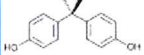


様式 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	食保健学科	助手	小林慧子
研究の 名称	ビスフェノールA曝露による精子運動能低下に寄与する タンパク質の同定		
研究のキ ーワード (注1)	環境ホルモン 精子 酸化ストレス		
研究の 概要 (注2)	ビスフェノールA (BPA) はプラスチックの可塑剤として工業的に広く用いられているが、同時に環境ホルモン作用を持つ化合物として、日本では食品中への溶出試験規格が定められている (2.5 ppm)。しかし、これまでの研究結果から、国の定める半分以上の濃度のBPAに曝露されたラットの精子は運動能に異常をきたすことが明らかとなっている。また、精子はエネルギー産生の要であるミトコンドリアを豊富に含んでいるため、ミトコンドリア機能障害による精子運動能低下が引き起こされる可能性がある。本研究では、精子の運動に重要な役割をもつ、ミトコンドリアに対するBPAの作用に着目し、酸化ストレスによって増加する4-ヒドロキシ2-ノネナールによって修飾されるタンパク質 (HNE修飾タンパク質) の同定を試みた。Wistar系雄性ラットに、BPA 1 mg/mLおよび200 mg/Lを2～8週間ラットに投与したところ、成熟した精子の貯蔵庫である精巣上体尾部におけるHNE修飾タンパク質が53 kDa付近に検出された。この部分を切り出してnanoLC-MS/MSによる詳細な検討を行ったところ、アルデヒドデヒドロゲナーゼやATPシンターゼなどミトコンドリアにおける重要なタンパク質が検出された (図参照)。 現在、これらのタンパク質がHNE修飾のターゲットとなっているのか、またどのようなメカニズムで精子機能障害を引き起こすのか、検討を行っている。		

	Bisphenol A  0~200 mg/Lを 2wk, 8wk投与  精巣上体尾部タンパク質を SDS-PAGEで分離 53 kDa付近を切り出し 2 wk 8 wk Control BPA (1 mg/L) Control BPA (1 mg/L) Control BPA (200 mg/L) Anti-HNE 60 50 40 60 50 40 Anti-HNE 60 50 40 60 50 40 nano LC-MS/MS 解析結果 はミトコンドリアタンパク質 <table><tr><th></th><th colspan="2">2 wk</th><th colspan="4">8 wk</th></tr><tr><th></th><th>CTL</th><th>BPA (1 mg/L)</th><th>CTL</th><th>BPA (1 mg/L)</th><th>CTL</th><th>BPA (1 mg/L)</th></tr><tr><td>Aldehyde dehydrogenase</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>ATP synthase subunit α</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>ATP synthase subunit β</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>Glutamate dehydrogenase 1</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>Tubulin α-1A chain</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>Tubulin α-1B chain</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>Tubulin β-4B chain</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>Tubulin β-5 chain</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr></table>		2 wk		8 wk					CTL	BPA (1 mg/L)	CTL	BPA (1 mg/L)	CTL	BPA (1 mg/L)	Aldehyde dehydrogenase	○	○	○	○	○	○	ATP synthase subunit α	○	○	○	○	○	○	ATP synthase subunit β	○	○	○	○	○	○	Glutamate dehydrogenase 1	○	○	○	○	○	○	Tubulin α-1A chain	○	○	○	○	○	○	Tubulin α-1B chain	○	○	○	○	○	○	Tubulin β-4B chain	○	○	○	○	○	○	Tubulin β-5 chain	○	○	○	○	○	○
	2 wk		8 wk																																																																				
	CTL	BPA (1 mg/L)	CTL	BPA (1 mg/L)	CTL	BPA (1 mg/L)																																																																	
Aldehyde dehydrogenase	○	○	○	○	○	○																																																																	
ATP synthase subunit α	○	○	○	○	○	○																																																																	
ATP synthase subunit β	○	○	○	○	○	○																																																																	
Glutamate dehydrogenase 1	○	○	○	○	○	○																																																																	
Tubulin α-1A chain	○	○	○	○	○	○																																																																	
Tubulin α-1B chain	○	○	○	○	○	○																																																																	
Tubulin β-4B chain	○	○	○	○	○	○																																																																	
Tubulin β-5 chain	○	○	○	○	○	○																																																																	
	図. 精巣上体尾部におけるHNE修飾タンパク質の検出結果を基に、53 kDa付近のタンパク質を解析した																																																																						
研究の背景	内分泌攪乱作用を持つビスフェノールA (BPA) はプラスチックの原料や可塑剤として使用されている化学物質だが、食品用プラスチック容器や缶詰の内面塗料から食品への溶出が報告されているため、日本では溶出試験規格が定められている。しかし、これまでの研究結果から、国の定める半分以下の濃度のBPAに曝露されたラットの精子は運動能に異常をきたすことが明らかとなった。(Free Radical Research, 2010) 精子は運動能を有するという点で他の細胞と大きく異なっており、中片部にはエネルギー産生の要であるミトコンドリアを豊富に含んでいる。ミトコンドリアが機能不全に陥ると活性酸素 (ROS) 産生が増大し、細胞傷害を起こすことから、精子は酸化ストレスに極めて鋭敏に反応する細胞として用いることができる。これまでに、BPA曝露のラット精子では、4-hydroxy-2-nonenal (HNE) によって修飾されたタンパク質が増加することを見出した。HNEは、生体脂質のω6系高度不飽和脂肪酸が酸化ストレスをうけて生成する酸化二次生成物 (アルデヒド) の一つであり、HNE修飾によるタンパク質の構造変化や機能障害が知られている。																																																																						
研究手法	Wistar系雄性ラット (16週齢) に1, 200 mg/LのBPA水溶液を2, 8週間投与した。コントロールは同週齢のラットを用いた。解剖、脱血還流後、精巣上体尾部を取り出し、直ちに-80℃で保存した。この精巣上体尾部中のHNE修飾タンパク質を、ウエスタンブロット法を用いて検出した。ウエスタンブロットで確認されたバンドを基に、SDS-PAGE後のゲル切り出しを行い、ゲル片中のタンパク質をLC-MS/MSを用いて同定を行なった。																																																																						

研究の進捗状況と成果	今回の研究で明らかとなったミトコンドリアタンパク質のうち、HNEによる修飾のターゲットとなるタンパク質が実際にどのぐらい存在するのか、またどのようなメカニズムで精子運動能低下に寄与するのかについて詳細な検討を行っている。
地域への研究成果の還元状況	一部の結果は国内学会にて報告済みである。 より詳細な成果が出次第、論文投稿を行い、成果の還元を行う。
今後の期待	HNEがミトコンドリアの機能不全に直接的に関わるのか、あるいは精子ミトコンドリアの機能不全の結果増加したROS産生によって生成されるのかを解明できれば、BPA曝露による精子運動能低下のメカニズム解明に繋がるだけでなく、ROSを消去する抗酸化物質による、精子運動能低下の予防効果への研究の発展が期待できる。
研究発表 (注3)	第17回日本ミトコンドリア学会年会（H29年11月23日）

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	公共政策学部	准教授	竹部晴美
研究の 名称	民事執行法改正に伴う財産開示についての比較法的研究 ー特に制裁規定の必要性に関する具体的検討ー		
研究のキ ーワード (注1)	民事執行法 財産開示 制裁		
研究の 概要 (注2)	本研究は、民事執行法第4章196条以下にある財産開示について、現在、検討が進められている改正民事執行法の検討に一定の示唆を与えるために、特に現行執行法では認められていない財産開示について、仮に財産開示が認められるようにとして、それが誠実に行われなかった場合の制裁につき、その「制裁の必要性」と「我が国にどのような制裁規定を設けるべきか」を諸外国の同等の制度を参考にしながら、比較法的に検討を行うものである。		
研究の 背景	現在まで、アメリカ民事訴訟手続におけるディスカバリー制度（証拠もしくは情報開示）に関して注目し、研究を行ってきた。アメリカの民事訴訟手続はプリトライアルとトライアルの二段階に分かれており、ディスカバリー手続はプリトライアル段階の中心的手続であり、この手続で収集した資料・情報が訴訟の争点を明らかにすることになりため、ディスカバリー手続が訴訟上大きな役割を果たしていることは言うまでもない。 その研究を踏まえた上で、2016年度にコーネル大学ロースクールに留学の機会を得た。その際にディスカバリー手続以外の民事訴訟法について改めて勉強し、コーネル大学のクレモント教授（Prof. Kevin Clermont）やニューヨーク大学のチェイス教授（Prof. Oscar Chace）にインタビュー調査をするなかで、より裁判所の手続的情報と処理方法を考える機会に恵まれ、アメリカで民事訴訟手続が二段階に分かれている理由や意義、そしてディスカ		

	バリー手続を指揮するマジストレイト裁判官の役割を歴史的または現在的に知る必要性を感じ、ディスカバリー手続の歴史的背景にも関心をもつようになった。また日本の民事訴訟手続について逆に質問を受ける機会もあり、改めて日本の民事訴訟手続の問題点に関して検討するとともに、執行法に関しても関心をもつこととなった。アメリカの制度では執行手続をどのように取り組み、解決しているのか疑問が生じたことが、本研究の着想に至った経緯である。
研究手法	アメリカ法の分野については、法律文献調査データベースによる該当問題に関する情報と資料収集ならびに実務家（マジストレイト裁判官）と民事訴訟法を専門とする学者へのインタビュー調査を遂行し、それらの収集した情報・資料等をもとに整理検討を行った。日本法の該当部分については、書籍と法律文献等の資料収集と行い、それらを精読して検討を行った上で、アメリカ法との比較的研究を行う手法を採った。
研究の進捗状況と成果	より適当な研究成果を得るため、現在も研究を継続して行っている。
地域への研究成果の還元状況	この点についても、現在どのような還元ができるのか検討しながら、引き続き研究を行っている。
今後の期待	研究の概要のところでも述べたが、現在改正が進められている民事執行法において、民事執行法第4章196条以下にある財産開示の検討が、改正課題の一つとして検討が進められている。その検討において比較法的見地から一定の示唆を行うことが、今後本研究に期待されることである。

研究発表 (注3)	未定。
--------------	-----

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立大学大学院文学 研究科史学専攻	博士後期課程 1 回生	稲穂 将士
研究の 名称	江戸時代における丹後海と人々の関わり －海運・海難事故処理・地域社会に着目して－		
研究のキ ーワード (注 1)	丹後、海運、海難事故、風待ちの港、漁業		
研究の 概要 (注 2)	四辺を海に囲まれた日本において、人々は古来より海と密接に関わりながら生活をしてきた。京都府丹後地域も例外ではなく、「海がもたらす恵み」を享受しながら生活してきた。この「海がもたらす恵み」は海産物だけでなく、他の地域から船によって運ばれてきた米などの物資もあった。本研究では以上の点をふまえ、伊根浦（現在の京都府伊根町）を主なフィールドとして、以下の 2 点の解明を目的とした。 ①近世の海運が、地域社会によってどのように支えられてきたのか。 ②丹後地域をはじめ、日本海沿岸地域では海運によってどのような恩恵がもたらされていたのか。		
研究の 背景	これまでの伊根浦を扱った研究は漁業を分析が中心であった。しかし、伊根浦のような「海付の村」を取り扱った近年の研究では、漁業以外の生業のあり方を検討するなど、新たな研究視角が提起されている。また、伊根浦は宮津藩が藩の入港してくる船を管理するために設置していた、船番所があったことなどから、廻船の「風待ちの港」としての機能が注目されている。「風待ちの港」であったことにより、伊根浦には入港してくる船と商品の売買をしたり、船の乗組員の宿泊所を提供したりする船宿（廻船問屋）という商売をおこなう者がいた。 以上の点をふまえると、「船宿」という生業に着目することは、海運と地域社会の関係性を明らかにする上で有効的な視角であると考えた。		
研究手法	①伊根浦の村落構造と海運の関わりについて検討 伊根町誌などの自治体史や京都府立丹後郷土資料館所蔵の古文書などの史資料を収集、分析をおこなった。また、現地で聞き取り調査をおこない、近現代の生業や自然の様子もあわせて分析し、近世における伊根浦の村落構造や海運との関わりについて検討した。		

	②他地域との比較 伊根浦との比較をおこなうため、山形県酒田市飛島、島根県隠岐の島、兵庫県香美町、沖縄県など、日本海沿岸地域を中心に、自治体史や古文書資料などの収集・閲覧をおこなった。特に飛島では現地で聞き取り調査もおこなった。
研究の進捗状況と成果	伊根浦と海運の関わりについて特に特徴的であったのが、海難事故処理であった。当地において、海難事故にあった船の検査・荷受け、事故処理に関わる経費の請求、濡米（海水に濡れて商品価値が下がった米）の入札の差配を船宿が担っていた。また、入札にかけられた濡米は船宿によって購入された。さらに、濡米以外の、他国の廻船が売り払う米の購入は船宿が一括しておこなっており、周辺地域の飯料米（食料となる米）の供給についても船宿が担っていたようである。伊根浦は三方を山に囲まれ耕地が少なかったため、このような海運がもたらす飯料米の供給は非常に重要であったのではないかと考えられ、海運の存在が伊根浦の存立に必要不可欠なものであったのではないかと指摘した。また、伊根浦は宮津藩領であったが、隣接する幕領の大島村にも飯料米を供給しており、この点は近世の在地支配のあり方を考える上で見逃せない点であること、船宿は「漁師惣代」を務めることもあり、さまざまな生業に従事していた点についても言及した。以上の内容については学会報告を2度おこない（研究発表①・②）、一部は学術雑誌に要旨が掲載されている（研究発表⑥）。今後この内容を論文化する予定である。 日本海沿岸の他地域との比較に関しては、現地調査をおこなった飛島と2017年度京都府立大学地域貢献型特別研究「「丹後の海」の歴史・文化に関する総合的研究-丹後東部を中心に-」（研究代表：藤本仁文）との関連で調査を実施した但馬国沿岸地域を対象におこなった。飛島は伊根浦と同じく、廻船の風待ちの港であり、多くの船宿が存在した点、耕地がほとんどない点、漁業がさかんな点など伊根浦との共通点が多い場所である。飛島関連の古文書群は、漁業や海運関係の資料が多く、近世段階における生業の実態がよくわかる。現地の聞き取り調査では、現在でも普段は漁業に従事しつつ、夏は観光客向けの民宿をおこなうような家が多く残っていることがわかり、現在の生業の様子をふまえたうえで、近世の海付の村落の構造について考える必要がある。また、本研究で分析した伊根浦を初めとする丹後国や但馬国、飛島などで漁場争論がおこなわれる際、海難事故処理を適切におこなったかどうか、漁業権の正当性を主張する根拠となる事例が多く見られた。この点から海難救助は海付の村の人々にとって生きていくために必要な行為であったのではないかと指摘した。以上の内容については、学内のフィールド調査報告会で発表をおこなった（研究発表③）。これに関しても論文化する予定である。

	さらに、琉球で発生した日本船の漂着事例に関しても分析をおこなった。琉球では海流や季節風の影響から特定の地域で日本船その他異国船の漂着が集中しており、その地域に琉球王府の役所（番所）が置かれている。このような役所の配置は丹後半島の各役所の配置のあり方にも類似している。また、漂着船への地域社会による対応の様子が共通していた。この内容に関しては論文化し、調査報告書に掲載した（研究発表⑥）。
地域への研究成果の還元状況	本研究の研究成果の地域への還元は、本学で一般の方を対象に開催された歴史学科2017年度フィールド調査報告会において、京都府立大学地域貢献型特別研究（ACTR）の成果とあわせて報告をおこなった（研究発表③）。また、本研究で得た地域史研究の知見をもとに、洛北地域の歴史や文化を扱った一般書の書評を執筆し、学術雑誌に投稿した（研究発表⑤）。この雑誌は京都府立大学附属図書館他、他大学の図書館等で閲覧することができる。
今後の期待	本研究をとおして、伊根浦などでは漁業以外の生業のあり方について船宿に着目しつつ分析をおこなった。しかし、近世の伊根浦では酒造業など、たくさんの生業が存在しており、全てを総合的に分析することができなかった。その作業をおこなうことによって、伊根浦をはじめとする「風待ちの港」である海付の村の構造について、より具体的に明らかにできると考えられる。この点を今後の課題としたい。
研究発表（注3）	【学会発表など】 ①「近世海運と地域社会-丹後国伊根浦の船宿を素材に-」、第1回歴史地理学サマーセミナー、京都府立大学（京都市）2017年9月18日。 ②「近世後期の丹後国伊根浦の生業と地域市場-漁業と「船宿」に着目して-」、日本史研究会近世史部会、機関誌会館（京都市）、2018年1月24日。 ③京都府立大学地域貢献型特別研究（ACTR）「「丹後の海」の歴史・文化に関する総合的研究-丹後東部を中心に-」、京都府立大学文学部歴史学科2017年度フィールド調査報告会、京都府立大学（京都市）2018年2月9日。 【そのほか】 ④「近世琉球における大和船の海難事故に関する覚書」、『南風原町（2017年度地理学実習 現地調査報告書）』、京都府立大学文学部歴史学科文化遺産学コース、pp49-58、2018年。 ⑤「書評 京都学研究会編『京都を学ぶ【洛北編】-文化資源を発掘する-』」、『洛北史学』、洛北史学会、20号、pp172-178、2018年6月。 ⑥「部会ニュース 近世史部会 近世後期の丹後国伊根浦の生業と地域市場-漁業と「船宿」に着目して-」、『日本史研究』、日本史研究会、669号、2018年掲載予定。

様式 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	生命環境科学研究科 応用生命科学専攻	博士後期課程3年	倉橋 亮
研究の 名称	タンパク質構造形成における重要部位探索と その進化における選択要因解明		
研究のキ ーワード (注1)	・好熱性エステラーゼ ・タンパク質進化工学 ・タンパク質の熱安定性		
研究の 概要 (注2)	タンパク質の立体構造形成における重要部位(残基)を同定する 新たな手法を提唱し、その部位を実験的に特定する。 具体的には、タンパク質に強制的にアミノ酸変異を導入・蓄積させ、致命的部位(変異不可能部位)を抽出する。さらに、活性・安定性・構造形成能などで変異体をスクリーニングすることで、『タンパク質進化』における優位な選択要因を探知する。 進化実験：ランダム変異 多重変異体 脱落変異体 致命部位の同定 アミノ酸配列アライメント WT 変異体 保存部位の同定 <pre> WT ETGEIRDEVWRKWLEGGKIY 変異体1 ETGICRDEVWSKWLEGGKIY 変異体2 ETGEIRDIVWRKGLAGKG EY 変異体3 ETGEIRDEVWRKFLGEGKGLD 変異体4 ETGEIRD D G W R L W L E G E G I Y 変異体5 E S G E E R D E V W R K W L E G A G R Y </pre>		

研究の背景	タンパク質は生命の基本的な構成要素であり、生体内の重要な反応を触媒する酵素でもある。その機能はアミノ酸配列に起因して特異的な構造を形成することによって発揮することができる。その構造形成メカニズムに関しては多くの研究が行われているが、未知の部分も多い。 現存するタンパク質は生物進化の過程でアミノ酸変異を繰り返し、同様に進化してきたと考えられる。進化の結果で生じた同じ機能をもつタンパク質は類似のアミノ酸配列と構造を有する。それらの配列を比較すると部位によってアミノ酸の保存度合いが異なる。このことから、保存度合いの高い部位はそのタンパク質の機能や構造に重要な領域で、保存度の低い部位はアミノ酸置換が可能であると考えられる。 これまでも変異を導入する研究は多数報告されているが、多くは配列空間と機能の関係や進化の観点から調べたもので、配列空間と構造形成メカニズム・安定性や選択要因などとの関係を調べたものはない。また、網羅的一残基置換による構造への影響を調べた報告はあるが、多数の多重変異体までは扱われていない。
研究手法	本研究では、進化工学的手法を用いて、タンパク質に対してランダムに複数の変異を導入し、蓄積させることによって、立体構造形成に関する重要部位の探索を目指す。これにより、変異を導入する過程（進化）においてどのような選択要因が優位であるかも明らかにすることができる。本研究で用いるタンパク質は、進化系統樹の根本に位置する好熱菌由来エステラーゼである。このエステラーゼは熱に安定なため、多くの変異を受け入れることが可能であり、また変異の効果も検出しやすいことが特徴的である。このエステラーゼを用いた進化工学実験は当研究室ですでに確立されている。 まず、エラープローンPCRを用いてエステラーゼ遺伝子に対しアミノ酸残基置換が1-3個程度になるように変異を導入し、蓄積させる。これらの変異体エステラーゼを大腸菌にて発現させ、活性および安定性を評価する。特徴的な変異体を選抜して継代進化を行う。活性を指標にした継代進化と安定性を指標とした継代進化を比較することによって、変異の違いを見出し、新たな知見を獲得する。

研究の進捗状況と成果	第一世代において、Sto-Estの野生型（WT）と比較して、活性や安定性が上昇した変異体と低下した変異体が得られた。安定性が進化過程において必須因子であるという本研究室における先行実験より、安定性に着目し、安定性が向上した変異体に対し、さらに変異を導入し、第二世代を作製した。また、活性が大幅に低下した変異体から、致命的部位の同定を行った。得られた変異体ライブラリを相同タンパク質の配列アライメントと比較したところ、保存部位においても変異が導入されていたが、保存部位に導入された変異の割合は安定性保持変異体よりも安定性損失変異体の方が大きかった。今後さらなる変異の導入により、配列アライメントの保存部位と変異部位の関連性を明らかにし、重要部位の探索において本実験法の検証を進めている。
地域への研究成果の還元状況	本研究に関連する論文が国際雑誌である「Journals of Molecular Evolution」に受理され、世界へ発信される。この知見を基に、酵素を扱う産業分野での事業の拡大や発展が期待され、地域の産業の活性化に貢献することが可能となる。
今後の期待	活性依存的な進化工学実験と安定性依存的な進化工学実験の結果を比較し考察することによって、進化だけではなく、構造形成や物性研究に対しても、新たな切り口からの知見を得ることが期待される。
研究発表 (注3)	(学会発表) ・タンパク質進化を潜在的に支配する安定性 日本進化学会第19回大会、京都、2017.8.24-26 ・タンパク質進化を潜在的に支配する安定性 日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、2018.3.15-18 ・Protein stability potentially governing protein evolution SMBE 2018, Yokohama, 2018.7.8-12 (予定) (論文) <u>Ryo Kurahashi</u>, Satoshi Sano and Kazufumi Takano (2018) Protein Evolution is Potentially Governed by Protein Stability: Directed Evolution of an Esterase from the Hyperthermophilic archaeon <i>Sulfolobus tokodaii</i>. <i>J. Mol. Evol.</i> in press.

様式 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	生命環境科学研究科 分子栄養学研究室	大学院生・博士後期 課程3年	畑澤 幸乃
研究の 名称	骨格筋における転写調節因子FOXO1、PGC1の機能解析による筋萎縮、運動時代謝変化メカニズムの解析 ～筋萎縮抑制・運動模倣食品開発を目指して～		
研究のキ ーワード (注1)	骨格筋、筋萎縮、運動		
研究の 概要 (注2)	骨格筋は人体最大の組織であり、その量と構成成分は骨格筋機能の主要な決定要因です。例えば、筋萎縮はガン（悪液質）や敗血症、1型糖尿病あるいは老化により生じます。これらの骨格筋機能不全は著しい生活の質（QOL）の低下をもたらすにもかかわらず、効果的な治療法・予防法はなく、国民生活に密接に関連する難治病態です。本研究は、筋萎縮や栄養条件により著しく発現変動する転写調節因子PGC1 α （運動による代謝変化のマスターレギュレーター）およびFOXO1（筋萎縮誘導因子）に着目し、骨格筋量あるいは骨格筋代謝の分子機構の解明を目指す基礎研究です。		
研究の 背景	日本を含む様々な国において、超高齢社会が医療費や介護の観点から問題となっています。加齢による筋萎縮は高齢者の活動量の低下のみならず、精神状態（うつ）や様々な病気の進行につながるため、予防法の確立は重要です。一方、適度な運動によって筋肉の代謝が活発になり筋萎縮が抑制されます。しかし、高齢者は運動がしづらかったり、あるいは病気で運動することをお医者さんに止められている人もいます。このような人たちのために、筋萎縮時や運動時の身体（特に筋肉）でどのような分子変化が起こっているか理解することは重要です。というのは、その反応を起こす様な機能性食品や薬剤があれば、寝たきりの人の筋肉でも、筋萎縮を抑制したり、運動をしたのと同じ様な効果をもたらす医薬品や機能性食品の開発が理論上期待できるからです。		

研究手法	遺伝子改変マウスと培養C2C12筋芽細胞を用いて、In vivoとIn vitroの両面から研究をしました。 また、DNAマイクロアレイ解析および次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析により、標的遺伝子の同定を行いました。さらには、独自の実験系を用いてFOXO1の転写を測定しました。
研究の進捗状況と成果	1、FOXO1／PGC1の標的遺伝子の同定および発現調節機構解明 FOXO1過剰発現マウスを用いてDNAマイクロアレイ解析および次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析により、DNAメチル化酵素Dnmt3aの発現低下を見出しました。そして、Dnmt3aがエピジェネティクスな制御によりGdf5の遺伝子発現を調節している事を見出しました。 2、FOXO1／PGC1の転写調節能を指標とした機能性成分探索 FOXO1にDNA結合領域（GAL）を付加すると、FOXO1自体の転写活性化能をレポーターで測定できる独自の実験系を構築しました。そして、筋萎縮を抑制する候補化合物を探索するために、市販の化合物ライブラリーを用いてFOXO1の転写を抑制する化合物をスクリーニングしました。その結果、ビタミンDがFOXO1の転写を抑制することを見出しました。 食品成分スクリーニング FOXO1の活性を測定する系を構築し、スクリーニングを行った
地域への研究成果の還元状況	研究内容を学会や学術雑誌等で積極的に発表しています。京都市に本社のあるファーマフーズ社と共同研究に向けた話し合いをしました。

今後の期待	本研究により、DNAメチル化酵素を介したエピジェネティクス制御による筋萎縮のメカニズムを初めて提唱しました。 また、ビタミンDが加齢などによる筋萎縮を抑制する新しい作用機序の可能性を見出しました。 これらの研究は今後、筋萎縮や運動模倣のための機能性食品医薬品の開発に繋がる可能性があります。
研究発表 (注3)	【学術雑誌】 Hatazawa Y, Ono Y, Hirose Y, Kanai S, Fujii N L, Machida S, Nishino I, Shimizu T, Okano M, Kamei Y, Ogawa Y Reduced Dnmt3a increases Gdf5 expression with suppressed satellite cell differentiation and impaired skeletal muscle regeneration. FASEB Journal (2018) 【学会】 Hatazawa Y , Kamei Y. Reduced Dnmt3a increases Gdf5 expression with suppressed satellite cell differentiation and impaired skeletal muscle regeneration、Keystone Symposia、バンクーバー、カナダ (January 2018)

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。