

学際科学実験センター ニュース

Advanced Science Research Center
NEWS

2017.2
第14号

◆ CONTENTS ◆

◆ 巻頭言 1	◆ 研究紹介 5
◆ ニュース 2	◆ 事業日誌 8

巻頭言 私と学際科学実験センター

医薬保健学総合研究科長 堀 修

この度、巻頭言を書く機会に恵まれましたので、初めに、私と学際科学実験センターの関わりについて、次に、これからの学際科学実験センターに対する私なりのイメージを書かせていただきたいと思います。

私は、助手だった2000年頃、実験の関係で多くの時間をアイソトープ総合研究施設で過ごしておりました。当時は遺伝子発現を定量化する方法としてノーザンプロットという手法がよく使われておりましたが、核酸プローブを³²Pでラベルする必要があり、プローブの精製、ハイブリダイゼーション、そしてバンドの検出、を同施設で行っておりました。イメージングアナライザーから結果が出てくる瞬間は、結構ドキドキ感をもって待ち構えていたのを覚えています。リアルタイムPCRの進歩により、現在ではノーザンプロットはあまり行われなくなりましたが、サザンプロットやゲルシフトアッセイなどの実験ではその感度の良さから今でもラジオアイソトープが良く用いられています。

また、アイソトープ総合研究施設と並んでお世話になってきたのが実験動物研究施設です。遺伝子改変技術が進み、非常に多くのノックアウトマウスやトランスジェニックマウスが使われる様になりました。しかし、これら動物実験は質の高い飼育管理が行われて初めて可能になるものであります。飼育室の温度管理やケージ洗浄など毎日の業務から、モニターマウスによる微生物検査、個々の動物実験計画に対する対応など、非常に多くの業務の上に動物実験は成り立っています。現在私は、動物実験委員会の委員長も兼ねておりますが、動物実験に対するレギュレーションが厳しくなるなか、実験動物研究施設の先生方には、動物実験規程に基づき行うすべての動物実験の評価など、委員会業務に対しても多大な貢献をしていただいております。また、通常の飼育管理のみならず、受精卵凍結、胚移植、ノックアウトマウス作製等、多くの研究支援もしていただいております。

その他、遺伝子研究施設でもDNAマイクロアレイやプロテオーム解析などでお世話になってきました。私は、まだ、学際センターに「恩返し」をできる所までは至っておりませんが、せつかくの機会ですから、これからの学際科学実験センターについて私なりのイメージを書かせていただきたいと思います。現在、金沢大学では非常に大きな大学改革が進められております。今年度から始まった第3期中期計画において、第3類型、つまり「世界トップレベルの大学と伍して、国際的な教育研究成果を挙げる大学を目指す」ことが明言されました。そのような中、学際科学実験センターが今後果たす役割は、特に二つの点で大変重要になっていくと考えます。一点目は、先進的な実験技術を提供する場としての重要性です。細胞生物系に限っても、ゲノム編集、イメージング、次世代シーケンシング等、昨今の研究ツールの開発は目覚ましく、如何にそれらを有効かつ的確に利用していくかは大学にとって非常に大きな問題であると言えます。各分野での需要と全学的な予算配置、そして学際科学実験センターの運営方針がすべて同じ方向に向いて初めてうまく行くと思われる。この意味で、日頃から各分野、学際センター、大学執行部の連携を取れる体制作りが大切だと思います。二点目は、先進的な技術の利用に際して必要となるレギュレーションの設定・管理等に関する司令塔としての重要性です。全学的な委員会がコントロールする形が一般的だと思いますが、知識、経験の点でやはりセンターの教員の方に積極的に加わっていただき、リーダーシップを発揮していただければと思います。中々、簡単に解決しにくい問題もあるかと思いますが、知恵を出し合い、金沢大学の研究拠点形成に貢献していただくことを願っております。

ニュース

平成28年度 小学生・中学生の放射線教室 —ふるさと科学者実験セミナー「おもしろ放射線教室」—

平成28年5月7日(土)午前9時30分～15時(昼食休憩をはさむ)、学際科学実験センターと(財)金沢子ども科学財団の共催で、金沢市の小学生や中学生を対象とする、ふるさと科学者実験セミナー「おもしろ放射線教室」が開催された。会場は(財)金沢子ども科学財団実験室(金沢大学サテライトプラザ)で、参加者は11名であった。

はじめに、石川県出身の飯盛里安博士の生涯と業績について、ラドン測定器(IM泉効計)の開発や石川県長手島での新たな放射性鉱物(長手石)の発見などについて説明があった。次に、「はかるくん」やGMサーベイメータなど各種放射線測定器を使って、放射線の性質(半減期、遮へい効果、放射線の距離と量の関係)を調べたり、岩石や鉱物の放射能測定、霧箱の観察、ウランガラスの蛍光の観察をしたりして、放射線のいろいろなことを実際に体験した。午後からは、マイクロバスに乗って金沢市内を周り、街中やトンネル内、橋の上、野田山墓地の墓石などの放射線量を測定し、場所によって放射線量が違うことを体験学習した。子供達が放射線について正しく興味を持ってもらうための良い機会になったと思われた。



第15回北陸地域アイソトープ研究フォーラム

平成28年5月17日(火)15時～16時30分において、第15回北陸地域アイソトープ研究フォーラムを金沢大学十全講堂にて開催した。本フォーラムは、北陸地域の大学・自治体・民間企業の研究者・学生・技術者でアイソトープ研究・教育・安全管理に携わっている人達を中心に、アイソトープの最新技術や研究開発の推進と安全の両面について幅広い視点から理解を深めてもらい、北陸地域におけるアイソトープの有効利用の推進及び安全管理の徹底を目的として、金沢大学学際科学実験センターと北陸地域アイソトープ研究会の主催で毎年開催している。

今年度の第15回フォーラムでは、演者に樋口真人氏(放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター脳分子動態チームリーダー)を迎えた。「脳内異常タンパクを標的とした神経病態イメージング」と題し、アルツハイマー病患者脳内に蓄積するアミロイドやタウと呼ばれる病的なタンパクのイメージング研究について、基礎研究から臨床応用にわたる研究成果を幅広く講演していただいた。

学内外から約240名の参加者があり、アルツハイマー病の画像診断研究の最先端について知る良い機会となった。



第53回北陸実験動物研究会

北陸3県の実験動物研究者、技術者、実験動物取り扱い企業の情報交換の場として年2～3回開催しております北陸実験動物研究会の年次総会および研究会が、金沢大学十全医学会の後援のもと平成28年6月4日(土)に開催されました。まず、テクニプラスト・ジャパン株式会社の山下真由氏により「基礎医学研究施設に於ける器材メーカーの役割～飼育従事者と動物に配慮した製品のご紹介及び会社説明～」が行われました。その後、東京医科歯科大学・実験動物センターの金井正美先生による「Sox17ヘテロ変異の疾患モデルへの応用」と和歌山県立医科大学・先端医学研・遺伝子制御学研究部の山田源先生による「マウスミュータント系を用いた生殖器形成の解明の最前線：性差は如何に制御されるか」の2題が特別講演として発表されました。それぞれの発表後、学内外から約40名の参加者を交えて活発な討論が行われ、さまざまな意見交換ができた会となりました。



第31回生命工学トレーニングコース —遺伝子工学・基礎技術コース—

遺伝子研究施設にて、平成28年7月12日(火)～15日(金)の4日間にわたり、第31回生命工学トレーニングコース「遺伝子工学・基礎技術コース」が開催され、幅広い年代、経歴の12名(学内10名・学外2名)が講義を受け実習を行った。

今回のトレーニングコースでは、「遺伝子欠損細胞株を樹立しよう!」及び「未知の相互作用するタンパク質を同定しよう!」の2点をテーマに設定した。遺伝子欠損細胞株樹立ではゲノム編集

技術の一つであるCRISPR/Cas9システムのターゲット用プラスミドの構築と遺伝子に生じた変異の検出法の概説・実習を行った。相互作用タンパク質同定では、Haloタグ融合タンパク質を利用したプルダウンを行いSDS-PAGEによって検出する実験を行った。



第32回 生命工学トレーニングコース —生命科学・RI利用技術基礎コース—

平成28年9月14日(水)～16日(金)の3日間に渡り、アイソトープ総合研究施設において第32回生命工学トレーニングコースを開催し、学内から6名(募集定員上限)の参加があった。本コースでは、小動物用in vivoイメージング装置を用いたマウスの生体機能解析技術の習得を目的としたカリキュラムを編成しており、小動物用PET(ポジトロン断層法; Positron Emission Tomography)-CT(コンピュータ断層撮影; Computed Tomography)装置を利用した ^{18}F FDGによる腫瘍イメージングや、放射性核種標識薬剤の体内分布の基礎検討を題材とした。

初日は、RIの安全取扱いの基礎など法定講習とRIを用いたin vivo動物実験の基本についての講習を行った後、当施設の小動物用PET-CT装置(FX3000; GAMMA MEDICA-IDEAS, California, USA)を実際に操作しながら、装置の操作方法や、マウスへの尾静脈内投与からの実験の流れを演習した。2日目は、がん検査に臨床応用されている放射性医薬品 ^{18}F FDGを担癌マウスに静脈内投与し、PET-CT撮像実験を行った。その後、収集データからの画像再構成、および画像データ解析を行い、腫瘍への ^{18}F FDG

の集積を画像化する技術を実習した。3日目は、ドーパミン神経系の変性が原因とされるパーキンソン病などの疾患の早期診断のために開発研究された放射性ヨウ素標識IBZMをマウス尾静脈に投与し、組織摘出法にて放射能測定およびデータ解析を行い、ドーパミン神経受容体の局所脳内分布を調べた。学ぶ知識や技術が多くて難しくはあったが、参加者は小動物用in vivoイメージング装置を用いた動物実験技術の習得に熱心に取り組んでいた。



平成28年度実験動物慰霊祭

学際科学実験センター、医薬保健研究域およびがん進展制御研究所共催で、平成28年9月21日(水)に実験動物慰霊祭が執り行われました。会場となった学際科学実験センター実験動物研究施設前にある「実験動物の碑」の前には、向総括・改革・研究・財務担当理事を始めとする教職員や大学院生、学類生、動物施設職員を合わせて約200名が参列し、動物実験に使用された実験動物へ黙祷を捧げるとともに、参列者全員が献花を行い、教育・研究に供された実験動物への感謝の意を表しました。大黒実験動物研究施設長からの挨拶では、マウス飼育数の増加で飼育室が手狭となっているが、互いに譲り合って欲しい旨、またコロニー維持のために飼育しているマウスについては精子・受精卵凍結し飼育数を減らすなどの工夫でスペースを有効活用して欲しいとの要望が述べられました。



第33回生命工学トレーニングコース -発生工学・基礎技術-

発生工学基礎技術コースとしては12回目になる技術研修が、平成28年11月7日(月)～9日(水)の3日間にわたり実験動物研究施設を会場に、学内からの参加者6名を迎えて開催されました。本研修は、マウス胚および精子操作技術の初心者に対して、発生工学に関する基礎知識の習得、直ちにマウス胚および精子操作実験に入っていくために必要な基礎技術習得を目的としているため、マウス胚および精子のハンドリングの基本操作、保存のための凍結操作、IVFおよび受精卵の偽妊娠マウスへの移植を参加者全員が行いました。さらに、東京医科歯科大学・実験動物センターの平手良和先生に「発生工学的的手法を駆使したマウス着床前胚の細胞分化研究」というタイトルで講演していただき、受講者の方に発生工学的的手法とその応用についての知識を深めてもらいました。



研究紹介

APOBECタンパクのB型肝炎ウイルス複製阻害活性

金沢大学 医薬保健研究域医学系 分子遺伝学 教授 村松 正道

私達の研究室は、古くは医学部の第1生化学教室と呼ばれておりました。2007年頃、村松の着任時より分子遺伝学教室となりました。教室は宝町キャンパス内のE棟5階フロアの動物実験施設側にあります。教育では医学類2年生に対して生化学・分子生物学分野の講義や実習を担当しています。研究は、ヒトに感染しがんなどの病態を誘発するDNAウイルスと、そのウイルスを排除する抗ウイルス因子との関係性をテーマにしており、ウイルス学、免疫学、分子生物学的アプローチを駆使して、ウイルス感染病態解明を目指しています。

現在取り組んでいるのは、B型肝炎ウイルス(HBV)、ヒトパピローマウイルス16型(HPV16)、ポリオーマウイルスの感染病態解析で、宿主側はAPOBECや塩基除去修復因子群などの宿主因子をキーワードにしています。

ここではこれらのうちのHBVのプロジェクトを端折って紹介します。

HBVは日本人の肝臓の3割程度の誘因ウイルスと考えられており、世界的には3億人程度がこのウイルスの感染状態にあるといわれています。現在の日本においては、感染経路の知識やHBV検査やワクチンの普及により、昭和の時代よりは遥かに新規感染は減っております。感染者についても抗ウイルス剤(核酸アナログ)が有効なため、ある程度の感染症を制御できていると言っていると思います。ウイルスはヒト肝細胞に感染後、核内にcccDNAというエピゾームを形成し、このエピゾームから様々なウイルスRNAが作られます。その中にウイルスRNAゲノムも含まれ、これはウイルスタンパクとスクレオキャップシドを形成し、その後、逆転写によりウイルスDNAゲノムに変換されます。新生DNAの一部は核に運ばれcccDNAに変換されます。一方、大部分の新生DNAはキャップシド内にとどまり、新規ウイルスとして細胞外に放出されます。抗ウイルス剤は、逆転写を阻害する事で新規ウイルス産生を阻害しますが、cccDNAには直接作用しません。そのため抗ウイルス剤服用時は、ウイルス産生を制御できますが、休薬するとcccDNAからのウイルス生活環が再開し、再発が危惧されます。従って、cccDNAを除去する方法の開発が望まれています(引用1)。

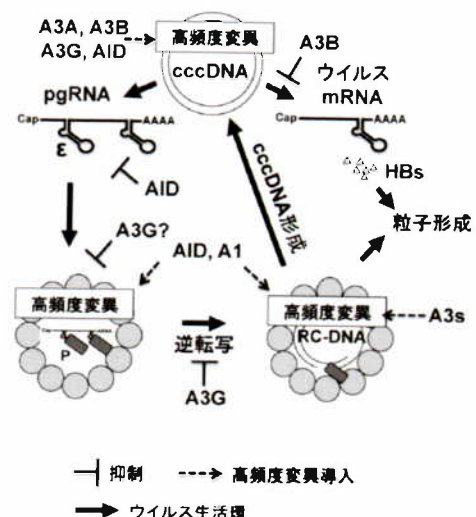
私達の研究室は、抗ウイルス因子APOBECや塩基除去修復系(Base excision repair; BER)とcccDNAの関わりに着目した研究を展開しています。APOBECはDNAやRNA上のシトシンをウラシルに変換する酵素群で、ヒトゲノム上には11種類が確認されています。AIDは、このファミリーの中で最も良く研究されている分子で、抗体遺伝子座のクラススイッチ組換え現象やsomatic hypermutation現象の引き金を引く分子です(引用2)。APOBEC3Gは、ヒト免疫不全ウイルスである

HIV-1の抗ウイルス因子であることが明らかになっています。これまで私達は、主に培養細胞の系を用いて以下の事を明らかにしてきました。まずサイトカインがHBV感染細胞に作用するとAPOBECが誘導される事、例えばTGF- β ではAIDが、インターフェロンではAPOBEC3Gが誘導される事を明らかにしました。誘導されたAPOBECは、スクレオキャップシド内で、逆転写にて作られた新生ウイルスDNAに作用し、シトシンをウラシルに変換します。その結果、新生ウイルス粒子は遺伝情報を破壊され、複製能力を喪失すると考えられます。私達はさらに核にあるcccDNAにもAPOBECがウラシルを蓄積させ、APOBECが導入したウラシルの一部は塩基除去修復系で修復されている事を報告しています(引用3)。TGF- β で誘導されたAIDは、ウイルスRNAに作用し、RNAを破壊するRNA exosome複合体に依存してウイルスRNA量を低下させる事も報告しました(引用4)。APOBECのHBVに対する活性を図にまとめました。

HBV感染症を制御するためにはcccDNAを除去する方策の開発が必要であり、そのためにはcccDNAの形成や維持のメカニズム解明が欠かせません。今後もcccDNAについて一歩一歩理解を深めていく事で、HBV感染症克服に貢献したいと考えています。

- 引用1 村松正道 喜多村晃一 若江亨祥 『B型肝炎ウイルスとAPOBECファミリー』生化学 第88巻第5号 (2016)
 引用2 Muramatsu M, et al. *Cell*. 2000 Sep 1;102(5):553-63.
 引用3 Kouichi Kitamura, et al. *Plos Pathogens* 2013 May 16;9(5): e1003361.
 引用4 Guoxin Liang, et al. *PLoS Pathog.* 2015 Apr 2;11(4):e1004780. doi: 10.1371/journal.ppat.1004780. eCollection 2015.

図 タイトル：APOBECタンパクのB型肝炎ウイルスへの作用



研究紹介

高等哺乳動物を用いた大脳皮質の形成機構と疾患病態の解析

金沢大学 医薬保健研究域医学系 脳神経医学 教授 河崎 洋志

大脳皮質は脳機能の中核であり、様々な脳神経疾患や発達障害の首座であることから、大脳皮質の形成機構およびその異常による疾患病態の研究が精力的に行われている。大脳皮質に関する研究は分子遺伝学的研究が容易なマウスを用いて主に行われているが、その限界も提起されている。即ち、ヒトに比べてマウスでは大脳皮質が未発達で重要な脳構造が存在しないことから、高等哺乳動物に特徴的な脳構造の解析はマウスでは困難である。そこで、よりヒトに近い大脳皮質を持つ高等哺乳動物を用いた分子遺伝学的研究が重要になってきている。

我々は高等哺乳動物に特徴的な大脳皮質構築のなかで、とくに脳回に注目して研究を進めている。ヒトなどの高等哺乳動物の大脳皮質の表面にはシワ(脳回)が存在する。進化の過程で脳回を獲得したことにより大脳皮質の表面積が著しく増加し多くの神経細胞を持つことが可能となったことから、脳回は大脳皮質の高機能化の基盤となる重要な構造と考えられている。さらに滑脳症や多小脳回症など脳回異常疾患の病態解明も必要であり、また自閉症や統合失調症での脳回異常も報告されている。

このように脳回への関心は高いが、その形成機構はあまりわかっていない。その理由として以下の2点が挙げられる。1) マウスの大脳には脳回が存在しないことから(図)、マウスを用いた脳回の解析は困難である点、2) 脳回を持つ高等哺乳動物では分子遺伝学的技術が整備されていなかった点である。そこで我々では、脳回を持つ高等哺乳動物フェレットに着目し研究を進めてきた(図)。フェレットでの分子遺伝学的技術が整備されていなかったため、我々はフェレット用cDNAマイクロアレイを独自に作成しフェレットを用いた遺伝子スクリーニングを可能とするとともに、高等哺乳動物で特徴的な発現分布を示す遺伝子を同定してきた^{1,3}。さらにマウス用に開発された子宮内エレクトロポレーション法を応用し、フェレットの大脳皮質での簡便かつ迅速な遺伝子操作法の確立に成功した^{1,5}。

これらの技術を用いて脳回の形成機構の解析を行った⁶。まず発生期のフェレット大脳皮質において、将来に脳回になる部分に転写因子Tbr2が多く発現していることを見いだした。さらにTbr2の機能を阻害した結果、脳回の形成が障害されることを見いだした。これらの結果は、Tbr2が脳回の形成に重要な遺伝子であることを意味している。さらに組織学的に解析したところ、Tbr2機能阻害により大脳皮質の表面側の神経細胞が減少することがわかった。このことから、Tbr2が大脳皮質の表面側の神経細胞数を増やすことにより脳回が生じると考えている⁶。

また、脳回の形成異常疾患である多小脳回症(polymicrogyria)の疾患モデルフェレットを作成した⁷。多小脳

回症は文字通りに「小さい脳回が多くできる疾患」であるが、脳回を持たないマウスでの解析が困難であったために病態解析が遅れていた。過去に海外のグループより、多小脳回症の患者さんの遺伝子解析がなされFGF受容体3の活性化型変異が報告された。そこで、FGF受容体3を活性化させるFGF8をフェレット大脳皮質に導入したところ多小脳回症を再現することに成功した。この多小脳回症フェレットを解析した結果、大脳皮質の表面側の神経細胞が増加していることがわかった。このことから、FGF受容体活性化により大脳皮質表面側の神経細胞が増加し、小さい脳回が多くできると考えている⁷。

このような高等哺乳動物の脳研究を一緒にする大学院生や研究員の仲間を受け入れています。興味のある人は気軽に私までご連絡ください。研究室ホームページもしくはFacebookから研究室の様子はご覧頂けますので、興味があればぜひ!

最後に研究紹介の機会を頂きました金沢大学学際科学実験センターの大黒多希子先生、また日頃より研究をサポートして下さっている金沢大学学際科学実験センターの皆様にも御礼申し上げます。

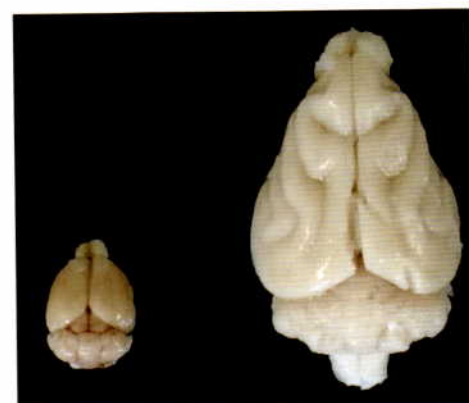
E-mail: kawasaki-labo@umin.ac.jp

Tel: 076-265-2365

<http://square.umin.ac.jp/top/kawasaki-lab/><https://www.facebook.com/hiroshi.kawasaki.372>

参考文献

- 1.Kawasaki, H. *et al.* *J Neurosci* 2004, 24, 9962-70.
- 2.Iwai, L. *et al.* *Neuroscience* 2009, 159, 1326-37.
- 3.Iwai, L. *et al.* *Cereb Cortex* 2013, 23, 2204-12.
- 4.Kawasaki, H. *et al.* *Mol Brain* 2012, 5, 24.
- 5.Kawasaki, H. *et al.* *Biol Open* 2013, 2, 95-100.
- 6.Toda, T. *et al.* *Sci Rep* 2016, 6, 29578.
- 7.Masuda, K. *et al.* *Sci Rep* 2015, 5, 15370.



マウス脳

フェレット脳

図. マウスの脳とフェレットの脳。マウスの大脳皮質には脳回はないが、フェレットの大脳皮質には脳回が存在する。