バイオサイエンス研究所年報

第二十五号

令和二年度

# 武庫川女子大学
# バイオサイエンス研究所年報

第　25　号
（令和２年度）

# Annual Report of Institute for Biosciences

Volume 25
(2020)

Mukogawa Women's University

# バイオサイエンス研究所年報　第 25 号

Annual Report of
Institute for Biosciences Vol. 25　2020

## 目　次


**令和元年度活動概況**

**所 長 報 告**　萩中　淳（1）

**研究業務報告**

- 個体生命解析学部門
  - 籠田智美（2）
  - 義澤克彦（4）
- 細胞生命解析学部門
  - 伊勢川裕二（6）
  - 高　明（8）
  - 蓬田健太郎（10）
- 分子生命解析学部門
  - 中瀬朋夏（12）
  - 森山賢治（14）
- 生命化学解析学部門
  - 仁木洋子（16）
  - 土生敏行（18）
  - 吉田　徹（20）

**研究活動の概要**

- 研究成果発表会（27）
- 学会発表（28）
- 誌上発表（32）
- その他（36）

**バイオサイエンス研究所規程**（37）

# 所　長　報　告

所長　萩　中　　淳

## 令和二年度　活動状況

バイオサイエンス研究所は設立後 24 年を迎えました。本年度は、新型コロナの感染拡大により、事業計画は大きな影響を受けました。特別経費事業（統一テーマ：ジェンダーバイオサイエンス）において、下記の部門研究員の多くは、研究計画の変更を余儀なくされました。しかし、専門領域の技術を駆使して分担課題研究を実施し、その研究成果を公開発表会（2021 年 3 月 4 日）、学術雑誌、専門学会において公表しました。また、公開セミナー事業は、今年度は開催を中止しました。さらに、もう一つの特別経費事業として、「2016 年度私立大学等改革総合支援事業（教育・研究装置）」で採択された『去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）の薬物治療、並びにメタボローム解析による CRPC バイオマーカーの探索および予後予測マーカーの探索』事業を、本年度も実施しました。事業の研究機器として設置した、超高分解能質量分析装置 1 台（ブルカー・ダルトニクス社、島津株式会社製）は、「共同利用機器管理運営委員会」を設置し、「機器共同利用規程」に従って研究員をはじめ大学内外の研究者により利用されています。バイオサイエンス研究所の研究活動が、本学の研究環境の向上、共同研究の推進に寄与できることを期待しています。

本年度の研究所組織を下記に記載します。

所　　長　萩中　淳特任教授

研 究 員

| | |
|---|---|
| 個体生命解析学部門 | 籠田智美教授（薬学部、兼務）、義澤克彦教授（食物栄養科学部、兼務） |
| 細胞生命解析学部門 | 伊勢川裕二教授（食物栄養科学部、兼務）、高　明教授（薬学部、兼務）、蓬田健太郎教授（食物栄養科学部、兼務） |
| 分子生命解析学部門 | 中瀬朋夏教授（薬学部、兼務）、森山賢治教授（薬学部、兼務）、 |
| 生命化学解析学部門 | 吉田　徹教授（食物栄養科学部、兼務）、仁木洋子准教授（薬学部、兼務）、土生敏行准教授（食物栄養科学部、兼務） |

研 究 所 教 員　　本田千恵助教、穐久舞教務助手

運営委員

委 員 長　萩中　淳特任教授

委　　員　伊勢川裕二教授、中村一基教授、森山賢治教授、義澤克彦教授

# 個体生命解析学部門

# メタボリックシンドロームにおける血管抵抗性調節変化とそれに及ぼす血管周囲脂肪の影響　～雌雄差に関する検討

研究員　籠　田　智　美
共同研究者　麓（丸山）加菜

## １．研究概要

**【研究の背景および目的】**

メタボリックシンドローム（MetS）は、内臓脂肪型肥満を基盤とし、インスリン抵抗性、脂質代謝異常や血圧高値といった動脈硬化の危険因子が重複することにより、心血管病や糖尿病の発症リスクが相乗的に増加する病態であることから、重要な予防ターゲットとされている。MetSの罹患率には性差があり、内臓脂肪型肥満になりやすい男性に多く、皮下脂肪型肥満になりやすい女性では低い。しかし閉経後は、エストロゲン不足とアンドロゲン作用の相対的過剰によって内臓脂肪の蓄積が生じることにより、閉経後の女性では高血圧や虚血性心疾患、心不全の罹患率が高くなると考えられている[1,2]。

血管抵抗性の増大は、高血圧や虚血性疾患の発症リスクとなる。血管の内側を覆う内皮細胞は、一酸化窒素（NO）を産生・放出し、血管緊張性を抑制的に制御している。他にもNOは、血小板の凝集、血管平滑筋細胞の浸潤や増殖等の動脈硬化発症過程を抑制することが明らかとされ、血管の恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられている[3]。一方、1991年に正常ラット胸部大動脈を用いて、血管周囲脂肪組織（Perivascular adipose tissue, PVAT）が血管収縮を抑制している[4] と報告され、PVATと動脈との機能連関が示唆されている。MetSにおいて内臓脂肪の増加に伴い動脈周囲脂肪組織も増加することから、PVATがMetSにおける動脈の収縮・弛緩反応性に影響する可能性は高い。

我々はこれまでに、遺伝的要因によりMetS様症状を呈するSHRSP.Z-*Lepr*$^{fa}$/IzmDmcr（SHRSP.ZF）ラットを用いて、MetSにおける動脈拡張機能変化とその発症機序を検討してきた。その結果、雄性SHRSP.ZFラットでは、動脈壁はレニンーアンジオテンシン系の活性化により生じる酸化ストレスに慢性的にさらされており、血管平滑筋のNOに対する反応性が減弱すること、冠動脈に生じる拡張機能低下が心機能低下を引き起こす要因となることを見出している[5,6]。さらに、雄性SHRSP.ZFラットの腸間膜動脈PVATは、動脈に拡張障害が生じている際には代償的にNOに対する血管弛緩作用を亢進させること、しかし加齢とともにその代償効果が消失することを見出した[7]。

そこで本研究では、雄性SHRSP.ZFラットに観察されたPVATによる代償的動脈拡張増強機能は、雌性ラットにおいても観察されるか検討した。

**【方法】**

麻酔下に20週齢の雄性（6匹）及び雌性（8匹）SHRSP.ZFラットの体重及び腹部周囲―体長比を測定し、非絶食下の血液および尿を採取した後、腸間膜動脈及び腎動脈を摘出した。両動脈からリング状のPVAT剥離標本及び剥離しない標本を作製し、95%$O_2$-5%$CO_2$混合ガスを通気したKrebs-Henseleit

液で満たしたマグヌス管に静止張力を負荷して懸垂した。標本に、フェニレフリンを累積的に添加、または、フェニレフリン添加により収縮させた後にアセチルコリンを累積的に添加し、生じる反応をOrgan Bath法により測定した。血清中のインスリン、糖、中性脂肪はそれぞれ既存のキット、尿蛋白及び尿糖はUROPAPER III‘栄研’を用いて測定した。収縮期血圧は、実験 1 週間前にtail-cuff法により測定した。尚、実験は、武庫川女子大学動物実験委員会の承認を得た後（承認番号P-12-2020-01-A）、動物愛護法を遵守し、「武庫川女子大学動物実験規定」に基づいて実施した。

**【結果】**

20週齢の雌性SHRSP.ZFラットは、雄性ラットに比べ、体重は低く、腹部周囲－体長比は大きく、血圧は低く、高い血清インスリン値を認めたが、血糖及び中性脂肪、尿蛋白及び尿糖に差はなかった。

雌性SHRSP.ZFラットの腸間膜動脈におけるアセチルコリンによる弛緩反応は、PVAT非存在下（動脈の弛緩反応性）では、雄性ラットと同程度に減弱しており、PVAT存在下（動脈の弛緩反応性に及ぼすPVATの影響）では、雄性ラットの場合と同様に、非存在下に比べ有意に増大した。一方、雌性SHRSP.ZFラットの腎動脈におけるアセチルコリンによる弛緩反応は、PVAT非存在下では雄性ラットに比べ減弱したが、PVAT存在下では雄性ラットと同程度にまで増大した。フェニレフリンによる収縮反応性は、両動脈ともに、PVATの有無による差はなく、雌雄差も認められなかった。

**【考察及び展望】**

SHRSP.ZFラットの腸間膜動脈におけるPVATによる動脈弛緩反応増強効果に雌雄差は観察されなかった。一方、腎動脈においては、動脈の内皮NO依存性弛緩反応及びそれに及ぼすPVATの効果に雌雄差が認められた。高血圧の進行による慢性腎臓病の進展は女性の方が顕著である[2)] ことを考えると、今回認められた雌雄差は興味ある結果である。今後は、血管部位による差の持つ意味、閉経前後でPVAT効果に差があるか、別のMetS動物モデルでも同様の効果が見られるか等、検討していきたい。

**【参考文献】**

1）西澤均ら, *臨婦産*, 60, 866-871（2006）.
2）長谷部直幸ら, *日臨*, 73, 611-616（2015）.
3）Rajendran P, *et al., Int J Biol Sci*, 9, 1057-69（2013）.
4）Soltis EE, *et al., Clin Exp Hypertens*, 13, 277-96（1991）.
5）Kagota S, *et al., Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37, 1035-43（2010）.
6）Kagota S, *et al., Microvasc Res*, 88, 70-78（2013）.
7）Kagota S, *et al., Metab Syndr Relat Disord*, 15, 233-239（2017）.

# 個体生命解析学部門

# 食品由来物質による各種疾患モデルでの予防・治療効果（雌雄差に関する検討）

研究員　義　澤　克　彦
共同研究者　竹之内　明　子

## 1．研究概要

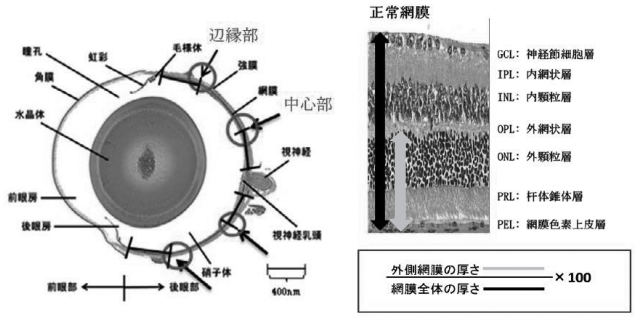
**【目的】**

網膜色素変性症（RP）は視細胞のアポトーシスによって最終的に失明を来す代表的な眼科疾患である。先行研究ではビタミンCを主成分とするアセロラ（ニチレイ・アセロラパウダーVC30）による*N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素（MNU）誘発雌ラット網膜変性症の病態抑制効果を明らかにした[1)]。本研究では、アセロラ混餌食の自由摂取によって血清アスコルビン酸濃度を維持し、MNU誘発雄ラット網膜変性症での病態抑制効果を検証した。

**【方法】**

出産直後の母ラットにCMFもしくは1, 2, 4%アセロラ混餌食（AP）を自由摂食させ、母乳を通じて雄仔ラットにアセロラを摂取させた。3 週齢で離乳させ、8 週までCMFもしくはAPを摂取させた。7 週齢時に50 mg/kg MNU もしくは生理食塩液を単回腹腔内投与した。8 週齢に眼球を採取し、網膜の形態学的評価を実施した。また、血清を採取し血清アスコルビン酸濃度を測定した。
網膜の画像解析検査方法（視細胞比率）を下記に示した。

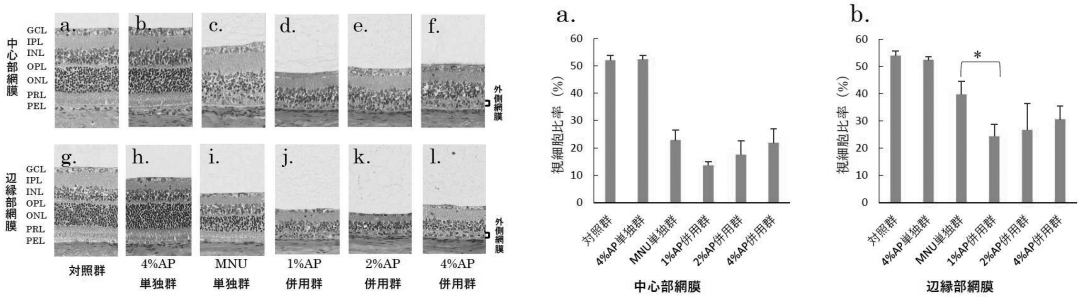
網膜外層は視細胞の存在する部位であり、視細胞比率は視細胞の数を反映するパラメーターである。榎本らの報告をもとに、メタカルン固定標本のデジタルデータを用いて、中心部網膜（視神経から400 μm）、辺縁部網膜（虹彩基部から400 μm）を400倍の視野で各 2 ヵ所について網膜全体の厚さ（神経節細胞層から網膜色素上皮層）、網膜外層の厚さ（外網状層から網膜色素上皮層）を計測し、［(網膜外層の厚さ／網膜全体の厚さ）×100］を算出した。中心部及び辺縁部網膜の各 2 ヵ所の平均値をその動物の視細胞比率とした[2)]。




赤丸：測定部位

**【結果】**

MNUを投与した全ての群で網膜の外顆粒層（ONL）及び杆体錐体層（PRL）が消失し、群間に差はみられなかった。さらにAP摂取による視細胞比率減少の抑制はみられなかった。なお血清アスコルビン酸濃度は対照群に比べて4%AP単独群が有意に高かった。




**【考察】**

AP摂取では網膜色素変性症による病態抑制効果は認められなかった。先行研究[1)]との比較より、生体でのアスコルビン酸量の雌雄差やMNU投与後の摂餌量減少によるアセロラ摂取量の低下が影響していると推察される。今後、AP投与によるRPモデルの効果を検証するには雌ラットを用い、MNU投与後でもアセロラ摂取を維持した状態が必要であると考えられる。

**【参考文献】**

1）Koyama C, Tatsuda H, Fukubara Y, Hiraoka R, Nagamine K, Takenouchi A, Yoshizawa K. *Functional Food Research* 16, 75-86, 2020.

2）Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuri T, Yuki M, Sayama K, Shikata N, Tsubura A. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 252, 1377-1384, 2014.

# 細胞生命解析学部門

# エストロゲン活性を有する8-プレニルナリンゲニンの抗インフルエンザ効果

研究員　伊勢川　裕　二

## 1．研究概要

**【目的】**

これまでの研究により抗インフルエンザウイルス（以下：IFV）効果を示す食品成分の候補として食品（植物）の二次代謝物であるフラボノイド類が挙げられた。一部のフラボノイド類はA/H1N1/PR/8株を感染させたMDCK細胞において、抗IFV効果が確認された。また、カラハリスイカ果汁も抗IFV効果が確認された。果汁に含まれる8-プレニルナリンゲニン（8-PN）も女性ホルモン様作用が知られている。よって、本研究では8-PNの抗IFV効果と、抗IFV作用機構の検討を目的とした。

**【結果・考察】**

**（1）8-PNの抗IFV効果の検討**

8-PNはウイルス増殖サイクルのうち、吸着期と培養後期に阻害を示した（Fig. 1）。

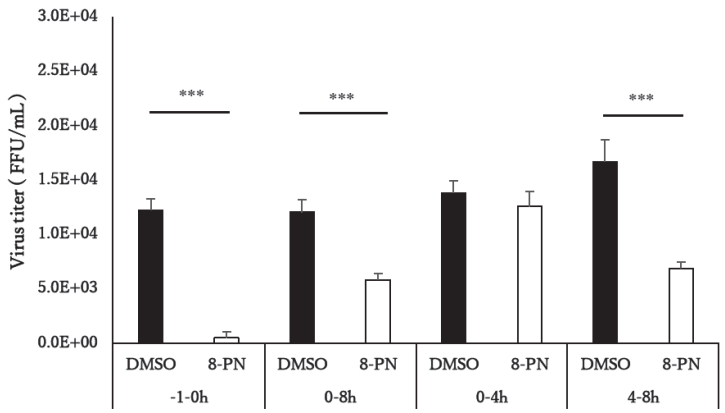



**Fig.1　8-PNのIFV増殖阻害段階**

24 wellプレートにMDCK細胞を培養し、0.01MOIのIFV（A/H1N1/PR/8/34）を1時間吸着させた。-1-0h、0-8h、0-4h、4-8hの各時間にのみ8-PN（11.4μg/mL）を含むDMEM培地500 μL/wellを添加し、37 ℃ $CO_2$インキュベーター内で8時間培養した。培養終了後は-80℃で一晩静置させ、37℃で45分融解した。凍結融解を2回繰り返した後、5 ℃、2000 rpm、5分の条件で遠心分離にかけ上清を回収した。回収した上清のウイルス力価はFFRAによって測定した。データは平均±標準偏差（n=3）として表示した。データは3つの独立した実験の代表である。（*：$p<0.05$、**：$p<0.01$、

***：p<0.001）

用いたすべてのIFV株に対して吸着期阻害が示された一方で、オセルタミビル耐性株の培養期にのみ阻害効果を示さなかった（Table 1）。これより、8-PNの培養後期阻害はオセルタミビル同様、ノイラミニダーゼ阻害によるものである可能性が高いと考えられた。吸着期阻害に関しては、温度依存的なウイルス侵入を阻害したこと、8-PNを添加した細胞においてNPが明らかに細胞膜上に局在していたことからウイルスの侵入部分であるエンドサイトーシスを阻害している可能性が高いと考えられた。カラハリスイカ果汁による抗IFV効果とウイルスエントリーの阻害効果は一致したが、果汁においてはオセルタミビル耐性株にも培養後期にも阻害効果を示し、8-PN以外の培養後期阻害物質が存在することが示唆された。

Table 1. Effect of 8-prenylnaringenin on the multriplication of various influenza virus strains

| Virus type and strain | Adsorption | | Replication | |
|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ (μg/ml) | SI[a] | $IC_{50}$ (μg/ml) | SI[a] |
| A (H1N1) | | | | |
| PR/8/34 | 18.4 ± 3.1 | 3.6 | 5.5 ± 0.4 | 12.2 |
| Suita/114/2011 | 12.3 ± 2.6 | 5.4 | 24.3 ± 1.1 | 2.8 |
| Osaka/2024/2009[b] | 6.4 ± 2.1 | 10.5 | ND[c] | ND[c] |
| Osaka/71/2011[b] | 14.3 ± 2.1 | 4.7 | ND[c] | ND[c] |
| A (H3N2) | | | | |
| Sydney/5/97 | 7.1 ± 0.7 | 9.4 | 2.9 ± 1.6 | 23.1 |
| Aich/2/68 | 6.7 ± 0.6 | 10.0 | 2.5 ± 0.2 | 26.8 |
| B | | | | |
| Shanghai/261/2002 | 11.7 ± 0.3 | 5.7 | 2.2 ± 0.4 | 30.4 |
| Nagasaki/1/87 | 12.3 ± 0.2 | 5.4 | 6.6 ± 0.2 | 10.1 |

[a] Selectivity index = $CC_{50}/IC_{50}$, $CC_{50}$ = 66.9 μg/ml
[b] Oseltamivir-resistant virus, pdm09
[c] ND=Not detected

## （２）8-PNのIFVエントリー阻害効果の検討（Fig. 2）

8-PNによりトランスフェリン、コレラ毒素の細胞内への内在化が阻害された。各経路に特異的に関与する蛋白質のクラスリンとカベオリンの発現量は変化しなかった。更に8-PNはカベオリンの細胞内局在に影響を示さなかったがクラスリンに関してはControl群で細胞質全体に局在していることに対し、8-PN添加群ではゴルジ付近に集積した。クラスリン依存性エンドサイトーシスとカベオラ型エ ンドサイトーシスの両方の経路に対して阻害を示したことから8-PNは、クラスリン、カベオリンといった各経路に特異的な蛋白質に直接的に影響を与えるのではなくエンドサイトーシスを引き起こすための調節因子や各経路に共通して必須な蛋白質であるダイナミンへ影響を与えることでIFVの侵入を阻害している可能性が示唆された。

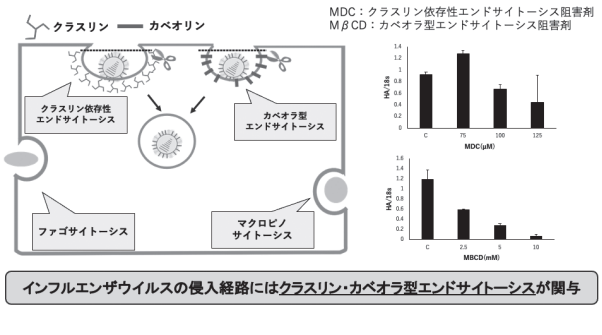



Fig. 2. 8-PNによるエンドサイトーシスの阻害機構
クラスリン依存性とカベオラ型エンドサイトーシスの両経路の阻害剤により、IFVのエントリーは濃度依存的に阻害された。

# 細胞生命解析部門

# 新規天然薬用植物及びその含有成分の生活習慣病に対する予防、治療効果と作用メカニズムの解明

研究員　高　　明
共同研究者　工　藤　麻　耶

## １．研究概要

**【目的】**

肥満症はカロリーの過剰摂取やエネルギー収支のバランスの乱れにより、体重の過剰な増加や臓器・組織内に脂肪が蓄積されることで引き起こされる。体重の過剰な増加や脂肪の蓄積状態になると、高脂血症、高血圧、糖尿病などの生活習慣病の原因となり、発症した場合は薬物治療を行うが、副作用などの悪影響が懸念されている。従って、体重の過剰な増加および脂質の蓄積を予防・治療可能な新規天然薬用植物の探索が期待される。ヤマブシタケは400年以上前から、日本や中国などで食されており、食物繊維、ビタミン、アミノ酸などを豊富に含んでいる。本研究で使用したアミセノンは、ヤマブシタケの活性物質の一つであり、これまでの研究で、認知症やうつ病、不眠症改善効果を有するとされているが、肥満症に関する報告は少ない。そこで本研究では、肥満、糖尿病モデルであるKK-Ayマウスを用いて、アミセノンの肥満に対する予防、治療効果とその作用メカニズムについて検討を行った。

**【研究方法】**

本動物実験は動物愛護法を順守し、武庫川女子大学動物実験委員会の承認を得て実施した。8週齢雄性のKK-Ayマウスを用いて、アミセノン群とコントロール群の二群に分け、アミセノン群にはアミセノン（13.6mg/day）添加の水を、コントロール群には同量の水を、8週間強制経口投与させた。実験期間中は、体重、摂餌量の記録と、採血を行った。実験終了後には、心臓より採血した後解剖し、関連臓器と組織の摘出、秤量と、血中指標の測定および、脂肪組織、肝臓を用いて、脂質代謝関連因子の発現量の解析をWestern blotting法およびReal-time PCR法を用いて行った。

**【研究結果及び考察】**

**（１）KK-Ayマウスの体重、摂餌量、臓器・組織重量、脂質関連指標におよぼす影響**

KK-Ayマウスにアミセノンを投与した結果、摂餌量の差はなかったが、体重は増加抑制傾向が認められた。また臓器、組織重量については、肝臓の重量はアミセノン群で減少した。その他の臓器・組織重量は二群間で差はなかった。次に血中指標に対する影響について、空腹時血糖値、血中コレステロール値、血中中性脂肪値、遊離脂肪酸値は、アミセノン群で有意に減少した。さらに肝臓中の、コレステロール値、中性脂肪値も、アミセノン群で有意に減少した。

**（２）脂肪組織における脂質代謝関連因子の発現量におよぼす影響**

アミセノン投与による、体重増加抑制傾向の作用機序を解析するため、KK-Ayマウスの脂肪組織を摘出し、脂質代謝関連因子について検討したところ、精巣周囲脂肪および皮下脂肪における、AMPKのリン酸化の割合は、二群間で差はなかった。一方、腹部脂肪および腸間膜脂肪におけるAMPKのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇した。そこでこの二種類の脂肪組織に着目し、解析を行った。腹部脂肪に関して、AMPKの下流因子であるFASの発現量は、二群間で差はなかったが、HSLのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇した。さらにAMPKの別の下流因子であるACCのリン酸化の割合も、アミセノン群で有意に上昇した。またACC下流のCPT1の遺伝子発現量は、アミセノン群で有意に上昇した。次にAMPKの上流因子について検討を行ったところ、LKB1のリン酸化の割合は二群間で差はなかったが、PKAのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇した。次に腸間膜脂肪に関して、AMPK下流因子のHSLのリン酸化の割合および、FASの発現量は二群間で差はなかった。しかしACCのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇した。またAMPKの上流因子について、LKB1のリン酸化の割合は、二群間で差はなかったが、PKAのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇した。

**（３）肝臓における脂質代謝関連因子の発現量におよぼす影響**

アミセノン投与による、脂質代謝改善の作用機序を解析するため、KK-Ayマウスの肝臓を摘出し、脂質代謝関連因子について検討したところ、AMPKのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇した。AMPKの下流因子について、ACCのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇し、さらにFASの発現量は、有意に減少した。次にAMPKの上流因子について、LKB1および、LKB1上流のPKAのリン酸化の割合は、アミセノン群で有意に上昇した。

**（４）総括**

アミセノンは、腹部脂肪におけるPKA-AMPK-ACC-CPT1およびHSL経路ならびに、腸間膜脂肪におけるPKA-AMPK-ACC経路を介した、脂肪の合成抑制、分解促進、β酸化促進により、体重増加抑制傾向を示し、また肝臓におけるPKA-LKB1-AMPK-ACCおよびFAS経路を介した、脂肪の合成抑制により、血中・肝臓中の脂質関連指標を減少させ、抗肥満および高脂血症改善効果を発揮することが示された。

# 細胞生命解析学部門

## 骨粗鬆症の発生要因の再検討

研究員　蓬　田　健太郎
共同研究者　巽　　都香沙

### １．研究概要

**【背景】**

日本の高齢者人口は、団塊の世代の高齢化と平均寿命の延長が重なり、急激に増加している。これに伴い高齢者の低栄養や運動不足によるサルコペニアやロコモティブシンドロームも増加しており、フレイル症候群として健康寿命の延長を阻害する因子として注目を集めている。特に、昨年初めからのコロナ禍による活動の自粛により、高齢者におけるこれらの症候群の発症に拍車をかけているとの指摘もある。これらの疾患においては、骨粗鬆症を伴うことが多く、転倒による骨折の一因となっている。骨粗鬆症は、ほとんど自覚症状がなく、受診時のレントゲン撮影等により指摘されることが多く、その実数については把握が困難とされているものの、横断的研究により我が国における骨粗鬆症患者は、1300万人に上るものと推定されている。骨粗鬆症の原因としては、患者が高齢女性に多く見られることから、閉経によるエストロゲン分泌の低下によるものと考えられてきた。この根拠として、マウス・ラットにおける卵摘モデルにおいて骨密度の低下がみられるとの報告があるが、骨密度の低下を生じさせるにはCa制限だけでなく、動物の加齢が必要とされる。一方、高齢男性の増加から、男性においても骨粗鬆症患者が増加しており、骨粗鬆症の原因について改めて検討すべきではないかと疑問を抱くようになった。このため、３年前より骨粗鬆症の要因の再検討に着手し、昨年度までに妊娠授乳期のCa制限が続発性骨粗鬆症の原因となること卵摘とCa制限によっても術後半年程度では骨密度低下は認められないことを報告してきた。

**【目的】**

これまでの結果に基づき、骨粗鬆症の発症要因として加齢とCa制限の重要性を検証するため、卵摘マウスと偽手術マウスを比較するだけでなく、雄マウスも含めた骨密度の加齢に伴う変化を追跡することとした。

**【方法】**

10週齢のICRマウスの雄を購入し、以後AIN-93G（５%Ca含有）食で飼育したものをコントロール群とし、２%Ca含有食をCa制限食群として10週齢雄マウス、卵巣摘出した10週齢雌マウス、偽手術した10週齢雌マウスの３群を設定し、以後75週齢まで４週ごとにCTにて骨密度変化を追跡した。

**【結果】**

飼育期間中の各群間での摂餌量、体重変化には性差によるもの以外に有意差は見られず、本実験系によるCa制限によるエネルギー摂取量による影響はないと判断された。経時的な骨密度追跡により30週齢前後からコントロール群に比べ雄のCa制限群で海綿骨密度、皮質骨密度、全骨密度で有意な

低下がみられるようになったが、雌の卵摘による骨密度低下は見られなかった。実験終了時の骨量並びに骨中のCa，Mg，P含有量も雄のCa制限群のみ有意に低下していることが確認された。血中電解質濃度には群間での有意差は見られず、血中エストロゲン、骨芽細胞マーカーである血中ALPならびに破骨細胞マーカーである血中TRACPはいずれも低値を示していたが、コントロール群との明確な差異は見られなかった。

**【考察】**

本実験の結果は、卵摘による骨密度低下は見られず閉経によるエストロゲン低下が骨粗鬆症の誘因であるというこれまでの説を否定するものである。昨年度すでに報告したように、妊娠・授乳期のCa制限により短期間のうちに骨密度の低下が生じることから、女性では急激なCa代謝環境の変化を何回か経ることに加齢が加わることで骨密度低下が起こっていた可能性がある。近年、若年時から女性の痩せ願望が強くなっており、各年齢における女性の平均BMIは年々低下しており、OECD加盟国の中でも我が国の低体重出生児の出生率の増加は突出している。一方、男性の高齢化に伴う低栄養により男性の骨粗鬆症の増加しており、骨粗鬆症の要因として長期間にわたるCaの摂取不足を考慮する必要があろう。先行研究では、雌雄での比較がなされておらず、閉経という人に特有の現象をマウス・ラットで再現するために卵摘を行っているが、ヒトにおける卵巣摘除により骨粗鬆症が誘発されたという報告はほとんどなく、エストロゲン分泌の急激な低下が骨粗鬆症の直接原因とは考えにくい。高齢人口の増加に伴う骨粗鬆症の予防には、新たな視点が必要と思われる。

# 分子生命解析学部門

## トランスポーターから紐解く女性特有の疾患
## ：乳がん悪性化機構の解明と新治療戦略の開発

研究員　中　瀬　朋　夏

## １．研究概要

**【目的】**

現在、日本人女性において、乳がんの罹患数は急激に増加している[1)]。乳がんは、初期治療が成功しても、長い年月を経て、転移や再発、薬剤耐性を頻繁に引き起こし、生命予後を脅かす。これは、現在確立されている治療法に限界があることを意味するが、乳がん悪性化機構の大部分が未だに解明されていない。

乳がんの脅威の根源として、乳がん組織の中にごくわずかに潜み、他の大部分を占める乳がん細胞とは明らかに異なるたちの悪い性質を持つ乳がん幹細胞様の細胞（Breast cancer stem-like cell; BCSC）の存在が分かってきた。BCSCは、自己複製によってがん幹細胞の性質を維持しながら、分化により周辺の乳がん細胞を生み出す元となることが明らかになりつつある[2)]。従って、治療成績を上げ、根治を導くためには、BCSCを標的とした治療法の開発が喫緊の課題である。しかし、BCSCは生体内での存在数が少なく、追跡が難しいことから、その存在の仕組みを読み解くシグナルネットワークや周囲の細胞との相互作用は未だ不明である。さらに、BCSCの特性は、他の正常な組織幹細胞の機能調節に必要な機構と重複する部分も多く、BCSC特異的に関連分子を制御できる方法は未だ無い。

近年、亜鉛イオン（$Zn^{2+}$）およびその輸送体である亜鉛トランスポーターは、これまで説明できなかった乳がん悪性化プロセスと密接に関連しているとの報告が相次ぎ、乳がん治療新戦略のターゲットとして注目を集めている[3)]。亜鉛は生存に必要不可欠な必須微量元素であり、細胞内$Zn^{2+}$濃度は、細胞膜や細胞内小器官に発現する亜鉛トランスポーターによって厳密に制御されている。さらに、亜鉛トランスポーターによって輸送される$Zn^{2+}$は標的分子を選択的に制御し、この「亜鉛シグナル」を介して、細胞機能の変化や病態形成を支配していることが明らかになってきた[3,4)]。しかし、これまでに、BCSCに対する亜鉛シグナルの役割について解析した報告はない。

本研究では、乳がん治療の新戦略を開発するため、BCSCの$Zn^{2+}$と亜鉛トランスポーターの機能を狙って、乳がん幹細胞の潜伏と乳がんの悪性化の決定がどのように支配されているのか、明らかにすることを目的とした。

**【方法】**

ヒト乳がん細胞MCF-7を使用し、3次元スフェア培養によりBCSCを調製した。その特性と$Zn^{2+}$との関係について、細胞生物学的解析およびBCSCを移植した担がんマウスで評価した。動物実験は、武庫川女子大学および文部科学省が定める動物実験ガイドラインに従い実施した（承認番号P-09-2020-01-A）。

**【結果】**

MCF-7のスフェア培養由来の細胞集団は、BCSCの特徴を示した。スフェアの形成は、細胞内$Zn^{2+}$量に依存し、$Zn^{2+}$の標的分子として、BCSCの維持に必須の転写因子PR domain zinc finger protein 14（PRDM14）を同定した。さらに、悪性度の高い乳がんを模倣した亜鉛トランスポーターZIP6をノックダウンした乳がん細胞は、コントロール細胞に比べてスフェアの形成効率が著しく高く、小胞体から細胞質への$Zn^{2+}$を輸送する亜鉛トランスポーターZIP7を特異的に阻害することで、$Zn^{2+}$依存的なPRDM14の活性を介したスフェアの形成は消失した。BCSCを乳腺内に移植した担がんモデルマウスに対するZIP7選択的な阻害剤の投与は、副作用なく、原発巣の腫瘍の体積を著しく減少させ、腫瘍周辺の血管新生をも抑制し、転移の抑制傾向があった。以上より、BCSCの維持には$Zn^{2+}$を必要とし、その機序として、ZIP6とZIP7の発現バランスを起点とした$Zn^{2+}$依存的なPRDM14の活性制御が関与することを明らかにした。

**【考察】**

本研究では、BCSCの維持に$Zn^{2+}$が必要で、その制御にZIP6に対するZIP7の高い発現と活性が関与することを明らかにした。BCSCにおける細胞内$Zn^{2+}$の役割としては、BCSCの維持に必須の転写因子PRDM14の核内発現量を制御することを明らかにした。ZIP6の発現抑制が引き金となり、ZIP7を介して細胞質に輸送された$Zn^{2+}$がPRDM14に選択的に直接あるいは他の分子を介して渡され、BCSCを維持していることが考えられる。PRDM14は正常な組織幹細胞には発現しないこと、ならびに、PRDM14の発現が高い乳がん患者は、5年生存率が著しく低いことが報告されている[5)]。そのため、PRDM14を標的とする治療法の開発が強く求められているが、PRDM14は細胞核内で機能するため、抗体や低分子による治療薬の開発が難しい[6)]。本研究では、BCSC移植マウスに対するNVS-ZP7-4の投与は、ZIP7を介した細胞質への$Zn^{2+}$の輸送を阻害することで、BCSCの機能を抑制できることが示唆された。BCSCは腫瘍周囲の血管内皮細胞の成長を促し、腫瘍内の血管を構成する細胞をも生み出すことが報告されており、ZIP7の阻害は、BCSCが関わる腫瘍血管形成を抑制しているかもしれない[7)]。これらのことから、ZIP7を標的とすることで、PRDM14の機能を制御し、BCSCの機能を抑制できる可能性がある。今後、さらなる$Zn^{2+}$とBCSCの連関機序解明およびそれを利用した治療戦略が期待される。

**【参考文献】**

1）がん研究振興財団, がんの統計'19（2020）
2）Kreso A. *et al., Cell Stem Cell*, 14, 275–291（2014）
3）Takatani-Nakase T., *Biol. Pharm. Bull. Review*, 41, 1517-1522（2018）
4）Matsui C. et al., *FEBS Lett*., 591, 3348-3359（2017）
5）Taniguchi H. et al., *Oncotarget*, 8, 46856-46874（2017）
6）Taniguchi H. et al., *Methods Mol. Biol*., 1974, 233-243（2019）
7）Prieto-Vila M. et al., *Am. J. Cancer Res*., 6, 1906-1921（2016）

# 分子生命解析学部門

## エネルギー代謝における性差とは
## ～性差の分子生物学的基礎的検討～

研究員　森　山　賢　治
共同研究者　光　谷　真　奈

## １．研究概要

**【目的】**

1980年代後半から、米国を中心として性差に注目した性差医療が脚光を浴び、発展してきた。これと前後して、生物学的な性の二形性が心血管系疾患に影響を及ぼすことも知られていた。これには当時、女性の心疾患罹患率あるいは心血管疾患による死亡率の増加が男性を上回って上昇していたことが背景にある。当時、既に女性の虚血性心疾患が閉経後に有意に増加することも報告されていた。これらの流れを受けた大規模臨床試験が開始された。この試験は、更年期以降の健康な女性に対し、ホルモンの補充療法を行った上で二次予防効果と安全性を４年間追跡したものである。その結果は、心血管死を含むエンドポイントには性差が認められ無かった。さらにホルモンの補充療法群においては、冠動脈疾患の有意な増加、乳がん、脳梗塞、肺梗塞発症率も有意に増加した。内因性のホルモンと外因性のホルモンの効果の相違についても詳細は未だに明らかになっていないものの社会に衝撃を与えた。

心血管系の硬化性疾患として病態の基盤にあるのは、LDL-コレステロールや中性脂肪の影響である。このうち前者は、女性の方が有経期後半以降より高い値で推移する。この傾向は、過去の調査において一貫しており変化することなく続いている。特に、閉経後にはLDL-コレステロール値が上昇するのは、先述の通りである。このように、LDL-コレステロール値を代表として、ヒト有経期から閉経期にかけて性差は着実に顕在化する。この理由の一端は、エストロゲン作用の変化によるものと推察されるが、詳細な分子メカニズムは不明のままである。

エストロゲンによるLDLR遺伝子発現調節を示唆する報告はあるものの、直接的なシグナル伝達の下流にあるのか、他の転写因子もしくは転写共役因子のシグナル伝達を介した発現によるものなのか詳細なメカニズムは判っていない。以上の経緯を背景として、本研究は昨年度に引き続きコレステロールの主要なレギュレーターである3 hydroxy – 3 – methylglutaryl - Coenzyme A reductase（HMGCoAR）ならびにlow density lipoprotein receptor（LDLR）のエストロゲンによる遺伝子発現とその制御に関わる因子ついて継続して検討を行った。

**【方法】**

エストロゲンにはestradiol（$E_2$）を用いた。適用濃度は、生理的量～薬理量である1 nM～100 nMとした。また、$E_2$の発現への影響を検討するためにレポーターアッセイを実施した。レポーターコンストラクトには、human HMGCoAR、LDLRプロモーター領域をluciferase発現ベクターに組込み構築した。受容体には、estrogen receptor-$\alpha$, $\beta$（ER $\alpha$ / $\beta$）、estrogen related receptor-$\alpha$, $\beta$, $\gamma$（ERR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$）を用いた。

転写活性は、ヒト胎児腎細胞（HEK293由来TSA201細胞）にインターコントロールを含め遺伝子導入してアッセイを行った。この他、LDL-コレステロールやコレステロールの代謝に関与する、Sterol regulatory element-binding protein-1, 2（SREBPs）、Liver X receptor（LXR）、Farnesoid X receptor（FXR）、Peroxisome Proliferator-activated Receptors（PPARs）、Retinoid X receptor、ビタミンD受容体、Forkhead box containing protein O、Un-coupling protein、ATP-binding cassette sub-family A transporter 1、Acetyl-CoA carboxylase、Acetyl-CoA oxidase、Fatty acid synthaseなど脂質代謝に関与する遺伝子についても$E_2$による発現に対する影響をスクリーニングした。

**【結果】**

HMGCoAR-lucならびにLDLR-lucコンストラクトを導入し、ERsあるいはERRsに$E_2$添加により濃度依存的にHMGCoAR 並びにLDLRの転写活性を観察した結果は、いずれも濃度依存性など、統計的な有意差や傾向などは認めなかった。更に、各種の遺伝子$E_2$を添加して同様に観察した。結果は、いずれも統計的な有意差や傾向などは認めなかった。

**【考察】**

先述の通り$E_2$がin vivoにおいてLDLRの発現を正に制御することは報告されている。今回の結果より、$E_2$はLDLRの遺伝子発現に直接的に関与していないことが明らかとなった。よって$E_2$がERs結合以降、どのシグナル伝達因子と経路を経てLDLR遺伝子の発現を制御しているのか不詳のままである。研究室における先行研究では、*HMGCoAR*や*LDLR*はGHのシグナル伝達経路やGATAファミリーの下流にあり、標的遺伝子として存在することが示唆されている。以上の証左を勘案すると、これらGATA系の転写因子などの中間シグナルを介して$E_2$/ERs/ERRsが何らかの影響を及ぼしている可能性がある。現在、これについて検討を重ねているところである。既報では、肝細胞中のisoformとしてER$\alpha$が優位に発現している。それ故、シグナル伝達経路のスタートは、ER$\alpha$を介したものと示唆される。よって、今後$E_2$/ERaのトランスクリプトーム解析などを利用することも有用であると考えている。

臨床研究より、若年女性のLDL-コレステロール値は男性と比較してかなり低値を示し、閉経後は男性を上回り高い値を推移するなど脂質代謝には確実に性差が存在する。今回の検討では、これら臨床の観察研究の結果を直ちに分子生物学的検討に付すことに解釈上の無理があったかも知れない。次年度以降、これらの性差をもたらすメカニズムについて、脂質代謝及ぼす影響をストイキオメトリー等を行い更に検討を進める予定である。

# 生命化学解析部門

## 熱及び紫外線による毛髪のカルボニル化

研究員　仁　木　洋　子
共同研究者　吉　田　萌　生、前　薗　詩　織

### １．研究概要

**【目的】**

毛髪にダメージを与える外部因子である紫外線、及び熱によるカルボニル化について検討を行った。

**【背景】**

毛髪は 1 年間で約12 cm伸び、健康な毛髪のヘアサイクルは、男性で平均 3 ～ 5 年、女性で 4 ～ 6 年である。地肌から出ている部分の毛髪（毛幹）は、死んだ細胞からなり代謝は行われておらず、毛髪ダメージは年単位で蓄積する。毛髪にダメージを与える因子としては、太陽光線に含まれる紫外線や、日常のケアに使用するドライヤー、ヘアアイロンによる熱が知られている。

カルボニルタンパク（carbonylated proteins: CPs）は、タンパク質中のアルギニン残基やリジン残基のアミノ基が酸化修飾を受け、カルボニル誘導体となったタンパク質の総称である。タンパク質の酸化ダメージの 1 種であり、紫外線などによって発生する活性酸素（ROS）によっても産生される。先行研究では、CP化が毛髪のハリやコシ、ツヤの低下といった毛髪エイジングに繋がる可能性が示唆されている。

**【方法】**

CPs検出は、カルボニル基に特異的に結合する蛍光色素フルオレセイン 5 -チオセミカルバジド（FTSC）染色によって行った。FTSC染色した毛髪を蛍光顕微鏡で観察し、取得画像から蛍光輝度を計測し、毛髪CP化レベルの指標とした。紫外線（UVB）照射光源には312 nm BLX UV Tubes（コスモバイオ）を用いた。熱処理は、市販ヘアアイロンを180℃設定にし、水道水に 1 分間浸した毛髪に対して約20 cm/秒で 5 回繰り返し滑らすことを 1 セットとし、10、20、30セット行うことで実施した。

**【結果・考察】**

UVB照射を行った毛髪では、紫外線照射量の増加に伴い毛髪CP化が進んでいることが確認された（Fig. 1）。毛髪の垂直切片において断面を観察したところ、UVB照射を行った毛髪では、 2 重のリング状にCPsが観察された（Fig. 2）。毛髪断面は内側から、メデュラ、コルテックス、キューティクルの 3 層構造となっており、特にキューティクルの下層、コルテックスとの境で強くCP化が生じていることが観察された。ヘアアイロンによって、30セットの熱処理を行った毛髪では未処理と比較して有意差をもって毛髪CP化が進行した。毛髪には自家蛍光があることが知られているが、紫外線や熱処理によって毛髪の自家蛍光は変化せず、本評価法を用いて、紫外線及び熱による毛髪CP化の誘発が検出された。

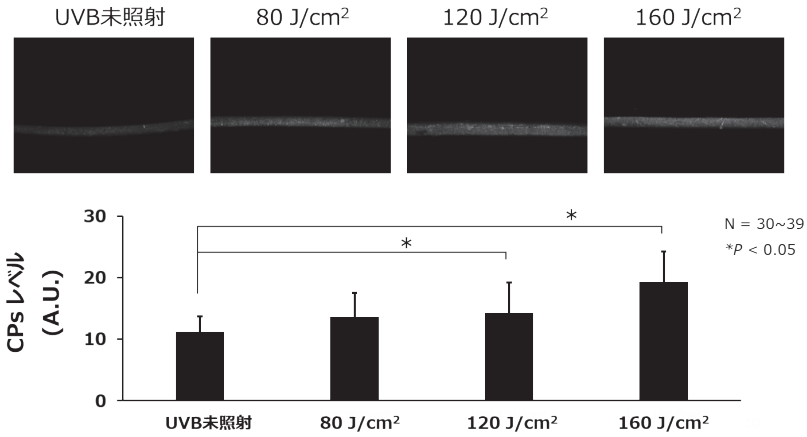



**Fig. 1　UVB照射による毛髪CP化の変化**

上段：FTSC染色を行った毛髪の蛍光顕微鏡観察像　グラフ：蛍光輝度（CP化レベル）

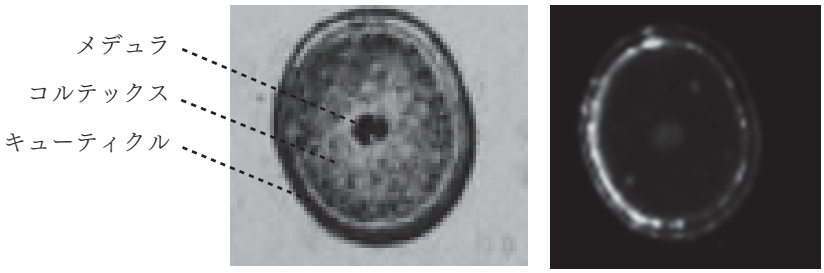



**Fig. 2　UVB照射（120 J/cm$^2$）後にFTSC染色を行った毛髪の断面（左：明視野像、右：蛍光像）**

**【今後の展望】**

既存のヘアケア化粧品用素材には、毛髪のアミノ基に結合、または接近して毛髪にハリやコシ、ツヤを付与するものがあり、これらによってアミノ基に生じる毛髪CP化を抑制できる可能性がある。今後、本研究で検討した方法を用い、紫外線照射、及び熱による毛髪CP化をアミノ基結合型ヘアケア素材が抑制するかを評価する予定である。

**【参考文献】**

Tomoko Watanabe, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn*. 48(4),(2014)

# 生命化学解析学部門

## モヤモヤ病感受性因子RNF213の機能

研究員　土　生　敏　行

### １．研究概要

**【目的、結果、考察】**

もやもや病は、内頸動脈終末部の閉塞、狭窄とその動脈近傍で形成される異常な血管網を示す疾患である。「もやもや病」という特徴的な病名は、血管造影によって見える異常血管網がタバコの煙のもやもやとたちのぼる様子に似ていることからきている。治療として唐沢らのグループが開発した外科的療法が行われ有効な治療として確立されている。もやもや病は、東アジアの日本、韓国および中国で頻度が高い疾患で、日本ではおおよそ 1 万人に 1 名の頻度で、女性に多く、脳出血や脳梗塞として発症する。小児期にも発症し、脳出血や脳梗塞で発症し、深刻な脳血管障害を生じると発達障害の原因となることが知られている。本疾患は難病の特定疾患に指定されており、おおよそ13000人の医療受給者がいます。また本疾患には、約15％に家族歴が認められ、遺伝素因の関与が疑われてきました。

京都大学のグループは、国内15家系及び海外の家系症例より17番染色体の1.5Mb領域に位置する領域を絞り込み、全ゲノム配列の配列決定により、RNF213遺伝子の4810番目のアルギニンがリジンに代わる多型（p.R4810K）が発症家系に共有されることを見出している。

RNF213はAAA+ ATPaseドメイン及びRINGドメインを有する590kDaの巨大タンパク質である。このたんぱく質の細胞内での機能を明らかにするためにRINGドメインに着目し、そのユビキチン鎖慎重反応の特性を明らかにすることで、その標的やRNF213分子が関与するネットワークを導き出すことを目的としている。ユビキチン反応はE1, E2, E3の大きく 3 種類の酵素による連続反応により構成されており、RINGドメインを持つ酵素は、E3ユビキチン結合酵素と呼ばれ、基質との特異性を決定する大きな役割を持つ。またユビキチン鎖の伸長反応はユビキチンのLys残基を利用したポリユビキチン鎖形成が行われ、ユビキチン内の利用するLys残基の種類により、ポリユビキチン鎖の種類が多数存在し、タンパク質分解の標的となるユビキチン鎖にはLys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48残基などがあり、Lys63残基を利用したポリユビキチン鎖を結合されたタンパク質は分解されることなく、シグナル伝達分子として機能することが知られている。このLys残基の利用様式を決定する酵素がE2酵素で、E3ユビキチン鎖結合酵素と直接結合し、機能することが知られている。これらのことより、RNF213のE2パートナーを決定することはRNF213の関与するネットワークの類推に有用であると考えられる。本実験では、ライブラリー化した34種あるE2酵素とRNF213の結合を酵母Two-Hybridアッセイにより結合するE2酵素を同定した。さらにこの酵素のもつポリユビキチン鎖慎重に利用するLys残基を同定し、Lys63残基を利用したポリユビキチン鎖伸長反応を行い、その活性は血管内皮細胞の持つ血管細胞網形成には必要ではないものの、細胞の移動運動能を大きく変化させることを明らかにしてきた。興味深いことにこの血管内皮細胞でのユビキチン活性要求とことなり、上皮細胞由来細胞では、細胞の浸潤能に関与していることも見出してきた。これらのことは、RNF213は血管内皮細胞の活性には必要ではあるが、ユビキチン化能はその活性に大きな影響は与えないものの、細胞の運動性

に大きな影響を与えることが明らかとなった。今後このユビキチン鎖伸長活性が関与する細胞現象を明らかにすることが、MMDの理解につながると考えている。

# 生命化学解析学部門

# アルテミア（雌雄）水和胚膜透過性改善処理の検討

研究員　吉　田　　徹

## １．研究概要

**【背景及び目的】**

アルテミアは、陸上の塩水湖に生育する小型節足動物甲殻類であり、酵母などの微生物を捕食し、何度か脱皮を繰り返しながら、孵化より２週間程度で体長10mm程度の成体となる。成体での雌雄の区別は、その体型から容易に判別できる。雌は、通常期には卵胎生によってノープリウス幼生を産出するが、厳冬期に入る前に、卵生ステージに入り、乾燥耐久卵を産出する。アルテミアの乾燥耐久卵は、様々な厳しい生育環境に耐性を持っており、アルテミアが極限環境生物として分類される根拠になっている。極限環境生物は、高温高圧や超低温あるいは強い電離放射線などの極端なストレスに対し、クリプトビオシス（休眠状態）に入ることで、著しい耐性を示すことができる一群の生物である。これらのクリプトビオシスを示す生体内部は、常温ガラス化状態にあることが示唆されており、極限環境生物がどのようにして常温ガラス化状態を導入するかの探索や、そのために必要な機能性分子の同定が試みられている。

一般に、溶液状態にある細胞が、凍結や乾燥によって脱水されると、細胞内部に残留する溶液成分が結晶化してしまうことが多い。細胞溶液が結晶状態になると、生体分子の有機的配置を保持出来ず、細胞は大きなダメージを受ける。例えば、冷凍された食材食品が解凍によりドリップ現象や、スルメのような乾燥食品で経験する味や品質低下は、まさにこうした劣化状況を示している。一方、常温ガラス化状態とは、いわばゴムが固まったように液体状態の分子配列を保ったままの状態を保存しており、細胞内部の微細構造を破壊させずに固化させることが原理的に可能となる。極限環境生物が有する自然の仕組みをそのままバイオミメティックスとして活用するため、アルテミアの乾燥耐久卵を段階的に水和させ、乾燥ストレスに感受性をもった一連の水和卵をモデル系として作成した。

常温ガラス化状態を導く機能性分子としては、トレハロースやLEAタンパク質などが知られているが、アルテミアの場合は、乾燥耐久卵を水和させることで、トレハロースが著しく減少していき、同時に耐性能力も失われる。本研究では、常温ガラス化を達成する機能性分子を細胞外から導入することを最終的な目的として、そのためのステップとなるアルテミア水和胚の卵殻を除去した上で、その細胞膜の膜透過性改善を試みたので報告する。

**【方法】**

アルテミアの乾燥耐久卵は直径が0.2mmであり、特注のシードスプーンを利用して、220個程度を毎回計量した。その後、海水中で30分間水和後、10%次亜塩素酸ナトリウムによって脱殻処理を行い、２%チオ硫酸ナトリウムによって反応を停止させた。膜透過性改善処理は、１－ピレン酪酸、ドデシルりん酸のような両親媒性アニオン分子、ポリアリルアミン、ポリジアリルジメチルアンモニウムのようなカチオン性合成ポリマーなどの各種試薬を用いた。膜透過性の改善評価については、プランクトンの生細胞検出などで使われる、ニュートラルレッド（NR）染色法によって行い、画像解析は、

ImageJ/Fijiを用いて、三原色分解した画像をヒストグラムによるカラー補正を行った上で、一定水準の色調変化が得られたものを陽性とした。また、様々な改善処理後の細胞毒性について、水和48時間後の実効孵化率によって評価を行なった。孵化瓶は開口部の大きい広口瓶を採用し、エアレーションを行っている。得られたデータは、それぞれSPSS（IBM SPSS Statistics）およびPRISM8（GraphPad Software）によって統計処理を行った。

**【結果及び考察】**

アルテミア乾燥卵を28℃下で水和30分後、次亜塩素酸による脱殻処理を60分間行うことで、脱殻が適切に行われていることを確認した。続いて、合計水和時間を 3 時間以内となるよう膜透過性改善処理を最大60分間行い、最適な膜透過性の改善効果が認められるよう調整した。今回調べた膜透過性改善試薬では、ドデシルりん酸が80％以上の陽性率となり、ポリアリルアミンは30％前後の陽性率を示した。しかしながら、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロリド、DMSO、 1 －ピレン酪酸の陽性率は低い結果となった。一方、膜透過性改善処理による細胞毒性を確かめるため、処理後のアルテミア水和胚の孵化率を調べたところ、DMSOが最も高く、ポリアリルアミンがこれに続き、ドデシルりん酸が最も低かった。以上より、NR陽性率と孵化率ともに高い値を示したポリアリルアミンがアルテミア水和胚の膜透過性改善に最も有効であった。

カチオン性合成ポリマーによる膜透過性の改善メカニズムとしては、クラスリンやカベオリン経由のエンドサイトーシスなど諸説があるが、細胞膜に吸着したポリマーが、直接的に膜透過するか、マクロピノサイトーシスによって細胞内に取り込まれるプロセスが有力と考えられる。また，カチオン性合成ポリマー試薬が、両親媒性アニオン試薬と錯形成することによって、細胞膜通過を促進することが提唱されているため、ドデシルりん酸を共添加することにより、陽性率が向上する可能性も考えられる。今回の研究により、アルテミア水和胚の膜透過性改善に対して有効な試薬候補が得られたが、今後はさらに条件を絞り込んでいきたい所存である。

## 2．研究論文

低温生物工学会誌〔Cryobiology and Cryotechnology〕，Vol. 66, No. 2, 151～155, 2020

# 水和処理を行ったアルテミア耐性卵卵膜における膜透過性改善処理の検討

[1]武庫川女子大学食物栄養科学部,
[2]武庫川女子大学バイオサイエンス研究所
諸井美樹[1]，福尾惠介[1]，吉田徹[1, 2†]

# Evaluation of the improved embryonic membrane permeability for *Artemia franciscana* hydrated cysts

Miki MOROI[1], Keisuke FUKUO[1], Toru YOSHIDA[1,2†]

*[1] School of Food Science and Nutrition, [2] Institute for Bioscience, Mukogawa Women's University, 6-46, Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan*
(†Corresponding author, e-mail: tyoshida@mukogawa-u.ac.jp)

The cysts of *Artemia franciscana (A. franciscana)* exhibit intense tolerance to desiccation and freezing. However, when cysts are hydrated, these resistances to the extreme environments are drastically impaired. In this report, we investigated into improved membrane permeability of the decapsulated cysts by the treatments of synthetic cationic polymer and several amphipathic anionic surfactants. We found here that poly-allylamine, synthetic cationic polymer, was to be relatively effective on the embryonic membrane permeability of hydrated cysts. This reagent could prove useful when introducing alternative endogenous factors that assist their stress-resistant functions in future studies.

（Received Xxx. xx, 20xx; Accepted Xxx. xx, 20xx）

## 緒　　言

水生の小型節足動物であるアルテミアの耐性卵は，激しい温度変化，強い乾燥，低い酸素分圧，高い浸透圧のほか，紫外線や電離放射線などの幅広い外界環境のストレスに著しい耐性を示す[1,2]．耐性卵は，原腸胚初期のステージにあり，胚の周囲を覆う卵膜と，アルテミアの育房室卵殻腺より分泌されるムコ多糖の一種，キチンによって構成される卵殻を持つ．ただし，アルテミアのストレス耐性は，外界環境に合わせて獲得するわけでなく，外界環境の変化を感じ取った親の世代において，運命づけられたものである[3]．耐性卵が持つ様々なストレスの耐性メカニズムとして，セルロースに類似した構造を持つムコ多糖の一種，キチンによって構成された透過性の低い卵殻がまずあげられるが，こうした物理的障壁によるものに加えて，胚内部に貯蔵された多くの機能性因子が重要と考えられている．乾燥した耐性卵内

研究報告
[Key words: Artemia, membrane permeability, synthetic cationic polymers, amphipathic anionic surfactants; アルテミア，膜透過性，カチオン性合成ポリマー試薬，両親媒性アニオン試薬]

部には，乾燥重量で約 15%のトレハロースが含まれるほか，植物の種子や他の極限環境生物にも存在する Late Embryogenesis Abundant （LEA） proteins[4]や，p26 や Hsp21 などの分子シャペロンとして働く各種ヒートショックタンパク質の存在が確認されている [5]．これらのトレハロースや一部の機能性タンパク質が協同することによって，耐性卵内部にガラス化が誘導され，クリプトビオシス（無代謝休眠）状態に入ることで，多様なストレス耐性が生み出されていると考えられる．

一方，十分乾燥させた耐性卵は，適正な環境下で再水和させると，休眠状態が解かれてただちに発生を再開し，およそ 24 時間で孵化が認められる．しかし，発生再開によって，これまで保持されていた様々な耐性能力は速やかに失われてしまう [3]．具体的には，胚内部に蓄積されたトレハロースは，発生のエネルギー源として使われ，内在性のトレハラーゼによって分解を受け，最初の 12 時間で大きく減少することは特筆に値する [6]．このような水和胚は，凍結や乾燥に対しても強い感受性を示すようになり，例えば，再水和 1 時間の水和胚を急速凍結した場合の孵化率は，著しく減少する [7]．また，筆者らのこれまでの研究から，再水和 3 時間程度で，乾燥耐性の著しい低下についても明らかにしてきた（未発表データ）．我々は，このような背景から，あらかじめ再水和時間を調節することによって，様々な外界ストレスに対する一連の感受性胚を作成し，凍結に伴うアルテミアの耐凍能力について，孵化率を指標とした評価モデル系を開発している [7,8]．

再水和によって，胚内部に備わった凍結耐性能力が速やかに喪失していくのであれば，卵外から凍害防御効果のあるいくつかの代替物質を導入することでその能力を補塡し，アルテミア水和胚の感受性を軽減させることも可能になるだろう．そこで，我々は耐性卵のキチン層からなる卵殻を脱殻し，我々の知る限り，これまでほとんど研究例のないアルテミア卵膜の透過性を各種試薬によって改善させることを目的として，新たな水和胚を利用した評価モデル系の作製を試みた．具体的には，ストレス耐性が著しく低下する再水和 3 時間後の水和胚に対して，膜透過ペプチド（CPP）と同様な活性を示すカチオン性合成ポリマー試薬，並びに両親媒性アニオン試薬などを用い，アルテミア水和胚卵膜を処理し，その膜透過性変化を生細胞染色法によって検討したので報告する．

## 材料および方法

アルテミアの耐性卵は，シードスプーン（BMS-SS50, BioMedical Science Inc.）により計量し，マイクロチューブ内で人工海水（Tetra Marine Salt Pro 70751, テトラジャパン）に 30 分間浸漬後，既に報告している脱殻処理 [8]を一部改変して行った．簡潔に記すと，10%次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて 60 分間浸漬させて緩やかな脱殻処理を行い，2%チオ硫酸ナトリウムで反応を停止させた．脱殻処理を行った水和胚は，ポリアリルアミンのようなカチオン性合成ポリマー，及びドデシルりん酸，1-ピレン酪酸のような両親媒性アニオン試薬，さらに非プロトン性極性溶媒としてジメチルスルホキシド（DMSO）を用い（Table 1），合計水和時間が 3 時間以内となるように時間調整を行った上で，室温で反応させた．反応後は，繰り返しリンスを行った後，水和胚を 2 群に分けて，膜透過性の改善評価と孵化率の評価を行った．

**Table 1.** List of synthetic cationic polymers and amphipathic anionic surfactants

| Reagents | Mol.Weight | Features |
|---|---|---|
| Dodecyl phosphate | 266.31 | Amphipathic anionic surfactants |
| 1-Pyrenebutyric acid | 288.35 | |
| Poly-allylamine | Av~17000 | Synthetic cationic polymer |
| Dimethyl sulfoxide | 78.13 | Aprotonic polar solvent |

膜透過性の改善評価は，バラスト内に発生するプランクトンの生死判定にも利用されるニュートラルレッド（NR）染色法 [9]を用いた．NR は生細胞の細胞膜を通過して細胞内に蓄積するため，膜透過性の難易判定にも利用できると考えられる．具体的には，水和胚を 0.0005%NR により 15 分間処理した後，暗箱内に設置した光学顕微鏡(CX-23, オリンパス)の両側面から光度一定の白色 LED ランプを照射し，画像撮影装置(Motic Image Plus 2.3S, 島津理化)を使って画像を取り込んだ．その後，ImageJ/Fiji を用いて画像解析を行い，アルテミア水和胚の染色像を，三

原色分解した画像のヒストグラム補正により，染色像の明度ではなく，NR 染色による色相バランスで評価したものを陽性像とした．水和胚の孵化率評価については，ユニット恒温槽（SM-05R, TAITEC）と冷却装置（TRL107 NHF, Thomas Kagaku Co.）を接続した温度コントローラー（TC-107, Thomas Kagaku Co.）で 28℃に保ち，24 時間明暗サイクル（明期 15 時間／暗期 9 時間）の照明下で，48 時間後の孵化率を自然孵化数との相対値によって求めた．孵化瓶は開口部の大きい広口瓶を採用し，エアレーションを行っている．得られたデータは，それぞれ SPSS（IBM SPSS Statistics）および PRISM8（GraphPad Software）によって統計処理を行った．

## 結果および考察

アルテミア耐性卵の脱殻処理は，これに続く膜透過性改善処理のため，水酸化ナトリウムを使わずに緩やかな脱殻条件下で反応させたが，既報 [8]と違わない脱殻された水和胚を得た（Fig.1A, B）．また，この脱殻処理により，自然孵化率（86.2% ± 2.06）に影響がほぼないことを確認した．なお，脱殻が完全に施された水和胚では，透明な卵膜表面構造が確認できる（Fig. 1 C）．卵膜への膜透過性改善処理は，カチオン性合成ポリマー試薬の中では，20 mM ポリアリルアミン 15 分間の処理で 30%前後の陽性率を示した（Fig.2). また, 両親媒性アニオン試薬の中では，1-ピレン酪酸は有意な結果が得られなかったが，80 mM を数倍超えるドデシルりん酸 15 分間の処理で 60%以上の陽性率を示し，今回調べた範囲内において濃度依存的に上昇した（Fig.1D, E; Fig.2）．

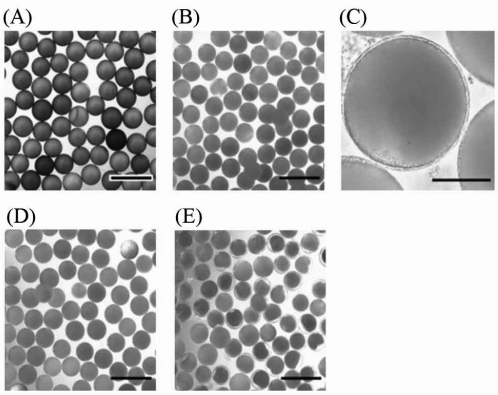
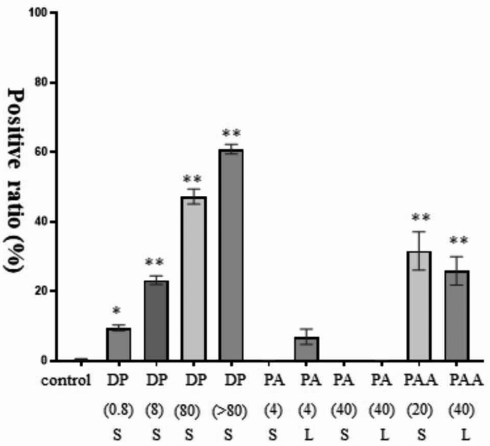



**Fig.1.** The external appearance of *A. franciscana* hydrated cysts. (A) Hydrated untreated cysts (40X, Bar 500μm). (B) Decapsulated hydrated cysts (40X, Bar 500μm). (C) Magnified (400X, Bar 100μm) surface image of the decapsulated hydrated cysts. (D) NR stained image of the decapsulated hydrated cysts without permeabilization treatments (40X, Bar 500μm). (E) NR stained image of the decapsulated hydrated cysts after the treatment (15 min) of >80 mM dodecyl phosphate (40X, Bar 500μm).




DP : Dodecyl phosphate, PA : 1-Pyrenebutyric acid,
PAA : Poly-allylamine
(concentration : mM) S : 15min, L : 30min

**Fig.2.** Evaluation of membrane permeability of the decapsulated cysts by the treatments of synthetic cationic polymer or several amphipathic anionic surfactants. Each bar represents the ratio of the NR-staining positive embryos in the approximately 3000 examined embryos.
*p<0.05, **p<0.0001

次に，膜透過性改善処理による細胞毒性を確かめるため，膜透過性改善処理後のアルテミア水和胚の孵化率を調べたところ，非プロトン性極性溶媒の DMSO が最も高く，ポリアリルアミンがこれに続き，ドデシルりん酸が最も低かった（Table 2）．DMSO は卵膜が半透明化したために，NR 染色法を用いた今回の系では評価出来なかったが，凍害防御効果のある DMSO による損傷が低いことは，膜透過改善剤の溶媒としての利用価値を高めると考えられる．ま

た，両親媒性アニオン試薬のドデシルりん酸による陽性率の高さは，細胞膜を構成するリン脂質二重層と直接的な相互作用によるものと考えられるが[10]，高濃度では細胞膜の可溶化を促す界面活性剤であるほか，溶解熱により孵化温度の上限を越えたことが，その後の水和胚発生に影響をもたらし，孵化率の著しい低下を認めた可能性が考えられる．

**Table 2.** Relative hatching ratio of hydrated decapsulated cysts after the treatments (15 min) of various reagents.

| Reagents (mM) | Relative hatching ratio (%) | Reagents (mM) | Relative hatching ratio (%) |
|---|---|---|---|
| DP (0.8) | 59.2 ± 23.7 | PA (4) | 22.8 ± 5.1 |
| DP (8) | 0.7 ± 0.2 | PA (40) | 9.1 ± 3.0 |
| DP (80) | 1.1 ± 0.6 | PAA (20) | 91.9 ± 11.0 |
| DMSO (0.75) | 109.8 ± 5.5 | PAA (40) | 63.4 ± 17.6 |

DP : Dodecyl phosphate, PA : 1-Pyrenebutyric Acid, PAA : Poly-allylamine

今回の調査では，アルテミア水和胚の孵化率を考慮すると，カチオン性合成ポリマー試薬のポリアリルアミン(20 mM)による処理を行うことによって，アルテミア卵膜の膜透過性に一定の改善が認められた．しかし，カチオン性合成ポリマー試薬が，両親媒性アニオン試薬と錯形成することによって，細胞膜通過を促進することが提唱されており[11,12]，今後，溶解熱を抑えながらドデシルりん酸を共添加することにより，陽性率を向上させられるかも知れない．なお，実際にカチオン性合成ポリマー試薬が卵膜表面に吸着し，それに依存する形で機能分子が細胞内部へどの程度取込まれるかどうかについては，蛍光色素などを使った定量的な検証が必要であろう．本研究をさらに進めていくことによって，細胞膜透過性の低いトレハロースなどの物質を細胞内へ導入することを将来的に図っていきたい．

## ま　と　め

アルテミアの耐性卵は，幅広い外界環境変化に対して著しい耐性を示すが，再水和によって，そのストレス耐性を失う．本研究では，耐性卵のキチン質からなる卵殻を脱殻し，卵膜の透過性を各種試薬によって改善させることを目的として，生細胞染色法を利用した評価モデル系の作製を試みた．その結果，カチオン性合成ポリマー試薬のポリアリルアミンで処理を行うことで，アルテミア卵膜の膜透過性の向上が示唆された．

## 文　　献


1) Clegg J. S. : Desiccation tolerance in encysted embryos of the animal extremophile, *Artemia*, Integr. Comp. Biol., **45**, 715-724 (2005)
2) T. H. MacRae : Cell Stress Chaperones, **21**,9 (2016)
3) 吉田徹 ： アルテミアのストレス耐性とバイオアッセイ法，冷凍, **92**, 16-20 (2017)
4) Hand S. C., Jones D., Menze M.A., Witt T. L. : Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. J. Exp. Zool., **307A**, 62-66 (2007)
5) Viner R. I., Clegg J. S. : Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/α-crystallin protein. Cell Stress. Chaperones., **6**, 126-135 (2001)
6) Yoshida T., Arii Y., Hino K., Sawatani I., Tanaka M., Takahashi R., Bando T., Mukai K. and Fukuo K. : High hatching rates after cryopreservation of hydrated cysts of the brine shrimp *A. franciscana*, Cryo Lett., **32**, 206-15 (2011)
7) 吉田徹，鮫島由香，田中翠，鹿住敏，福田満，福尾惠介 ： アルテミア水和凍結胚の孵化率を指標とした凍害防御法，低温生物工学誌，**58**, 195-199 (2012)
8) 吉田徹，田中翠，坂上万里，福尾惠介，福田満 ： 脱殻処理を施したアルテミア水和凍結胚による凍害評価法，低温生物工学誌, **59**, 121 (2013)
9) 鋤崎俊二，海野圭祐 ： バラスト水処理装置の性能試験に適用する植物プランクトンの生死判別技術，日本プランクトン学会報，**60**, 35-40 (2013)
10) Keller S., Heerklotz H., Jahnke N., Blume A. : Thermodynamics of lipid membrane solubilization by sodium dodecyl sulfate, Biophysical J., **90**, 4509-4521 (2006)

11) Sakai N., Matile S. ; Anion-mediated transfer of polyarginine across lipid and bilayer membranes, J. Am. Chem. Soc., **125**, 14348-14356 (2003)
12) Perret F., Nishihara M., Takeuchi T., Futaki S., Lazar A. N., Coleman A. W., Sakai N., Matile S. : Anionic fullerenes, calixarenes, coronenes, and pyrenes as activators of oligo/polyarginines in model membranes and live cells, J. Am. Chem. Soc., **127**, 1114-1115 (2005)

# バイオサイエンス研究所 研究成果発表会

**令和２年度 バイオサイエンス研究所 研究成果発表会を下記のとおり開催いたします。**
**多数ご参加くださいますよう、お願い申し上げます。**

## 日時：2021 年３月４日（木）13:30～16:30
## 場所：公江記念館　地階　大講義室（KM109）

## プログラム

発表順、発表時間 8 分、質疑応答時間 5 分

■ **生命化学解析学部門**

土生　敏行　：モヤモヤ病感受性因子 RNF213 の機能
仁木　洋子　：熱及び紫外線による毛髪のカルボニル化
吉田　徹　　：アルテミア（雌雄）水和胚膜透過性改善処理の検討

■ **個体生命解析学部門**

籠田　智美　：メタボリックシンドロームにおける血管抵抗性調節変化とそれに及ぼす血管周囲脂肪の影響 ～雌雄差に関する検討
義澤　克彦　：食品由来物質による各種疾患モデルでの予防・治療効果（雌雄差に関する検討）

■ **細胞生命解析学部門**

伊勢川　裕二：エストロゲン活性を有する 8-プレニルナリンゲニンの抗インフルエンザ効果
高　明　　：新規天然薬用植物及びその含有成分の生活習慣病に対する予防、治療効果と作用メカニズムの解明
蓬田　健太郎：骨粗鬆症の発生要因の再検討

■ **分子生命解析学部門**

中瀬　朋夏　：トランスポーターから紐解く女性特有の疾患　：乳がん悪性化機構の解明と新治療戦略の開発
森山　賢治　：「エネルギー代謝における性差とは」 ～性差の分子生物学的基礎的検討～

■ **総括**　　萩中　淳

＊学外の方で参加を希望される方は、事前に本田（hondac@mukogawa-u.ac.jp）までお知らせください。

主催：武庫川女子大学　バイオサイエンス研究所
お問合せ先：武庫川女子大学　バイオサイエンス研究所
ダイヤルイン：0798-45-9941　　内線：72-444、449

## 学　会　発　表

**AT1受容体拮抗薬によるメタボリックシンドロームラットの動脈拡張能低下の改善は動脈周囲脂肪組織を介する調節機構に依存しない**
籠田智美，麓（丸山）加菜，島利美保，篠塚和正
第93回日本薬理学会年会，横浜，2020.3.16-18.

**脳卒中易発症高血圧自然発症ラットの血管周囲脂肪は動脈弛緩反応性を増大する**
水野真帆，麓（丸山）加菜，森川花菜，島利美保，篠塚和正，籠田智美
日本薬学会第140年会，京都，2020.3.26-28.

**ラットの全身及び末梢循環に及ぼすクロレラの影響**
乗井萌花，籠田智美，麓（丸山）加菜，塩川やよい，森川花菜，山田静雄，篠塚和正
日本薬学会第140年会，京都，2020.3.26-28.

***Acanthopanax senticosus*根抽出物による消化管運動調節作用**
和久田（宮内）詩野，籠田智美，麓（丸山）加菜，塩川やよい，森川花菜，島利美保，乗井萌花，水野真帆，山田静雄，篠塚和正
日本薬学会第140年会，京都，2020.3.26-28.

**各種薬剤のムスカリン性受容体結合活性の評価と抗コリン負荷のスコア化**
山田静雄，地本純子，望月正栄，黄倉崇，森川花菜，籠田智美，篠塚和正，海野由里子，鈴木真由美，速水慎介
第27回日本排尿機能学会，東京，2020.10.17.

**網膜色素変性症モデルにおけるアセロラの病態抑制効果**
小山千尋，辰田ひかり，福原由実子，平岡るい，永峰賢一，竹之内明子，義澤克彦
第16回ファンクショナルフード学会学術集会，東京，2020.1.11.

**INHAND: International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions – An Update 2020**
Hayashi S, Keenan CM, Bradley A, Goodman DG, Harada T, Herbert R, Iwata H, Jacobsen M, Kellner R, Mahler B, Meseck E, Nolte T, Rittinghausen S, Vahle J, Yoshizawa K.
第36回日本毒性病理学会学術集会学術集会，東京，2020.2.13.

**Protective effect of the proton pump inhibitor lansoprazole in lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats**
Nakatake R, Hishikawa H, Kotsuka M, Yoshizawa K, Nishizawa, M, Okumura T, Tolba R, Sekimoto M.
55th Congress of the European Society for Surgical Research, Austria, 2020.5.13.

**8-Prenylnaringeninのインフルエンザウイルス侵入阻害機構**
花田あかり，吉岡花恵，森本亮祐，尾形篤太郎，伊勢川裕二
第74回日本栄養・食糧学会大会，2020.5.16.

**大豆によるインフルエンザウイルス侵入阻害機構の検討**
坂田菜摘，堀尾侑加，伊勢川裕二
第74回日本栄養・食糧学会大会，2020.5.16.

**ダイゼインによるインフルエンザウイルスRNA転写・複製阻害機構の検討**
堀尾侑加，七里元督，伊勢川裕二
第74回日本栄養・食糧学会大会，2020.5.16.

**ユーグレナ熱水抽出物による抗インフルエンザウイルス効果とその作用機構の検討**
堀尾侑加，中島綾香，鈴木健吾，伊勢川裕二

第59回日本栄養・食糧学会近畿支部大会，2020.11.14.

**YNCRGのメタボリックシンドローム改善効果について**
工藤麻耶，林美沙，田芃，呉莉莉，洪朝陽，趙益通，西垣敏明，西原政晃，劉銅華，高明
日本薬学会第140年会，京都，2020.3.25-28.

**肥満糖尿病モデルマウスにおけるプラズマローゲンの体重増加抑制作用について**
林美沙，工藤麻耶，孫伯菊，劉銅華，高明
日本薬学会第140年会京都，2020.3.25-28.

**肥満糖尿病モデルマウスにおけるMadecassosideの体重増加抑制作用について**
孫伯菊，工藤麻耶，林美沙，劉銅華，高明
日本薬学会第140年会，京都，2020.3.25-28.

**SHRSP5ラットにおけるL-citrullineの脂質代謝に対する影響について**
工藤麻耶，山岸淑恵，勝呂栞，西原政晃，吉富久恵，林美沙，高明
第56高血圧関連疾患モデル学会，東京，2020.11.14-15.

**漢方薬による高血圧治療の最新進展**
高　明
中国天津市中西結合第3回消化-心-脳融合学術会議，天津，2020.7.22.（招待講演）

**日本漢方薬と中国中医薬の異同**
高　明
留日中国人生命科学協会第2回交流会，兵庫，2020.10.31.

**妊娠授乳による続発性骨粗鬆症と閉経後骨粗鬆症のならびに発症要因の検討**
巽都香沙，梶原みづほ，米谷安規子，蓬田健太郎
第74回日本栄養・食糧学会大会，仙台，2020.5.15-17.

**微弱振動磁界下急速凍結法による細胞保存への改善効果**
國谷かおり，奥田華奈，河内愛子，蓬田健太郎
第43回日本分子生物学会年会，オンライン開催，2020.12.2-4.

**乳がん幹細胞様細胞の維持に必要な亜鉛と亜鉛トランスポーター**
鳥井栄貴，生嶌千菜美，大塚晴香，湯谷玲子，松井千紘，中瀬生彦，中瀬朋夏
第15回トランスポーター研究会，京都，2020.10.12-16.

**ドラッグリポジショニングによるシスチントランスポーターを標的とした難治性乳がん治療戦略の開発**
生嶌千菜美，松井千紘，大塚晴香，鳥井栄貴，湯谷玲子，中瀬生彦，中瀬朋夏
第15回トランスポーター研究会，京都，2020.10.12-16.

**亜鉛と亜鉛トランスポーターによる乳がん幹細胞様細胞維持機構の制御**
鳥井栄貴，生嶌千菜美，松井千紘，中瀬生彦，中瀬朋夏
第36回日本DDS学会学術集会，兵庫，2020.8.28-29.

**ドラッグリポジショニングによる酸化ストレス分子機構を標的とした難治性乳がん治療の新戦略**
生嶌千菜美，鳥井栄貴，松井千紘，中瀬生彦，中瀬朋夏
第36回日本DDS学会学術集会，兵庫，2020.8.28-29.

**Cell-penetrating sC18 peptide modified extracellular vesicles for intracellular delivery**
Noguchi Kosuke, Sumi Haruka, Takatani-Nakase

Tomoka, Neundorf Ines, Nakase Ikuhiko
ISEV2020 Virtual Annual Meeting, Philadelphia, USA, 2020.7.20.

**細胞膜透過性sC18ペプチド修飾型エクソソームを基盤とした薬物送達技術の開発**
野口公輔，角春佳，中瀬朋夏，Ines Neundorf，中瀬生彦
日本膜学会第42年会，東京，2020.5.20.

**日本薬剤学会永井財団大学院学生スカラシップ受賞**
**ドラッグリポジショニングによる酸化ストレス分子機構を標的とした難治性乳がん治療戦略の開発**
生嶌千菜美，鳥井栄貴，酒井佑佳，松井千紘，中瀬生彦，中瀬朋夏
日本薬剤学会年会第35年会，熊本，2020.5.14-16.

**乳がん幹細胞様細胞の維持機構を制御する亜鉛と亜鉛トランスポーター**
鳥井栄貴，生嶌千菜美，酒井佑佳，松井千紘，中瀬生彦，中瀬朋夏
日本薬剤学会年会第35年会，熊本，2020.5.14-16.

**乳がん幹細胞様細胞の維持機構における亜鉛と亜鉛トランスポーターの役割**
松井千紘，鳥井栄貴，酒井佑佳，生嶌千菜美，中瀬生彦，中瀬朋夏
日本薬学会140年会，京都，2020.3.26-28.

**シスチントランスポーターを標的とする難治性トリプルネガティブ乳がんの治療戦略**
生嶌千菜美，酒井佑佳，松井千紘，鳥井栄貴，中瀬生彦，中瀬朋夏
日本薬学会140年会，京都，2020.3.26-28.

**細胞膜透過性sC18ペプチド修飾型エクソソームを基盤とした細胞内薬物送達**
野口公輔，角春佳，中瀬朋夏，Ines Neundorf，中瀬生彦
日本薬学会140年会，京都，2020.3.26-28.

**膜透過性ペプチドsC18修飾型エクソソームの効率的な薬物送達**
野口公輔，角春佳，中瀬朋夏，Ines Neundorf，中瀬生彦
BioMedical Forum 2020，大阪，2020.2.6.

**タバコ煙抽出物はコレステロール代謝に影響を及ぼすか**
松下翠，二若久美，林美沙，光谷真奈，増田奈菜子，宮脇尚志，田上哲也，森山賢治
日本薬学会第140年会，京都，2020.3.25-28.

**成長ホルモンによるGATA転写因子群を介したエネルギー代謝調節の基礎的検討**
光谷真奈，二若久美，松下翠，増田奈菜子，田上哲也，森山賢治
第93回日本内分泌学科学術総会，浜松，2020.6.4-6.

**STATを介したGATA2の発現調節の基礎的検討**
増田奈菜子，二若久美，光谷真奈，松下翠，岩井和，田上哲也，森山賢治
第70日本薬学会関西支部大会，草津，2020.10.10.

**GATA転写因子群がコレステロール代謝に及ぼす影響の基礎的検討**
光谷真奈，二若久美，松下翠，増田奈菜子，岩井和，田上哲也，森山賢治
第70日本薬学会関西支部大会，草津，2020.10.10.

**UCP2の発現調節におけるGATAの基礎的検討**
岩井和，光谷真奈，松下翠，増田奈菜子，二若久美，田上哲也，森山賢治

第70日本薬学会関西支部大会，草津，2020.10.10.

**甲状腺ホルモンのコレステロール調節作用と喫煙**

光谷真奈，二若久美，増田奈菜子，松下翠，林美沙，田上哲也，森山賢治

第63回日本甲状腺学会学術集会，奈良，2020.11.19-12.15.

**甲状腺ホルモン製剤の剤型によるアレルギー反応と対処法の検討**

森山賢治，光谷真奈，増田奈菜子，林美沙，松下翠，二若久美，坂根依子，森徹，須川秀夫

第63回日本甲状腺学会学術集会，奈良，2020.11.19-12.15.

**小児四肢疼痛発作症の神経過興奮メカニズム解明のためのNav1.8欠損マウスの作出**

奥田裕子，竹谷朱，小林果，土生敏行，原田浩二，ショハブユーセフィアン，小泉昭夫

第91回　日本衛生学会学術総会，富山，2021.3.6-8.

**アルテミア水和胚卵膜における膜透過性改善処理の検討**

吉田徹，諸井美樹，福尾惠介

日本低温生物工学会第65回大会，京都，2020.5.30-31.

## 誌 上 発 表

**Vasorelaxant effects of Chlorella on blood circulation in healthy rats**

Kagota S, Norii M, Morikawa K, Maruyama-Fumoto K, Yamada S, Shinozuka K.

*Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, **8**, 1142 (2020).

クロレラは、ラット摘出動脈を内皮依存性および非依存性に弛緩させる作用があるが、経口摂取により全身および末梢循環に影響しないことを見出し、立ちくらみや起立性低血圧等の有害事象を発生させることなく使用できることを示唆した。

***Acanthopanax senticosus* root extract exerts dual action on mouse ileal smooth muscle function, leading to modulation of gastrointestinal motility**

Miyauchi-Wakuda S, Kagota S, Maruyama-Fumoto K, Shiokawa Y, Yamada S, Shinozuka K.

*Biological and Pharmaceutical Bulletin,* **43**, 817-822 (2020).

*Acanthopanax senticosus* 根抽出物は、マウス回腸平滑筋を直接弛緩させることにより、亢進した腸管運動を改善することを見出し、運動異常による下痢症状を改善する効果が期待できることを示唆した。

**Effect of *Saw Palmetto* Extract on urodynamic parameters, bladder contractility and pharmacological receptors in female rats**

Yamada S, Ito Y, Morikawa K, Kagota S, Shinozuka K.

*Academia Journal of Medicinal Plants*, **8**, 171-178 (2020).

ノコギリパルメット抽出物は、膀胱ムスカリン受容体拮抗作用により雌ラットの排尿筋過活動を改善することを見出し、過活動膀胱女性患者の下部尿路症状を改善するための治療薬となる可能性を示唆した。

**Direct in vitro and in vivo demonstration of muscarinic receptor binding by the novel radioligand, [3H] 5-hydroxymethyltolterodine, in the bladder and other tissues of rats**

Yamada S, Kuraoka S, Ito Y, Kagota S, Shinozuka K, Onoue S.

*Journal of Pharmacological Sciences,* **142**, 127-130 (2020).

[3H] 5-hydroxymethyltolterodineは、ラット組織のムスカリン受容体を特異的に標識することを見出し、ムスカリン受容体を高い親和性で標識するための有用な放射性リガンドであること示唆した。

**2020 Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pasticide Residues,** Geneva, Switzerland, 17-26 September 2019

Yoshizawa K.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION

2019年のジュネーブで開催されたFAO/WHO合同残留農薬専門家会議（JMPR）の公式文書であり、これをもとにコーデックスでの残留農薬基準が設定される。この会議で評価された一部の農薬の毒性評価を義澤が担当・執筆した。

**Suppressive effects of mead acid supplementation on acute liver damage model in rats**

Takenouchi A, Kinoshita Y, Hirayama Y, Shinke Y, Hamazaki K, Yoshizawa K.

*Journal of Lipid Nutrition,* **29**, 55-67 (2020).

四塩化炭素並びにアセトアミノフェン誘発の雄ラット急性肝障害モデルでのミード酸食による病態抑制効果を明らかにし、そのMOAを解明した。食品由来物質による急性肝障害抑制効果の応用例である。

**Inhibitory effects of mead acid supplementation on acetaminophen-induced renal toxicity in rats**
Takenouchi A, Koyama C, Kinoshita Y, Hamazaki K, Tsukaguchi H, Yoshizawa K.
*Journal of Lipid Nutrition,* **29**, 15-25（2020）.
アセトアミノフェン誘発の雄ラット急性腎障害モデルでのミード酸食による病態抑制効果を明らかにし、そのMOAを解明した。食品由来物質による急性腎障害抑制効果の応用例である。

**Suppressive effects of black soybean seed coat extract（Chrono-Care）supplementation on retinal degeneration models**
Tatsuda H, Koyama C, Takenouchi A, Yoshioka M, Akagi R, Maruo T, Suzuki T, Yuir T, Yoshizawa K.
*Functional Food Research,* **16**, 87-96（2020）.
*N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素誘発の雌ラット網膜変性症モデルにおけるクロノケア経口投与による病態抑制効果を明らかにし、そのMOAを解明した。食品由来物質による網膜変性症抑制効果の応用例である。

**Inhibitory effects of chitosan oligosaccharide supplementation on acute liver damage models**
Takenouchi A, Koyama C, Fujiwara R, Hirayama Y, Kunihiro A, Fujita N, Kurozumi S, Sato K, Okamoto Y, Yoshizawa K.
*Chitin and Chitosan Research,* **26**, 29-41, 2020.
緑茶抽出物並びに四塩化炭素誘発の雄ラット急性肝障害モデルでのキトサンオリゴ糖経口投与による病態抑制効果を明らかにし、そのMOAを解明した。食品由来物質による急性肝障害抑制効果の応用例である。

**Suppressive effects of acerola supplementation on rodent retinal degeneration models**
Koyama C, Tatsuda H, Fukubara Y, Hiraoka R, Nagamine K, Takeuchi A, Yoshizawa K.
*Functional Food Research,* **16**, 75-86（2020）.
*N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素誘発の雌ラット網膜変性症モデル並びに遺伝性網膜変性症マウスにおけるアセロラ水の経口投与による病態抑制効果を明らかにし、そのMOAを解明した。食品由来物質による網膜変性症抑制効果の応用例である。

**Juice of Citrullus lanatus var. citroides（wild watermelon）inhibits the entry and propagation of influenza viruses in vitro and in vivo**
Morimoto R, Yoshioka K., Nakayama M., Nagai E, Okuno Y, Nakashima A., Ogawa T., Suzuki K., Emomoto T, Isegawa Y
*Food Sci Nutr*, **9**, 544-552（2021）
カラハリスイカ抽出物は細胞レベルで、インフルエンザウイルスの侵入と複製を阻害し、マウスの感染実験においてもウイルスの増殖抑制効果を示し、延命効果を示した。

**YNCRG inhibited metabolic syndrome through appetite suppression and improved lipid metabolism in metabolic syndrome model rats**
Kudo Maya, Hayashi Misa, Tian Peng, Liu Danyang, Wu Lili, Li Wei, Hong Zhaoyang, Zhao Yitang, Nishigaki Toshiaki, Nishihara Masaaki, Koike Kazuo, Liu Tonghua, Gao Ming.
*OBM Integrative and Complementary Medicine,* **5**（3）, 26（2020）.
本研究では肥満モデルであるSHRCPラットを用いて、YNCRG（健康食品）が食欲抑制および脂質代謝改善により体重増加抑制効果を有することを示した。

**Therapeutic potential of Centella asiatica and its triterpenes**
Sun Boju, Wu Lili, Wu You, Zhang Chengfei, Qin Lingling, Hayashi Misa, Kudo Maya, Gao Ming, Liu Tonghua.
*Frontiers in Pharmacology,* 568032（2020）.
本論文は漢方生薬である積雪草の含有成分およびその機能性について論述した。

***Morinda citrifolia*（Noni）fruit juice promotes vascular endothelium function in hypertension via glucagon－like peptide－1 receptor－CaMKKβ－AMPK－eNOS pathway**
Yoshitomi Hisae, Zhou Jingxin, Nishigaki Toshiaki Li Wei, Liu Tonghua, Wu Lili, Gao Ming .
*Phytotherapy Research,* **34**, 2341-2350（2020）.
本研究はノニー果実の抗高血圧効果を証明し、その作用メカニズムはNOの分泌を促進させることを明らかにした。

**Quality improvements to mackerel（Scomber japonicus）muscle tissue frozen using a rapid freezer with the weak oscillating magnetic fields**
Okuda K, Kawauchi A, Yomogida K.
*Cryobiology,* **95**, 130-137（2020）.
微弱振動磁界付加急速冷凍法により新鮮魚介（サバ）の組織内氷晶形成が抑制されることにより鮮度が維持されることを示したもの。

**Data of the freezing curves of tuna blocks with or without the weak Oscillating Magnetic Fields**
Okuda K, Kawauchi A, Yomogida K.
*Data in Brief,* **31**, 105852（2020）.
微弱振動磁界付加急速冷凍法によりマグロ切り身の凍結時の潜熱発生が抑制されることを示したもの。

**Antibody-based receptor targeting using an Fc-binding peptide-dodecaborate conjugate and macropinocytosis induction for boron neutron capture therapy（BNCT）**
Nakase I, Aoki A, Sakai Y, Hirase S, Ishimura M, Takatani-Nakase T, Hattori Y, Kirihata M.
*ACS Omega,* **5**, 22731–22738（2020）.
がん受容体を標的とした抗体結合型ホウ素薬剤を創製し、がん選択的に高い細胞死の活性とその機序にマクロピノサイトーシスの誘導が重要な役割を果たすことを明らかにした。従来のホウ素中性子捕捉療法よりも、がん選択的かつ強力に腫瘍組織を破壊できることを示した。

**Technical Review 亜鉛トランスポーターと乳がんの悪性化進展**
中瀬朋夏
*亜鉛栄養治療,* **11**, 176-183（2020）.
亜鉛と亜鉛トランスポーターが支配する乳がんの悪性化機構について概説した。

**乳がん細胞の悪性化進展を制御する亜鉛トランスポーターZIP6**
中瀬朋夏, 松井千紘
*Precision Medicine,* **3**, 1268-1270（2020）.
乳がん細胞の悪性化に重要な役割を果たす亜鉛トラ ンスポーターZIP6について概説し、その診断マーカーおよび治療標的の可能性について示した。

**乳がん細胞の悪性化進展を制御する亜鉛と亜鉛トランスポーターZIP6**
中瀬朋夏, 松井千紘, 生嶌千菜美, 鳥井栄貴
*Precision Medicine,* **3**, 379-381（2020）.
乳がん細胞の悪性化制御機構における亜鉛ネットワークついて、我々の研究成果を中心に概説した。

**乳がん細胞の悪性形質獲得に重要な亜鉛と亜鉛トランスポーター**
中瀬朋夏, 松井千紘, 生嶌千菜美, 鳥井栄貴
*アグリバイオ*, **4**, 69-72（2020）.
乳がん細胞の悪性形質獲得を支配する亜鉛と亜鉛トラ ンスポーターについて、概説した。

**乳がん細胞の悪性形質獲得における亜鉛と亜鉛トランスポーターの役割**
中瀬朋夏, 鳥井栄貴, 松井千紘
*月刊「細胞」*, **52**, 33-35（2020）.
乳がんの生命予後に大きな影響を与える乳がん細胞の特性と、それを司る亜鉛ト ランスポーターの機能的役割について概説した。

**細胞のNrf2抗酸化システムの活性化を介したアンチポリューション効果**

仁木洋子, 小寺啓貴, 小野内裕美

*Fragrance Journal,* **48**（10）, 26-31（2020）.

ディーゼル排気微粒子が誘発する皮膚細胞への酸化ダメージを生理活性脂質ホスファチジルイノシトール含有リポソームがNrf2活性化を介して抑制することを示した。

**UBC13 is an RNF213 associated E2 Ubiquitin-conjugating enzyme, and Lysine 63-linked ubiquitination by the RNF213-UBC13 axis is responsible for angiogenic activity**

Habu Toshiyuki, Harada Kouji H.

*FASEB BioAdvances*, **20** January 2021

https://doi.org/10.1096/fba.2019-00092

モヤモヤ病（MMD）感受性因子RNF213の細胞内機能を明らかにするために、そのタンパク質がコードするRINGドメインに着目し、ユビキチン化反応のうちLys63にリンクしたユビキチン化を行う酵素活性を有することを見出した。この活性に寄与するアミノ酸配列を同定し、それらのアミノ酸変異と血管機能への影響を再血管内細胞で明らかにした。

**水和処理を行ったアルテミア耐性卵卵膜における膜透過性改善処理の検討**

諸井美樹, 福尾惠介, 吉田徹

*低温生物工学会誌*, **66**, 151-155（2020）.

アルテミアの耐性卵は、幅広い外界環境変化に対して著しい耐性を示すが、再水和によって、そのストレス耐性を失う。本研究では、耐性卵のキチン質からなる卵殻を脱殻し、卵膜の透過性を各種試薬によって改善させることを目的として、生細胞染色法を利用した評価モデル系の作製を試みた。その結果、カチオン性合成ポリマー試薬のポリアリルアミンで処理を行うことで、アルテミア卵膜の膜透過性の向上が示唆された。

## そ　の　他

**日本毒性病理学会認定毒性病理専門家試験－ミクロ試験解説**
義澤克彦
日本毒性病理学会主催講習会，東京，2020.2.12.

**神経毒性・感覚器毒性・運動器毒性**
義澤克彦
令和 2 年度日本毒性学会主催講習会，東京，2020.3.3.

**滝川中学校・高等学校-自分発見セミナー「医療従事者の仕事について～学生時代に身に付けてほしいこと～」**
義澤克彦
滝川中学校・高等学校，神戸，2020.10.17.

**冷え性の漢方治療**
高明
兵庫県製薬協会・医薬品小売商業組合研修会.
神戸，2020.11.19.

**「今、生命科学が面白い」**
森山腎治
武庫川女子大学附属中学校高等学校
2020.11.14, 24.

**「生物基礎」の教科書から学ぶ内分泌　～ハッピーホルモンからシンデレラホルモンまで～**
森山腎治
武庫川女子大学附属中学校高等学校
2021.2.

**地球の食糧資源を持続させるために食品ロスを減らそう**
吉田徹，諸井美樹
武庫川女子大学附属高等学校出張授業及びリアルタイムアンケート調査　145人
2020.10.10.

**女子大生を対象とした食品ロス問題の解決に向けた意識調査**
吉田徹，阪上綾，矢野めぐむ，横路三有紀，福尾恵介
日本栄養食糧学会第74回大会，仙台（オンライン），2020.5.15-17.

# 武庫川女子大学バイオサイエンス研究所規程

（設置）

第１条　武庫川女子大学（以下「本学」という。）に武庫川女子大学バイオサイエンス研究所（以下「研究所」という。）を置く。

（目的）

第２条　研究所は、天然資源の保全、太陽と緑のエネルギーの循環再利用並びに新しい医薬品・食品等の開発、生産を計るために、動物や植物等の生命活動の仕組みを取り入れて、基礎的並びに人間生活に直接役立つ応用的な研究を行い、本学の先端科学教育の振興に寄与することを目的とする。

（所掌業務）

第３条　研究所は、前条の目的を達成するため、次の業務を行う。

1　生命科学分野における基礎的な研究と調査

2　応用的な研究による成果の公表と利用

3　研究及び調査の受託並びに嘱託研究員の受け入れ

4　その他第２条に定める目的達成のために必要な事項

（組織）

第４条　研究所は、所掌業務を達成するため、研究分野別の研究部門を置くことができる。

（所長）

第５条　研究所に所長を置く。

2　所長は、理事長が教授のうちから任命する。 ただし、非常勤教員をもって充てることもできる。

3　所長の任期は２年とし、再任を妨げない。

4　所長は、学長の命を受け、所掌の業務を処理し所属職員を指導監督する。

（研究員）

第６条　研究所に所要の研究員を置く。

2　研究員は、教授、准教授又は講師をもって充てる。

3　研究員は、所長の指導監督の下に研究業務に従事する。

（嘱託研究員）

第７条　研究所には、嘱託研究員を置くことができる。

2　嘱託研究員は、必要により所長が推薦し学長が委嘱する。

3　嘱託研究員は、特定又は共同研究の業務に従事する。

（助手）

第８条　研究所には、所要の助教若しくは助手を置く。

2　助手は、研究員の命を受け、その業務を助ける。

（事務職員）

第 9 条　研究所に所要の事務職員を置くことができる。

2　事務職員は、事務局長の指揮監督のもと、所長の指示を受けて研究所の事務を処理する。

（運営委員会）

第 10 条　研究所の運営に関する具体的業務を審議するため、本学に「武庫川女子大学バイオサイエンス研究所運営委員会」（以下「運営委員会」という。）を置く。

2　運営委員は若干名とし、学長が委嘱する。

3　委員長は、所長をもって充てる。

4　委員の任期は 2 年とし、再任を妨げない。ただし、欠員が生じた場合の委員の任期は前任者の残任期間とする。

5　運営委員会に関する細則は別に定める。

（補則）

第 11 条　この規程に定めるもののほか、研究所の管理運営に関し必要な事項は、所長が別に定める。

附　則

この規程は平成 8 年 4 月 1 日から施行する。

武庫川女子大学バイオサイエンス研究所年報
第 25 号（ 令和 2 年度 ）
編　　集　　武庫川女子大学バイオサイエンス研究所
発 行 者　　学校法人　武庫川学院
〒 663－8558 兵庫県西宮市池開町 6 番 46 号
PHONE 0798－47－1212（代表）
発 行 日　　2021 年 3 月 31 日
印　　刷　　大和出版印刷株式会社