

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580252

研究課題名（和文） 魚類コラーゲン架橋形成機構に関する研究—魚類コラーゲンの化学的不安定性の原因究明

研究課題名（英文） Studies on mechanisms for the crosslinking formation in fish collagen - Cause investigation of the chemical instability in fish collagen

研究代表者

横山 芳博（YOKOYAMA YOSHIHIRO）

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：90291814

研究成果の概要（和文）：

希酢酸に対する高い溶解性に示される魚類コラーゲンの化学的不安定性は、魚類コラーゲン分子間の架橋が、哺乳類のものと比較して、量または質的に異なることを示唆している。しかし魚類では、コラーゲンの架橋およびその形成機構は明らかでない。そこで、コラーゲン架橋形成機構の基礎的情報を得るために、フグのLH各分子種（LH1、2a、2b、および3）のcDNAをクローニングするとともに、成魚各組織および初期胚における発現特性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The chemical instability of fish collagen, higher solubility to dilute acetic acid, indicates that the intermolecular cross-links in fish collagen differ from those in mammal collagen in quantity and/or quality. In fish, however, little information is available on the collagen cross-links, and the mechanism of cross-link formation has not been clear. To obtain the fundamental information on the regulatory mechanism of collagen-cross-linking pathway in fish, the author conducted cDNA cloning of fugu *Takifugu rubripes* LHs (LH1, 2a, 2b and 3) and performed expression analysis in the adult tissues and the embryos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：水産化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：トラフグ・コラーゲン・コラーゲン修飾酵素・LH

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、魚類コラーゲンの架橋に関する

報告はわずかである。大西洋根魚筋肉中の還元性コラーゲン架橋において、二官能基性の

架橋成分が2魚種間およびラット尾腱と異なることが報告されている。さらに、マダイ、ハマチおよびトラフグの筋肉と皮に含まれるピリジノリン含量は、魚種間でその量が異なること、3魚種の中でトラフグ筋肉に最もピリジノリンが含まれていることが知られている。しかし、トラフグ筋肉に含まれるピリジノリン量はウサギ筋肉の1/4程度である。これらの知見は、コラーゲンの架橋含量が魚種間で異なること、哺乳動物と比較し魚類筋肉ではピリジノリン含量が少ないことを示している。しかしながら、なぜ魚類筋肉中のコラーゲン架橋が哺乳動物のものよりも少ないのか不明である。さらに、筋肉以外の組織より調製されたコラーゲンが筋肉と同様に酸に対して高い溶解性を示すのかどうか不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、魚類コラーゲン架橋形成機構に関する基礎的知見の集積を目的として、コラーゲン分子間架橋に化学的・物理的安定性を付与する LH ファミリーメンバーの一次構造の解明ならびに成魚組織および初期胚発生過程における発現解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

トラフグは福井県立大学海洋生物資源臨海研究センターの屋外水槽 (8t) で配合飼料を与えて飼育した。標準体長 33cm 前後のものを実験に供した。トラフグ初期胚は同研究センターより提供を受けた。同研究センターで人工授精させた後、初期胚を孵化するまで水温約 18°C で飼育し、各種サンプリングを行った。

### (2) データベース分析とプライマーの設計

トラフグ LH1、2 および 3 の cDNA クローニングを行うために、マウス LH1 (AF046782)、2 (AF080572) および 3 (AF046783) の塩基配列およびアミノ酸配列をトラフグゲノムデータベース (<http://fugu.biology.qmul.ac.uk/>) に対する Blast アルゴリズムを用いた検索に供した。データベース分析により得られた配列をもとに、遺伝子特異的プライマー (GSP) を設計した。また、mRNA 発現の内部コントロールとして利用するためにペプチド鎖伸長因子 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) についても同様の操作を行った。

### (3) 全 RNA の調製

トラフグより、普通筋、血合筋、卵巣、頭腎、体腎、鰓、皮膚、背鰭、脾臓、肝臓、目、脳、心臓、腸および鰾の全 15 組織を採取した。セパゾール RNA I super (Nacalai Tesque)

を用いて組織ホモジネートを調製した。全 RNA の調製はメーカー推奨のプロトコールに従って行った。

### (4) cDNA 断片のクローニング

頭腎より調製した全 RNA を逆転写反応に供した。得られた一本鎖 cDNA を鋳型に、PCR による遺伝子増幅を試みた。PCR は、Hot starTaq (Qiagen) を用いて、95°C 15 分 1 回、94°C 1 分・60°C 1 分・72°C 1 分 35 回、72°C 10 分 1 回の条件で行った。PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動に供した。臭化エチジウムによる DNA 断片の染色を行った。得られたバンドを切り出した後、スピнкаラム (SIGMA) によりゲル中の cDNA 断片を精製した。次に、PCR Cloning kit (QIAGEN) を用いて cDNA 断片の pDrive vector へのライゲーション反応を 16°C で 1 晩行なった。ライゲーションを行ったベクターを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換した後、アンピシリンを含む LB 培地で 37°C 15 時間培養を行った。得られたコロニーから白色コロニーを回収し、TB 培地で培養した。次に、スモールスケールアルカリ SDS 法によりプラスミドを精製した後、インサートの確認を行うために各種制限酵素処理を行った。目的とするインサートを確認したものについて、ポリエチレングリコールを用いてプラスミドを精製した。塩基配列は BigDye Terminator v 3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) および ABI PRIZM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたダイターミネーター法により決定した。

### (5) RACE プライマーの設計

得られた cDNA 断片の塩基配列を相同性検索に供し、目的とする遺伝子の増幅が行われたことを確認した。rapid amplification of cDNA ends (RACE) により完全長 cDNA を得るために、cDNA 断片の内部配列を含む GSP および Nested プライマー (NGSP) を設計した。プライマーは、約 25 塩基で、その GC 含量が 60% 以上となるように設計した。

### (6) cDNA ライブラリーの構築

遺伝子の全一次構造を明らかにするために、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) によるトラフグ初期胚 cDNA ライブラリーの作製を行った。RNAlater (Ambion) 中で保存した受精後 3 日目および 6 日目の初期胚より、セパゾール RNA I super (ナカライ) による全 RNA の調製を行った。Oligotex-dT30 (Super) mRNA Purification Kit (TakaRa) により mRNA を精製した後、SMART RACE cDNA Amplification Kit を用いてメーカー推奨のプロトコールに従い RACE ready cDNA ライブラリーを構築した。

(7) 5'-および3'-RACE

先に作製した RACE ready cDNA ライブラリーを用い、5'-および3'-RACE PCR を行った。また、クローニングの困難であったものについては 5' / 3' RACE kit, 2nd generation (Roche) を用い、RACE を行った。なお、PCR には Advantage 2 Polymerase (CLONTECH) を使用した。1st PCR は、94°C 3 分 1 回、94°C 1 分・68°C 1 分・72°C 3 分 35 回、70°C 3 分 1 回により行った。1st PCR 産物を鋳型に、NGSP を用いて同様の反応系により 2nd PCR を行った。2nd PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動に供し、得られたバンドを切り出した。以降の操作は 1-2-1-4 と同様に行い、塩基配列を決定した。

(8) cDNA 塩基配列および演繹アミノ酸配列の解析

塩基配列および演繹アミノ酸配列は、BLAST (<http://blast.genome.jp>) および ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) プログラムを用いて解析した。

(9) RT-PCR によるトラフグ LH2a および LH2b の探索

一部の哺乳動物においては、LH2 に 2 種類のスプライシング変異体が存在し、組織により発現様式の異なること、機能の異なることが報告されている。そこで、トラフグ LH2 スプライシング変異体の有無を調べるために、1-2-1-4 と同様に RT-PCR を行った。2 つのスプライシング変異体を増幅可能なプライマーは、マウス LH2a、2b の塩基配列およびフグゲノムデータベース上の塩基配列をもとに設計した。

(10) DIG ラベル DNA プローブの作製

pDrive へのサブクローニングを行った cDNA を鋳型として用い、94°C 2 分、94°C 30 秒・60°C 30 秒・72°C 1 分 30 サイクルで PCR を行った。PCR に使用したプライマー配列を Table 1-4 に示した。PCR 産物の一部を鋳型に、DIG (ジゴキシゲニン) -dUTP を含む反応液中で 1st PCR と同様の温度条件により 2nd PCR を行った。Probe Quant G-50 カラム (Pharmacia Biotech) を用いて PCR 産物を精製し、これを DIG ラベル DNA プローブ液とした。プローブサイズはそれぞれ 845 bp (1323-2167, LH1)、853 bp (348-1200, LH2) および 977 bp (694-1670, LH3) であった。

(11) ノザンブロッティング

先に調製した全 RNA を 1.5% 変性アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、ナイロン膜 (Pall BiodyneA) にキャピラリー法によ

り RNA を転写した。紫外線照射を行い、RNA を膜に固定した。膜上の RNA を CBP 染色により観察した。RNA を固定した膜をハイブリダイゼーション溶液中で 42°C・3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、100°C・5 分間熱処理した DIG ラベル DNA プローブ溶液を加え、42°C・16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、膜を 0.1% SDS/2×SSPE で室温 5 分間 4 回、0.1% SDS/1×SSPE で室温 5 分間 2 回、0.1% SDS/0.2×SSPE で 65°C・15 分間 2 回、0.1% SDS/0.1% SSPE で 65°C・15 分間 2 回洗浄した。シグナルはアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) および CDP-Star (Amersham Biosciense) を用いて、X 線フィルムを感光することにより検出した。また、Quantity One (Bio-Rad) を使用し、得られたバンド強度を解析した後、EF-1 $\alpha$  の発現量に対する各 LH 遺伝子の発現量を求めた。

(12) サザンブロッティング

トラフグ肝臓 (約 1g) を液体窒素中で粉碎し、10 倍量の TNE 溶液 (75mM Tris-HCl pH8.0、150mM EDTA、150mM NaCl、1.5% SDS) を加えて混和した。次に、Proteinase K および RNaseA を加えて 55°C・1 時間、さらに 37°C・1 晩反応させた。フェノール、フェノール/クロロホルムおよびクロロホルム処理後、回収上清に 4M 酢酸アンモニウムおよび 100% エタノールを加え、-80°C で 30 分間静置した。ゲノム DNA をガラス棒で回収し、70% エタノールによる洗浄後、滅菌蒸留水に溶解した。トラフグ肝臓より調製したゲノム DNA を各種制限酵素により 37°C で 1 晩処理した。フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿法によりゲノム DNA を回収した。回収したゲノム DNA を 1% アガロースゲル電気泳動に供した。ゲル中の DNA を 0.25M HCl による加水分解および 1.5M NaOH・0.5M NaCl による変性の後、0.5M Tris-HCl (pH8.0)・1.5M NaCl により中和した。ナイロン膜 (Pall BiodyneA) にキャピラリー法で DNA を転写した後、80°C、2 時間の加熱によって DNA を膜に固定した。以降の操作は先と同様に行った。

(13) RT-PCR によるトラフグ LH2a および LH2b の成魚組織における発現解析

組織ホモジネートより全 RNA を調製し、DNase I (Takara) を用いて 37°C・30 分間処理した。さらにフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール処理し、エタノール沈殿を行った。全 RNA 5・g を ReverTra ace (TOYOBO) を用いた逆転写反応に供した。逆転写反応液を蒸留水で 7.5 倍に希釈し、一部を PCR に供した。PCR は Blend Taq -plus- (TOYOBO) を用いて 94°C 2 分 1 回、および、92°C 30 秒・60°C 30 秒・72°C 1 分を 40 回、および、70°C 2 分 1

回により行った。

#### (14) トラフグ初期胚のサンプリング

受精後のトラフグ初期胚を定期的にサンプリングした。各ステージの初期胚を2つに分け、一方は、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション (WISH) 法に使用するために4%パラフォルムアルデヒドを含むPBS (PFA) により固定した。固定後、使用するまでメタノール中に-30℃で保存した。もう一方は、RT-PCRを行うためにcDNAを調製した。

#### (15) RT-PCRによるトラフグ LH の初期胚発生過程における発現解析

RT-PCRは先述と同様に行った。

#### (16) DIG ラベル RNA プローブの作製

センスプローブおよびアンチセンスプローブを作製するために各遺伝子断片のインサートを持つ組換えプラスミドを制限酵素でそれぞれ線状化した。なお、インサートサイズはそれぞれ845 bp (1323-2167, LH1)、853 bp (348-1200, LH2) および 977 bp (694-1670, LH3) であった。続いて、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿によりプラスミドDNAを精製し、DEPC処理水に溶解した。DIG RNA Labeling kit (SP/T7) (Roche) を用い、メーカー推奨のプロトコールに従ってDIGラベルRNAプローブを作製した。プローブは使用するまで-80℃で保存した。

#### (17) WISH

-30℃メタノール中で保存したトラフグ初期胚を、Tween20を含むPBS (-) (PBST) で段階的に洗浄した。卵殻を除去した後、Proteinase K処理を室温で1-5分間行った。酵素反応は4%PFAで停止した。ハイブリバッファー (HB) 中で65℃1時間プレハイブリダイゼーションを行った。次にHBを除去した後、プローブを加えたHB中で65℃、1晩ハイブリダイゼーションを行った。PBSTに液を置換した後、ブロッキング液で1時間ブロッキングを行った。トラフグ初期胚を用いて抗体の吸収を行った抗DIG-AP標識抗体 (Roche) をブロッキング液に加え、室温で2時間反応させた。初期胚をPBSTで十分に洗浄し、さらにアルカリフォスタファーゼバッファーにより洗浄した。BM Purple (Roche) を発色基質に用いて、25℃で1晩、酵素反応を行い、十分な発色を確認したところで、4%PFAにより酵素反応を停止した。PBSTで洗浄後、メタノールに段階的に液を置換し、80%グリセロール/PBST溶液で1時間処理した後、4℃で遮光保存した。

#### (18) 組織切片の作成

WISHを行った初期胚をPBSTで2回洗浄し、段階的に浸漬エタノール濃度を上げることにより、十分に脱水した。次に95%組織脱水溶液、無水組織脱水溶液 (Wako)、レモゾール (Wako) の順に浸透させた。パラフィン包埋後、組織切片を作製し、光学顕微鏡下で組織観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) トラフグ LH1、2 および 3 の一次構造の解明

先行試験の結果より、コラーゲンの酸への溶解性にリジン残基の水酸化率が関与していることが示唆されたことから、リジン残基を水酸化すると考えられている LH に着目した。LH に関しては、これまでヒト遺伝病との関連により研究が進められてきており、3つのアイソフォームが存在し、また、各々が異なる基質特異性を有することが示唆されてきている。また魚類では、ゼブラフィッシュを用いた3つのLHアイソフォームの構造と胚発生における発現解析が、報告されているのみである。魚類 LH に関して、成魚組織における発現特性は解明されておらず、また、一次構造に関する知見も極めて限られている。そこでまず初めに、トラフグ LH1、2 および 3 の cDNA クローニングを行い、全一次構造の解明を試みた。

トラフグ LH について、cDNA クローニングを行った。トラフグ LH1 cDNA は、5' 非翻訳領域に 165 bp、ORF に 2187 bp、3' 非翻訳領域に 781 bp を有し、全長 3134 bp であった。演繹アミノ酸配列は 729 アミノ酸残基より構成されており、その配列より計算された分子量および等電点はそれぞれ 84,385 および 5.8 であった。

トラフグ LH2 においては、RT-PCR の結果、2つの増幅断片が得られた。塩基配列を解析した結果、それらは共にトラフグ LH2 であることを確認した。増幅サイズの小さいもの、大きいものをそれぞれトラフグ LH2a および LH2b とした。LH2b には 498 残基目のメチオニンと 499 残基目のグリシンとの間に 21 残基のアミノ酸配列の挿入が認められた。トラフグ LH2a cDNA は、5' 非翻訳領域に 197 bp、ORF に 2205 bp、3' 非翻訳領域に 1185 bp を有し、全長 3579 bp であった。演繹アミノ酸配列は 735 アミノ酸残基より構成されており、その配列より計算された分子量および等電点はそれぞれ 85,063 および 6.2 であった。トラフグ LH2b の演繹アミノ酸配列は 756 アミノ酸残基より構成されており、その配列より計算された分子量および等電点はそれぞれ 87,500 および 6.3 であった。

トラフグ LH3 cDNA は、5' 非翻訳領域に 144 bp、ORF に 2193 bp、3' 非翻訳領域に 511 bp

を有し、全長 2849 bp であった。演繹アミノ酸配列は 731 アミノ酸残基より構成されており、その配列より計算された分子量および等電点はそれぞれ 84, 558 および 6.1 であった。

いずれのトラフグ LH の C 末端領域にも、3つの鉄イオンの結合に必要な2つのヒスチジン残基および1つのアスパラギン残基と、2-オキソグルタル酸の C-5 カルボキシル基の結合に必要なアルギニンが保存されていた。トラフグ LH 間のアミノ酸配列の相同性は、LH1 と LH2 (a および b)、LH1 と LH3、および LH2 (a および b) と LH3 ではそれぞれ 56、55、および 59% であった。また、トラフグとヒト LH 間のアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 64% (LH1)、70% (LH2) および 64% (LH3) であった。

## (2) トラフグ LH (1、2 および 3) の成魚各組織における発現解析

ノザンブロッティングに用いたプローブの特異性を調べるためにサザンブロッティングを行った。その結果、各プローブは制限酵素で切断されたそれぞれ異なるサイズのゲノム DNA 断片を認識した。以上の結果より、実験に用いた DIG ラベル DNA プローブについてトラフグ LH 間に特異性のあることが示された。

トラフグ LH mRNA の成魚組織における発現特性を解明するために、ノザンブロッティングを行った。トラフグ LH1 および 3 mRNA は単一のバンドとしてそれぞれ 3.2kb および 2.6kb 付近に認められた (Fig. 1)。両遺伝子ともに実験に供した全ての組織において発現が認められたが、その発現レベルに組織間

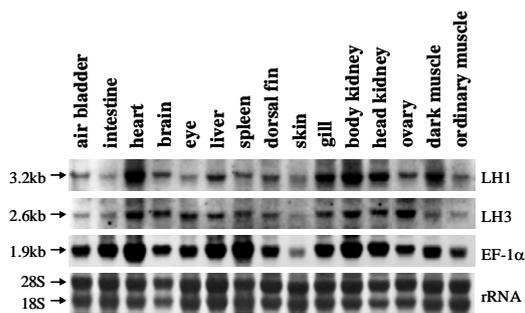


Fig. 1 ノザンブロッティング。LH1 および LH3 の各種組織における発現。

で差異が認められた。トラフグ LH1 mRNA は筋肉において発現レベルが高く、また、LH3 mRNA は卵巣において高い発現レベルを示した (Fig. 1)。一方、トラフグ LH2 mRNA の発現をノザンブロッティングにより検出することができなかった。さらに、RNA 量を増加し再度ノザンブロッティングを試みたが、トラフグ LH2 mRNA の発現を検出することができなかった。以上の結果より、LH2 mRNA の

成魚組織発現レベルは極めて低いことが示された。

トラフグ成魚組織において遺伝子発現量の低いことが示されたトラフグ LH2 に関して、検出感度に優れた RT-PCR による発現解析を試みた。トラフグにおいても、LH2a および 2b スプライシング変異体が認められたため、両者を増幅可能なプライマーを用いた。Figure 2 にトラフグ LH2a および 2b mRNA の発現解析の結果を示す。LH2b mRNA は実験に

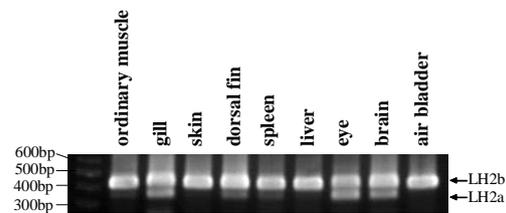


Fig. 2 RT-PCR。LH2a および 2b の各種組織における発現。

供したいずれの組織 (普通筋、鰓、皮、背鰭、脾臓、肝臓、目、脳および鰾) においても発現することが示された。一方、トラフグ LH2a mRNA は組織特異的に発現することが示された。目、脳、さらに鰓や背鰭などの軟骨組織においては、トラフグ LH2a mRNA は他の組織と比較し顕著に発現した。しかしながら、筋肉および脾臓においては LH2a mRNA の発現レベルは他の組織と比較し顕著に低かった。さらに皮、肝臓および鰾においては LH2a mRNA の発現を検出することができなかった。また、腎臓においては6個体の成魚より発現解析を行ったが、発現様式に再現性が認められなかった。

## (3) トラフグ LH (1、2 および 3) の初期胚発生過程における発現解析

3つのトラフグ LH アイソフォームの機能特性を解明するために、トラフグ初期胚発生過程における遺伝子の発現解析を行った。トラフグ LH1 および 2 は受精後3時間の初期胚において発現レベルは低く、その後は一定レベルの発現を示した。また、いずれの発生ステージにおいてもトラフグ LH2b は LH2a mRNA よりも発現レベルが高いことが示された。一方、LH3 mRNA はいずれの発生ステージにおいてもハウスキーピング遺伝子様の発現様式を示し、受精後3時間の胚においても高レベルに発現することが示された。

次に、WISH 法によりトラフグ初期胚発生過程における LH mRNA の分布を解析した。トラフグ LH1 および LH2 mRNA は脊索および沿軸中胚葉において高レベルで発現した。一方、トラフグ LH3 mRNA は初期胚全体で発現しており、なかでも polster および脊索において強く発現することが認められた (Fig. 3)。

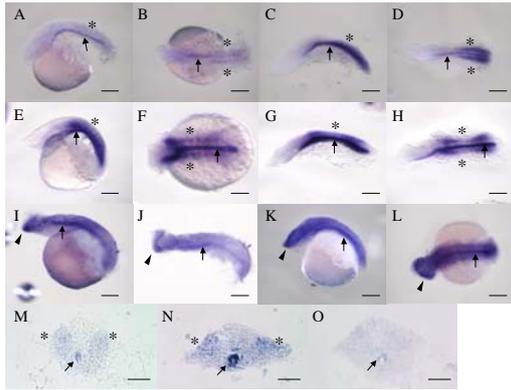


Fig. 3 WISH。フグ初期胚における LH1 (A-D、M)、LH2 (E-H、N) および LH3 (I-L、O) mRNA の発現。

A、B、E、F、I、J; 1-4 somite stage (48 hpf)。C、D、G、H、K、L; 4-8 somite stage (56 hpf)。M、N、O; 56 hpf 胚の横断面。

トラフグ LH1 mRNA は特に沿軸中胚葉および目において高レベルで発現した。また、トラフグ LH2 mRNA は終脳、間脳、下索、底板) および脊索の末端領域において高レベルで発現していた。一方、沿軸中胚葉における発現レベルは減少した。また、トラフグ LH3 mRNA は目において高レベルで発現した。いずれのトラフグ LH においても、受精後 72 時間の脊索では発現レベルが減少した。

受精後 92 時間では、トラフグ LH1 mRNA は特に筋節および咽頭領域において強く発現した。トラフグ LH2 mRNA は特に終脳、咽頭領域、および腭臓原基において強く発現した。トラフグ LH3 mRNA は胚全体で発現し、なかでも腭臓原基において強い発現が認められた。トラフグ LH2 および LH3 mRNA は腭臓原基において高レベルで発現したが、両者の発現部位は明白に異なっていた。一方、トラフグ LH1 mRNA に関しては、腭臓原基において弱い発現が認められた。受精後 114 時間においては、胸鰭原基における発現様式は 3 つのトラフグ LH で異なった。トラフグ LH1 および LH3 mRNA は胸鰭原基の上皮細胞で発現し、一方、トラフグ LH2 mRNA は胸鰭原基の基部で発現した。受精後 168 時間の仔魚においては、トラフグ LH1 および LH3 mRNA は胸鰭原基および尾部末端で強く発現した。表皮においては、トラフグ LH1 および LH3 mRNA の発現が検出された。一方、トラフグ LH2 mRNA の特異的な発現を検出することはできなかった。

## 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 1 件)

① Y. Yokoyama (2010); Structure and expression of lysyl hydroxylase in fish. Proceedings of 'The 13th International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources'. Gangneung, Korea, June 03-05, 2010, 査読無。

〔学会発表〕 (計 4 件)

① 山岸和希子・細井公富・水田尚志・横山芳博: コイ Lysyl Hydroxylase (LH) 1、2 および 3 の cDNA クローニングと発現解析, 2011 北陸合同バイオシンポジウム, 2011 年 11 月 12 日, 黒部, 宇奈月国際会館セレネ。

② 山岸和希子・細井公富・水田尚志・横山芳博: コイリジルヒドロキシラーゼ 1、2 および 3 の発現解析, 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年 9 月 29 日、長崎, 長崎大学。

③ 横山芳博: 魚類コラーゲンはなぜ酸に溶け易いのか? 北陸合同バイオシンポジウム 2010 年 11 月 12-13 日、あわら、芦泉荘。

④ Y. Yokoyama; Structure and expression of lysyl hydroxylase in fish. The 13th International Symposium on the "Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources" Gangneung, Korea, June 03-05, 2010.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

特許番号: 特許第 4796914

名称: クラゲ類からのコラーゲン回収方法

特許権者: 公立大学法人福井県立大学、日本原子力発電株式会社

発明者: 吉中禮二・横山芳博・(他 3 名)

特許登録日: 2011 年 8 月 5 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 芳博 (YOKOYAMA YOSHIHIRO)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号: 90291814