

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 7名

- 9 該当審査区分    理工・情報       生物・医歯      人文・社会

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
新蔵礼子	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	力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

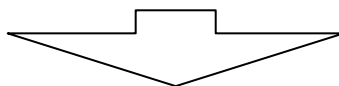
(変更の時期:平成 28 年 9 月 30 日)

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
-------------------------------	---------------	------	--------------------

(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

## 11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

### (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。

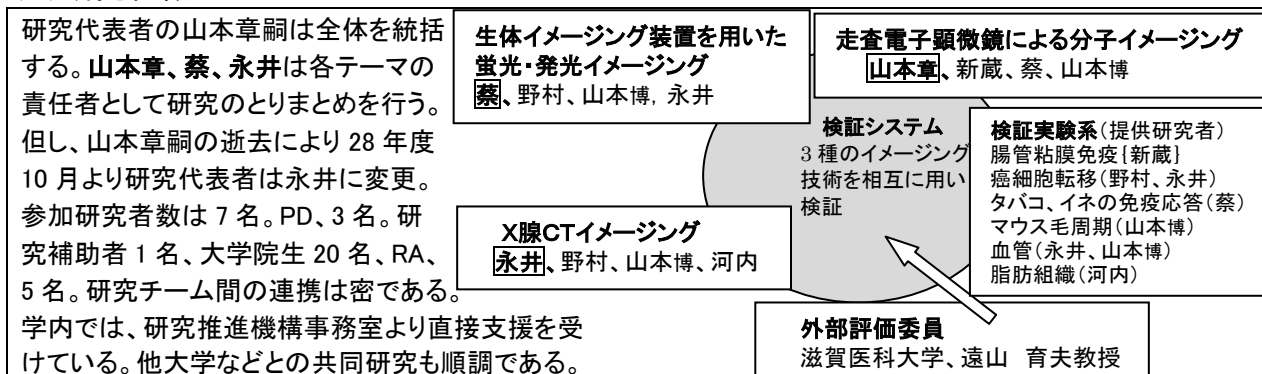
**テーマ1**「走査電子顕微鏡による個体レベルの分子イメージング技術の開発」では、免疫金法を用いて走査電顕下で特定タンパク分子の分布を画像化する技術を開発し、腸粘膜におけるIgAや植物細胞壁、細胞膜におけるタンパク質の分布のイメージングを行う。走査電顕によるセリウム塩法による活性酸素発生のイメージングやCT血管造影法と対応可能な微細血管観察法の開発も行う。

**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



(3) 研究施設・設備等

研究に使用した研究施設の面積と使用者数。命岳館(実験室・教員室) 約 640 平米、57 名(延人数)。実験付属施設・動物舎 約 160 平米、120 名(延人数)。命北館(実験室・教員室) 約 980 平米、95 名(延人数)。

**主な研究装置の名称及びその利用時間数**

走査電子顕微鏡 日立 S-3400N(EDX、クライオシステム装着) 2,100 時間  
 生体イメージング装置 日本ローパー社製 Lumazone 1200 時間  
 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 ヘルスケアジャパン社製 200 時間  
 生理活性反応測定装置、バイオエックス社製 AMIS-101X 100 時間

(4) 研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び\*を付すこと。

**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) 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。近年、腸内細菌叢の異常(dysbiosis)が炎症性腸疾患だけで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 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。\*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 (Serine hydroxymethyltransferase) 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。この分泌型 IgA 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 IgA の検出。①の方法を用いてマウス腸内在性 IgA 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事が出来ず、空間分布を明瞭なイメージングには至らなかった。

③ W27 抗体と培養腸内細菌との結合のイメージング。培養した大腸菌に、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、EDX 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ないことに起因する。そこで、金標識抗体の金粒子を 50nm 以上に成長させる新規の方法を確立し、*Staphylococcus 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生体試料観察。琵琶湖産のカビ臭を産生する藍藻の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、\*緑色および褐色の *P. tenue* の形態を走査電顕で比較した。\*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に鞘を持たないのに対して褐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

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 ( $CeCl_3$ ) 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、Mercocx 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 Mercocx 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 Mercocx 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。内耳蝸牛のより細かい脈管系については、Mercocx 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 を蛍光プ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、腸など生体の深部では難しいことが明らかになった。次に、プ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。\*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。

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。その結果尿管口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ところ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が明らかになった。

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 法で観察されるかを検討した。各組み合わせて遺伝子導入した 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-Vc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。

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。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-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剤の検討のため、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10μm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量を測定した。同時に生化学的手法であるBligh&Dyer法(BD法)による脂肪含有量を測定し、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値画像による観察で筋肉内に脂が入る時期を検討し、体重250g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PPARγ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 350 g に給与しても筋肉に脂は入らず、内臓に脂肪が蓄積することを認め、ピワマスにおいては、皮下脂肪—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—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 550 g、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 $\gamma$  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ハ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 $\gamma$  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間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れる。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 種の血管鑄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) ピ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 を用いたピワマスの個体レベルの脂肪比率および筋肉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、パージャ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。ピ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、ピ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適用が可能であり、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 (2) 生体イメージング装置 (3) X線 CT  
 (4) 蛍光イメージング (5) 免疫金法 (6) IgA  
 (7) BiFC 法 (8) 血管

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
- 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)  $\gamma$ -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

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

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) 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

#### 新蔵礼子

\*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. 査読有

#### 蔡晃植

1) 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

2) 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

4) 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. *Ch. F. S. Biosci. Biotech. Biochem.*, 78, 438-447, 2014. 査読有

6) 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

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  $\alpha$ -2-glycoprotein promotes TGF $\beta$ 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 Modifying 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

- 8) Chean T, Konno 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

- 1) 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)
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 8) 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

- 1) 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
- 2) 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  $\alpha 2$ -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) 4',6-dimethoxyisoflavone-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 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
- \*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

- 3) 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

## &lt;図書&gt;

**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**

1) 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關与する遺伝子。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

2) 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

## &lt;学会発表&gt;

**山本章嗣**

\*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) 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

**新蔵礼子**

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。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。

\*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

- 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) 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.
- 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.

#### 蔡晃植

- 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  $Ca^{2+}$  依存性エンドヌクレアーゼである IREN は過敏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
- 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)  $Ca^{2+}$  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)  $Ca^{2+}$  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 $Ca^{2+}$ 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。 澁谷仁寿 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 日本化粧品学会(東京) 2012 年 6 月 7 日~8 日

#### 永井信夫

- \*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. 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  $\alpha 2$  アンチプラスミンの役割、東京、2013 年 3 月。

#### 河内浩行

- \*1) 17th AAAP Animal Science Congress 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  $\gamma$  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 真田的貴、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 醤油粕中に含まれる PPAR  $\gamma$  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、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

## &lt;「選定時」に付された留意事項&gt;

該当なし

## &lt;「選定時」に付された留意事項への対応&gt;

該当なし

## &lt;「中間評価時」に付された留意事項&gt;

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。
2. 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せん。

## &lt;「中間評価時」に付された留意事項への対応&gt;

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。

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1201037

16

(千円)

年度・区分	支出額	内 訳						備考
		法人負担	私学助成	共同研究機関負担	受託研究等	寄付金	その他( )	
平成24年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	54,474	18,158	36,316				
	研究費	18,412	9,431	8,981				
平成25年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	35,178	18,660	16,518				
平成26年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	20,829	11,116	9,713				
平成27年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	10,375	5,465	4,910				
平成28年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	18,985	10,993	7,992				
総額	施設	0	0	0	0	0	0	0
	装置	0	0	0	0	0	0	0
	設備	54,474	18,158	36,316	0	0	0	0
	研究費	103,779	55,665	48,114	0	0	0	0
総計	158,253	73,823	84,430	0	0	0	0	

17

《施設》(私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。)(千円)

施設の名 称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
命岳館		計 631	計 8				
実験室1	14	148		9			
実験室2	14	148		9			
共通器材室1	14	52		6			
共通器材室1-1	14	52		8			
共通器材室2	14	75		7			
恒温室2	14	36		7			
研究室14	14	60		5			
研究室16	14	60		5			
実験附属施設		計 160	計 7				
観察室	20	21		30			
学生動物実験室	20	53		5			
動物処置室	20	23		29			
学生マウス室	20	19		19			
準SPF室1	20	14		9			
SPF室1	20	15		20			
SPF室2	20	15		8			
命北館		計 869	計 8				
研究室1	20	157		12			
研究室2	20	126		4			
研究室3	20	127		20			
研究室4	20	164		24			
研究室31	20	117		9			
研究室33	20	117		8			
測定室1	20	30		4			
測定室2	20	31		8			

※ 私学助成による補助事業として行った新增築により、整備前と比較して増加した面積

0 m<sup>2</sup>

《装置・設備》(私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。)(千円)

装置・設備の名称	整備年度	型 番	台 数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
(研究装置)							
(研究設備)							
生理活性反応測定装置	24	AMIS-101X	1	100 h	5,103	3,402	私学助成
走査電子顕微鏡システム	24	S-3400N	1	2,100 h	42,000	28,000	私学助成
蛋白質用クロマトグラフィーシステム	24		1	200 h	7,371	4,914	私学助成
透過型電子顕微鏡	15	H7650	1	50 h			
透過型電子顕微鏡CCDカメラシステム	22	ORIOUS SC200	1	50 h			
共焦点顕微鏡システム	20	FLUOVIEW FV1000	1	350 h			
小動物用X線CT	23	R_mCT2	1	1,600 h			
生体イメージング装置	23	Lumazone-NP	1	1,200 h			
蛍光実体顕微鏡	15	MZFLⅢ	1	350 h			
蛍光スキャナー	15	FLA3000	1	175 h			
(情報処理関係設備)							

## 18 研究費の支出状況

(千円)

年 度	平成 24 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消耗品費	7,167	試薬、容器等購入費	7,167
光熱水費			
通信運搬費			
印刷製本費			
旅費交通費			
報酬・委託料 ( )			
計	7,167		
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人件費支出 (兼務職員)	1,445		1,445
教育研究経費支出			
計	1,445		
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品 図 書	9,800		9,800
計	9,800		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント			
ポスト・ドクター			
研究支援推進経費			
計			

年 度	平成 25 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消耗品費	22,414	試薬、容器等購入費	22,414
光熱水費			
通信運搬費			
印刷製本費			
旅費交通費			
報酬・委託料 ( )			
計	22,414		
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人件費支出 (兼務職員)	8,580		3,313
教育研究経費支出			4,999
計	8,580		268
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品 図 書	4,184		4,184
計	4,184		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	500		500
ポスト・ドクター			
研究支援推進経費			
計	500		

法人番号

251002

年 度	平成 26 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	10,961	試薬、容器等購入費	10,961
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費	1	郵送費	1
印 刷 製 本 費			
旅 費 交 通 費			
報 酬 ・ 委 託 料	294	校閲費、修理費	294
( )			
計	11,256		
ア ル パ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 ( 兼 務 職 員 )	9,193		5,008 1人、月額37万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月 2,753 1人、月額20万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月 1,432 4人、時給1,000円、年間計1,432時間
教 育 研 究 経 費 支 出			
計	9,193		
設 備 関 係 支 出 ( 1 個 又 は 1 組 の 価 格 が 5 0 0 万 円 未 満 の も の )			
教 育 研 究 用 機 器 備 品	380		380 シリンジポンプ
図 書			
計	380		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	1,000		1,000 学内2人、定額(1人50万円)
ポスト・ドクター	9,029		9,029 学内2人、月額30万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月
研究支援推進経費			
計	10,029		学内4人

年 度	平成 27 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	8,852	試薬、容器等購入費	8,852
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費			
印 刷 製 本 費			
旅 費 交 通 費			
報 酬 ・ 委 託 料	874	委託費、会議費	874
( )			
計	9,726		
ア ル パ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 ( 兼 務 職 員 )	4,743		1,672 1人、月額37万円＋保険、1日7.5時間・4ヶ月 2,761 1人、月額20万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月 310 3人、時給1,000円、年間計310時間
教 育 研 究 経 費 支 出			
計	4,743		
設 備 関 係 支 出 ( 1 個 又 は 1 組 の 価 格 が 5 0 0 万 円 未 満 の も の )			
教 育 研 究 用 機 器 備 品	1,828		1,828 蛍光検出器、脂肪分測定装置、iMac
図 書			
計	1,828		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	2,000		2,000 学内4人、定額(1人50万円)
ポスト・ドクター	11,858		8,507 学内2人、月額30万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月 3,351 学内1人、月額37万円＋保険、1日7.5時間・8ヶ月
研究支援推進経費			
計	13,858		学内7人



法人番号

251002

年 度	平成 28 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	11,051	試薬、容器等購入費	11,051 試薬、容器等
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費			
印 刷 製 本 費			
旅 費 交 通 費			
報 酬 ・ 委 託 料	1,267	委託費、修理費	1,267 マウス飼育、機器修理
( 計 )			
計	12,318		
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 ( 兼 務 職 員 )	3,022		2,542 1人、月額20万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月 480 2人、時給1,000円、年間計480時間
教 育 研 究 経 費 支 出			
計	3,022		
設 備 関 係 支 出 ( 1 個 又 は 1 組 の 価 格 が 500 万 円 未 満 の も の )			
教 育 研 究 用 機 器 備 品 図 書	3,645		3,645 システム顕微鏡、液体クロマトグラフィーアミノ酸分析セット、他10点
計	3,645		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	1,000		1,000 学内2人、定額(1人50万円)
ポスト・ドクター	9,215		5,048 学内1人、月額37万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月 4,167 学内1人、月額30万円＋保険、1日7.5時間・12ヶ月
研 究 支 援 推 進 経 費			
計	10,215		学内4人

## 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、琵琶湖産のカビ臭発生、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、タンパク質間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	S1201037
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	<p>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、この分野の発展を押し進めるとともに、その有効性を検証することを目的としている。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>
外部評価委員	滋賀医科大学・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	観点	個別評価		コメント
研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要	研究プ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	B 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と、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	B 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、研究を遂行できたと評価する。
		B	かなり合致している	
		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・設備は当初計画の見込みどおり進んでいるか。	A	大いに進んでいる	A 予定していた走査電顕システム、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	個別評価		コメント
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IgA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、BiFC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、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、研究代表者の研究途上での逝去による遅れや、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。
		B	かなり説明・言及されている	
		C	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・言及されていない	
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。	A	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。
		B	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	
		E	対応していない	

総合評価	<p>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、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の腸粘膜におけるIgA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、BiFC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電顕鏡システム、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。</p> <p>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つたものの、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創出は、まだ開発途上にあると考えられる。</p>			
------	---	--	--	--