーターの下流に挿入する)ことにしたが、当該の遺伝子はハプロインサフィシェンシー(haploinsufficiency)を引き 起こす可能性があった。そこで、この心配がないメラニン合成系の遺伝子で、細胞腫特異性が極めて高く、メラ ニン合成の鍵酵素をコードするチロシナーゼ(*Tyrosinase*)遺伝子のプロモーターの利用を計画した。このプロモ ーターはその調節領域がよく研究され、我々自身も当該プロモーターを用いて、トランスジェニックマウスの最初 の報告に成功している(Tanaka ら、Development 108, 223-227, 1990)。

その後、上記プラスミドの改編に必要な情報について我々自身で明らかにすべき DNA 領域があることに気付 き、この解析に時間を要したが、ようやく2015 年度に入り、分子間型 FRET バイオセンサー法を用いる系に必要 な、蛍光物質とその可動性を上げる linker をコードしたベクターの分与を依頼できる段階になり、供与を受けた。 開示されていない当該ベクターの詳細な配列情報を解析し、インサートの組み込みサイトを設計したが、目的と する組換え体を得ることが出来なかった。そこで、制限酵素サイトとその周辺配列情報から、目的遺伝子の挿入 部位を改めて予測しなおした。同時にマウス皮膚より調製された cDNA を用いて、標的遺伝子のクローニングも 並行して行った。ベクターはインサートの挿入部位で直鎖化し、In-Fusion にて、標的遺伝子の挿入を行う計画を 立てた。その後、マウス皮膚より調製された cDNA を用いて、標的遺伝子の挿入を行う計画を 立てた。その後、マウス皮膚より調製された cDNA を用いて、標的遺伝子の挿入を行う計画を 立てた。その後、マウス皮膚より調製された cDNA を用いて、標的遺伝子のクローニングを 行った。2015 年度に 供与されたベクターについて、ようやくインサートの挿入部位の正しい配列が判明したので、そのサイトで直鎖化 し、In-Fusion にて、標的遺伝子の挿入を行う段階に達した。計画してきた当該ベクター2 種のうち1種は使用で きる段階であるが、2 種目のコンストラクト作製に必要な標的遺伝子のクローニングに問題が生じたため、2 系統 マウスの樹立と掛け合わせによる生体イメージング用マウスの成立に時間を要している。しかしながら、このクロ ーニングは必ず解決できる問題であり、本計画終了時に間に合うか否か、微妙ではあるが、その成果を目前と しているところまで到達した。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

本研究の遂行において、ベクターとインサートの、部分的ではあるものの、配列解析に多大な時間を要した。 それは塩基配列が通常のシーケンサーで読み取れない部分に対してであったが、前述の制限酵素サイトと周辺 の配列情報を用いて首尾よくコンストラクトが得られなかった場合は、塩基配列解析の黎明期によく用いられた マキサム・ギルバート法に戻っても、当該部位の配列解析を行う覚悟を持った。旧式ではあるが、マニュアルで のシステムを保有しておく重要性を再認識した。今後は、上記のコンストラクトを用いて、トランスジェニックマウ スの作製をぜひ進めていきたい。

4. 研究成果の発表

章末に記載

テーマ3:X線 CT イメージング技術の開発・改良とその有効性の検証 研究課題:低粘性造影剤を用いた撮影技術の確立による血管構造の測定精度の向上

1. 研究目的

組織学的手法での解析が困難な有色組織である眼球脈絡膜内の微細血管構造の解析に活用できる、低粘 性の造影剤・造影剤担体の選抜・開発と、それを用いた撮影技術の確立を行う。開発した造影剤により、メラノ サイトの発生異常を示す mi(Mitf)マウス突然変異体の血管形成異常を検証し、脈絡膜また蝸牛血管条における 血管形成に及ぼす色素細胞の機能を解明する。

背景:

報告者が対象とする神経冠(堤)由来のメラニン色素細胞・メラノサイトは、いくつかの組織・器官で脈管系に近接して、場合によっては脈管系の周囲をびっしり覆って分布する。この色素細胞と脈管系からなる高次構造を、 X線 CT 装置による再構築像で解析しようとしたところにこの計画は始まる。

その端緒は、メラノサイトを欠損する Mitf^{mi-bw} (black-eyed white allele at the mouse *mi* locus。遺伝子座名は、 クローニングされて後に Microphthalmia-associated transcription factor と改名される)ホモ接合体マウスの、眼 球の外側を覆う脈絡膜に発達する脈管系の断面構造が、野生型マウスに比して押しつぶされた(ひしゃげた)構 造を取ることを、光顕レベルで観察した 10 年ほど前にさかのぼる。後にこの観察は、内耳血管条の中間層に張 り巡らされた血管網と、それを覆う聴覚に必須のメラノサイトからなる当該中間層の構造にも当てはまることに気 付いた。

以来、これら組織の立体構造をメラノサイトの有無と対応させて解析したいと強く望んできた。それには今回の X線 CT 装置による再構築像の観察が欠かせないと判断した。

2. 研究内容

脈管系は CT 値が低く、そのままでは構築像が取得できない。そこで、当初はヒトでよく利用されるヨウ素系の 造影剤を利用し、上記脈管系がよく発達する脈絡膜内の血管と色素細胞の位置取りを解析しようとした。

当初、テイラーメイドのヨウ素系造影剤や、実験動物用に開発された Fenestra(ヒト用の、短時間で排泄され、 臓器への滞留も少ない性質を改め、肝臓や血管に特異的に長時間滞留し、かつ、毒性が低いもの)や、ミルテ ニー ExiTron nano 12000 等の造影剤を用いて脈絡膜血管の再構築像を得ようと試みた。

この手法を用いる際の最大の問題点は、観察対象領域の構造である。すなわち、眼窩に埋まる眼球の外側 (体内側)を観察するには、周囲の頭蓋骨の高い CT 値が邪魔をして、当該領域の再構築像が得られないことで あった。そこで、眼球全体を摘出することにしたが、その間に視神経と一緒に眼球内に配向する太い血管や、脈 絡膜に出入する太い血管を切断せざるを得ず、その際に造影剤が漏れ、高コントラストの高次構造像の取得に 大きな影響を及ぼすことであった。

そのために、眼球摘出時に当該部分を結索することにしたが、それでも当該手術ステップまでに(眼の奥側に アクセスする際に)造影剤の漏れは避けられなかった。

そこで、まず器官を取り出し、ヨウ素系の造影剤に近い組成を持つ薬液に浸漬後、CT 観察することにした。しかしながら、脈管系と周囲の組織の像が重なってしまい(十分に分離できず)適当ではないことが判明した。

一方 Microfil (Flow Tech, Inc., Carver, MA, USA)と呼ばれるクロム酸鉛と硫酸鉛粒子を含み、シリコンラバーを

素材とした樹脂状の血管造影剤は、前出の造影剤に比して粘度が高いものの、比較的細い血管まで侵入し、固 化すれば漏れ出すことが無く、眼球摘出にも耐えられることが判明した。初期に取得された図 1 の像は、細い血 管網の CT 再構築像取得は十分ではないが、操作の改良でより良い再構築像が得られることを期待させるもの であった。



図1 C57BL/6 マウスにおける脈絡膜血管の再構築像

還流固定後、造影剤・マイクロフィルを導入し、眼球を摘出後、マイクロ CT 装置で観察した。ファイルを DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine) ファイルに変換、画像処理ソフトウェア OsiriX で解析したものである。発達した血管網が観察される。

この像に意を強くし観察を重ねたが、当初予想しなかった問題点に気付いた。それは、造影剤注入の条件検討が必須であることであった。

図2は図1に比して、再構築される脈管系がはるかによく観察されるが、明らかに脈管系から造影剤が漏れ出 している。脈絡膜脈管系はその有窓化が顕著であり、そこからの漏出であろうと予想されるが、いずれにしても、 変異体と野生型の比較には、造影剤の注入速度と注入量を正確にコントロールする必要があることを納得し た。



図 2 C57BL/6 マウスにおける脈絡膜血管の再構築像 手法は図1に同じ。

本造影剤は粘度が比較的高いので、ペリスタポンプを用いて注入している。流速また注入量を種々検討してみたが、流速は約2 ml/min、総注入量は5 ml 位が、漏れ出しが少なく、微細な高次構造の観察に適していると判断した。

図3はこの条件で脈絡膜脈管系の比較を行ったものである。予想通り、メラノサイトを欠損すると脈絡膜脈管系 は疎になることを示唆している。



図3 野生型マウスの脈絡膜脈管系構造

これを定量的に解析する手法の検討が今後必須である。変異体では血管断面が扁平になる傾向があり、切 片上での専有面積は野生型に比して小さい。この機構を探ることが次の課題となる。 加えて、CT 観察時の条件設定を検討し、再構築像改善に向けた努力を継続する必要がある。

これら眼球を用いた Microfil の還流条件の検討により、論文として投稿できるまでの再現性を得ることができるようになった。

そこで、ここで見出したマイクロフィル使用の適正条件下で、内耳血管条脈管系の解析を行った。その結果、 内耳血管条にマイクロフィルを配送させるには、脈絡膜では過剰と思われる流速が必要であることなど、組織に 依存した手法の検討が必要であることがわかった。現在内耳血管条の比較的大きい内径をもつ血管の造影に は成功しているが、当該領域の非常に細い毛細血管からなる構造の全容については、まだこの方法ではうまく 構築できないでいる(図 4)。



図 4. 野生型マウスの内耳蝸牛管血管への造影剤の送出 マイクロフィル造影剤に置換された内耳蝸牛管血管の実体顕微鏡による観察

次に発想を変えて、ヨウ素系造影剤による蝸牛脈管系のネガティブ造影法を試行した。この方法は、組織を当 該造影剤に浸漬し、ネガティブ像を構築することにより、脈管系を浮かび上がらせようとするものである。染色条 件を検討した結果、血管条を造影することができたが、micro-CTの空間分解能の限界のため、血管を確認する ことはできなかった。今後は、より解像度の高いCT、例えばナノCTを用いて解析を行う必要があろう。なお予備 的な結果は、メラノサイトの存否が、内耳血管条組織においても、脈管系の構造構築に寄与することを強く示唆 するものであった。

3. 研究成果の副次的効果と今後の展開

①副次的効果

この間、思わぬ副産物が得られた。貴重な実験動物からできるだけ多くの情報を得たいと思い、全身の脈管 系についても比較解析しようした。全身を対象とした CT 像の取得は本学の CT 機器の得意とするところであり、 データ取得も迅速に行うことができる。この解析を行う際、心臓から造影剤を注入しているが、戻ってきた造影剤 が周囲に漏れ、仰向けの個体の背側に回り込み、皮膚に付着する。この造影剤が内部の CT 情報取得を阻害 するので、いつも皮膚を除去して CT 像の観察を行ってきた。これまでのところ、眼や内耳を除いて、他の全身の 脈管系に、野生型、変異体に顕著な違いを見つけられずにいるが、驚いたことに、除去された皮膚の裏側(個体 内部側)に、きれいな血管網が残されていることに気付いた(図 5)。 Mitfmi-bw/+



図 5 Mitf^{mi-bw} ヘテロ接合体における皮膚脈管系の配行

Mitf^{mi-bw} アレルは劣勢であるので、ヘテロ接合体は野生型と区別がつかない。メラノサイトを欠損する皮膚においては脈管系の発達が十分ではないことを示唆する結果を得た。この再現性と、もしそれが確かであるならば、 当該機構の解析は新たなチャレンジとなる。

現状の手法下で使用する CT の再構築像に限界を感じたため、一つの展望として、より粘度の低い試薬を用いて、脈管系のレプリカを取る試みも始めた(テーマ 1:「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」参照)。

②今後の展開

走査型電子顕微鏡用の血管鋳型標本試料作製には組織の溶解を必要とするため、その操作中に鋳型が壊 れ、再現性良く像を得ることが困難であることが判明した(テーマ1参照)。この点については、マイクロCT用試料 作製にはこの操作を必要とせず、再現性良く血管のイメージング像が得られる点で優れていることが判明した。 しかしながら、微小領域の血管の超微細構造については、走査型電子顕微鏡で観察した像の方が、解像度の 点で良い像が得られた。より低粘度の造影剤を開発し、かつ、解像度の高い nano-CT 装置であれば、脈管構造 の超微細形態像を再現性良く獲得できる可能性がある。

なお新しい低粘度の造影剤の開発は、当初、努力項目の一つとして設定したが、現在商品化されている当該 薬剤の使用方法、特にごく微小な血管への送出法に関する詳細な検討に時間が必要で、まだ完成できていな い。しかし、これまでの試行から、Microfil やヨウ素系造影剤とMercoxの混液を利用できるようにする案等、今後 の課題が明らかになったことは大きな収穫であった。なお、他の研究課題で開発された低粘土造影剤を用いた 試行も行ったが、本研究課題が対象とする超微細血管への適応には、克服すべき点がいくつかあることが判明 した。特に造影剤の均一性を保持しながら当該血管内に送出する技術の開発が欠かせない課題であることが 明らかになった。すなわち次の一目標が明確にできたことも重要な成果であった。

なお、CT 像取得の技術修得については、学内機器、また学外機器、それぞれ現時点でも完璧とは言えないが、試料のハンドリングや位置決め等々も含め、満足できるレベルになったのではないかと自己評価する。

4.研究発表の状況

<学術論文>

- 1) Impaired development of melanoblasts in the black-eyed white Mitfmi-bw mouse, a model for auditory-pigmentary disorders. Hozumi, H, Takeda, K., Yoshida-Amano, Y., Takemoto, Y, Kusumi, R., Urara Fukuzaki-Dohi, U., Higashitani, A., Yamamoto, H. and Shibahara, S. Genes to Cells 17, 494~508, 2012. 査読有
- 2) Otx2 is involved in the regional specification of the developing retinal pigment epithelium by preventing the expression of Sox2 and Fgf8, factors that induce neural retina differentiation. Nishihara, D., Yajima, I., Tabata, H., Nakai, M., Tsukiji, N., Katahira, T., Takeda, K., Shibahara, S., Nakamura, H. and Yamamoto, H. PLOS ONE 7 (11), e48879 (12 pages), 2012. 査読有
- 3) A subpopulation of smooth muscle cells, derived from melanocyte-competent precursors, prevents patent ductus arteriosus. Yajima, I., Colombo, S., Puig, I., Champeval, D., Kumasaka, M., Belloir, E., Bonaventure, J., Mark, M., Yamamoto, H., Taketo, M. M., Choquet, P., Etchevers, H. C., Beermann, F., Delmas, V., Monassier, L. and Larue, L. PLOS ONE 8(1), e53183 (13 pages), 2013. 査読有
- 4) Insertion of long interspersed element-1 in the Mitf gene is associated with altered neurobehavior of the black-eyed white Mitf(mi-bw) mouse. Genes Cells. 19, 126-140, 2014. 査読有
- 5) Microphthalmia-associated transcription factor is expressed in projection neurons of the mouse olfactory bulb. Ohba K, Takeda K, Yamamoto H, Shibahara S. Genes Cells. 20(12), 1088-1102, 2015. 査読有
- 6) Regional Fluctuation in the Functional Consequence of LINE-1 Insertion in the Mitf Gene: The Black Spotting Phenotype Arisen from the Mitfmi-bw Mouse Lacking Melanocytes. Takeda K, Hozumi H, Ohba K., Yamamoto H, Shibahara S. PLoS One 11(3), e0150228 (23 pages), 2016. 査読有
- 7) Microphthalmia-associated transcription factor ensures the elongation of axons and dendrites in the mouse frontal cortex. Ohba, K., Takeda, K., Furuse, T., Suzuki, T., Wakana, S., Suzuki, T., Yamamoto, H. and Shibahara, S. Genes Cells 21, 1365-1379, 2016. 査読有
- *8) <u>Melanocytes support the vasculature of the choroid. Shibuya, H., Watanabe, R., Maeno, A., Ichimura, K., Tamura, M.,</u> Wakana, S., Shiroishi, T., Ohba, K., Takeda, K., Shibahara, S. and Yamamoto, H. (submitted)

く書籍>

- 1) 色素細胞の多様な機能発現について。 山本博章 Fragrance Journal 11、37-40, 2012.
- ネズミの毛色発現に関与する遺伝子。庫本高志、山本博章 色素細胞第2版-基礎から臨床へ―(伊藤祥輔、 柴原茂樹、錦織千佳子 監修 慶応大学出版会) pp71-86、2015.
- 3) 皮膚以外に存在するメラノサイトの機能。矢嶋伊知朗、大神信孝、山本博章、加藤昌志 色素細胞第 2 版-基

礎から臨床へ—(伊藤祥輔、柴原茂樹、錦織千佳子 監修 慶応大学出版会) pp223-235、2015.

<学会発表>

- 1) 色素細胞の発生と機能発現機構、環境ストレス緩和(招待講演)。山本 博章 日本香粧品学会(東京) 2012 年6月7日~8日
- 2) Involvement of Pax6 in the retinal pigment epithelium development. Nishihara, D., Kawasaki-Nishihara, A., Nakamura, H. and Yamamoto, H. 第 24 回日本色素細胞学会学術大会(長浜) 2012 年 11 月 24 日~25 日
- *3) <u>Functional divergence of mammalian melanin pigment cells (in dimly lit organs)</u> (Invited) Yamamoto, H., Uehara, S. and Shibuya, H. 日本実験動物科学技術さっぽろ 2014. (札幌)
- *4) <u>Functional divergence of mammalian melanocytes. (Invited) Yamamoto, H. XXII International Pigment Cell</u> <u>Conference, Singapore, 2014.</u>
- *5) <u>Do melanocytes contribute to the structure of their niches?</u> Shibuya, H. and Yamamoto, H. XXII International Pigment Cell Conference, Singapore, 2014.
- 6) How is regionalization of the chicken developing eye primordium regulated? Tabata, H. and Yamamoto, H. XXII International Pigment Cell Conference (IPCC), Singapore
- *7) <u>眼球と内耳メラノサイトハビタットにおける血管構造の解析。 澁谷仁寿 山本博章 2014/9/17~9/19 日本遺</u> 伝学会第 86 回大会 長浜バイオ大学
- *8) メラノサイトが関わる蝸牛血管条形成過程の発生遺伝学的解析。 澁谷仁寿、渡辺隆太郎、前野哲輝、田村勝、 若菜茂晴、城石俊彦、山本博章 2015/09/24-2015/09/26 日本遺伝学会第 87 回大会 東北大学
- 9) マウス Mitf 変異体を用いた眼球脈絡膜構造の解析。 澁谷仁寿、市村薫、前野哲輝、上田明弘、田村勝、若菜 茂晴、城石俊彦、山本章嗣、山本博章 2016/09/07-2016/09/09 日本遺伝学会第 88 回大会 日本大学国際 関係学部(三島)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」

(平成 24 年度~平成 28 年度)

研究成果報告書

テーマ2:「生体イメージング装置を用いた新規蛍光・発光イメージング法の開発とその有効性の実証」 研究課題:蛍光タンパク質を用いた特定タンパク質の組織・個体レベルにおける空間的イメージング

> 研究機関・研究室名:バイオサイエンス研究科・動物生理学研究室 担当者職名・氏名:教授・永井 信夫 研究協力者:湯川 直人、俣野 泰毅、足立 悠太

1. 研究の目的

本研究目的は、生体イメージング装置(Lumazone)を用いた組織、個体レベルでの新規のイメージング技術を確 立し、その技術を動物、植物の機能調節メカニズムの解明に用いることで、新しく開発した技術の有用性を実証 することである。

2. 研究成果

1) 蛍光波長の異なる蛍光タンパク質による生体イメージングの比較

励起・蛍光波長の異なる 2 種類のタンパク質を導入した細胞をマウスに移植し、イメージの比較により、マウスの蛍光イメージングの特徴と技術開発における問題点を検討した。

①腫瘍を誘導したマウスにおける蛍光イメージング

がん遺伝子の Ras および EGFP (励起波長 488nm、蛍光波長 509nm)の遺伝子導入した NIH3T3 細胞の移植により、ヌードマウスに腫瘍を形成し、Lumzone で蛍光を測定した。

その結果、腫瘍部位の全部(図1c)あるいは一部(図1g)において蛍光を認めた。摘出した腫瘍は両者とも全体が蛍光を示した(図1d,h)この結果はEGFPの励起光の透過性が低いため、皮膚直下の細胞の発現するGFPのみが観察されたことが示唆された。



図1 腫瘍形成とイメージング

3T3-Ras-GFP細胞(1x10⁶個)の皮下移植15日目の明視野(a,e)と蛍光(c.g)イメージおよび摘出腫瘍の 明視野(b,f)と蛍光(d,h)イメージ。マウス1(a-d)では生体内で腫瘍部位全体に蛍光が認められた(c)が、 マウス2では一部のみに蛍光が認められた(g)。しかし、摘出した腫瘍は、全体に蛍光が認められた。

②蛍光タンパク質発現細胞を移植したマウスの蛍光イメージング

Ras および DeRed(励起波長 557nm、蛍光波長 579nm)の遺伝子導入をした NIH3T3 細胞(1.2x10⁵-1.2x10⁶個)を ヘアレスマウス(HRM2)の皮下および小腸に移植し、直後に蛍光を観察した。

その結果、皮下に移植した細胞では容量依存性の蛍光が観察された(図2a-d)。一方、皮皮膚表面より約4mmの深さに位置している小腸に移植した細胞(1.2x10⁶ 個)の蛍光は全く観察されなかった。以上の結果より DeRed の蛍光は皮下であれば明瞭に観察されるが、皮膚表面より約4mm 深度では 1.2x10⁶ 個の細胞では観察 できないことが明らかとなった。



図2 3T3-Ras-DeRed細胞の移植直後のイメージング

ヘアレスマウス皮下に1.2x10⁶個(①)、4.0x10⁵個(②)、4.0x10⁵個(②)の細胞を移植(a)。ヘアレスマウスの 小腸内(④)に1.2x10⁶個の細胞を移植し、腹部を縫合(b)。移植後のマウスの明視野(c)と蛍光(d)イメージ。 皮下移植では用量依存的な蛍光が認められたものの、小腸移植での蛍光は認められなかった。観察には Cy3フィルター(励起552nm、蛍光565nm)を使用。

③マウスストレインによる生体イメージングの比較

Ras/DeRed 3T3 細胞(1.2×10⁵ -1.2×10⁶ 個)をヘアレス(HRM2)、BALB/c、C57BL/6 の各マウスの皮下に移植し、 直後に直後に蛍光を観察した。

その結果、ヘアレスマウスでは容量依存性の蛍光が観察されたが(図3a-c)、BALB/c マウス(図3d-f)、 C57BL/6 マウス(図3g-i)では感度が低くなること、特に白毛系のマウスでは毛の自家蛍光がイメージングの著 しい障害となることが明らかとなった(図3d-f)。



図3 Ras/DeRed 3T3細胞の移植直後のイメージング

ヘアレスマウス(a-c)、BALB/c(d-f)、C57BL/6(g-h)の各マウスの明視野(a,d,g)、GFPフィルター(b,e,h)、 Cy3フィルター(c,f,i)のイメージ。1.2x10⁶個(①)、4.0x10⁵個(②)、4.0x10⁵個(②)の細胞を皮下投与した。 ヘアレスマウスではすべての量の投与で皮下のシグナルが明瞭に認められた。BALB/cではGFPフィル ターおよびCy3フィルターのイメージにおいて、毛のシグナルが強く認められた。C57BL/6マウスでは毛の シグナルは認められず、DeRedのシグナルは1.2x10⁶個のシグナルのみ認められた。

④小括1

マウス生体イメージングにおいて EGFP では生体深部のイメージングに適していないことが示唆された。また DeRed でも比較的低密度の細胞で発現している場合は皮下4mm以下の深度では検出できないことが明らかと なった。

さらに体毛(特に白色体毛)は蛍光イメージングの障害となることから、蛍光タンパク質の遺伝子組換マウスを 作成し生体イメージングを行う場合は、剃毛あるいはヘアレスマウスと交配して無毛化する必要があることが示 された。

2) PROsense および MMPsense によるプロテアーゼ活性の可視化

PROsense680 と MMPsense680 によるプロテアーゼ活性の局在を、腫瘍形成モデルおよび脳梗塞モデルを用いて検討した。特に脳梗塞モデルでは Lumazone と長波長蛍光観察システムによる組織レベルの蛍光観察を組み合わせることにより、個体から組織・細胞レベルの連続した可視化技術の確立を目指した。

PROsense680 はプラスミンあるいはカテプシンの切断、MMPsense680 はマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs)の切断により蛍光波長 700 nm(励起光 680 nm)の蛍光を発する指示薬である。プラスミンは血栓の主 成分であるフィブリンや細胞外マトリックスタンパク質の分解を担う細胞外プロテアーゼであり、血栓溶解や組織 のリモデリングに寄与する。生体内でのプラスミン活性化因子として、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)お よびウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)の2つのプロテアーゼが存在している。これらの因子を総称 して線溶系と呼ぶ(図4)。MMPs も細胞外マトリックスタンパク質の分解を介して組織リモデリングに重要な役割 を担う。組織リモデリングは、正常な生体の成長プロセスに加え、病態形成、傷害修復、腫瘍形成などの形態の 変化に広く認められる反応である。また、MMPs のうち MMP3, MMP9,MMP12 はプラスミンによって不活性前駆 体から活性化されることが知られている。



図4 線溶系

プラスミンは血栓の主成分であるフィブリンや細胞外マトリックスタンパク質(ECM)の分解を担う細胞外プロテアーゼであり、血栓溶解や組織のリモデリングに寄与する。生体内でのプラス ミン活性化因子として、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)およびウロキナーゼ型プラスミ ノゲン活性化因子(uPA)の2つが存在する。これらの因子を総称して線溶系と呼ぶ。またプラ スミンは不活性前駆体MMP(proMMPs)を活性型MMP(activeMMP)に活性化する。MMPsも ECMの分解を介して組織リモデリングに重要な役割を担う。

①腫瘍形成モデルにおける観察

これまでに腫瘍の形成において、プラスミンおよび MMP 細胞外プロテアーゼの発現が亢進していることが報告 されている。これらを踏まえて、Lumazoneを用いた ROsense680と MMPsense680の可視化を、腫瘍形成モデル を用いて検討した。

ヌードマウス(BALBc^{nu/nu})の皮下に 4×10⁵ 個の Ras/GFP 遺伝子導入 NIH3T3 細胞を移植した。移植 2 週 間後に明瞭な腫瘍の形成を確認し、PROsense 50 μI、あるいは MMPsense 75 μI 静注し、24 時間後に Lumazone にて蛍光を観察した。

その結果、形成された腫瘍は GFP 陽性であった(図5)。この観察は2-1で示した結果に一致する。さらに、 腫瘍の内部および周囲において PROsense680(図5)および MMPsense680(図6)の蛍光が観察された。さらに 腫瘍を被覆する皮膚において活性が顕著であった。



図5 PROsenseによる腫瘍イメージ

経皮(a-d)および皮膚剥離(e-f))の明視野(a,e)、GFP(b,f)、PROsense(c,f)、 GFPとPROsenseの重ね合わせ。GFPに対してPROsenseのシグナルは腫瘍 組織間隙に強く認められた。aのバーは1cmを示す。



図6 MMPsenseによる腫瘍イメージ 経皮(a-d)および皮膚剥離(e-f))の明視野(a,e)、GFP(b,f)、MMPsense(c,f)、 GFPとMMPsenseの重ね合わせ。GFPに対してMMPsenseのシグナルは皮膚 に強く認められた。aのバーは1cmを示す。

これらの結果より、Lumazoneを用いてプラスミン/カテプシンの活性の分布あるいは MMP の活性の分布の可 視化法を確立した。また、腫瘍形成時に腫瘍を被覆する皮膚においてこれらの細胞外プロテアーゼの活性化が 誘導されることを見いだした。

次に、本評価システムを用いて、新規がん遺伝子 dynactin-associated protein(dnAP)の腫瘍形成能の検討を 行った。 dynAP は AktSer473 のリン酸化活性を有する膜貫通タンパク質である。 ヌードマウス(BALBc^{nu/nu})の皮下に LacZ および GFP 遺伝子を導入した NIH3T3 細胞(LacZ)、dynAP およ び GFP 遺伝子を導入した NIH3T3 細胞(dynAP)、H-Ras および GFP 遺伝子を導入した NIH3T3 細胞(H-Ras)、 dynAP,H-Ras および GFP 遺伝子を導入した NIH3T3 細胞(H-Ras dynAP)を各 4×10⁵ 個を移植し、その後の腫瘍 形成を観察した。その結果 dynAP の導入により腫瘍形成が認められた(図 7a)。その腫瘍形成能は H-ras よりも 少なかったものの、H-ras との共導入により相加的に形成能を促進した。(図 7a)。これらの結果は、dynAP がが ん遺伝子として機能し、その作用は H-ras と異なる機序に因ることを示唆する。また、dynAP 導入により形成され た腫瘍は H-ras 導入により形成された腫瘍に比べて血管が多く、形成される腫瘍の性質に差が認められた(図 7b)。



5 mm

図7 dynAPの腫瘍形成の評価

スードマウス(BALBcnu/nu)の皮下にLacZおよびGFP遺伝子を導入したNIH3T3細胞(LacZ)、dynAPおよびGFP遺 伝子を導入したNIH3T3細胞(dynAP)、H-RasおよびGFP遺伝子を導入したNIH3T3細胞(H-Ras)、dynAP,H-Rasお よびGFP遺伝子を導入したNIH3T3細胞(H-Ras dynAP)を各4×10⁵個を移植、腫瘍サイズ(a)および腫瘍の形態 (b)を評価した。

その結果dynAPの導入により腫瘍形成が認められた(a)。また、dynAP導入により形成された腫瘍はH-ras導入により形成された腫瘍に比べて血管が多く、形成される腫瘍の性質に差が認められた(b)。

②脳梗塞モデルにおける観察

C57BI/6J マウスに光化学凝固反応を用いて脳梗塞を誘導し、誘導後3日目に PROsense680 150 µIを静注した。また安楽死1時間前に血管透過性マーカーである FITC-デキストランを静注した。PROsense680 投与24時間後に FITC-デキストランおよび PROsense の観察を Lumazone で行ったものの、陽性は観察されなかった。その後、安楽死を誘導し、脳を摘出し観察を行った。その結果、全脳および前額断切片において、傷害外周囲部に FITC-デキストランの漏出を認めた。さらにその領域とその周囲に PROsense680 の蛍光を認めた(図8)。



図8 脳梗塞4日目の脳におけるプラスミン活性の分布 反射光(a)で認められる傷害部位の周囲において血管透過性マーカー(bFITC-デキストラン)の陽性 が傷害周囲部の領域に、PROsense陽性(c)がFITC-デキストラン陽性領域(矢印)、およびその外縁部 (矢頭)に認められた。

同様の評価を、プラスミノゲン遺伝欠損(Plg^{+/+})マウスとおよび対照野生型(Plg^{-/-})マウスを用いて行った。その 結果、脳梗塞 4 日目の脳において両マウスで血管透過性の亢進が認められたものの、Plg^{-/-}マウスでは PROsense の陽性を認められなかった。これらの結果より脳梗塞4日目のPROsense 陽性はプラスミン活性を反 映することが明らかとなった。

次に、傷害部位の前額断切片を長波長蛍光顕微鏡観察システムで観察した。その結果、傷害周囲部では浸 潤性細胞様、および血管様の構造に PROsense680 の活性の分布を見いだした(図9)。



図9 脳梗塞後4日目の脳切片におけるプラスミン活性の分布 後可視光イメージ(a)とプラスミン活性(b:PROsense680)。プラスミン活性は傷害周囲部の浸潤性細胞(矢頭)と血管様の構造(矢印)に認められた。バーは100mmを示す。

さらに、血管透過性マーカーである FITC-デキストランとの比較を行ったところ、傷害周囲部の FITC 陽性部位 およびその周囲の陰性部位でプラスミン活性を認めた(図 10)。特に FITC 陽性領域においては、プラスミン活性 との強い共在(図 11c、矢印)認められた。一方、FITC 陰性領域においても、プラスミン活性が顕著な領域では、 微弱な FITC 陽性を認めた(図 11f、矢頭)。これらの結果より、プラスミン活性は透過性が亢進した血管に局在す る可能性が強く示唆された。



図11 脳梗塞後4日目の脳切片におけるプラスミン活性とFITCの分布 図6hの矢印の示すFITC陽性-プラスミン活性(PROsense)陽性領域(a-c)および矢頭の示す FITC陰性-プラスミン活性陽性領域(d-f)の分布。FITC陽性領域ではプラスミン活性の分布 が強く一致する領域が認められる(c、矢印)。また、FITC陽性領域においても、プラスミン活 性は微弱な陽性を共在する(f、矢頭)。パーは10μmを示す。

③PROsense および MMPsense によるプロテアーゼ活性の可視化の応用

脳血管は血液脳関門によりその透過性が極めて低く制御されているが、脳梗塞に伴い脳梗塞周囲部で血管透 過性が亢進することが知られている。しかしながら、血管透過性亢進の影響の検討はほとんど行われていない。 我々は、脳定量傷害モデルを確立し、傷害後の修復プロセスを定量的に検討するモデルを確立した(Nagai N et.al. Brain Res. 2010; 1322:109-117)。このモデルを用いて、血管透過性の亢進は急性期には神経細胞の生死 に影響を与えないもの、虚血ストレスによる神経細胞死を促進することを明らかにした(投稿中)。

また、上述のように、脳梗塞に伴い傷害周囲部においてプラスミン活性が認められたことから、プラスミン活性の生理的意義と活性発現メカニズムについて検討を行った。

まず、PROsense 陽性がプラスミン活性に起因することを確認するため、PROsense の陽性を、プラスミノゲン遺 伝子欠損(Plg^{-/-})マウスを用いて検討した。その Plg^{-/-}および対照野生型(Plg^{+/+})マウスに脳梗塞を誘導し、誘導 後1、4、7日目の血管透過性マーカーの FITC-デキストランおよび PROsense 陽性の分布を検討した。その結果、 両マウスでは、傷害4日目に傷害周囲に血管透過性の亢進を認め、その領域は脳梗塞7日まで経時的に縮小 した。PROsense 陽性の分布は脳梗塞4日後の(Plg^{+/+})マウスの傷害周囲とその外縁に認められ、この活性は 傷害7日目の傷害内部にも認められた。一方、Plg^{-/-}マウスでは脳梗塞4日目の活性は消失したものの、



図11 Plg*/*マウスとPlg^{-/-}マウス脳梗塞脳におけるPROsense陽性の分布の比較

脳梗塞1日目(A)、4日目(B)7日目(C)のPlg^{+/+}マウス(WT)およびPlg^{+/+}マウス(KO)の反射光、FITC-デキス トラン、PROsenseを示す。傷害1日目では両マウスとも傷害周囲部にFITC-デキストランの漏出が認められ たが、PROsense陽性が認められなかった。脳梗塞4日目では、Plg^{+/+}マウスの傷害周囲部にFITC-デキスト ランの漏出(ij)が認められたが、本領域とその外縁に認められたPROsense陽性はWTのみに認められ、 Plg^{-/-}マウスには認められなかった。脳梗塞7日目では両マウスともに傷害内部にFITC-デキストランの漏出 (gh)およびPROsense陽性が認められた。 傷害 7 日目では傷害周囲部に分布が認められた(図 11)。これらの結果より、傷害 4 日目の傷害周囲に認めら れた PROsense 陽性はプラスミン活性に由来すること、また傷害 7 日目に認められる PROsense 陽性の一部は プラスミンに依存しないことが示された。

次に、脳梗塞 4 日目の血管透過性領域のサイズを Plg^{+/+}マウスと Plg^{-/-}マウスで比較した。その結果、血管透 過性亢進領域は Plg^{+/+}マウスに比べ Plg^{-/-}マウスで有意に増加していた(図 12)。血管透過性は脳梗塞後 1 日目 から 7 日目まで経時的に縮小する(図 12)ことを考え合わせると、Plg の欠損により血管透過領域の縮小が遅延 することが明らかとなり、プラスミン活性が血管透過性の修復に寄与する可能性が示唆された。また、プラスミン の活性が脳梗塞 4 日後に血管透過性亢進領域の血管様構造に局在していること(図 11)もプラスミンが血管透 過性亢進を修復する可能性を支持する。



図12 血管透過性亢進領域サイズの比較 Plg+/+マウス(a)とPlg-/-マウス(b)の血管透過性亢進領域を比較した。矢印はFITC陽性 領域を示す。また、サイズを定量た結果をclに示す。サイズは両側大脳皮質の大きさに 対するFITC陽性部位の面積比(%)で表した。 血管透過性亢進領域はPlg+/+マウスに比べPlg-/-マウスで増加していた。

④小括2

以上のように、Lumazoneと長波長蛍光顕微鏡システムを組み合わせた、個体から組織・細胞レベルまでの連続した可視化・評価技術を確立した。また、本技術を用いて腫瘍形成および脳梗塞の血管透過性における細胞 外プロテアーゼ活性の分布の可視化に成功した。特に、脳梗塞後の血管透過性亢進の修復においてプラスミン 活性が寄与する可能性を明らかにした。血管透過性亢進は脳梗塞の増悪要因と考えられており、その修復プロ セスにプラスミン活性が寄与することを示唆したことは、脳梗塞治療において重要な知見と考える。

3)活性酸素種の発生の可視化

DHEを用いて、活性酸素種(ROS)発生の局在を、脳梗塞モデルを用いて検討した。

ROS はミトコンドリアでのエネルギー産生に伴い生成するが、細胞内の抗酸化システムにより除去される。しかし、紫外線照射などの刺激により発生する過剰な ROS は DNA を含む細胞内分子を破壊し、細胞の生存に影響

を及ぼす。一方、マクロファージは体内に侵入した細菌の除去のために、活性酸素の生成を行うことも知られて いる。

ROS 産生は Dihydroethidium(DHE)の酸化物の蛍光を指標とした。DHE は脂質膜透過性を持ち、ROS により酸化された後、核に移行して DNA に結合して蛍光波長を変化させる(励起光 480-530nm、蛍光 510-630nm)。 また低分子で生体に対する毒性が低く、脳を含む多くの臓器を対象にした生体イメージングに利用可能と考えられる。

①培養細胞を用いた ROS の可視化の検討

DHE による ROS 産生の可視化を確認するため、マウス脳由来血管内皮細胞株である bEnd.3 を用いて UV 照 射に伴う活性酸素種の生成を可視化した。可視化には CellROX green および DHE を用いた。CellROX green は ROS による酸化により、核に移行して蛍光を発する試薬(励起光 485nm/蛍光 520nm)であり、培養細胞用での ROS 生成指示薬として市販されているものの個体への使用はできない。



図13 DHEによる培養細胞を用いたROSの可視化 bEnd.3を用いてUV照射に伴うROSの生成をCellROX(a,c)およびDHE(b,d)を用い て可視化した。UV非照射(a,b)に比べ、UV照射によりGFPフィルターで観察される 核染色がCell Rox(c)、DHE(d)ともに顕著に誘導された。パーは100µmを示す。

観察の結果、CellROX および DHE は添加しても蛍光を認めないが、UV 照射により GFP フィルターで観察される核染色が両者とも顕著に誘導された(図 13)。この結果より、ROS 産生に伴う酸化 DHE の可視化が GFP フィルターにより可能であることが確認できた。

②脳梗塞における ROS 産生の可視化と血管透過性亢進の検討

脳梗塞においては、脳血管閉塞とそれに続く再灌流によりROSの生成が起こり、脳梗塞を増悪すると考えら

れている。しかし、多発性硬化症において脊髄での血管透過性の亢進に伴い血漿中の Fibrinogen(Fbg)が漏出し、 ミクログリアの活性化により ROS を産生して軸索を損傷する可能性が提唱された(Ryu et.al. Nat Comm 2010; doi: 10.1038 /ncomms9164.)。脳梗塞においても急性期に血管透過性が亢進することから、同様のメカニズムで 神経障害が誘導される可能性が考えられる。この可能性を検証するため、生体内で ROS 産生と血管透過性を 同時に可視化するシステムを確立し、脳梗塞に伴う血管透過性の亢進と ROS の産生を検証した。

マウス脳定量傷害モデルにおいて、脳梗塞後4時間で傷害周囲部に血管透過性マーカーの Cy5-デキストランの漏出の亢進が認められた。一方、GFP フィルターによる観察において、脳全体に自家蛍光が認められるものの、DHE 投与に伴い傷害周囲での酸化 DHE の蛍光の増強が認められた。さらに、DHE と Dextran-Cy5 の同時に投与した結果、傷害周囲部の Dextran の陽性の領域と DHE 蛍光の陽性領域が一致した(図 14)。



図14 脳梗塞に伴う血管透過性亢進とROS産生

脳梗塞後4時間の脳でのROS産生と血管透過性の亢進を比較した。無投与(a,e,i)、DHEのみ (b,f,j)Cy5-デキストラン(c,g,k)、DHEとCy5-デキストラン(d,h,l)投与の脳。GFPフィルター(ad)、Cy5フィルター(e-h)、重ね合わせ(i-l)。GFPフィルターで観察される酸化DHEが傷害周 囲部で認められ、その分布はCy5フィルターで観察される血管透過性亢進領域と一致した。

次に、各脳の切片を、各種フィルターを用いて比較した(図 15)。傷害周囲部の酸化 DHE は GFP フィルターの みで観察された。一方、DsRed フィルターは DHE 投与に依存した全脳での蛍光を認め、還元型の DHE の蛍光を 観察していると考えられた。Cy5-デキストランは Cy5 および Cy5.5 フィルターで観察されたが、Cy5 フィルターの ほうがより明瞭であった。これらの結果より、酸化 DHE の分布は GFP フィルターでのみ観察され、ROS 産生と血 管透過性亢進がそれぞれ GFP フィルターおよび Cy5 フィルターでの観察により比較可能であることが明らかとな った。

また、切片の観察においても、全脳の観察同様に酸化 DHE の示す ROS 産生(GFP フィルター)と Cy5 陽性の

示す血管透過性亢進領域分が一致していた(図 15)。



図15 脳梗塞脳切片の各フィルターでの観察

無投与、DHE、cy5-デキストラン、DHE+cy5-デキストランの脳切片の比較。Altb-dの写真のサンブルの配置を示 す。b:GFPフィルター、c:DsRedフィルター、d:Cy5フィルター、e: Cy5.5フィルターでの観察。GFPフィルターでは傷害 周囲にのみで観察された、Cy5-デキストランはCy5とCy5.5のフィルターで観察されたが、Cy5フィルターの方がよ り顕著であった。DeRedフィルターではDHE投与に伴う蛍光が認められた。fltbの、gltdの点線内の拡大写真、h はその重ね合わせ。酸化DHEとCy5の陽性は一致した。

さらに、組織レベルの ROS 産生と血管透過性の関連を、長波長蛍光観察システムを用いて検討したところ、 ROS 産生細胞が傷害周囲部に認められ、その分布は血管透過性亢進領域と一致していた(図 16)。



図16 脳梗塞脳切片の蛍光顕微鏡観察

ROS産生と血管透過性亢進を長波長蛍光観察システムで評価した。酸化DHEの示 すROS産生(a、核染色)とCy5-デキストランの示す血管透過性亢進領域(b)は重複し ていた。aの実線は脳表面を、点線は傷害部位と正常部位の境界を、バーは200µm を示す。cの矢印は共陽性を示す。

上記の評価に利用した光化学血栓モデルは光感受性色素である Rose Bengal を静注し、局所に光を当てて 一重項酸素を生成し、血管障害とそれに続く血栓形成により脳梗塞を誘導するモデルである。このモデルは、傷 害形成時に活性酸素の生成が誘導されている可能性があるため、よりヒトの病態に近い中大脳動脈結紮モデ ルを用いて、同様の評価を行った。

その結果、傷害後4時間では血管透過性の亢進と酸化DHEの蛍光は認められなかったものの、1日目、4日 目7日目に傷害内部での血管透過性亢進(Cy5)とそれに一致するDHE蛍光の増加を認めた(図17)。これらの 結果より、動物モデルを問わず、血管透過性亢進とROS産生は関連していることが明らかとなった。



図17 中大脳動脈閉塞モデルにおける血管透過性亢進とROS産生 中大脳動脈閉塞モデルを用いてROS産生(a,d,g,j)と血管透過性亢進(b,e,h,k)の経時 的変化(a-c:4時間、d-f:1日、g-i:4日、j-1:7日)を評価した。脳定量傷害モデルと異なり、 傷害4時間後には顕著な酸化DHEの生成および血管透過性の亢進は認められず、 1日-7日では血管透過性亢進した酸化DHEの産生が認められた。

③小括3

以上のように Lumazone と長波長蛍光観察システムを用いて、ROS 産生と血管透過性亢進を同時に評価する システムを確立した。また、このシステムを用いて、脳梗塞の急性期の血管透過性亢進が ROS 産生を誘導する 可能性を明らかにした。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

本研究室の研究テーマは、抗脳梗塞薬を開発する基盤を確立することである。本プロジェクトにおいて確立した、 生体イメージング装置を用いたプロテアーゼ活性の局在、機能的血管造影および ROS 産生の可視化の技術は、 脳梗塞に伴う血管透過性、プロテアーゼ活性および ROS 産生が脳梗塞に及ぼす影響の検討において有用な技 術であり、これらを用いた検討により脳梗塞の病態形成のあたらしい一面がが明らかになりつつある。今後はこ れらの分子メカニズムの解明を進める予定である。

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

- 1) Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, <u>Nagai N</u>, Tokuhisa T, Matsuo O. Lack of both α2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. Life Sci. 査読有 93:89-95. 2013.
- *2).Kunoh T, Wang W, Kobayashi H, Matsuzaki D, Togo Y, Tokuyama M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, <u>Nagai N</u>, Nakamura T, Nomura S, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T. Human Dynactin-Associated Protein Transforms NIH3T3 Cells to Generate Highly Vascularized Tumors with Weak Cell-Cell Interaction. 査読有 PLoS One. 10: e0135836. 2015.
- 3) Suzuki Y<u>, Nagai N</u>, Yamakawa K, Muranaka Y, Hokamura K, Umemura K. Recombinant tissue-type plasminogen activator transiently enhances blood-brain barrier permeability during cerebral ischemia through vascular endothelial growth factor-mediated endothelial endocytosis in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 査読有 35: 2021-31. 2015
- 4) Suzuki Y, <u>Nagai N</u>, Umemura K. Front Cell Neurosci A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. 査読有 Front Cell Neurosci. 25;10:2. 2016.

<図書>

- 1) マウス解剖イラストレイテッド、1-105 頁、秀潤社、2013 年
- 2) バイオテクノロジー入門、建帛社、1-157 頁、2016 年

<学会発表>

- 第 90 回日本生理学会大会、山田雅香、永井信夫、脳傷害修復プロセスにおける α2アンチプラスミンの役割、 東京、2013 年 3 月。
- 2)第36回日本血栓止血学会学術集会、木村七海、長谷川慎、永井信夫、血管内皮細胞表面のプラスミンの基質の検討、大阪、2014年5月
- *3) <u>第 36 回日本血栓止血学会学術集会湯川直人、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫、脳梗塞に伴う傷害部位周辺</u> での血管透過性の亢進におけるプラスミンの関与、大阪、2014 年 5 月
- 4)第36回日本血栓止血学会学術集会、酒井祐輔、森田真弘、大森智恵美、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫、脳 梗塞における組織型プラスミノーゲン活性化因子(tPA)による神経機能障害の回復への関与の検討、大阪、 2014年5月
- 5) 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、大森智恵美、高島里美、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫、脳梗塞後の神 経機能制御におけるプラスミノーゲンの寄与の検討、大阪、2014 年 5 月
- 6)第36回日本血栓止血学会学術集会、高島里美、岩前拓志、永井信夫 血管内皮細胞での Tie-1 および Tie-2 の発現における tPA の作用 第36回日本血栓止血学会学術集会、大阪、2014年5月
- 7) 第 92 回日本生理学会大会、永井信夫、酒井祐輔、脳梗塞後の修復における tPA の関与、神戸、2015 年 3 月
- 8) 第37回日本血栓止血学会学術集会、酒井祐輔、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫 組織型プラスミノーゲン活性

化因子(tPA)の脳梗塞後の組織学的回復への関与の検討、山梨、2015年5月

- 9) 第 93 回日本生理学会大会、Miyabi Ono, Nobuo Nagai Effect of high-fat diet on alpha・2-antiplasmin knock out mice.札幌 2016 年 3 月
- 10) 第 93 回日本生理学会大会、Nanami Kimura, Makoto Hasegawa, Nobuo Nagai. Identification of novel substrates of plasmin on endothelial cell.札幌 2016 年 3 月
- 11) 第 93 回日本生理学会大会、Yusuke Sakai, Chiemi Omori, Yasuhiro Suzuki, Kazuo Umemura, Nagai Nobuo Role of tissue plasminogen activator/ plasmin system on the functional recovery and histological repair in ischemic stroke in mice. 札幌 2016 年 3 月
- 12) 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、永井 信夫、木村 七海、長谷川 慎. 血管内皮細胞上のプラスミンの新 規の基質の同定。奈良、2016 年 6 月。
- *13) <u>第 94 回日本生理学会大会、Yasuki Matano, Kumiko Takayama, Ryosuke Ohi, Nobuo Nagai. Reactive oxygen</u> species generation and neural network rearrangement is associated with the increase in vascular permeability after ischemic stroke.浜松、2017 年 3 月
- 14) 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、脳梗塞の傷害部位周辺での血管透過性亢進の修復におけるプラスミンの寄与。名古屋、2017 年 6 月

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「個体レベルの新規分子イメージング技術の開発とその有効性の検証」

(平成 24 年度~平成 28 年度)

研究成果報告書

テーマ3:「X線CTイメージング技術の開発・改良とその有用性の検証」 研究課題:ビワマス筋肉内の脂肪分布・含有率の測定技術の確立とその応用

> 研究機関・研究室名:バイオサイエンス研究科・食品分子機能学研究室 担当者職名・氏名:准教授・河内 浩行 研究協力者:眞田 的貴、沢田 直規、今井 良政、藤井 壮生、青田 昇大

1.研究目的

ビワマスはサケ目サケ科に属する琵琶湖固有の淡水魚である。主にアユやスジエビ、イサザなどを捕 食している。天然のビワマスは餌としてアユやスジエビ、イサザなどを捕食している。他のサケ科の魚 類と同様に母川回帰本能を持つため、成魚は 10 月中旬から 11 月下旬にかけて琵琶湖北部を中心とする 生まれた川に帰り、産卵を行う。そのため、10 月 1 日から 11 月 30 日は禁漁期間と定められている。ビ ワマス漁には自然条件に加え、漁師の経験や腕が必要とされており、漁獲量が限定されている。大きい ものでは 60cm にもなり、旬である初夏のビワマスのその身は非常に脂が乗りマグロのトロにも負けない とされ、琵琶湖の宝とも言われている。ビワマスは人に慣れないため、養殖不可能な魚とされていたが 現在では養殖法が確立されている。しかし、旬の天然ビワマスと比べると脂ののりが少なく味が劣ると されている。そのため旬の天然ビワマスのように美味しい養殖ビワマスを年中食べられることが求めら れている。

ビワマスと同様に筋肉内脂肪(霜降り)が価格、味に影響するウシでは筋肉内にいつ脂肪が入るのか分 かっているため、その時期に脂肪が入りやすい肥育用飼料に切り替え効率良く肥育管理が行われている が、ビワマスにおいてはいつ筋肉内に脂肪が入るのかは明らかになっていない。

本研究では、ビワマスの脂肪量の評価法を、CT を用いて確立し、その方法を用いて筋肉内に脂肪が 入る時期を決定し、ビワマスに効率の良く脂肪を蓄積させる養殖法の開発につなげるのが目的である。 脂の乗りを評価する方法として現在主に用いられている方法が Bligh & Dyer 法である(Bligh ら 1959)。 この方法は生体材料から総脂質を抽出する方法で、特に、水溶性のものと脂溶性のものの分離にも頻用 され、動物組織や脂肪細胞、食品など様々なものを対象として行われている。本研究では、Bligh & Dyer 法とCTを用いた測定法を比較し、CTを用いたビワマスの筋肉内脂肪の評価を検証した。次に、筋肉内の 脂肪量の成長に伴う変化を、CTを用いて検討し、ビワマスの筋肉内に脂肪が蓄積する時期の解析を試み た。さらに、測定が簡便かつ安価な魚類の新しい脂肪率測定方法としてFish Analyzer (Yamato)が登場し、 漁業関係者から俄然注目を集めたことから、今回 Fish Analyzer がビワマスの脂肪含有測定にも適する どうかの検討を行った。

2.研究成果

1) ビワマスの筋肉内脂肪の CT を用いた評価

緒言

動物組織の脂質含量の研究において、現在主に脂質抽出及び脂質量測定に用いられている方法が Bligh &Dyer 法である。これは簡便な生体材料からの脂質抽出法であり、クロロホルム、メタノール、低濃度 の酢酸をボルテックス、遠心分離することで 3 層に分離し、有機溶媒層である下層に脂質分子が回収さ れるという方法である。これは脂質量測定として確立された実験法であるのに対し、CT を利用したビワ マスを含めた魚類の脂質量測定はまだ確立されてはいない。そこで本研究では、Bligh&Dyer 法と CT を 用いた測定法を比較し、CT を用いたビワマスの筋肉内脂肪の評価を検証する。



写真:養殖ビワマス(1歳9ヵ月)

方法

<u>CT を利用した脂質量の算出</u>

CT ではビワマス個体の頭部、腹部、尾部の 3 ヵ所を撮影し、そのデータから解析ソフト Metabolic analisis により部位ごとの CT の解析画像をインポートし、3 次元平滑化(SOFT)、その後 2 値化をし、 画像解析を行う。脂肪組織の CT 値はマウスでは upper レベル-145.0、lower レベル-350.0 であるが、ビ ワマスの内臓脂肪より脂肪組織のみと思われる部分を採取し、CT 値を測定したところ、-100 から-300 の 間であったので、ビワマスでは upper レベルを-100.0、lower レベルを-300.0 に設定した。画像解析は、 X 軸、Y 軸が 0 になっているか確認後、解析する範囲を選択する。下部に表示される上から見たビワマス の CT の解析画像では、全体を選択し、上部に表示されるビワマスの CT の解析画像では、全体、背側、 腹側、内臓脂肪の計4通りを右クリックで囲い込み選択する。解析後、X 軸、Y 軸がずれるため0 に戻し た後、レポート作成を選択し、脂質量を算出する。

<u>Bligh&Dyer法による脂質量の算出</u>

Bligh&Dyer 法ではまず、個体の頭部、腹部、尾部の3ヵ所における背側と腹側から約1gをメス等で 身を剥ぎ、量り取る。それをそれぞれビーカーに入れ、そこに0.1%CH₃COOHを10 mL、メタノールを25 mL、 CHCI₃を12.5 mL入れ、ボルテックスで30秒撹拌し、30分放置する。30分後、CH₃COOHを10 mL、CHCI₃ を12.5 mL入れ、ボルテックス30秒撹拌し、アルミホイル等でビーカーを塞ぎ、一晩放置する。その後、 3 層にしっかり分離したかどうかを確認し、3 層に分かれていれば、上層と、中層をしっかりと取り除く。 下層の有機溶媒層に脂質成分は集まっている。ピンセットでビーカー内のビワマスの身を取り除いた後、 その下層をそれぞれろ過し、ナスフラスコに移す。また、ナスフラスコに有機溶媒層を移す前に、ナス フラスコの重さをそれぞれ正確に量っておく。そしてこの有機溶媒層入りナスフラスコを水に浸し、恒 温槽を約40 に設定したロータリーエバポレーターにかけ有機溶媒を飛ばす。この抽出した脂質分子の 重さを算出し、脂肪の割合を算出する。

結果と考察

図1は、CT によるビワマスの断面写真である。この図の黄色く染まった部分がビワマスに含まれる脂肪である。また、腹側に見える楕円上の大きな脂肪部分は内臓脂肪である。本研究は、全体の脂肪からこの内臓脂肪を除いたデータを出している。この図からわかるように、CT の解析画像で、筋肉組織と筋肉組織の間に脂肪が入っている様子が観察できた。



図1、CTによるビワマスの断面写真



ビワマスを個体番号 A-1 から A-12 までの合計で 12 匹の個体の CT、Bligh & Dyer 法による脂肪の割合 の算出データを頭部、腹部、尾部を背側と腹側に分け、それぞれ比較を行った結果を図 2 に示した。


図2、ビワマスの部位ごとのCTとBligh&Dyer法の比較

また、表1は12匹のビワマス個体のCTとBligh&Dyer法で測定した脂質量の割合の比較である。

表1、ビワマスの部位ごとの脂肪の割合と体重、体長のデータ

胎费割合 。04 (A-1)	ст		Dilah 8 Duay	미나 분락 형	81 A . 04 (A_9)	ст		Diah 9 Duast
<u>相負割日 70(A-1)</u> 頭部 背側脂肪	3.4		6.2	<u>加貝</u> 頭部	<u>时日 70(A-2)</u> 背側脂肪	4.2		6 6
<u>或得得的</u> 能防	3 3		5.7	面刻	<u>肖朗船时</u>	3.8		6.0 6.7
<u>旗印 波风加加</u> 隋朝 娄卿昨时	2		3.1	防部	<u>波风加加</u> 背側時時	1.8		4 1
随动 随间形比	2 2		5.0	腹の	<u>肖肉加加</u>	2 1		4.0
皮中 波风加加	1 4		1.5	皮印	<u>能像能</u> 能	1 4		7.0 2.5
尼亚 隋御能陆	1.4		1.0	尼立	<u>月頃加加</u>	1.8		2.5
尼印 腹侧加加 体重·174~	1.7	休息.270-	1.9	16 10	<u>腹側加加</u> 107~	1.0	休息 · 290m	z.1
m主·1/4g		种设.2701		<u> </u>	1 <i>31</i> g		₩ <u>1</u> 2.20011	
時費割合:96(Δ-3)	ст		Bligh & Dver法	時費加	비수 • 96 (Δ-4)	ст		Bligh & Dyer注
<u> </u>	12.9		14.9	頭部	背側脂肪	9.1		8.7
頭部 腹側脂肪	12.8		12.9	頭部	<u>肖朗船防</u> 腹侧脂肪	7		6.5
腹部 背側脂肪	6		6.2	腹部	<u>波(別記)の</u> 背側脂肪	3.3		19
腹部 腹側脂肪	7.2		8	腹部	<u>肖朗船防</u> 腹侧脂肪	4.6		7.8
尾部 背側脂肪	2.1		3.6	尾部	<u>後</u> 側時時	1.6		2.5
尾部 背侧脂肪	2		A 1	尾翦	<u>再例能時</u>	2		5.0 5.4
体重·325g	-	体長・320m		体重・	346 g	1-	体長·334m	m.
			FT- 32. 1	0.005		μ		
脂質割合・%(A-5)	ст		Bligh & Dver法	胎督乳	레合·%(A-6)	ст		Bligh & Dver法
<u>胡賀朝日 20(八 0)</u> 頭部 背側脂肪	97		4.4	頭部	背側脂肪	5.2		2.5
頭部 腹側脂肪	6.2		3.6	頭部	<u>肖朗船防</u> 腹側脂肪	5.1		1 1
腹部 背側脂肪	2.9		4.2	腹部	<u>波() 船 防</u> 背側脂肪	2.6		1.9
腹部 腹側脂肪	3.3		2.3	腹部	<u>肖朗船防</u> 腹側脂肪	3.9		3
尾部 背側脂肪	1.4		2.0	尾部	<u>波() 加切</u> 背側脂肪	1.5		14
尾部 腹側脂肪	1.9		4.6	尾部	<u>肖朗船防</u> 腹侧脂肪	1.5		3.5
体重:335g		体長:338r	nm	位重	323¢		体長 :315m	m
11 2								
脂質割合・%(A-7)	習割合・%(A−7) CT		Bligh & Dver法	脂質類	副合・%(A-8)	ст		Bligh & Dver法
頭部 背側脂肪	6.3		1.8	頭部	背側脂肪	3.6		0.9
頭部 腹側脂肪	6.9		14.8	頭部	腹側脂肪	3.9		0.9
腹部 背側脂肪	4.1		14.8	腹部	背側脂肪	1.8		3.8
腹部 腹側脂肪	4.7		2.8	腹部	腹側脂肪	2.4		9.4
尾部 背側脂肪	1.2		1	尾部	背側脂肪	1		1.7
尾部 腹側脂肪	1.6		2.7	尾部	腹側脂肪	1.5		2.9
体重:363g		体長:322r	nm	体重:	409g		体長:350m	m
脂質割合・%(A-9)	СТ	-	Bligh & Dyer法	脂質器	削合・%(A−10)	СТ		Bligh&Dyer法
頭部 背側脂肪	4.7		1.4	頭部	背側脂肪	2		0.9
頭部 腹側脂肪	5		3	頭部	腹側脂肪	2.6		2.8
腹部 背側脂肪	2.8		3.1	腹部	背側脂肪	1.5		2.6
腹部 腹側脂肪	5		4	腹部	腹側脂肪	2.2		3.2
尾部 背側脂肪	1		1	尾部	背側脂肪	0.8		0.4
尾部 腹側脂肪	1.7		3.5	尾部	腹側脂肪	1		1.8
体重:529g		体長:360r	nm	体重:	399g		体長:343m	m
脂質割合•%(A-11) CT		Bligh & Dyer法	脂質	削合・%(A-12)	СТ		Bligh & Dyer法	
頭部 背側脂肪	2.6		2.6	頭部	背側脂肪	3.1		3.1
頭部 腹側脂肪	2.6		1.8	頭部	腹側脂肪	3.2		5.2
腹部 背側脂肪	2.4		3.1	腹部	背側脂肪	2.3		5.7
腹部 腹側脂肪	2.9		5.1	腹部	腹側脂肪	3		4.1
尾部 背側脂肪	0.8		1.4	尾部	背側脂肪	1		0.2
尾部 腹側脂肪	1.2		3.3	尾部	腹側脂肪	1.9		3.3
体重:527g		体長:382r	nm	体重:	381g		体長: 310m	m

魚類は頭部、腹部、尾部の順に脂が多く、背側と腹側については、マグロでいう大トロ(大阪黒門市場)、サケでいうハラスと呼ばれる脂が非常にのった部位が腹側にあるため、基本的に腹側の方が脂肪の

量が多い。このデータを見てわかるのが、CT では、頭部と腹部で多少誤差があるものがあったものの、 ほぼどのデータも頭部、腹部、尾部の順に脂質が多く含まれているのがわかる。これに対し Bligh & Dyer 法では、体長 300mm 以下の A-1、A-2 と、300~320mm の A-3、A-6、A-12、320mm 以上の A-4、A-5、A-7、 A-8、A-9、A-10、A-11 に分け比較してみると、300mm 以下では CT と同様に頭部、腹部、尾部の順に脂質 が多く、また、背側と腹側では腹側の方が多いことがわかるが、300~320mm ではこれらの逆転が見られ はじめ、320mm 以上では腹側の方で脂質が多い傾向にあるが、頭部、腹部、尾部の順で脂質が多くなって いるものが少なく、データがバラついているのがわかる。

この結果より、恐らく体重や体長が小さければ Bligh&Dyer 法は正確な測定が可能であるが、個体が 大きくなればなるほど、組織を採集した部分によって測定値がバラつくのではないかと推察できる。そ れは、個体が大きくなれば表面積が大きくなるのに対し、無作為に約1g量り取るという採取法のため、 どこから採集するかにより誤差が生じてしまうのではないかと考えられる。本研究では、個体の中で最 も大きなものが A-11 であったが、これでもビワマスの中では大きいと言えるサイズではない。今後の研 究では、より大きなサイズの個体でもこれらを比較していく必要があると思われる。だが、ビワマスの 脂肪量測定において CT を利用した方法と Bligh&Dyer 法ではどちらが適当かという点では、体調 300mm 以下のサイズのビワマスに対して Bligh&Dyer 法は適用可能といえるが、320mm 以上になれば Bligh& Dyer 法ではさらにサンプリング領域を増やさなければ対応できないと考えられ、その点では CT の方が簡 便に実像評価できていると思われる。従って、今後はさらにより大きいサイズのビワマスでも CT により 筋肉内脂肪を測定、検証することで CT を利用した方法の確立を目指して行きたい。



さらに、図3はこれらのビワマスの体長に対する脂肪割合を部位ごとにプロットしたものである。

図3、ビワマスの部位ごとの脂肪割合

今回の測定では、サンプル数が少なく、いつどの部位に脂肪が入り出すのかその傾向は明らかではな い。本研究の最終目標は、マグロでいう大トロ、サケでいうハラスの部分にビワマスではいつ脂が入る かを知ることにある。肉牛ではビワマス同様、筋肉内脂肪の量により価値が決まる産業動物である。脂 肪組織は、腎臓、筋肉間、皮下、筋肉内の順で増加し、13ヶ月齢から19ヶ月齢にかけて最長筋内の脂肪 細胞数が増加すること、最長筋内の脂肪細胞数と脂肪交雑は高い相関関係を有することが報告されてい る。これにより肉牛は15ヶ月から17ヶ月齢にかけて脂肪が増えやすい飼料(ビタミンA欠乏飼料)が 与えられている。ビワマスでも、いつ大トロ、ハラスの部分に脂肪が入るのかわかれば、その時期にウ シと同様に脂肪が増えやすい飼料を与え、効率よく脂が乗せられ、養殖ビワマスが天然ビワマスに負け ないくらいの味になるのではないかと期待している。そのためにも今後サンプル数を増やし、この研究 を続けていく必要がある。

2) CT 解析によるビワマスの筋肉組織中の脂肪含有量測定法の確立、および Bligh& Dyer 法との比較

緒言

ビワマスの養殖においては天然のビワマスと比較し脂の乗りが劣ることが課題となっている。また、 サケやマスにおいて頭部から腹部の腹側のハラスと呼ばれる脂が乗りやすい部位に、ビワマスではどれ くらいの大きさに成長すれば、脂が乗るのか明らかになっておらず、検討していく必要がある。

その為には脂肪含有量の測定が必要であり、これまで CT を用いて測定を行っている。CT は X 線の吸収 量が組織によって異なることを利用し、生体内部の 3 次元構造を非侵襲的に可視化する技術であり、CT において脂肪の X 線吸収値(CT 値)は筋肉組織より低い。これまでに簡便な生体材料からの脂質抽出法 である Bligh-Dyer 法と比較し CT の方がビワマスの脂肪含有測定において優れていることを報告した。

前章に引き続き Bligh-Dyer 法と CT の比較を行うが、前章で最もばらつきが大きな中央部・腹側を 9 分割し Bligh&Dyer 法による解析を行い、より詳細な比較検討を行った。

これとともに、ビワマスのハラス部分にいつ脂が入るのかについても検討して行きたい。本研究室で は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるPeroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR

)のアゴニストの探索を行ってきており、幾つかその候補分子が見つかっている。この内1つの醤油油 についてビワマスの飼料に添加し3ヶ月間飼育後食味試験を行い、醤油油添加によるビワマスの食味改 善効果があることが示唆された。この飼育の際、ビワマスの筋肉内脂肪を経時的に測定していたが、体 重約100g~300gの幼魚のサンプルデータは無い。そこで本研究では幼魚からの養殖ビワマスの筋肉内 脂肪を経時的に測定していくことで、いつどの時期に筋肉内に肪が入るかを明らかにすることを目的と する。

ここで明らかになった養殖ビワマスの筋肉内に脂が入る時期に合わせて醤油油を与えることで、効率 良く天然のビワマスと同等の脂の乗りを実現することができると考えられている。これにより養殖ビワ マスの効率の良い肥育管理を目指す。

材料と方法

<材料>

本実験では株式会社びわ鮎センターで育成された醤油油を飼料として与えたビワマスと、コントロールとして既存の飼料を与えたビワマスを用いた。Bligh&Dyer法で用いた溶媒、メタノール(MeOHと略記)、

クロロホルム(chloroform)、酢酸(AcOH と略記)はすべて、和光純薬工業社製を使用した。 < CT を用いた脂質含有量の算出 >

ビワマスの頭部、腹部、尾部の背側と腹側、計6ヵ所(図4)をサンプルとして測定した。



頭部 背側 腹部 背側 尾部 背側頭部 腹側 腹部 腹側 尾部 腹側図4:ビワマスの CT 測定領域

測定は実験動物用 3D マイクロX線 CT R_mCT2(Rigaku)で撮影し、そのデータから解析ソフト Metabolic analisis により部位ごとの CT の解析画像をインポートし、3次元平滑化(SOFT)と脂質とそれ以外を区別するために2値化を行った(図5)。ここでは二値化することにより脂肪組織が緑色で表される。



図5: ビワマスの二値化画像

二値化を行った後、測定範囲を指定し、画像解析を行った(図 6)。測定された部分は黄色で表される。 次に内臓脂肪量を除去する為に、今度は内臓脂肪の領域を選択し内臓脂肪含量の測定を行い(図 7)、全体 の脂肪量から引くことで内臓脂肪以外の脂肪量を算出した。



図6:測定終了後の画像

図7:内臓脂肪測定後の画像

<Bligh&Dyer 法を用いた脂質含有量の算出>

CT で測定した頭部、中央部、尾部の背側と腹側、計6ヵ所の領域(図4)から身を約1gメスで剥ぎ取 り軽く刻んだ後、100 mL ビーカーに入れた。また、同じ領域内でも身を取る場所によって結果が変動す る可能性があるため、一番脂肪量が多いと考えられる中央部・腹側の領域 を9分割した後、約1gを 計りとった(図8)。そこに0.1 N 酢酸を10 mL、メタノールを25 mL、クロロホルムを12.5 mL 加えスタ ーラーで撹拌後、30分間静置する。そして、0.1 N 酢酸を 10 mL、クロロホルムを 12.5 mL 加えて撹拌 し、アルミホイルでビーカーを塞ぎ、常温で一晩放置した。その後、下層にある脂質抽出液を Whatman フィルター グレード 2(GE ヘルスケア・ジャパン)に通し、ロータリーエバポレーター(YAMATO)で溶媒を 飛ばした後、抽出物の重量を測定し脂質含有量を算出した。



図8:9分割した際の採取領域

結果

脂肪組織の CT 値はマウスでは upper レベル-145.0、 lower レベル-350.0 であるが、ビワマスの内臓脂肪より脂肪組織のみと思われる部分を採取し、CT 値を測定したところ、-100 から-300 の間であったので、ビワマスでは upper レベルを-100.0、 lower レベルを-300.0 に設定し測定した。

まず初めに、通常の餌で飼育した養殖ビワマスについて解析を行った。比較的小さい 300 mm 以下の個体においては、CT と Bligh&Dyer 法であまり差を確認することが出来なかった(図 9)。









体長:280 mm

体長:280 mm



図9:通常飼料で肥育した体長 300 mm 以下の養殖ビワマスの部位ごとの CT と Bligh& Dyer 法の比較

また、両者とも脂肪の割合が頭部から尾部にかけて減少しており、背側より腹側の脂肪の割合が多いという結果となった。しかし、体長が大きくなるにつれて Bligh&Dyer 法ではばらつきが大きくなり、特

に中央部・腹側の値に大きな変化を確認することが出来た(図 10)。これに対し、CT ではそのような大き なばらつきを確認することは出来ず、小さいサイズと同様に頭部の方が高く腹側の方が高い傾向を示し た。





図 10:通常飼料で肥育した体長 300 mm 以上の養殖ビワマスの部位ごとの CT と Bligh& Dyer 法の比較

そこで、最もばらつきが大きな中央部・腹側を9分割し、Bligh&Dyer法による解析を行った。その結果、予想通り腹側の脂肪の割合が高い値を示し、背骨に向かうにつれて脂肪の割合が低くなるという結

果となり、Bligh&Dyer法では1gを採取する部位によって大きく結果が異なることが分かった(図11)。



図 11: 中央部・腹側を 9 分割した Bligh&Dyer 法の結果

以上の結果、Bligh&Dyer 法と比較し CT の方が簡便で正確にビワマスの脂肪含有量を評価出来ているので はないかと考え、CT を用いて醤油油を与えたビワマスと既存の飼料を与えたビワマスの脂肪含有量の比 較を行った。



図 12: CT による頭部の脂肪割合の比較

その結果、頭部、中央部の背側、腹側の両方で醤油油群の方が大きく上回ることが分かった(図 12)。 醤油油群も通常群と同様に脂肪の割合が頭部から尾部にかけて減少しており、背側より腹側の脂肪の割 合が高いという結果となった。また、尾部の脂肪割合は通常群とあまり変わらない結果となった(図 12)。

考察

Bligh&Dyer 法では、330 mm 程度の個体では CT と同様の傾向で脂肪の割合が変動したが、個体が大き くなるにつれてばらつきが見られるようになった。これは、個体が大きくなれば表面積が大きくなるの に対し、無作為に約1g量り取るという採取法のため、どの部分から採集するかにより誤差が生じてしま うのではないかと考える。そこで、一番ばらつきが大きく見られた中央部・腹部をさらに9分割し、肉 片を採取する場所によりどの程度脂肪含有量が異なるかを検討した。その結果、腹側の脂肪の割合が高 い値を示し、背骨に向かうにつれて脂肪の割合が低くなるという結果となった。このことから、予想さ れた通り採取する場所により脂肪含量が大きく変動することが示唆された。一方、CT は測定領域内を全 て測定するため、測定ごと、サンプルごとの脂肪割合の変動はほぼ起こらず正確である。また、CT は1 回の測定時間は約1分で非常に簡便にデータ収集が出来る。従って、ビワマスの脂肪含有量を測定する 際には Bligh&Dyer 法ではなくCT の方が適しているのではないかと考える。

本研究では養殖ビワマスの効率の良い肥育管理を目指している。CT の結果から、醤油油を飼料に添加 することでハラスの部分に脂がより多く乗ることが分かった。さらに体長が 350 mm ぐらいまでは通常群 とあまり差はないが、350 mm を超える大きさになると脂の乗りが良くなるという結果から、ビワマスの 体長が 350 mm を超える辺りからハラスの部分に脂肪が付くと考える。そのため、350 mm までは通常の飼 料を給餌し 350 mm 以降で飼料に醤油油を添加することで、効率の良い肥育管理を行うことが出来るとの ではないかと思われる。

3) CT解析とFish Analyzerによる解析の比較、および経時的なビワマスの筋肉組織中脂肪含有量測定

諸言

ビワマスはサケ目サケ科に属する琵琶湖固有の淡水魚である。旬である初夏のビワマスのその身は非 常に脂が乗りマグロのトロにも負けないとされ、琵琶湖の宝とも言われている。しかし琵琶湖での漁獲 量は年間 30 t 弱と少なくなってきており、ビワマスの養殖への期待は高まっているのだが、天然のビワ マスと比較し脂の乗りが劣ることが課題となっている。また、サケやマスにおいて頭部から腹部の腹側 のハラスと呼ばれる脂が乗りやすい部位に、ビワマスではどれくらいの大きさに成長すれば、脂が乗る のか明らかになっておらず、検討していく必要がある。

その為には脂肪含有量の測定が必要であり、これまで CT (Computed Tomography: コンピュータ断層撮影) を用いて測定を行っている。CT は X 線の吸収量が組織によって異なることを利用し、生体内部の 3 次元 構造を非侵襲的に可視化する技術であり、CT において脂肪の X 線吸収値(CT 値)は筋肉組織より低い。 これまでに簡便な生体材料からの脂質抽出法である Bligh-Dyer 法(Bligh ら 1959)と比較し CT の方がビ ワマスの脂肪含有測定において優れていることを報告した(今井 2015)。

ところが、CTよりも測定が簡便かつ安価な魚類の新しい脂肪率測定方法としてFish Analyzer(Yamato) が登場し、漁業関係者から俄然注目を集めている。このFish Analyzer は4つの電極を用いて魚体に微 弱な電流を流し、その流れにくさを示す抵抗値から脂肪率を推定する生体電気インピーダンス法で測定 するものである。そこで、今回 Fish Analyzer がビワマスの脂肪含有測定にも適すのか検討を行った。

これとともに、ビワマスのハラス部分にいつ脂が入るのかについても検討して行きたい。本研究室では脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるPeroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR

)のアゴニストの探索を行ってきており、幾つかその候補分子が見つかっている(眞田 2015)。この内 1つの醤油油についてビワマスの飼料に添加し3ヶ月間飼育後食味試験を行い、醤油油添加によるビワ マスの食味改善効果があることが示唆された(Sugiura ら 2015)。この飼育の際、ビワマスの筋肉内脂肪 を経時的に測定していたが、体重約100g~300gの幼魚のサンプルデータは無い。そこで本研究では幼 魚からの養殖ビワマスの筋肉内脂肪を経時的に測定していくことで、いつどの時期に筋肉内に肪が入る かを明らかにすることを目的とする。

ここで明らかになった養殖ビワマスの筋肉内に脂が入る時期に合わせて醤油油を与えることで、効率 良く天然のビワマスと同等の脂の乗りを実現することができると考えられている。これにより養殖ビワ マスの効率の良い肥育管理を目指す。

材料と方法

<材料>

本実験では鮎茶屋で育成された既存のニジマス育成用飼料に飼料全体の 5%となるように醤油油を添加し た混合飼料(醤油油飼料)を与えたビワマスと、コントロールとして既存のニジマス育成用飼料(通常飼 料)を与えたビワマスを用いた。添加試験開始時より1ヶ月ごとに各試験区4匹ずつサンプリングを行っ た。

<方法>

CT を用いた脂肪測定手順

脂肪組織の CT 値はマウスでは upper レベル-145.0、 lower レベル-350.0 であるが、ビワマスの内臓脂 肪より脂肪組織のみと思われる部分を採取し CT 値を測定したところ、-100 から-300 の間であることが 明らかになっていた(今井ら 2015)。しかし、この数値は Target の CT 値が 20、air の CT 値が-1000 の条 件下で測定していなかったため、再度正確に CT 値校正を行った上で内臓脂肪の脂肪組織の CT 値を測定 した所、-40 から-300 の間であったため upper レベルを-40.0、 lower レベルを-300.0 に設定し測定した。

ビワマスの頭部、中部のそれぞれを背側・腹側の4ヵ所に分けた(図13)。



図 13:サンプル部位

それぞれの部位を実験動物用 3D マイクロX線 CT R_mCT2(Rigaku)で撮影し、そのデータから解析ソフト Metabolic analisis により部位ごとの CT の解析画像をインポートし、3 次元平滑化(SOFT)と脂質とそれ以外を区別するために2 値化を行った(図 14)。ここでは2 値化することにより脂肪組織が緑色で表される。



図 14: ビワマスの CT の 2 値化

ビワマスの CT の 2 値化後、測定範囲を指定し画像解析を行った(図 15)。測定された部分は黄色で表される。次に内臓脂肪の領域を選択し内臓脂肪含量の測定を行い(図 16)、全体の脂肪量から引くことで内 臓脂肪以外の脂肪量を算出した。



図 15:CT の脂肪測定範囲指定

図 16:CT の内臓選択

<u>Fish Analyzer を用いた脂肪測定手順</u>

測定を行う前に、魚体の表面や内部の温度を均一にする為、ビワマスを約1時間氷上で保存した。測定は、Fish Analyzer DFA100(Yamato)を使用し、登録されているアジ、サバ、ブリ、マグロ背、マグロ 腹、検量線の魚類測定モードで行った。測定位置は、背側では魚体背側中心、腹側では腹部中央部とし (側線より上方に軽く電極を当てた(図 13)。尚、検量線モードでの測定位置は背側中心で行った。また測定結果は、アジ、サバ、ブリ、マグロ背、マグロ腹の測定モードでは脂肪率(%)で表示されるが、検量線モードではインピーダンス値()で表示される。

結果

まず通常の飼料で飼育した養殖ビワマスについて解析を行った。

ビワマスの中部背側の脂肪含有量を Fish Analyzer に登録されているアジ、サバ、ブリ、マグロ背側の 魚類モードで測定した値と CT で測定した値との比較を行った(図 17)。



図 17:通常飼料で肥育した養殖ビワマスの中部背側の CT 値と Fish Analyzer 魚類モード値の比較

アジ、サバの魚類モードで測定した値と CT 値との間には低い負の相関(アジ:r=-0.31,サバ:r=-0.22)が 見られ、プリ、マグロ背側の魚類モードで測定した値と CT 値との間にはほとんど相関は見られなかった (プリ:r=-0.16,マグロ背側:r=0.05)(図 17)。

また、ビワマスの中部腹側の脂肪含有量に対しても Fish Analyzer に登録されているアジ、サバ、ブ リ、マグロ腹側の魚類モードで測定した値と CT で測定した値との比較を行った(図 18)。サバの魚類モー ドで測定した値と CT 値との間には低い正の相関(サバ:r=0.25)が見られたが、アジ、ブリ、マグロ腹側 の魚類モードで測定した値と CT 値との間にはほとんど相関は見られなかった(アジ:r=-0.03, ブ リ:r=0.13,マグロ腹側:r=0.08)(図 18)。



図18:通常飼料で肥育した養殖ビワマスの中部腹側のCT値とFish Analyzer 魚類モード値の比較

そこで、ビワマスの中部背側の脂肪含有量を Fish Analyzer に登録されていない魚類の脂肪含有量を 測定する際に推奨されている検量線モードで測定した値と CT で測定した値との比較も行ったが、低い負 の相関しか見られなかった(r=-0.22)(図 19)。



図 19: 通常飼料で肥育した養殖ビワマスの中部背側の CT 値と Fish Analyzer 検量線モード値の比較

以上の結果より、ビワマスの脂肪含有量測定には少なくとも Fish Analyzer は適用できないと結論付けた。

そこで CT を用い通常飼料を与えた養殖ビワマスと醤油油飼料を与えた養殖ビワマスの脂肪含有量の体 重、体長に対する経時的な変化の比較検討を行った。その結果、体重において頭部背側と腹側、中部背 側と腹側両方で筋肉内脂肪の割合に大きな変化は見られなかった(図 20)。体長においても同様に頭部背 側と腹側、中部背側と腹側両方で筋肉内脂肪の割合に大きな変化は見られなかった(図 21)。







図 21: CT による体長と筋肉内脂肪割合の比較

そこで、内臓脂肪含有量に注目し、体重、体長に対する経時的な変化の比較検討を行った。すると、醤油油飼料を与えた体重約 350 g、体長約 330 mm までの個体では頭部の腹側、中部の腹側共に通常飼料を 与えたビワマスよりも内臓脂肪含有量が大きく上回る結果となった(図 22)。



図 22: CT による体重・体長と内臓脂肪割合の比較

さらに幼魚からの通常飼料を与えた養殖ビワマスの筋肉内脂肪を経時的に測定したグラフより、体長約 370 mm、体重約 550 gを超えた辺りからハラス内に脂肪含有量が増加を始めることが観察できた。(図23)。



図 23:通常飼料給与のビワマスの中部背側の筋肉内脂肪含量

また、2値化した画像を見てみると、皮下脂肪については測定を開始した幼魚である120g前後から既 に皮下に脂の層が見られ、かなり早い時期から皮下脂肪がまず入り出すことが分かった(図24)。一方、 内臓脂肪については、120gの頃にはあまり存在しないがその直後から徐々に増加する傾向が観察できた。 さらに体重 250 g 前後の個体において筋肉と筋肉の間、つまり筋間に脂が入っているのが観察でき、こ の頃に筋間に脂が入り出すことが示唆された(図24)。



通常2 体重126 g 体長230 mm 醤油4 体重 131g 体長232 mm









通常15 体重297 g 体長315 mm 醤油19 体重 309g 体長 300 mm



通常28 体重496 g 体長365 mm 醤油26 体重 472g 体長 350 mm



通常23 体重666 g 体長380 mm



醤油32 体重 666g 体長385 mm

図 24: ビワマスの脂肪分布の経時的比較

また、醤油油飼料を与えた体重約350g、体長約330mmまでの個体ではコントロールであるニジマス用 飼料を与えた個体に比べ内臓脂肪含有量が大きく上回るという結果から、体重約350g、体長約330mm までの個体に PPAR アゴニストを含む醤油油飼料を給与してもハラス内に脂は入らず、内臓に脂肪が蓄 積することが示唆された(図24)。さらに成長し、体重約550g、体長約370mmを超えた辺りからハラ ス内に徐々に脂肪含有量が増加を始めることも観察できた(図24)。

考察

Fish Analyzer に登録されている魚類モードでビワマスの中部背側、腹側の脂肪含有測定を行ったが、 CT 値との相関は負、あるいはほとんど確認できなかった(図 17,18)。Fish Analyzer を使用した際、測定 位置や電極の向きが僅かに異なるだけで値が大きく変わるという印象だったことから、Fish Analyzer を 用いた計測には正確に再現性良く電極を魚体に当てるといった熟練の技術が必要と思われる。また、Fish Analyzer に登録されていない魚類を測定する際に推奨されている検量線モードで測定を行ったがCT値と の間には低い負の相関を示した(図 19)。脂肪率が高くなるとインピーダンス値も高くなることから、正 の相関を期待したが逆の結果となった。従って、ビワマスの脂肪含有測定には少なくとも Fish Analyzer は適用できないと結論付けることが出来る。

本研究では養殖ビワマスの効率の良い肥育管理を目指している。筋肉内脂肪の含有量は通常飼料、醤油油飼料を与えた個体の間で大きな変化が見られなかった(図 20、21)。このことからこの頃にはまず筋間に脂が入り出すことが示唆された。また、醤油油飼料を与えた体重約 350 g、体長約 330 mm までの個体では内臓脂肪含有量が大きく上回るという結果から(図 22)、体重約 350 g、体長約 330 mm までの個体に PPAR アゴニストを含む醤油油飼料を給与してもハラス内に脂は入らず、内臓に脂肪が蓄積することが示唆された。

また、2値化した画像を見てみると、皮下脂肪については測定を開始した幼魚である 120g前後から既 に皮下に脂の層が見られ、かなり早い時期から皮下脂肪がまず入り出すことが分かった(図 24)。一方、 内臓脂肪については、120gの頃にはあまり存在しないがその直後から徐々に増加する傾向が観察できた。 さらに体重 250g前後の個体において筋肉と筋肉の間、つまり筋間に脂が入っているのが観察でき、こ の頃に筋間に脂が入り出すことが示唆された(図 24)。また、醤油油飼料を与えた体重約 350g、体長約 330mm までの個体ではコントロールであるニジマス用飼料を与えた個体に比べ内臓脂肪含有量が大きく 上回るという結果から、体重約 350g、体長約 330mm までの個体に PPAR アゴニストを含む醤油油飼料 を給与してもハラス内に脂は入らず、内臓に脂肪が蓄積することが示唆された(図 24)。さらに成長し、 体重約 550g、体長約 370mmを超えた辺りからハラス内に徐々に脂肪含有量が増加を始めることも観察 できた(図 24)。この結果、ビワマスにおいては、皮下脂肪-筋間脂肪-筋肉内脂肪の順で脂 肪が入り出し、ウシやブタで言われている内臓脂肪-筋間脂肪-皮下脂肪-筋肉内脂肪という順とは異 なることが示唆された。

3.研究成果の副次的効果、今後の計画など

ビワマスと同様に筋肉内脂肪(霜降り)が価格、味に影響するウシでは、13カ月齢から19カ月齢にかけて 最長筋内の脂肪細胞数が増加することが分かっている。また、この筋肉内脂肪が増加する15カ月齢から 脂肪細胞分化が促進することが知られているビタミンA欠乏飼料を給与すると脂肪交雑は向上するが、 23カ月以降にビタミンA欠乏飼料を給与しても効果が認められないことが報告されており、適切な時期 に適切な飼料を付与することによる効率的な飼育が可能となっている。今回の研究により、ビワマスは 体長が 350 mm を超える頃からハラスの部分に脂肪が入り出す事が分かった。今後はさらに成長したビワ マスのハラスの部分の脂肪含量を計測する事で、いつ頃まで脂肪が入り続けるのか調べる。その時期を 特定することで、その期間にのみ醤油油添加飼料を与え、内臓脂肪量や皮下脂肪量を出来るだけ抑え、 ハラスの部分にのみより脂の乗った養殖ビワマスの肥育を目指したい。

ビワマスの養殖の歴史は昭和50年代からが始まりで、養殖を行っている施設も非常に少ないため、ま だビワマスの養殖という点では現時点でわかっていないことが多く、研究していかなければならないこ とが多く存在する。まだ全国的には知名度の低いビワマスだが、今後、よりビワマスが注目されていき、 様々な機関、施設でビワマスの研究が盛んになっていくことを願いたい。

4.研究発表の状況

<雑誌論文>

- *1) <u>4',6-dimethoxyisoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor</u> <u>γ (PPAR γ) agonist that stimulates adipocyte differentiation. M Sanada, R Hayashi, Y Imai, F Nakamura, T Inoue,</u> <u>S Ohta and H Kawachi Animal Science Journal. 86, 1347 頁~1351 頁 2016 年 11 月 1 日 査読有</u>
- *2) <u>Effects of dietary soy sauce oil supplementation on growth performance and sensory characteristics of Biwa</u> <u>salmon Oncorhynchus S Sugiura, Y Tonoyama, H Kawachi, M Tsukada, G Oka, Y Imai, M Sanada, Y Shimizu, T</u> <u>Kawase, N Hori and N Shimizu. Aquaculture Science. 63, 291 頁~297 頁 2015 年 9 月 1 日査読有</u>
- Bmp4 expressed in preadipocytes is required for the onset of adipocyte differentiation. M Suenaga, N Kurosawa, H Asano, Y Kanamori, T Umemoto, H Yoshida, M Murakami, H Kawachi, T Matsui and M Funaba Cytokine. 64, 138 頁~145 頁 2013 年 8 月 1 日 査読有
- *4) ノダフジ(Wisteria floribunda)種子に含まれる抗糖尿病因子の探索 井上朋世・菊永竜太郎・山田敬博・太田伸 ニ・河内浩行 微量栄養素研究. 29, 36 頁~40 頁 2012 年 12 月 1 日 査読有

<図書>

- 1) バイオテクノロジー入門 建帛社 1-157 頁 2016年
- 2) ペット栄養管理学テキストブック アドスリー 44 頁~55 頁 2013 年

<学会発表>

- *1) <u>17th AAAP Animal Science Congress</u> Y Imai, Y Yamada, M Sanada, F Nakamura, T Hayashi, S Ohta, H Kawachi Fractionation and identification of 5-nonadecylresorcinol as an agonist of PPAR γ in soy sauce oil 九州大学 <u>2016 年 8 月 23 日</u>
- *2) アクアゲノム研究会 殿山泰弘、今井良政、塚田匡輝 真田的貴、岡郷平、河内浩行、 杉浦省三、堀伸明、清水 淑子、清水信義 メダカを用いた脂肪細胞分化に影響を与える物質の評価系の開発 東京海洋大学 2015 年 5 月 30 日
- *3) <u>第 16 回日本ペット栄養学会大会日本獣医生命科学大学 眞田的貴、鈴木美里、河内浩行 ノダフジ(Wisteria floribunda)種子に含まれる Wistin の抗肥満作用 2014 年 7 月 19 日</u>
- *4) <u>第14回日本ペット栄養学会大会 ヤマザキ学園大学 山田敬博、井上朋世、太田伸二、河内浩行 醤油粕中に</u> 含まれる PPAR γ 活性化因子の探索 2012 年 7 月 22 日

5) 第29回日本微量栄養素学会学術集会 京都リサーチパーク 菊永竜太郎、井上朋世、山田敬博、太田伸二、 <u>河内浩行</u> ノダフジ(Wisteria floribunda)種子に含まれる抗糖尿病活性物質 2012 年 6 月 2 日

<その他の研究成果等>

- *1) 淡海の宝石ビワマス 市民広報誌「ながはま」8月号 長浜 2014年
- *2) ビワマス特集 インターネット放送局 STUDIO こほく 長浜 2014 年