

様式 4

京都府公立大学法人若手研究者・地域未来づくり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 (研究代表者)	生命環境科学研究所 助教	細谷 隆史	
研究の名称	木材からの石炭生成における分子機構		
研究の キーワード (注 1)	木材、石炭、高圧、機構		
研究の概要 (注 2)	<p>本研究では、木材からの石炭生成におけるメカニズムを、木材化学の観点から分子レベルで解明する。石炭は、木材が深海底などの高圧下で熟成されることで生成していると考えられているが、木材中の主成分（多糖類やリグニンなど）が、いかなる化学反応を経て石炭へと変化しているのかは、驚くほど明らかにされていない。本研究では木材やそれを構成する多糖類およびリグニンの高圧下での炭化機構を解明することで、木材からの石炭生成機構を提案することを最終目的とする。</p>		
研究の背景	<p>現代社会において重要なエネルギー源の一つである石炭は、古代の植物が長い年月をかけて炭化したものと考えられている。石炭の生成には、一般的に酸素などの酸化物質との遮断、木材を腐朽させる菌類との遮断が必要であるが、深海底や地下深部における高圧条件で生成されることが多い。しかしながら、木材やそれを構成するセルロース、ヘミセルロース、リグニンなどの天然高分子が、どのような化学的過程を経てほぼ炭素のみから構成される炭化物へと変換されているのかは明らかにされていないのが現状である。</p>		

研究手法	<p>試料（木材、セルロースなどの多糖類および単離リグニン）を、深海底を見立てた加圧塩水下（50 MPa程度）で反応させることができる耐圧反応容器を試作する。次に、試料を加圧塩水下、室温-100 °C、1時間-数日の条件で反応させ、得られた生成物（炭化物や液化物など）を、あらゆる化学分析法（GC/MS、各種NMR、IRなど）を駆使することで詳細にキャラクタライズする。得られた情報から、加圧塩水下で進行している反応を推測し、モデル化合物を用いた実験や量子化学的手法をベースとした理論計算を用いて、その検証と分子機構の提案を行う。</p>
研究の成果 (実現できた研究の質の向上又は地域振興の内容等)	<p>本研究では深海底を見立てた高圧条件下（50 MPa程度）の条件下で木材を反応させる必要があり、そのような反応条件できる耐圧反応容器を限られた予算内で作製することが、大きな課題であった。該当する研究分野（木質科学）において、上記の高圧条件下で反応を行った例は皆無に近いため、参考にできる反応装置なども研究開始当初は存在しない状態であった。そこで、耐圧反応容器の作製を専門とする業者と綿密に協議の上、特殊合金製（容量：5.0 mL）の耐圧試験管を試作した。次に浮上した問題は、耐圧容器へ実際に圧力をかける際に、一般の化学実験用に市販されているガスボンベでは圧力が足りず（ボンベの圧力は通常20 MPa程度）、何らかの方法で容器中をさらに加圧する必要があることであった。そこで本研究では、ガスボンベによる加圧を行った後に、さらに水を容器内に充填することで、耐圧容器内を30MPa程度に加圧できる反応系を構築し、何とか研究年度内に反応装置の試作を終えることに成功した。実際に木材を高圧条件で反応させることはまだ行えていないが、本年度の研究で30-40 MPaという超高压条件で木材を反応させるための、下地を整えることができたと考えている。</p>
今後の期待	<p>今年度の成果を踏まえて、試作された高圧反応装置を駆使し木材の反応を行っていくことで、石炭の生成機構の解明や人工的な炭化促進法が提案できると期待される。</p>

研究発表 (注3)	現段階では特になし。
--------------	------------

- 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・地域未来づくり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 (研究代表者)	生命環境科学研究所 応用生命科学専攻	博士後期課程3年	倉橋 亮
研究の名称	安定性を選択圧とした高機能タンパク質獲得のための効率的な手法の探索		
研究の キーワード (注1)	タンパク質進化工学 好熱菌由来エステラーゼ タンパク質の安定性		
研究の概要 (注2)	<p>進化は生命が誕生して以来、現在に至るまで常に進行している現象であるため、進化の研究は生命現象を理解する上で大変重要である。進化の過程で、遺伝的な変化はタンパク質におけるアミノ酸置換を起こし、その結果として新たな機能の獲得や機能の向上を行うことでその環境に適応する。残念なことに、ほとんどの変異はタンパク質を不安定化させる。従って、タンパク質の安定性は進化において重要な因子であるが、その役割は未だによくわかっていない。そこで、本研究では、進化過程におけるタンパク質の安定性の役割を解明するために、ランダム変異体のライブラリを作製し、タンパク質の活性（機能向上という進化）と安定性の間の関連性をシンプルかつ直接的に探究した。その結果として、安定性がタンパク質進化を潜在的に支配していることを見出した。この知見を基にタンパク質工学への応用を実現するため、トリプチリンプレートを用いた従来のスクリーニング法に安定性の選択圧を加えた新規の手法を探索する。</p>		
<p>淘汰方法</p> <p>トリプチリンプレート レプリカ</p> <p>熱処理 ハロ形成確認</p> <p>変異体ライブラリ</p> <p>遺伝子操作</p> <p>Error-prone PCR</p> <p>Start</p> <p>形質転換</p> <p>E. coli</p> <p>遺伝子の多様化</p>			

研究の背景	<p>タンパク質進化工学分野では、所望の機能を高度化するために、高活性変異体をピックアップして、より高活性な変異体を獲得する方法が基本であった。ここで、適応度地形の概念を取り入れる。xy平面がタンパク質の取り得る全ての配列空間とし、z軸を活性と考えると、タンパク質の配列空間は富士山のような単一ピークではなく、中心に最大の高さの山があり、その周りに様々な高さの山が存在することが分かる。これにより、従来の方法では、極大の活性をもつ変異体を獲得することはできても、最大の活性をもつ変異体を獲得することは困難である。本研究室における先行研究によって、低活性変異体の継代進化実験から、安定性を保持していれば、活性低下を回復させることができた。これは進化工学分野においては新たな知見であり、この応用が実現すると、酵素を扱う産業分野に大きな貢献を果たすことが可能となる。また、安定性はタンパク質がより良い機能を発揮するための配列空間を探索するために必要な因子であり、一定の安定性を基準としたスクリーニング法が確立すれば、高機能タンパク質を効率的に獲得することができると考えられる。</p>
研究手法	<p>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で発現させるために、IPTG含有プレートに菌液を塗布し、一晩培養する。このプレートの上に基質となるトリブチリンと菌体を破碎するTween20を含んだゲランガムを重層する。トリブチリンを分解することによって形成されるハロを確認し、特徴的な変異体を含むコロニーを選抜し、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。</p>

研究の成果 (実現できた研究の質の向上又は地域振興の内容等)	<p>先行研究から進化にとって安定性が重要であり、その役割は配列空間の探索に必要であることが分かった。さらなる解析により、タンパク質進化工学で使用するランダム変異浮動であっても、活性と安定性のトレードオフが起こることを見出した。これは、今までのタンパク質工学でも問題となっている。我々はこれらの知見を基に、新たな手法を提案した。まず、安定性指標による配列空間の探索を行い、第二段階として、散らばった変異体をそれぞれ活性指標によって山を登っていくことで、最大活性をもつ変異体を効率的に獲得するという方法（二段階法）である。この二段階法が実際に効率よく高活性変異体を取得することが出来るかどうかを検証するべく、ハロ形成確認を用いた簡易な実験系を構築した。その結果、先行研究では、活性が4倍までしか上がらなかったのに対し、本手法では、その限界を破る約5倍の活性をもつ変異体を取得することに成功した。</p>
今後の期待	<p>本研究によって確立された手法は、先行研究に比べ、短縮して世代を経ることができる。今後は、さらなる継代進化により、最高活性変異体の取得が実現すると期待される。</p>
研究発表 (注3)	<p>【学会発表】</p> <ul style="list-style-type: none"> • Protein stability potentially governing protein evolution SMBE 2018, Yokohama, 2018.7.8-12 • タンパク質進化の命運を握る安定性 日本進化学会第20回大会、東京、2018.8.22-25 <p>【論文】</p> <p>Ryo Kurahashi, 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> 86:283-292</p> <p>Natsuko Ota, Ryo Kurahashi, Satoshi Sano and Kazufumi Takano (2018) The direction of protein evolution is destined by the stability. <i>Biochimie</i>. 150:100-109.</p> <p>Ryo Kurahashi, Shun-ichi Tanaka and Kazufumi Takano (2019) Activity-stability trade-off in random mutant proteins. <i>J. Biosci. Bioeng.</i> in press.</p>

様式4

京都府公立大学法人若手研究者・地域未来づくり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 (研究代表者)	環境生命科学研究科 応用生命科学専攻	博士前期課程2回	中林ゆい
研究の名称	生態適応はいかにして交配前隔離を生み出すか？：強化仮説の検証		
研究の キーワード (注1)	種分化, 強化, 生態適応, 交配前隔離		
研究の概要 (注2)	種分化は地球上の生物多様性を生み出した仕組みそのものであるが、その詳細なメカニズムには依然不明な点が多い。そこで本研究では、2つのレースが含まれるホソガ科蛾類を用いて、適応進化と種分化の研究に異なる生態適応を遂げた集団間に交配前の隔離機構を自然選択によって進化させる唯一のメカニズムと考えられている「強化 reinforcement」の実証研究に挑戦した。その結果、異なるレース間での交配を避ける傾向が見られたものの、十分なサンプル数を得られなかつたため、処理間で有意な差は見られなかった。今年度以降も実験を継続し、結果がまとまり次第成果を発表する予定である。		
研究の背景	生物にはさまざまな生息環境に適応した集団が見られるが、単に個別の生態環境に適応するだけなら様々な環境に適応した種内集団が生じるだけで、生物の種多様化には至らない。この生態適応と種分化の隔たりを埋めるメカニズムの一つが「強化 reinforcement」である。強化とは、異なる生態適応を遂げた集団間の雑種の適応度が低い時に異集団とは交配しなくなるように選択が働くメカニズムであるが、理論的には提唱されてきたが強化の実証研究例は極めて少なく、種分化研究におけるネックとなってきた。この理由は、雑種が形成された場合に致死でない程度の適応度の低下が見られるようなちょうど良い文化程度を示す集団が見つかりにくいことと、仮に見つかったとしても、それらの野生生物間で自在に交配実験を行うことが困難であったためである。		

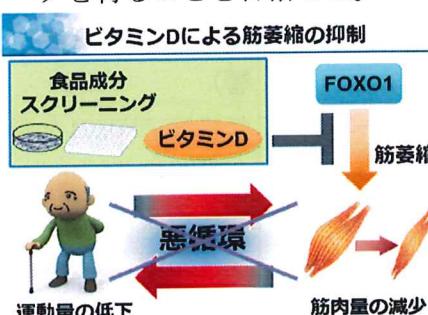
研究手法	<p>実験には、先行研究により、メス親がクルミレースでクルミ上に産卵された時には雑種は発育できるが、メス親がネジキレースでネジキに産卵された場合は、雑種世代はネジキがエサとして不適なため死亡する。羽化後6日のクルミホソガの両レース間の交配を、クルミレースとネジキレースのそれぞれがメス親の場合の2通りを行い、雑種が致死となるネジキレースがメス親の場合にのみ、交配率の低下が見られる、つまりクルミレースの雄とは交配を避ける傾向があるかどうかを検出した。実験には、両レースが同所的に存在する宮城県仙台市と岡山県新見市の集団を用いた。ペアにした翌日にメス個体を解剖し、メス体内の交尾囊内オスから渡された精包があるかどうかを確かめて交配の有無とした。</p>
研究の成果 (実現できた研究の質の向上又は地域振興の内容等)	<p>新見集団を異なるレース間でペアにした場合、同じレース同士でペアにした場合よりも、交配した割合が低い傾向にあった。しかし、夏期にネジキレースを十分量得られず、試行回数が少なかったために有意な差は確認されなかった。仙台集団は、飼育の失敗および十分なサンプル数を得られなかつたために実験を行うことができなかつた。昨年度の実験からは明瞭なデータは得られなかつたものの、今年度以降も実験を継続し、成果を報告する予定である。</p>
今後の期待	<p>さまざまな生態適応を遂げた種内集団が見られる植食性昆虫を強化の研究と組み合わせることで、命名されている生物種の1/4以上という膨大な種数を誇る植食性昆虫の種多様化機構にも一石を投じられると期待できる。さらに研究材料のクルミホソガでは、クルミとネジキという寄主植物の違いを生じさせているゲノム領域の比較も可能となるはずであり、ダーウィン以来の謎である適応進化と種分化の関連を研究する上で、大きな突破口になると期待できる。</p>

	なし
研究発表 (注3)	

- 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・地域未来づくり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 (研究代表者)	生命環境科学研究所 応用生命科学専攻 分子栄養学研究室	M2	大西拓己			
研究の名称	ビタミンDによるサルコペニアの予防・改善の分子基盤の解析					
研究の キーワード (注1)	骨格筋、筋萎縮、サルコペニア、FOX01、ビタミンD					
研究の概要 (注2)	<p>骨格筋は人体最大の組織であり、運動や糖取込み、エネルギー代謝などの重要な役割を果たしている。骨格筋の萎縮は寝たきりや加齢などにより生じ、生活の質(QOL)を低下させる。また、加齢による筋萎縮はサルコペニアと呼ばれ、高齢者の自立的な活動を制限しQOLを低下させるため、超高齢社会で大きな問題となっている。そのため、筋萎縮を防ぎ、骨格筋を維持することは健康増進の観点から重要である。</p> <p>研究代表者の所属する研究室では転写調節因子FOX01が様々な骨格筋萎縮時に発現増加し、筋萎縮を引き起こす重要な因子であることを以前に見出した。すなわち、FOX01の活性を抑制する食品成分は筋萎縮を抑制する可能性がある。独自に確立した実験系を用いてFOX01の活性を抑制する食品成分を探査したところ、活性型ビタミンDが検出された。すなわち、ビタミンDがFOX01経路を介して筋萎縮の抑制をすることが示唆された。本研究では、ビタミンDがサルコペニア（筋萎縮）を予防・改善するメカニズムとしてFOX01との相互作用に着目して分子機序を解析し、新しい機能性食品開発に向けた基盤的なデータを得ることを目指した。</p>					
 <p>筋萎縮と肥満</p> <p>骨格筋 人体最大の組織 (タンパク質・アミノ酸) 運動・エネルギー代謝</p> <ul style="list-style-type: none"> 適度な運動は肥満や糖尿病を防ぐ 骨格筋機能の保持は健康増進に重要 <p>サルコペニア (筋機能低下) 生活の質の低下 寝たきり 車いす</p> <p>サルコペニアは超高齢社会で問題となっている</p>						
 <p>ビタミンDによる筋萎縮の抑制</p> <p>食品成分スクリーニング ビタミンD FOX01 筋萎縮</p> <p>運動量の低下 悪循環 筋肉量の減少</p>						
(図1) 筋萎縮と肥満		(図2) ビタミンDによる筋萎縮の抑制				

研究の背景	<p>骨格筋は運動・糖取込み・エネルギー代謝に重要であるため、適度な運動・適切な食事によって骨格筋機能を保持することは健康増進に重要である。しかしながら、サルコペニアと呼ばれる加齢や不活動・低栄養・疾患などによる筋萎縮・筋機能低下が超高齢社会を迎えた我が国で問題となっている。加齢に伴いサルコペニアの有病率は増加しており、発症すると寝たきりや車いす生活を余儀なくされるなど、生活の質の低下、医療・介護費の増大が生じてしまう。</p> <p>近年サルコペニアとビタミンDの関係が示唆されている。ビタミンDは脂溶性ビタミンであり、核内受容体であるビタミンD受容体を介して遺伝子発現を調節する。体内では骨ホメオスタシスを制御していることがよく知られているほか、骨格筋を含む多くの組織で重要な役割を担っている。ヒト体内のビタミンDの充足・不足の基準は設けられているが、サルコペニアを発症するような高齢者ではビタミンDが不足・欠乏している場合が多い。また、血中ビタミンD濃度と高齢者の活動量や転倒リスク、筋力・筋量との関係が示唆されている。さらに高齢者にビタミンDを投与すると筋サイズが増大することも報告されている。しかし、その分子機序についてはよくわかっていない。</p> <p>本研究室ではこれまで筋萎縮を引き起こす重要な因子である転写因子 FOXO1に着目して研究を行ってきた。その過程でビタミンDが FOXO1を抑制するデータが得られた。すなわちビタミンDによって筋萎縮が抑制され、その分子機序として FOXO1が関与することが示唆された。本研究ではビタミンDと FOXO1の相互作用に着目し、ビタミンDによる筋萎縮抑制の分子機序解明に向けた実験を行った。</p>
研究手法	<p>○C2C12筋細胞にビタミンDが及ぼす表現型の解析 C2C12筋細胞を筋萎縮条件（グルココルチコイドの添加）におき、FOXO1の標的遺伝子（筋萎縮遺伝子）が発現増加するような状態で、ビタミンDを添加した。その際、これらの遺伝子の発現がビタミンDによって抑制されるかどうか調べた。</p> <p>○FOXO1抑制成分のスクリーニング（レポーターассеイ） 研究代表者が独自に確立した実験系（FOXO1の転写活性を定量し、化合物のスクリーニングを行うことができる）を用いて、ビタミンD以外にも筋萎縮を予防・改善しうる食品成分の候補を探索した。</p> <p>○FOXO1過剰発現マウスの解析（筋萎縮モデルマウスへのビタミンDの影響） 骨格筋でFOXO1を過剰発現した遺伝子改変マウス（FOXO1マウス）は顕著な骨格筋萎縮を生じる。FOXO1マウスを正常なビタミンD栄養状態を維持できる通常餌あるいはビタミンD含有量を少なくした低ビタミンD餌で1ヶ月間飼育し、骨格筋萎縮の表現型に関する解析を行った。</p>

研究の成果 (実現できた研究の質の向上又は地域振興の内容等)	<p>○C2C12筋細胞にビタミンDが及ぼす表現型の解析</p> <p>C2C12筋細胞を筋萎縮条件（グルココルチコイドの添加）におくと、FOXO1の標的遺伝子（筋萎縮遺伝子）の発現が顕著に増加した。この発現増加は活性型ビタミンDである$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$とその前駆体である$25(\text{OH})\text{D}_3$によって抑制された。すなわちビタミンDは筋萎縮条件下において、FOXO1を抑制し標的の筋萎縮遺伝子の発現を抑制することで、筋萎縮を抑制する可能性が示唆された。</p> <p>○FOXO1抑制成分のスクリーニング（レポーター・アッセイ）</p> <p>これまでに得ている研究結果より、$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$がFOXO1の転写活性を抑制することを見出している。その他にもFOXO1の転写活性を抑制し、筋萎縮の予防・改善につながる成分を探索したところ、レチノイン酸を含む10種の成分が検出された。今後更なる解析を行い、ビタミンDと同様に筋萎縮抑制作用を有するか検討を行う。</p> <p>○FOXO1過剰発現マウスの解析（筋萎縮モデルマウスへのビタミンDの影響）</p> <p>ビタミンDがFOXO1を抑制しているのであれば、顕著な筋萎縮を生じるFOXO1マウスを十分なビタミンD栄養状態で飼育した場合、ビタミンDが不足したFOXO1マウスと比較して筋萎縮が抑制されることが考えられる。FOXO1マウスを十分なビタミンDを含む餌あるいは低ビタミンD配合餌で1ヶ月間飼育したところ、骨格筋における表現型の変化は観察されなかった。しかし、体内のビタミンD濃度は低ビタミンD餌飼育群で低下しており、ビタミンD欠乏状態のモデルマウスとして応用できる可能性が示唆された。</p>
今後の期待	<p>本研究は、サルコペニアの予防・改善に効果があるとされるビタミンDの作用機序を独自の未発表データに基づき転写因子FOXO1との相互作用に着目し、解析を行ったものである。本研究結果より、ビタミンDによる筋萎縮抑制の作用機序としてFOXO1経路を介したものであることが示唆された。米国ではすでに流通している牛乳の大部分はビタミンDが添加されている。本研究結果に基づき、我が国においても、ビタミンDが欠乏しがちな高齢者に向けて、継続的な摂取によりサルコペニアを予防・改善するビタミンD強化乳製品などの開発が期待される。</p>
研究発表 (注3)	<p><学会発表></p> <ul style="list-style-type: none"> ・FOXO1の転写活性を指標とした筋萎縮を抑制する化合物の探索 (第72回日本栄養・食糧学会大会) ・FOXO1の転写活性を指標とした筋萎縮を抑制する化合物の探索 (第23回アディポサイエンス・シンポジウム) ・筋萎縮時の分岐鎖アミノ酸の異化亢進はビタミンDによって抑制される (日本アミノ酸学会 第12回学術大会)