

平成22年5月20日現在

研究種目：若手スタートアップ
 研究期間：2009～2010
 課題番号：20870037
 研究課題名（和文）学習行動に対するメチル化シトシン結合能を持つ転写共役因子の分子機構の解明
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms of transcriptional coactivator which has putative binding activity with methylcytosine during learnin
 研究代表者
 島山 大 (HATAKEYAMA DAI)
 徳島文理大学・薬学部・薬学科 講師
 研究者番号：20514821

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスは人類にとって大きな脅威である。本研究では、ウイルスの RNA 合成酵素の立体構造を解明し、新しい抗ウイルス薬の開発の基礎を構築する。現在までに大腸菌を用いて RNA 合成酵素の機能部位の人工的発現に成功し、今後、立体構造解析や機能解析を行う。また、緑茶カテキンとサリドマイド由来誘導体が RNA 合成酵素の機能を阻害することが明らかにされ、新しい抗インフルエンザ薬としての可能性を持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although the aim of this study was to investigate the molecular mechanisms of translational coactivators in honeybees, we could not isolate these functional genes. Then, we changed the experimental targets with the RNA polymerases of influenza A virus, which has histone-acetylating activity as well as those of honeybee genes. We succeeded in cloning the target genes and expressing its recombinant proteins, which will be used for analyzing tertiary structure and functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：分子生物学・神経生物学・構造生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：エピジェネティクス、メチル化シトシン、ヒストン・アセチル化

1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫であるミツバチは、訪れた花の位置を学習し、巣の仲間に教えることができる。最近の研究により、このような学習やコミュニケーションを含む個体行動に対して、新しい遺伝子発現の関与が明らかとなった。これまでの申請者の研究により、ミツバチで

はメチル化シトシン結合部位とヒストン・アセチル化部位の両方を持つ新規の遺伝子が存在することが分かり、これがメチル化シトシン依存性の転写活性促進に重要な働きを担っていることが予想された。一般に遺伝子のプロモーター領域にあるメチル化シトシンによって恒常的に遺伝子発現が抑制され

ることが定説とされており、このような、メチル化シトシンの転写抑制だけに限らない多様な役割は未だ報告された例がない。

2. 研究の目的

メチル化シトシン結合部位とともにヒストン・アセチル化部位も持つミツバチの転写共役因子と考えられる3種類の遺伝子に着目し、クローニングを行って、立体構造解析と上記の機能の有無を生化学的に解析する。

3. 研究の方法

①メチル化シトシン結合部位とともにヒストン・アセチル化部位も持つミツバチの転写共役因子と考えられる3種類の遺伝子のクローニングを行う。②単離した遺伝子の生化学的な機能解析のため、組換えタンパク質への発現を行う。③3種類の遺伝子のメチル化シトシンへの結合能、およびヒストン・アセチル化能の有無を生化学的に検証する。

4. 研究成果

本研究課題はミツバチの転写共役因子の分子機構の解明を目的とした。しかし、ミツバチの様々な組織から作成したcDNAを用いてPCRによるクローニングを試みたが、着目した3種類のすべての遺伝子においてPCR産物内に非翻訳部位や多数の終始コドンが含まれ、機能的な遺伝子として単離することができなかった。そこで実験対象をインフルエンザウイルスに変更し、ミツバチの遺伝子と同様、ヒストン・アセチル化能を持つRNAポリメラーゼPB2サブユニットに着目し、その立体構造と機能解析に着手した。

インフルエンザのRNAポリメラーゼPB2サブユニットは、その立体構造からRNA合成能とともにヒストン・アセチル化の機能を持つことが示唆されている。現在までに、大腸菌を用いてヒストン・アセチル化部位の組み換えタンパク質発現に成功した。

また、RNAポリメラーゼPAサブユニットはエンドヌクレアーゼ活性を持ち、宿主細胞のmRNAからキャップ構造を切り取って、これをプライマーとして自らのmRNAを合成することが知られている。そこで、PAサブユニットのエンドヌクレアーゼ活性を阻害する化合物はウイルスの増殖を抑える新薬になり得ると考え、探索を行った。その結果、緑茶カテキンとサリドマイド由来誘導体がPAサブユニットのエンドヌクレアーゼ活性を阻害し、特にサリドマイド由来誘導体はウイルスに感染した培養細胞の生存率を高める効果があることを発見した。緑茶カテキンとサリドマイド由来誘導体は3つのベンゼン環とそれに結合する多くの水酸基を持ち、分子シミュレーションの結果、PAサブユニットのエンドヌクレアーゼ活性を持つポケット

にすっぽりとはまることが示された。

PB2サブユニットの研究に関しては、大腸菌で発現させた組み換えタンパク質を用いて結晶立体構造を解析するとともに、生化学的実験によりヒストン・アセチル化能の有無を詳細に解析する。PAサブユニットの研究に関しては、エンドヌクレアーゼ活性の阻害機能をより詳細に解析すると同時に、同様の機能を持つ新たな化合物の発見を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. **Hatakeyama D**, Mita K, Kobayashi S, Sadamoto H, Fujito Y, Hiripi L, Elekes K, Ito E. Glutamate transporters in the central nervous system of a pond snail. *J Neurosci Res*, 88: 1374-1386 (2010). 査読有り
2. Iwai Y, Takahashi H, **Hatakeyama D**, Motoshima K, Ishikawa M, Sugita K, Hashimoto Y, Harada Y, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Sei Y, Yamaguchi K, Kuzuhara T. Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from thalidomide. *Bioorg Med Chem*, 掲載予定 (2010). 査読有り
3. Miyamae Y, Komuro M, Murata A, Aono K, Nishikata K, Kanazawa A, Fujito Y, Komatsu T, Ito D, Abe T, Nagayama M, Uchida T, Gohara K, Murakami J, Kawai R, **Hatakeyama D**, Lukowiak K, Ito E. Contrary effects of octopamine receptor ligands on behavioral and neuronal changes in locomotion of *Lymnaea*. *Biol Bull*, 218: 6-14 (2010). 査読有り
4. Kuzuhara T, Iwai Y, Takahashi H, **Hatakeyama D**, Echigo N. Green tea catechins inhibit the endonuclease activity of influenza A virus RNA polymerase. *PLoS Curr Influenza*, RRN1052 (2009). 査読有り
5. Nomura Y, **Hatakeyama D**, Horikoshi T, Sakakibara M. Immunohistological studies on the distribution of learning-related peptides in the central nervous system of conditioned *Lymnaea*. *Acta Biol Hung*, 59: 81-92 (2008). 査読有り

[学会発表] (計3件)

1. **畠山大**, 箕田康一, 小林卓, 定本久世, 伊藤悦朗. 「モノアラガイの咀嚼リズム形

成におけるグルタミン酸トランスポーターの役割」日本動物学会第 80 回大会, 2009 年 9 月 17-20 日, 静岡県静岡市

2. **島山 大**, 箕田康一, 小林卓, 定本久世, 伊藤悦朗. 「グルタミン酸トランスポーターによるモノアラガイ咀嚼リズムの調節」第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会, 2009 年 10 月 22-24 日, 大阪府豊中市
3. **島山 大**, 箕田康一, 小林卓, 定本久世, 伊藤悦朗. 「グルタミン酸トランスポーターによるモノアラガイ咀嚼リズム形成の制御」第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日-11 月 1 日, 徳島県徳島市
4. **島山 大**, Uli Mueller. 「ミツバチの MAPK プロモーター領域におけるメチル化シトシンの季節変動」日本動物学会第 79 回大会, 2008 年 9 月 5-7 日, 福岡県福岡市
5. **島山 大**, Uli Mueller. 「ミツバチ MAPK プロモーター部位でのメチル化レベルの季節変化」日本比較生理生化学会第 30 回大会, 2008 年 7 月 19-21 日, 北海道札幌市
6. **Hatakeyama D**, Mueller U. "Characterization of DNA methylation in the promoter regions of MAPK in honeybee genomic DNA." 6th FENS Forum of European Neuroscience, 2008 年 7 月 12-16 日, スイス, ジュネーブ.

[図書] (計 0 件) [産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

日本比較生理生化学会・第 18 回吉田奨励賞
受賞「生物学的階層性に基づくモノアラガイ
長期記憶成立機構の包括的解析」2009 年 10
月

<http://p.bunri-u.ac.jp/~seika/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

島山 大 (HATKEYAMA DAI)
徳島文理大学・薬学部・講師
研究者番号 : 20514821

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

葛原 隆 (KUZUHARA TAKASHI)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号 : 17370035

伊藤 悦朗 (ITO ETSURO)
徳島文理大学・香川薬学部・教授
研究者番号 : 80203131