

# 生命科学専攻

Department of Life Science

## Biochemistry

## 生体物質化学 I

## I 膜タンパク質の細胞内局在化とトポロジー形成機構

Molecular Mechanism for Topogenesis and Targeting  
of Membrane Proteins in the Cell

阪口雅郎・藤田英伸・衣斐義一  
Sakaguchi, M., Fujita, H., Emi, Y.

細胞および細胞小器官を取り囲む膜に存在する膜タンパク質は、物質輸送・情報交換、エネルギー産生、膜小器官の動態制御など、様々な機能を担っている。それらは細胞質のリボソームで合成され、適切なオルガネラへ局在化し、正確に膜に組み込まれ、はじめて機能構造を形成できる。我々は、膜タンパク質の小胞体、ミトコンドリア、ペルオキシソームへの局在化、並びにタンパク質膜透過チャネルを介した膜タンパク質の膜組み込み機構を研究している。本年度は以下の成果を得た。①タンパク質がリボソームで合成されてからオルガネラ膜を透過するまでの時間経過を定量的に見積もることが可能な実験系（フォールディングプローブ、CP-EGFP）を駆使して、膜透過関連遺伝子の作用の網羅的かつ定量的な解析を進めてきた。トランスロコン関連遺伝子として、小胞体内腔 Hsp70 である Kar2p の存在量に依存して、疎水性セグメントのトランスロコンにおける膜透過動きが向上すること、Kar2p の点変異体の追加発現によって強いドミナントネガティブ作用が見られることを見出した。さらに、Kar2p の、ATP 結合、リン酸加水分解、基質結合領域、J-タンパク質結合領域、ドメイン間ヒンジ領域など、各機能ドメインの点変異をの論点整理、変異体デザイン、構築をほぼ完了した。今後その表現型を、合成共役型タンパク質膜透過、合成完了後型透過、C-末端アンカー型膜組み込みに関する影響などの点について詳細に解析する。②合成共役型タンパク質膜透過の駆動作用の作用点の解析：合成後に進行するポリペプチド鎖の膜透過においては、Kar2p は Hsp70 のシャペロン作用サイクルを介してラチェット機能を発揮して駆動すると信じられている。一方、合成後型膜透過では、ポリペプチド鎖の伸長自体が駆動力として有効であり、ラチェット作用の貢献する余地がないと考えられているため、合成共役型膜透過における Kar2p の作用ドメインの解析が必要であった。そこで、Kar2p のドミナントネガティブ作用を示す点変異体について、そのネガティブ効果を消失する第 2 の変異、すなわち分子内抑圧変異の探索を進めている。これにより、合成共役型の膜透過における複数の Kar2p の作用点が明らかになるものと期待される。③膜タンパク質のトポロジーを規定する正電荷配列の作用機構の解析：これまでポリペプチド鎖上の正電荷残基がトランスロコンにおける膜透過を抑制することによって複雑な膜タンパク質の分子配向や膜貫通トポロジーが規定されることを明らかにしてきた。ここでは、正電荷残基を識別するトランスロコン側の要因を解明するために、トランスロコン本体分子 Sec61p および第 2 のトランスロコンチャネルである Ssh1p について、系統的変異を導入し、正電荷配列部分の合成共役型膜透過状況を調べている。正電荷配列の透過効率変動が、多数の変異株について観察されており、その効果を疎水性領域の透過状況、小胞体への標的化速度状況などの諸点についても詳細を解析していく。

## Ⅱ 低分子有機化合物に対する生体防御系の機能制御

### Regulation of Antiorganochemical Detoxification System

衣斐義一・阪口雅郎

Emi, Y., Sakaguchi, M.

我々のからだには、体内で合成されるホルモンなどの生理活性物質のほか、食物などから摂取した多種多様な有機化合物を、適切に処理して無害化して排出する仕組みが備わっている。肝臓で行われている異物代謝経路は、初めに酸素添加などにより官能基を導入し、続いてグルクロン酸などの水溶性原子団を抱合し、最後に代謝物を細胞外へ排出するという三つのステップに分けられる。ビリルビン为例にとると、ビリルビンの蓄積によって黄疸を引き起こし、重症例では神経核などが障害される。血中のビリルビンは、肝細胞の類洞側細胞膜にある輸送体（OATP1B1 および OATP1B3）によって取り込まれ、小胞体にある UDP-グルクロン酸転移酵素によってグルクロン酸抱合され、肝細胞の胆管側細胞膜にある輸送体（ABCC2）によって排出される。これらのタンパク質の機能や局在化を正常に保つことによって、ビリルビンの体内濃度が低く保たれている。

当研究室では、排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターに焦点を当て、生合成されたタンパク質の局在や機能を制御するしくみを解き明かし、化学物質に対する生体防御系の制御機構を明らかにすることを目標にして研究を進めてきた。ABCC2 はグルクロン酸抱合体などを肝細胞から胆管へ排出する輸送体であり、肝細胞において血管側ではなく胆管側の細胞膜に極性をもって局在化する。ABCC2 と同じファミリー C に分類される ABCC1 と OATP1B1 および OATP1B3 は、肝細胞において胆管側ではなく血管側の細胞膜に局在化する。同じ細胞膜であっても、このように極性の異なる局在化様式があるが、極性局在化を制御するしくみに関して全容解明から程遠いのが実状である。そこで、極性局在化の制御を明らかにする研究を進めている。

①ABCC2 の極性局在化を決定するシグナル配列の一つとして見出された、283 番目のセリンから始まる配列 (SQDAL) と結合するタンパク質を、酵母ツーハイブリッド法により見出しており、生合成された ABCC2 を細胞膜に標的化させる機構を明らかにする研究を進めている。

②酵母ツーハイブリッド法によって ABCC2 のカルボキシ末端部に結合するタンパク質をスクリーニングし、その一つとしてクラスリン被覆小胞に付随するタンパク質として知られている NECAP1 を見出した。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた ABCC2 を細胞膜に再循環させる過程において、NECAP1 がはたらいていることを証明すべく研究を進めている。

③17 回膜貫通型の ABCC2 と同じファミリー C に分類される ABCC4 や ABCC7 は、12 回膜貫通型でアミノ酸の数やドメインの構成が異なっている。上皮細胞の頂端側の細胞膜に局在化する ABCC7 の極性局在化を規定するシグナルの候補の一つとして、57 番目のトリプトファンから始まる配列 (WDRE) で表されるモチーフを見出した。また、ABCC7 と同じ 12 回膜貫通型の ABCC4 の局在化シグナル (WDKE) を見出した。

④OATP1B1 および OATP1B3 の極性局在化を決定する仕組みを解明する研究が進行中である。

#### 発表論文 List of Publications

- I -1 川井 拓哉, 小坂 優里菜, 阪口 雅郎「酵母小胞体内腔 HSP70(KAR2) の合成共役型膜透過における作用機構の系統的解析」第 45 回日本分子生物学会年会分子生物学会 (2022 年、千葉・幕張メッセ)
- I -2 藤田 英伸, 阪口 雅郎「小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質形成時のタンパク質の動態の解明」第 45 回日本分子生物学会年会分子生物学会 (2022 年、千葉・幕張メッセ)
- II-1 Haque MS, Emi Y, Sakaguchi M., "A conserved WXXE motif is an apical delivery determinant of ABC transporter C subfamily isoforms." Cell Struct. Funct. 48, 71–82 (2023)
- II-2 福田 昂輝, 衣斐 義一, ハック モハンマド=シャジェドオル, 阪口 雅郎「有機アニオントランスポーターOATP1B3 の側底部細胞膜への極性局在化シグナルの探索」第 45 回日本分子生物学会年会分子生物学会 (2022 年、千葉・幕張メッセ)

## 大学院生命理学研究科

博士後期課程

Md Shajedul Haque

## 生命科学専攻

博士前期課程

松本侑子

川井拓哉

## 科学研究費補助金等

- 1 学術研究助成基金助成金 (令和 2 年度～令和 4 年度) 基盤研究 C (一般)  
課題番号 20K06510  
研究課題 膜タンパク質の構造構築過程に関わるトランスロコン因子群の機能解明  
研究代表者 阪口雅郎
- 2 (公財) 武田科学振興財団 (令和 2 年度～令和 4 年度)  
研究課題 小胞体・ゴルジ体ストレス応答を軸とした新規創薬戦略の基盤構築  
研究分担者 阪口雅郎
- 3 学術研究助成基金助成金 (令和 4 年度～令和 6 年度) 基盤研究 C (一般)  
課題番号 22K06116  
研究課題 小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質形成時のタンパク質の動態の解明  
研究代表者 藤田英伸

## Spectroscopy

## 生体物質構造学Ⅱ

### I 金属タンパク質のラマン分光解析

#### Raman spectroscopic analysis of metalloproteins

柳澤幸子・佐藤航・長尾聡・山田大智・久保稔

Yanagisawa, S., Sato, W., Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

当講座では共同利用機器センターの振動分光装置群を維持管理するとともに、それらを用いて金属タンパク質の構造機能相関を研究している。特に可視共鳴ラマン分光法を用いて、ヘムと銅原子を含むチトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の活性増強機構を調べている。昨年度は低酸素下で CcO の活性を増強する膜タンパク質 (Hypoxia-inducible gene domain 1; HIGD1) が CcO の H<sup>+</sup>ポンプ経路に構造変化を引き起こすことを見い出した。2022 年度はさらに、H/D 交換に伴うヘム側鎖ラマンバンドの変化から H<sup>+</sup>ポンプ経路上の構造変化箇所を同定した。また、リボソームを用いたアッセイ系を用いて、HIGD1 結合時の H<sup>+</sup>ポンプ活性の上昇を観測した。共同利用機器センターの振動分光装置を用いた学外共同研究を 5 報論文発表した。

### II タンパク質の SACLA 時間分解構造解析

#### Time-resolved structural analysis of proteins using SACLA

長尾聡・山田大智・久保稔

Nagao S., Yamada, D., Yanagisawa, S., Kubo, M.

SACLA を用いた時間分解結晶構造解析は、タンパク質の動きを時間軸上で観測できる動的構造解析手法である。当講座は特にチトクロム P450 の中間体構造解析を進めてきた。2022 年度は、基質の結合、ヘムの還元、O<sub>2</sub> の結合に伴う連続した構造変化を動画として捉えることで、活性部位における基質配向の制御機構を明らかにした。

### III 酵素反応の時間分解分光解析

#### Time-resolved vibrational analysis of enzymatic reactions

山田大智・柳澤幸子・久保稔

Yamada, D., Yanagisawa, S., Kubo, M.

ケージド基質を用いた光誘起時間分解ラマン・赤外分光装置やストップフローラマン分光装置を立ち上げ、ヘムやフラビンなどの補因子を有する酵素の触媒反応機構を研究して

いる。2022年度は、Trp代謝酵素（インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ）の基質阻害機構を stopped-flow 法を用いて解析し、基質阻害サイトの熱力学的性質を明らかにした。さらに本年度は、損傷 DNA を光依存的に修復するフラビン酵素（6-4 フトリアーゼ）の反応中間体を時間分解赤外分光測定により捕捉し、同位体解析やスペクトルシミュレーションと合わせて、反応中間体の化学構造を決定した。また、NO還元酵素の初期中間体の赤外分光解析を論文発表した。

## IV タンパク質の構造機能解析に向けた表面増強

### 赤外分光装置の開発

SEIRAS system development for *operando* analysis of protein structure and function

山田大智・久保稔  
Yamada, D., Kubo, M.

タンパク質の構造解析と機能解析を同時に行なえる表面増強赤外分光装置を開発している。この装置では、Ni-NTA を化学修飾した金表面に His タグを付加したタンパク質を固定化し、表面敏感な赤外分光測定によりタンパク質の構造と機能をオペランド計測する。2022年度は温度依存性チャンネル（TRP チャンネル）の温度変化に伴う SEIRAS スペクトルを測定した。脂質由来のバンドのスペクトル変化が観測されており、TRP に結合した脂質を含めて現在解析中である。

## V 二機能性クリプトクロムの天然変性領域の構造解析

Structural analysis of intrinsically-disordered region in bi-functional cryptochrome

長尾聡・山田大智・久保稔  
Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

クラミドモナス由来の動物型クリプトクロム（CraCRY）は、DNA 光修復酵素／クリプトクロムスーパーファミリーに属するフラボタンパク質であるが、(i) クリプトクロムとしての概日時計制御機能に加えて、(ii) DNA 光修復酵素としての酵素機能も保持した二機能性タンパク質である。CraCRY は C 末端に約 100 残基の天然変性領域を有するが、光に依存した C 末端領域のダイナミクスが二機能性制御の鍵を握る。2022年度は、明状態（FADH<sup>-</sup>型）CraCRY の SAXS 測定に成功し、青色光吸収に伴う C 末端天然変性領域の構造変化を明らかにした。また、明状態 CraCRY の NMR 測定にも成功した。現在、暗状態（FADH<sup>•</sup>）CraCRY の調製を試みている。

## VI 協同性を有するミオグロビン人工二量体の分子設計

### Molecular design of artificial myoglobin dimer as cooperative O<sub>2</sub> carrier

長尾聡・山田大智・久保稔

Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

ミオグロビンは特定のループに変異を加えることで、互いの部分構造をスワップさせた二量体を形成する。本研究では変異導入を工夫することで、酸素結合に協同性をもったミオグロビン二量体を分子設計する。2022年度は、三箇所変異を加えたミオグロビン二量体を設計し、O<sub>2</sub>結合型の結晶構造解析をするとともにO<sub>2</sub>解離曲線を測定した。本変異体はO<sub>2</sub>親和性が非常に高くなっていることが判明した。現在、協同性を調べているところである。

#### 発表論文 List of Publication

- I-1 Kokubo, Y. (愛知工業大学), Yanagisawa, S., Kubo, M., Masuda, H. (名古屋工業大学), Kajita, Y.\* (愛知工業大学) et al.: Syntheses, characterizations, crystal structures, and protonation reactions of dinitrogen chromium complexes supported with triamidoamine ligands, *Inorg. Chem.* 62, 5320-5333 (2023).
- I-2 Nishida, Y. (国立循環器病研究センター), Yanagisawa, S., Kubo, M., Takashima, S. (大阪大学), Shintani, Y.\* (国立循環器病研究センター) et al.: Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases, *Nat. Commun.* 13, 7591 (2022).
- I-3 Yoshida, Y. (順天堂大学), Shimizu, I.\* (順天堂大学), Yanagisawa, S., Kubo, M., Soga, T.\* (慶応大学), Minamino, T.\* (順天堂大学) et al.: Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism, *Sci. Rep.* 12, 14883 (2022).
- I-4 Nagatomo, S.\* (筑波大学), Yanagisawa, S., Kubo, M., et al.: Heme-bound tyrosine vibrations in hemoglobin M: resonance Raman, crystallography and DFT calculation, *Biophys. J.* 121, 2767-2780 (2022).
- I-5 Gupta, R. (Ewha Womans University), Li, X.-X. (Ewha Womans University), Yanagisawa, S., Kubo, M., Sarangi, R.\* (Stanford University), Cho, K.-B.\* (Jeonbuk National University), Fukuzumi, S.\* (Ewha Womans University), Nam, W.\* (Ewha Womans University) et al.: Heme compound II models in chemoselectivity and disproportionation reactions, *Chem. Sci.* 13, 5707-5717 (2022).
- I-6 柳澤幸子, 松村和香, 長尾壮将 (国立循環器病研究センター), 西田優也 (国立循環器病研究センター), 伊藤・新澤恭子, 新谷泰範 (国立循環器病研究センター), 久保稔: チトクロム c 酸化酵素活性増強因子 Higd1a の作用機序に関する分光学的研究, 第 48 回生体分子科学討論会, 鳥取, 2022 年 7 月 1 日.
- I-7 佐藤航, 柳澤幸子, 新澤・伊藤恭子, 西田優也 (国立循環器病研究センター), 長尾壮将 (国立循環器病研究センター), 新谷泰範 (国立循環器病研究センター), 久保稔: プロテオリポソーム中における Higd1A によるシトクロム c 酸化酵素の活性増強機構, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 28 日.
- III-1 Takeda, H., Shimba, K., Horitani, M. (佐賀大学), Kimura, T. (神戸大学), Nomura, T., Kubo, M., Shiro, Y.\*, Tosha, T.\* (理化学研究所): Trapping of a mononitrosyl nonheme intermediate of nitric oxide reductase by cryo-photolysis of caged nitric oxide, *J. Phys. Chem. B* 127, 846-854 (2023)(Selected for Cover Picture).

- III-2 **Kubo, M**: Time-Resolved Spectroscopy for Tracking DNA Repair by Photolyase, Molecular Movie and Beyond, Yokohama, May 13, (2022).
- III-3 **久保稔**: 酵素反応ダイナミクスの時間分解分光追跡, 第 95 回日本生化学会大会「タンパク質構造ダイナミクス研究の最近のトピックスと未来展望」, 名古屋, 2022 年 11 月 11 日 (招待講演).
- III-4 **久保稔**: 分光学から見た光回復酵素のメカニズムと分子進化, 第 3 回構造生命科学研究会, 姫路, 2022 年 12 月 23 日.
- III-5 **楞野亜衣**, **山田大智**, 重田育照 (筑波大学), 山元淳平 (大阪大学), **久保稔**: 時間分解赤外分光法による(6-4)光修復酵素の光修復中間体の解析測定, 第 48 回生体分子科学討論会, 鳥取, 2022 年 6 月 30 日.
- III-6 **名定加峰**, **柳澤幸子**, **久保稔**: 免疫調節因子ヒト IDO における基質阻害機構の分光学的研究, 兵庫県立大学知の交流シンポジウム 2022, 姫路, 2022 年 9 月 27 日.
- III-7 **前野達海**, **山田大智**, **楞野亜衣**, 山元淳平 (大阪大学), **久保稔**: クリプトクロムが触媒する DNA 光修復反応の時間分解分光解析, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 29 日.
- IV-1 **北山実咲**, **山田大智**, **久保稔**: 温度感受性チャネルの反応機構解明に向けた表面増強赤外分光装置の立ち上げ, 兵庫県立大学知の交流シンポジウム 2022, 姫路, 2022 年 9 月 27 日.
- V-1 松田颯真, 長尾聡, 山田大智, 久保稔: X 線小角散乱測定を用いたクラミドモナス由来クリプトクロムの溶液構造解析, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 29 日.
- VI-1 **長尾聡**, **丸尾知紘**, **山田将司**, **山田大智**, **久保稔**: ミオグロビンへの協同的な配位子結合性付与に向けた二量体の合理的設計, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 29 日.

## 生命科学専攻

### 博士前期課程

- 楞野亜衣 (M2): 時間分解赤外分光法を用いた DNA 光修復酵素の触媒機構の解明
- 北山実咲 (M2): 温度感受性チャネルの反応機構の解明に向けた表面増強赤外分光解析
- 桑野わ子 (M2): 非天然基質を酸化するシトクロム P450BM3 の酸素化型中間体の無損傷構造解析
- 名定加峰 (M2): インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ基質阻害の温度依存性
- 前野達海 (M2): クリプトクロムの DNA 光修復機能の分光学的解析
- 貝出裕規 (M1): 核磁気共鳴分光法を用いたクリプトクロムの C 末端変性領域の動的構造研究
- 亀井拓斗 (M1): 時間分解分光法を用いたチトクロム酸化酵素活性増強因子 CHCHD2 の作用機序解明
- 松田颯真 (M1): X 線小角散乱測定を用いたクリプトクロムの溶液構造解析の研究

## 科学研究費補助金等

- 科学研究費補助金(令和 1~5 年度) 新学術領域「高速分子動画」 課題番号:19H05784  
研究課題 時間分解構造解析を補完する精密顕微分光計測  
研究代表者 久保 稔
- 科学研究費補助金(令和 4~6 年度) 基盤研究(B) 課題番号:22H02588  
研究課題 二機能性タンパク質のダイナミックな構造と機能制御



- 研究代表者 久保 稔
- 3 科学研究費補助金（令和 4～6 年度） 若手研究 課題番号：22K15076
- 研究課題 呼吸活性化因子 Higd1A によるミトコンドリア呼吸鎖末端の多段階反  
応制御機構
- 研究代表者 佐藤 航

## Protein Crystallography

## 生体物質構造学 I

## I 微生物の細胞機能を維持するタンパク質群のX線構造化学

## X-ray Structural Chemistry of Proteins in Various Metabolic Systems of Microorganisms

西川幸志・柴田直樹・緒方英明

Nishikawa, K., Shibata, N., Ogata, H.

微生物の細胞内では、酵素や電子伝達タンパク質など多くの生体高分子が重要な化学反応の制御に関与している。膜内外のプロトン濃度の調節や還元力の維持などはある種の微生物にとっては必須の生体内システムである。硫酸還元菌では[NiFe]ヒドロゲナーゼ、シトクロム類、硫酸塩・亜硫酸塩還元系酵素、フラビンタンパク質などの分子が水素代謝に関与している。超好熱菌ではセンサー型と電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼが同一オペロン上に配置されており、水素濃度に応じて水素代謝をおこなっている。我々はこれらの生体高分子のX線結晶構造解析を行い、その生化学的機能・分子間相互作用・電子伝達機構などの解明を目指している。特にヒドロゲナーゼについては、その水素活性化の分子機構の解明に近づいており、中性子結晶解析法による研究も進めている。さらに、水素から得られる電子を伝達する経路が分岐している電子伝達分岐型ヒドロゲナーゼの構造生物学も進めている。

ビタミンB<sub>12</sub>補酵素 (Co原子含有) の関与するジオールデヒドラターゼやエタノールアミンアンモニアリアーゼの構造解析を行い、酵素の触媒するラジカル反応機構を提唱している。他にナイロンオリゴマー分解酵素やデカルボキシラーゼ、フェレドキシン-NADP還元酵素、マルチ銅酸化酵素、抗生物質の生産など医薬品合成に応用できるアミノ酸2量体合成酵素などについても高精度な構造化学的研究を展開している。

外部からの様々な刺激・ストレス・外敵に応答してそれに対応、あるいは制御するためのシステムは生物が生命を維持するためには重要である。センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼをはじめとして気体分子に反応してDNAの転写制御に関わるタンパク質群のX線構造化学的研究を進めている。

## II 高等生物細胞のタンパク質間相互作用のX線構造生物学

## X-ray Structural Biology of Protein-protein Interactions in the Cells of Higher Organisms

柴田直樹・西川幸志・緒方英明

Shibata, N., Nishikawa, K., Ogata, H.

生物の細胞内、特に脳神経細胞内では様々な制御・調節のシステムが互いに高度な連携をとりながら機能している。これらのシステムに関与しているタンパク質群の構造生物学的研究は現在発展途上である。本研究室では脳・神経系で特異的に発現され、神経発生の多様性等に関与していると考えられているプロトカドヘリンのX線構造生物学を展開し、それらの分子構造に基づいて機能をより深く理解することをめざしている。

細胞は外界の変化に応答して代謝や増殖を調節するためのシグナル伝達機構をもっている。本研究室ではWntシグナルや関連する伝達経路のうち、特にβ-カテニン経路に関わるAxin, Dishevelled, Coiled-coil DIXタンパク質がもつDIXドメインや、新規の癌細胞増殖シグナル軸であるDKK-CKAP4経路に関して、結晶解析を通して、その分子間相互作用における構造基盤の解明を目指している。またこれに関連する転写因子として、軟骨形成に関わるSox9のDNA認識機構についても研究を行っている。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 C. Furlan, N. Chongdar, P. Gupta, W. Lubitz, H. Ogata, J. N. Blaza, J. A. Birrell, Structural insight on the mechanism of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase, *eLife*, 11, e79361 (2022)
- I-2 N. Chongdar, P. Rodriguez-Maciá, E. J. Reijerse, W. Lubitz, H. Ogata, J. A. Birrell, Redox tuning of the H-cluster by second coordination sphere amino acids in the sensory [FeFe] hydrogenase from *Thermotoga maritima*, *Chemical Science*, 14, 3682-3692 (2023)
- I-3 S. T. Stripp, B. R. Duffus, V. Fourmond, C. Léger, S. Leimkühler, S. Hirota, Y. Hu, A. Jasniewski, H. Ogata, M. W. Ribbe, Second and Outer Coordination Sphere Effects in Nitrogenase, Hydorgenase, Formate Dehydrogenase, and CO Dehydrogenase, *Chemical Reviews*, 122, 11900-11973 (2022)
- I-4 N. Shibata, Y. Higuchi, B. Kräutler, T. Toraya, Structural insights into the very low activity of the homocoenzyme B<sub>12</sub> adenosylmethylcobalamin in coenzyme B<sub>12</sub>-dependent diol dehydratase and ethanolamine ammonia-lyase. *Chemistry*, 18, e202202196 (2022).
- I-5 C. Furlan, N. Chongdar, P. Gupta, W. Lubitz, H. Ogata, J. N. Blaza, J. A. Birrell, Structure of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase, 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 神戸, 2022 年 12 月 2 日【口頭発表】
- I-6 C. Furlan, N. Chongdar, P. Gupta, W. Lubitz, H. Ogata, J. N. Blaza, J. A. Birrell\*, Structural insight on the mechanism of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase from *Thermotoga maritima*, EBEC2022, the 21st European Bioenergetics Conference, フランス エクサン・プロバンス, 2022 年 8 月 20-25 日【口頭発表】
- I-7 T. Sakai, S. Yamaguchi, T. Mashima, N. Kobayashi, H. Ogata, E. Hifumi, T. Uda, S. Hirota, Studies on the association character and structural analysis of antibody light chain that tetramerizes by domain swapping, 第 103 回日本化学会春季年会, 野田, 2023 年 3 月 22-25 日【口頭発表】
- I-8 K. Nishikawa, Y. Nakagawa, S. Inoue, T. Chuji, H. Ogata, S. Nakashima, Y. Shigeta, K. Fukutani and Y. Higuchi, New assay system for the enzymatic reaction with gaseous substrates by using Raman spectroscopy, 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 神戸, 2022 年 12 月 2 日【ポスター】
- I-9 C. Xie, J. Inomata, T. Mashima, H. Ogata, S. Hirota, Hemoprotein oligomerization by ammonium sulfate precipitation at low pH, 第 48 回生体分子科学討論会, 鳥取, 2022 年 6 月 30 日—7 月 1 日【ポスター】
- I-10 酒井隆裕, Wahyu Fitriana, 真島剛史, 小林直也, 一二三恵美, 宇田泰三, 緒方英明, 廣田俊, ドメインスワッピングにより 4 量化する抗体軽鎖の多量化会合挙動, 第 48 回生体分子科学討論会, 鳥取, 2022 年 6 月 30 日—7 月 1 日【ポスター】
- I-11 酒井隆裕, Wahyu Fitriana, 真島剛史, 小林直也, 一二三恵美, 宇田泰三, 緒方英明, 廣田俊, 4 量化する抗体軽鎖の会合挙動と構造解析に関する研究, 第 16 回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2022 年 9 月 10 日—9 月 12 日【ポスター】
- I-12 緒方英明, 嶋盛吾, メタン酸化系酵素の構造生化学, CREST「多様な天然炭素資源の活用に資する革新的触媒と創出技術」研究領域総合成果報告会, 神奈川, 2023 年 3 月 15 日【ポスター】
- I-13 柴田直樹, 樋口芳樹, 虎谷哲夫: O<sub>2</sub> により不活性化されたラジカル B<sub>12</sub> 酵素ジオールデヒドラターゼの構造解析と補酵素分解物の同定, 第 468 回ビタミン B 研究協議会, 岡山, 2022 年 9 月 2 日【口頭発表】
- I-14 玉田太郎, 廣本武史, 西川幸志, 樋口芳樹: *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来 [NiFe]-ヒドロゲナーゼ酸化型の中性子/X 線結晶構造解析, 第 22 回日本蛋白質科学会年会, つくば, 2022 年 6 月 8 日【口頭発表】
- I-15 西川幸志, 中川由佳, 井上翔太, 中地隆文, 中島聡, 緒方英明, 重田育照, 福谷克之, 樋口芳樹: Raman 分光法を用いたガス状分子を基質とする酵素反応の新規活性測定法, 第

16 回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2022 年 9 月 10 日【口頭発表】

### 科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金（令和 3 年度～令和 5 年度）基盤研究(B)（一般） 課題番号：21H02420  
研究課題： Wnt シグナル因子が関わる新規癌細胞増殖シグナル活性化と阻害抗体の構造基盤  
研究代表者 柴田直樹
2. 科学研究費補助金（令和 2 年度～令和 4 年度）基盤研究(C)（一般） 課題番号：20K06511  
研究課題： [NiFe] ヒドロゲナーゼの酸化に伴う鉄硫黄クラスターの構造変化に関する研究  
研究代表者 西川幸志
3. 科学研究費補助金（令和 2 年度～令和 4 年度）基盤研究(B)（一般） 課題番号：20K03215  
研究課題： [FeFe] ヒドロゲナーゼの構造基盤と反応機構  
研究代表者 緒方英明

## Cellular Regulation

## 細胞制御学 II

### I 哺乳類呼吸鎖シトクロム酸化酵素の構造と機能

#### Structural and Functional Studies on Mammalian Cytochrome *c* Oxidase

村本和優

Muramoto, K.

細胞呼吸を担う呼吸鎖電子伝達系は、基質の酸化（電子伝達）に伴い放出されるエネルギーを使って水素イオン（プロトン）を能動輸送する。エネルギーは膜を介したプロトンの電気化学ポテンシャル差へ環境に応じて効率的に変換され、ATP 合成など様々な生命活動に利用される。哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム酸化酵素（Cytochrome *c* oxidase: CcO）を対象にして、そのエネルギー変換反応と反応制御のメカニズムを分子構造に基づいて理解することを目指して研究を進めてきた。ウシ心筋 CcO の機能（酵素活性等）に影響を与えることが報告されているカルシウムイオンと酸化型および還元型 CcO との結合構造をそれぞれ 1.7 Å 分解能で決定し、電子伝達経路の構造変化を論文で報告した。活性阻害効果を示す界面活性剤を含まないコール酸フリー CcO を調製し、構造決定へ向けた X 線結晶解析および電顕単粒子解析を進めた。

### II 一酸化窒素還元酵素の構造と機能

#### Structural and Functional Studies on Nitric Oxide Reductases

村本和優・城 宜嗣

Muramoto, K., Shiro, Y.

一酸化窒素還元酵素（Nitric Oxide Reductase: NOR）は、微生物の嫌気呼吸の一種である脱窒において、中間体として産生される一酸化窒素 NO を亜酸化窒素 N<sub>2</sub>O に変換する酵素である。呼吸酵素の分子進化との関係や、地球温暖化・オゾン層破壊などの環境科学との関連、さらには抗菌薬開発などで注目されている。髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）由来のキノール依存性 NOR(NmqNOR) は、機能単位は単量体であるが二量体で高活性である。電顕単粒子解析により決定された単量体および二量体構造に基づきアミノ酸変異体を作製し、ゲルろ過、Blue Native-PAGE による分析および活性測定から二量体の安定化と二量体化による活性化に重要なアミノ酸残基を特定した。脂質ナノディスクに再構成された二量体 NmqNOR の電顕単粒子構造を 2.9 Å 分解能で決定し、二量体構造の安定化およびプロトン輸送経路の構造形成に関与する脂質を見いだした。

### Ⅲ 生体内の鉄動態に関わるタンパク質の構造と機能

#### Structural and Functional Studies on Proteins Related to Cellular Iron Dynamics

城 宜嗣  
Shiro, Y.

鉄は、ほぼ全ての生物にとって必須の元素であり、酸素の貯蔵・運搬、酸化還元、異物代謝など重要な生理機能を担うタンパク質の補因子として、生命機能の維持に貢献している。一方で、タンパク質に結合していない遊離の鉄は、活性酸素源として細胞損傷を引き起こす負の側面を有する。このように、生物にとって鉄は「両刃の剣」であるため、生体内には鉄の濃度や酸化状態（生体内鉄動態）を制御するシステムが存在する。本課題では、ヒトにおける鉄動態制御機構の分子論的な解明にむけて、ヒトの鉄吸収に関わるタンパク質に着目した研究に取り組んでいる。本年度は、十二指腸において鉄が取り込まれる際に中心的な役割を果たす膜タンパク質、二価鉄金属輸送体（DMT1）の発現・精製法の検討を行った。その結果、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO 細胞）を用いた系で、DMT1 を発現させることができ、膜の単離、界面活性剤での可溶化を経て、高純度に DMT1 を精製する手法を確立した。今後は、精製試料を大量に調製し、低温電子顕微鏡での構造解析に挑戦する。また、細胞内での鉄輸送に関わる鉄シャペロンタンパク質 PCBP についても発現・精製法を確立した。PCBP は、DMT1 をはじめ、様々な鉄動態制御に関わるタンパク質との複合体を形成すると提案されているので、これらの精製試料を用いて、複合体形成の確認、複合体の構造解析へと展開する。

#### 発表論文 List of Publications

- I-1 Muramoto K, Shinzawa-Itoh K. Calcium-bound structure of bovine cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1864, 148956 (2023) DOI: 10.1016/j.bbabbio.2023.148956
- I-2 島田 敦広、村本 和優、新澤-伊藤 恭子、月原 富武、吉川 信也 シアン化物結合シトクロム酸化酵素の結晶構造から示唆される金属中心の酸化状態変化による活性制御 日本生物物理学会第 60 回年会（函館, 2022）
- I-3 島田 敦広、新澤-伊藤 恭子、村本 和優、月原 富武、吉川 信也 XFEL を用いた時分割構造解析によって期待されるシトクロム酸化酵素の反応機構解明 第 48 回生体分子科学討論会（鳥取, 2022）
- II-1 Nishida Y, Yanagisawa S, Morita R, Shigematsu H, Shinzawa-Itoh K, Yuki H, Ogasawara S, Shimuta K, Iwamoto T, Nakabayashi C, Matsumura W, Kato H, Gopalasingam C, Nagao T, Qaqorh T, Takahashi Y, Yamazaki S, Kamiya K, Harada R, Mizuno N, Takahashi H, Akeda Y, Ohnishi M, Ishii Y, Kumasaka T, Murata T, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y, Honma T, Shigeta Y, Kubo M, Takashima S, Shintani Y. Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases. *Nat. Commun.* 13, 7591 (2022) DOI: 10.1038/s41467-022-34771-y
- II-2 Takeda H, Shimba K, Horitani M, Kimura T, Nomura T, Kubo M, Shiro Y, Tosha T.

Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide. *J. Phys. Chem. B*, 127, 846 (2023) DOI: 10.1021/acs.jpcb.2c05852

- III-1 Nakamura H, Hisano T, Rahman M, Tosha T, Shirouzu M, Shiro Y. Structural insight into heme detoxification by an ABC-type efflux pump in Gram-positive bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 119, e2123385119 (2022) DOI: 10.1073/pnas.2123385119
- III-2 柴田 晃利、藤宇 将吾、築取 いずみ、西谷 雄大、高原 教代、城 宜嗣、澤井 仁美 ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 の構造解析にむけた精製法の確立 第 48 回生体分子科学討論会 (鳥取, 2022)
- III-3 浦 敦人、築取 いずみ、城 宜嗣、澤井 仁美 ヒト由来鉄シャペロンタンパク質 PCBP による細胞内鉄イオン輸送・貯蔵の制御機構 第 48 回生体分子科学討論会 (鳥取, 2022)
- III-4 浦 敦人、築取 いずみ、城 宜嗣、澤井 仁美 ヒトの細胞内における鉄イオンの輸送と貯蔵の分子メカニズム 日本農芸化学会 2022 年度西日本支部大会 (長崎, 2022) \*優秀発表賞
- III-5 浦 敦人、築取 いずみ、城 宜嗣、澤井 仁美 細胞内鉄輸送タンパク質 PCBP1 における鉄イオンの結合と輸送の分子メカニズム 第 95 回日本生化学会大会 (名古屋, 2022)

## 生命科学専攻

### 博士前期過程

柴田晃利：ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 の構造機能解析

山岡博明：ナノディスク再構成系一酸化窒素還元酵素の構造機能解析

浦 敦人：ヒト由来鉄シャペロンタンパク質 PCBP による細胞内鉄イオンの輸送・貯蔵の制御機構解明

阪口智哉：フェロトキシスに關与するタンパク質 101F6 の構造解析

藤宇将吾：ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 と他タンパク質との相互作用解析

## 科学研究費補助金等

- 1 2022 年度 ひょうご科学技術協会学術研究助成金 課題番号：4069

研究課題 コール酸フリー新規精製法を用いた呼吸酵素の分子進化による獲得機能の解明

研究代表者 村本和優

- 2 科学研究費補助金 (令和 1-5) 新学術領域研究 (研究領域提案型) 課題番号：19H05761

研究課題 生命金属動態に關与するタンパク質分子の構造機能ダイナミクス研究

研究代表者 城 宜嗣

# Macromolecular Dynamics and X-ray Crystallography

# 生体高分子動的構造解析学

## I SPring-8 蛋白質結晶構造解析ビームラインの高度化と応用

### Research and Development for SPring-8 Structural Biology Beamlines

山本雅貴・吾郷日出夫  
Yamamoto, M., Ago, H.

本プロジェクトは、「あらゆる結晶の全自動構造解析の実現」を目標とした、SPring-8 構造生物学用ビームラインの高度化研究である。ここで言う全自動構造解析は、生体高分子結晶の構造解析の簡便化・迅速化・高精度化、さらに解析対象の拡大を包含する。これまでに「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」と高輝度光源並びに高速検出器の相乗効果によりビームライン自動運転と X 線回折強度データの大量取得が可能となった。これを受け、大量の X 線回折強度データ並びに構造解析結果の利用と活用に関する研究開発が始まっている。具体的には、大量の構造解析結果の閲覧性向上に資する計算機プログラムの開発や、結晶毎の僅かな X 線回折強度の違いを指標とした結晶弁別により、結晶構造に多様性があるときに、それらを個別に構造解析する試みである。生体高分子結晶の結晶構造の多様性は、分子機能を背景としている可能性もあり、構造生命科学への応用も期待される。

全自動構造解析とは異なる取り組みもある。放射光での常温時分割構造解析の開発は、高輝度光源と高速検出機の相乗効果で可能となった微結晶の高速回折像測定技術を活用した開発研究であって、XFEL の時間分解能構造解析を補完し、動的な観点での生体高分子が働く仕組みの解明への貢献が期待される。これとは別に、試料の X 線損傷を管理した X 線回折実験法の開発高度化研究もある。例えば、微小結晶を多数交換しながら測定を行う Serial Synchrotron Crystallography (SSX) や大量の微小結晶を凍結固定した大型の結晶ループを回転しながら走査する Serial Synchrotron Rotation Crystallography (SS-ROX) の開発などである。また XFEL 施設である SACLA では、無損傷結晶構造が決定できる超高輝度極短パルス X 線を活用した Serial Femtosecond Rotation Crystallography (SF-ROX) の開発と利用支援をおこなっている。

## II X線結晶構造解析関連応用技術開発

### Development of applied technology relating to X-ray protein crystallography

山本雅貴  
Yamamoto, M.



本課題は、ビームラインの効果的な運用に資する周辺技術の開発である。高輝度放射光を用いる現代の X 線結晶構造解析では、X 線損傷抑制の観点で凍結結晶の利用が基本である。しかし、繰り返し実験による凍結条件の最適化や実際の結晶凍結作業など、時間と人的資源の両方で、結晶凍結は効率の低い工程である。そこで、効率向上に向け、結晶凍結から回折計に結晶を設置するまでの自動化技術の開発を行なっている。

結晶凍結の効率化とは異なる発想で、常温測定を前提とした試料準備法の開発も進めている。具体的には、溶液交換可能なマイクロ流路に多数の結晶を固定し測定試料とする方法、結晶化で用いた SBS 規格の結晶化プレートをそのまま使用する方法などである。前者は、結晶周辺の溶媒交換の容易さから、多種類の低分子化合物との複合体構造を薬剤候補化合物の構造最適化に利用する創薬手法での使用が期待される。後者は、成長した結晶に一切手を加えないことを生かした X 線回折データ収集、例えば、環境変化に敏感な結晶の X 線回折強度測定や初期結晶化条件探索での微結晶の検出と X 線回折データ収集などでの活用が期待される。

これらとは別に、温度や水素イオン濃度といった試料環境を制御する装置やその使用法（HAG 法）の開発も進めている。時分割構造解析を含む生体高分子構造の環境応答を調べる実験での活用が進んでいる。またビームライン組込型顕微分光装置などの開発も進めている。結晶試料の *in situ* 電子状態分光観察による反応中間体の構造解析などへの応用が期待される。また構造研究を進める上で試料の質は極めて重要であることからタンパク質の生産精製の高度化に関する研究も行っている。

### Ⅲ タンパク質構造解析の新規手法開発

#### Research and Development for Protein Structure Analysis Methods

山本雅貴・吾郷日出夫  
Yamamoto, M., Ago, H.

現在のマイクロビームで扱っているミクロンサイズよりさらに小さな結晶への対応は、構造解析での一層の対象拡大に貢献する。より小さな結晶の構造解析を目標に、真空中に結晶を設置し X 線回折像を記録する技術開発を行なっている。真空中で回折実験を行うことでバックグラウンドノイズを抑制し、結晶からの微弱な回折強度の正確な測定が期待できる。

非晶質の試料について、X 線小角散乱による溶液場でのタンパク質の機能解析や X 線コヒーレント回折イメージング（Coherent X-ray Diffraction Imaging : CXDI）、クライオ電子顕微鏡による生体試料からの単粒子解析の技術開発なども進めている。

#### 発表論文 List of Publications

- I-1 K. Hirata (理研)・S. Abe (東工大)・M. Ueno (東工大)・T. Kojima (東工大)・H. Matsuura (理研)・Y. Kawano (理研)・N. Sakai (理研)・M. Yamamoto: Protein micro-crystallography using smaller crystals than 1  $\mu\text{m}$ 、日本蛋白質科学会年会 (つくば市)、

2022

- I-2 松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・竹下浩平 (理研)・當舎武彦 (理研)・河野能顕 (理研)・山本雅貴: SPring-8 MX-BLにおける自動化技術と高輝度微小ビームを駆使した構造多様性解析、日本蛋白質科学会年会 (つくば市)、2022
- I-3 松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・河野能顕 (理研)・山本雅貴: タンパク質の作用機序解明に迫る結晶構造解析の新たな展開、第 48 回生体分子科学討論会 (鳥取市)、2022
- I-4 M. Yamamoto・K. Hirata (理研)・H. Matsuura (理研)・N. Sakai (JASRI)・S. Baba (JASRI)・N. Mizuno (JASRI)・Y. Nakamura (JASRI)・H. Murakami (JASRI)・T. Kumasaka (JASRI): Development of automated high-throughput MX beamline at SPring-8, The 72nd annual meeting of the American Crystallographic Association (ACA2022) (米国、ポートランド)、2022
- I-5 N. Sugano-Nakamura (大阪大)・K. Matoba (大阪大)・M. Hirose (大阪大)・N. K. Bashiruddin (東京大)・Y. Matsunaga (大阪大)・K. Yamashita (理研)・K. Hirata (理研)・M. Yamamoto・T. Arimori (大阪大)・H. Suga (東京大)・J. Takagi (大阪大): De novo Fc-based receptor dimerizers differentially modulate PlexinB1 function, Structure, 30, 1411-1423 e4 (2022)
- I-6 松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・中山 楓・坂井直樹 (JASRI)・河野能顕 (理研)・山本雅貴: 回折データ分類による XRD ベースの構造多型解析、令和 4 年度新学術領域「高速分子動画」シンポジウム (淡路市)、2022
- I-7 平田邦生 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (理研)・河野能顕 (理研)・山本雅貴: タンパク質結晶構造解析のデータ収集・解析トリビア、日本結晶学会年会 (西宮市)、2022
- I-8 松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・坂井直樹 (理研)・河野能顕 (理研)・山本雅貴: 階層的クラスタリングを用いた構造多型解析の現状、日本結晶学会年会 (西宮市)、2022
- I-9 松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・河野能顕 (理研)・山本雅貴: 多数の結晶を利用したタンパク質の構造多型解析、日本放射光学会年会 (草津市)、2023
- I-10 上野剛 (理研)・奥村英夫 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・坂井直樹 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・平田邦生 (理研)・吾郷日出夫・河野能顕 (理研)・松浦滉明 (理研)・村上博則 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴: 理研構造ゲノムビームライン II の現状、日本放射光学会年会 (草津市)、2023
- I-11 平田邦生 (理研)・安部 聡 (東工大)・田中潤子 (東工大)・小島摩利子 (東工大)・上野隆史 (東工大)・河野能顕 (理研)・松浦滉明 (理研)・山本雅貴: 600 nm サイズのタンパク質結晶から高分解能構造解析、日本放射光学会年会 (草津市)、2023
- I-12 H.-E. Lee (東工大)・T. Okumura (高知大)・H. Ooka (理研)・K. Adachi (理研)・T. Hikima (理研)・K. Hirata (理研)・Y. Kawano (理研)・H. Matsuura (理研)・Masah. Yamamoto・Masah. Yamamoto (JAMSTEC)・A. Yamaguchi (東工大)・J.-E. Lee (理研)・K. T. Nam (ソウル大)・Y. Ohara (JAMSTEC)・D. Hashizume (理研)・S. E. McGlynn (東工大)・R. Nakamura (理研): Selective Ion Transport in Hierarchical Deep-sea Hydrothermal Vents, 11TH ELSI SYMPOSIUM THE LIVING UNIVERSE (東京), 2023
- I-13 山本雅貴: どうするタンパク質結晶構造解析 ―生体高分子構造研究における X 線結晶学―、

日本結晶学会誌、65, 55-63 (2023)

- II-1 Z. Ren (神戸大)・M. Nishimura (神戸大)・L. H. Tjan (神戸大)・K. Furukawa (神戸大)・Y. Kurahashi (神戸大)・S. Sutandhio (神戸大)・K. Aoki (神戸大)・N. Hasegawa (神戸大)・J. Arii (神戸大)・K. Uto (神戸大)・K. Matsui (神戸大)・I. Sato (神戸大)・J. Saegusa (神戸大)・N. Godai・K. Takeshita (理研)・M. Yamamoto・T. Nagashima (兵庫県健康財団)・Y. Mori (神戸大): Large-scale serosurveillance of COVID-19 in Japan: Acquisition of neutralizing antibodies for Delta but not for Omicron and requirement of booster vaccination to overcome the Omicron's outbreak, *PLoS One*, 17, e0266270 (2022)
- II-2 H. Okumura (JASRI)・N. Sakai (JASRI)・H. Murakami (JASRI)・N. Mizuno (JASRI)・Y. Nakamura (JASRI)・G. Ueno (理研)・T. Masunaga (JASRI)・T. Kawamura (JASRI)・S. Baba (JASRI)・K. Hasegawa (JASRI)・M. Yamamoto・T. Kumasaka (JASRI): In situ crystal data-collection and ligand-screening system at SPring-8, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 78, 241-251 (2022)
- II-3 上野剛 (理研)・舟久保智瑛 (北海道大)・真栄城正寿 (北海道大)・小西真晶 (リガク)・一町田由貴 (北海道大)・坂井直樹 (理研)・山本雅貴: 化合物スクリーニングに向けたマイクロ流路デバイス開発、日本蛋白質科学会年会 (つくば市)、2022
- II-4 S. L. Rose (リバプール大)・S. Baba (JASRI)・H. Okumura (JASRI)・S. V. Antonyuk (リバプール大)・D. Sasaki (リバプール大)・T. M. Hedison (マンチェスター大)・M. Shanmugam (マンチェスター大)・D. J. Heyes (マンチェスター大)・N. S. Scrutton (マンチェスター大)・T. Kumasaka (JASRI)・T. Tosha (理研)・R. R. Eady (リバプール大)・M. Yamamoto・S. S. Hasnain (リバプール大): Single crystal spectroscopy and multiple structures from one crystal (MSOX) define catalysis in copper nitrite reductases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119, e2205664119 (2022)
- III-1 H. Matsuura (理研)・H. Ago・K. Hirata (理研)・G. Ueno (理研)・A. Suzuki (北海道大)・M. Yamamoto: Development of in-vacuum diffractometer for micro-crystallography at SPring-8, *Molecular Movie International Symposium 2022* (横浜市), 2022
- III-2 J. Asami (東京大)・K. T. Kimura (京都大)・Y. Fujita-Fujiharu (京都大)・H. Ishida (東京大)・Z. Zhang (東京大)・Y. Nomura (京都大)・K. Liu (京都大)・T. Uemura (京都大)・Y. Sato (京都大)・M. Ono (京都大)・M. Yamamoto・T. Noda (京都大)・H. Shigematsu (理研)・D. Drew (ストックホルム大)・S. Iwata (京都大)・T. Shimizu (東京大)・N. Nomura (京都大)・U. Ohto (東京大): Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP, *Nature*, 606, 1021-1026 (2022)
- III-3 山本雅貴: 生命科学と創薬研究に向けた相関構造解析プラットフォーム、令和4年度 BINDS シンポジウム (東京)、2022
- III-4 K. Yoshimi (東京大)・K. Takeshita (理研)・N. Kodera (金沢大)・S. Shibumura (C4U)・Y. Yamauchi (東京大)・M. Omatsu・K. Umeda (金沢大)・Y. Kunihiro (金沢大)・M. Yamamoto・T. Mashimo (東京大): Dynamic mechanisms of CRISPR interference by *Escherichia coli* CRISPR-Cas3, *Nat Commun*, 13, 4917 (2022)
- III-5 C.C. Gopalasingam (理研)・H. Egami・K. Fukumoto・M. Sakaue・H. Shigematsu (理研)・M. Yamamoto・T. Tosha (理研)・K. Muramoto・Y. Shiro: CryoEM Structure of Monomeric qNOR from a Bacterial Pathogen Uncovers Key Structural and Functional

Rationalizations for Superior Nitric Oxide Detoxification in Dimeric qNOR, 10th Asian Bioinorganic Chemistry Conference (神戸市) , 2022

- III-6 K. Sakaniwa (東京大)・A. Fujimura (東京大)・T. Shibata (東京大)・H. Shigematsu (理研)・T. Ekimoto (横浜市大)・M. Yamamoto・M. Ikeguchi (横浜市大)・K. Miyake (東京大)・U. Ohto (東京大)・T. Shimizu (東京大) : TLR3 forms a laterally aligned multimeric complex along double-stranded RNA for efficient signal transduction, Nat Commun, 14, 164 (2023)

## 生命科学専攻

博士前期過程

尾松美音

五代乃々花

大恵千翔

## 科学研究費補助金等

- 1 (国研) 日本医療研究開発機構 生命科学・創薬研究支援基盤事業 (令和4年度～令和8年度)  
研究課題 生命科学と創薬研究に向けた相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化  
研究代表者 山本雅貴
- 2 科学研究費補助金 (令和元～5年度) 新学術領域研究 (研究領域提案型) 課題番号: 19H05783  
研究領域 高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用  
領域代表 岩田 想  
研究課題 動的構造解析に資する固定ターゲット微小結晶構造解析法の開発  
研究代表者 山本雅貴

## Molecular Biochemistry II

## 生体物質化学 II

## I ゴルジ体ストレス応答の解析

## The Analysis of the Golgi Stress Response

吉田秀郎・佐々木桂奈江

Yoshida, H., Sasaki, K.

ゴルジ体は分泌タンパク質や膜タンパク質の糖鎖修飾や選別輸送を行う細胞小器官であるが、細胞内のゴルジ体の存在量はゴルジ体ストレス応答と呼ばれる機構によって厳密に制御されている。ゴルジ体ストレス応答は小胞体ストレスと同様、細胞小器官の量的調節機構の一つであり、学術上非常に重要な研究課題である。われわれは、N 型糖鎖修飾や選別輸送に関与する因子の発現を制御するゴルジ体ストレス応答の一経路である TFE3 経路をこれまでに同定した。転写因子 TFE3 は TFE3 経路を制御する主要な転写因子であり、平常時にはリン酸化されることによって細胞質に繫留されて不活性な状態に保たれているが、ゴルジ体ストレス時には脱リン酸化されて核へ移行し、転写制御配列 GASE に結合して N 型糖鎖修飾の修飾酵素や選別輸送因子遺伝子の転写を誘導する。一方、もう一つの転写因子 MLX はゴルジ体ストレス時に核へ移行して GASE に競合的に結合し、TFE3 の GASE 結合を阻害することによってゴルジ体ストレス応答を負に制御している。TFE3 を脱リン酸化する脱リン酸化酵素や TFE3 経路のセンサー分子を Genome-wide siRNA library screening によって検索した結果、いくつかの制御因子候補を単離することが出来た（東京大学薬学研究科一条秀憲博士・名黒功博士との共同研究）。

また、ゴルジ体で起こる他のタイプの糖鎖修飾に関与する因子の発現を制御するゴルジ体ストレス応答の新規経路についても解析を進めている。具体的には、コンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸のようなプロテオグリカンの糖鎖修飾を制御するプロテオグリカン経路、消化管などの粘膜に存在するムチン型糖鎖修飾を制御する mucin 経路、小胞体からゴルジ体へのコレステロール輸送を制御するコレステロール経路について、転写制御因子や転写制御配列を同定しようと試みている。これまでに、プロテオグリカン経路を制御しているエンハンサー配列として PGSE を同定し、PGSE 配列に結合してプロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF2 と KLF4 を単離した。興味深いことに、KLF2 と KLF4 の発現は、プロテオグリカン経路によって誘導されることがわかった。現在は、GeCKO スクリーニングによってセンサー分子を検索しようとしている。また、GeCKO スクリーニングによってコレステロール経路の制御因子を探索したところ、PITPNB と PI4KA、PI4KB、CDIPT を単離した。ムチン経路に関しては、エンハンサー配列 MGSE と転写因子の候補を複数単離している。

## II 小胞体ストレス応答の解析

## The Analysis of the ER Stress Response

吉田秀郎・佐々木桂奈江  
Yoshida, H., Sasaki, K.

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の合成とフォールディングを司る細胞小器官であるが、細胞内の小胞体の存在量は小胞体ストレス応答と呼ばれる機構によって厳密に制御されている。小胞体ストレス応答も細胞小器官の量的調節機構の一つであり、細胞生物学の根幹に関わる命題の一つであるとともに、神経変性疾患など様々な疾患の発症と強く関連している。これまでにわれわれは、小胞体ストレス応答依存的な転写誘導を制御するエンハンサー配列 ERSEや転写因子 pATF6(N) やセンサー分子 pATF6(P)、活性型転写因子 pXBP1(S)と制御因子 pXBP1(U)、調節因子 UBC9 を同定した。これらの制御因子の機能解析と立体構造解析を並行して行うことによって、小胞体ストレス応答の分子機構をピコバイオロジーのレベルで解明する。現在は、pXBP1(U)に結合する因子 CK2α の解析を中心に研究を進めている。また、GeCKO スクリーニングによって小胞体ストレス応答の新規制御因子を検索中である。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Dang TT, Kim MJ, Lee YY, Le HT, Kim KH, Nam S, Hyun SH, Kim HL, Chung SW, Chung HT, Jho EH, Yoshida H, Kim K, Park CY, Lee MS, Back SH. Phosphorylation of EIF2S1 (eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) is indispensable for nuclear translocation of TFEB and TFE3 during ER stress. *Autophagy*. 2023 Feb 9;:1-32. doi: 10.1080/15548627.2023.2173900.
- I-2 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答:ゴルジ体の量と質を制御するサーベイランスシステム 第 95 回日本生化学会大会 (2022)
- I-3 佐々木 桂奈江、櫻井 香里、養王田 正文、山地 俊之、花田 賢太郎、吉田 秀郎、甲賀 大輔 電子顕微鏡新技術を駆使したゴルジ体ストレス及び細胞死の解析 第 45 回日本分子生物学会年会 (2022)
- I-4 佐々木桂奈江、森下史、足立拓弥、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、吉田秀郎 OSW-1 によって起こるゴルジ体ストレスや細胞死はゴルジ体の PI4P によって制御される 第 74 回日本細胞生物学会大会 (2022)
- I-5 三宅 衣織奈、坂本 美憂、小森 亮太、若林 貞夫、佐々木 桂奈江、吉田 秀郎 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF2 と KLF4 の発現制御機構 第 45 回日本分子生物学会年会 (2022)
- I-6 岡本 明日香、岩崎 洸介、小森 亮太、柱谷 詩織、若林 貞夫、名黒 功、一條 秀憲、佐々木 桂奈江、吉田 秀郎 ゴルジ体ストレス応答 TFE3 経路の制御因子の検索 第 45 回日本分子生物学会年会 (2022)

## 生命科学専攻

博士前期課程

岡本明日香：ゴルジ体ストレス応答の TFE3 経路の包括的解析

三宅衣織奈：ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF4 の解析

向井田弥来：ゴルジ体ストレス応答ムチン経路の解析

岡植龍：ゴルジ体ストレス応答コレステロール経路による転写制御機構の解析

檀本武澄：ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の制御因子の検索

柱谷志織：ゴルジ体ストレス応答 TFE3 経路の制御因子の探索

本多一樹：ゴルジ体ストレス応答コレステロール経路の制御因子の解析

田中伶知：ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写因子 KLF2/4 の標的遺伝子の検索

## 科学研究費補助金等

### 1 革新的先端研究開発支援事業 課題番号23gm1410012h0001 (令和4年度)

研究課題 ゴルジプロテオスタシスの理解と疾患への応用

研究代表者 吉田秀郎

### 2 科学研究費補助金(基盤研究C) 課題番号 22K06208 (令和4年度)

研究課題 ゴルジ体ストレス応答機構の全容解明

研究代表者 吉田秀郎

### 3 武田科学振興財団(特定研究助成)(令和4年度)

研究課題 小胞体・ゴルジ体ストレス応答を軸とした新規創薬戦略の基盤構築

研究代表者 吉田秀郎

### 4 東京医科歯科大学難治疾患共同研究拠点共同研究 課題番号2022-国内08 (令和4年度)

研究課題 ゴルジ体ストレス応答と新規オートファジー機構 GOMED の接点から迫る  
抗がん剤開発のための基礎研究

研究代表者 吉田秀郎

## Molecular Biomachine

## 分子機械学

**I 出芽酵母を用いた空間的・量的 tRNA 動態の解析**

Analyses of tRNA kinesis, dynamics of abundance and localization of tRNAs, in budding yeast

吉久徹

Yoshihisa, T.

真核生物の tRNA は、転写後に様々な修飾を受けて成熟化し、最終的には細胞質で働く。一部の tRNA は intron を含んだ前駆体として転写されるが、ほとんどの intron は anticodon 近傍に挿入されており、その splicing は tRNA の機能化に必須である。tRNA の splicing は、mRNA とは異なり、タンパク質のみから成る酵素群が司るが、我々は出芽酵母の splicing 酵素群が、細胞質、特にミトコンドリア表面で働くこと、さらには、成熟体 tRNA が細胞質と核とを行き来しながらその一生を過ごすことを見出している。現在、この過程を司る分子機構の全貌を明らかにするため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を進めている。

さらに近年、tRNA のレパートリーが、生理的環境や生物の発生段階、組織形成に応じて変化するという証拠が得られつつある。我々は、tRNA 量の新規絶対定量法である OTTER 法を開発し、また、積極的な tRNA 量の改変系を構築することで、tRNA レパートリーの生理的環境に応じた動態の詳細や、それを可能にする機構、さらには、そうしたレパートリー変化が翻訳をはじめとする生理機能へ及ぼす影響を解析している。この中で、定常期における tRNA レパートリー形成への自食作用の影響についても研究を進め、一部の tRNA が選択的自食作用で液胞に取り込まれていることを明らかにしている。また、複数の同義遺伝子にコードされる tRNA について、個々の tRNA 遺伝子の tRNA 産生、生育への寄与を解析する為に、tRNA<sup>Trp</sup>CCA についてシステムティックな多重欠失変異株セットを構築し、tRNA の産生については個々の tRNA の寄与はほぼ透過であるものの、遺伝子によっては生育への寄与に違いがあることを突き止めた。

**II 出芽酵母の tRNA 遺伝子に含まれる intron の生理的意義の解析**

Studies on physiological functions of tRNA introns in budding yeast

吉久徹

Yoshihisa, T.

前駆体 tRNA 中の intron は除かれることが tRNA の機能化に必須だが、逆に言えば tRNA 遺伝子に intron は必要なのだろうか？我々は、染色体上の遺伝子組換えが容易な出芽酵母の特性を生かし、tRNA の種類毎に、intron を持つ遺伝子全てを intron 欠失型に置き換えるプロジェクトを進め、



全ての isoacceptor tRNA にとって intron は必ずしも必要でないことを明らかにしている。intron 欠失株の表現型解析を進めるなかで、tRNA-Ile<sup>UAU</sup> の intron が必要なアンチコドン修飾に必須であるだけでなく、不必要な修飾を防ぐ役割を持つこと、intron 欠失株の一部では、rRNA の成熟化や核小体の形態に異常が見られることを明らかにした。現在、tRNA-Leu<sup>CAA</sup> の intron 欠失株において、intron 欠失の mRNA レポートリーや翻訳への影響を網羅的な解析で検討し、特に ribosome タンパク質の翻訳に影響が出ていることを見出した。現在、tRNA intron と ribosome の機能化の関係について研究を進めている。

### Ⅲ 一時的翻訳停止を必要とする mRNA の翻訳再開と品質管理回避のメカニズムの解析

Investigation of mechanisms that allow translational restart and avoidance from mRNA surveillance of certain mRNAs that require tactical translational arrest for their regulation.

吉久徹  
Yoshihisa, T.

出芽酵母の小胞体ストレス応答の鍵転写因子である Hac1 は、tRNA 型の細胞質スプライシングを受けるめずらしい mRNA から翻訳される。しかし、前駆体 *HAC1* mRNA は、(1) 翻訳停止状態にあること、(2) 見かけ上、未成熟終止コドンと認識されうる読み枠構造をもつこと等から、mRNA の品質管理機構によって分解されるべき特性を持つにもかかわらず、非ストレス下で安定な休眠状態にある。他の mRNA でも、その 2 次構造や rare codon を用いた一時的翻訳停止を用いて、タンパク質のドメイン毎の折りたたみを可能にする例があるが、こうした mRNA の翻訳停止機構がある程度理解されているに対し、その翻訳再開機構はよくわかっていない。当然、こうした mRNA もこれらも見かけ上、RNA の品質管理に抵触している。そこで、*HAC1* mRNA をはじめとする一時的翻訳停止を伴う mRNA の品質管理回避や、翻訳再開の機構について研究を進めている。特に、*HAC1* mRNA の翻訳制御にも関わり、この mRNA の細胞質スプライシング因子でもある Rlg1 に着目した解析を進めている。この中で、小胞体ストレス応答不全となる *rlg1* 変異の中には非ストレス下の *HAC1* mRNA が不安定になる変異があること、また、小胞体ストレス下では酵母 Ski 複合体が *HAC1* の翻訳制御に関わることを明らかにした。

一方、複数のリボソームが同じ mRNA 分子上に並んで翻訳を進めるのが普通であるが、一部の mRNA では十分な長さがあるにもかかわらず、1 分子の mRNA に 1 個のリボソームしか結合しない状態(モノソーム状態)で翻訳される。こうした mRNA の翻訳制御についても研究を進めている。特に、こうした mRNA の一部では、Puf3 という RNA 結合タンパク質がモノソーム状態を保つことに関わることが明らかとなった。さらに、一部のミトコンドリアタンパク質の mRNA には、非典型的な Puf3 結合配列が見られることも明らかにした。さらに、ribosome タンパク質 Rps7 のパラログの発現制御の相互作用に関する研究も展開している。

## IV 原生動物の運動に関与する分子機械

Studies on biomolecules responsible for motility of protozoa

園部誠司・吉久徹  
Sonobe, S., Yoshihisa, T.

原生動物は1個の細胞が1個体であり、運動、摂食、分裂、環境応答など多細胞生物が持つ様々な機能を同等に持っているが、1細胞であるがゆえに多細胞生物の細胞には見られない独特の様式でこれらの機能を発現している。特に運動様式は特殊なものが多くみられる。しかし、そこで用いられている運動タンパク質は微小管、アクチンといった多細胞生物と共通のものである。さまざまな原生動物を用いて、それらの特殊な運動様式の仕組みの解明を行い、それを通じて運動機構の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。

## V 植物小胞体の形態形成に関与する分子機械

Studies on biomolecules responsible for morphogenesis of  
endoplasmic reticulum in plant cells

横田悦雄・吉久徹  
Yokota, E., Yoshihisa, T.

植物細胞の機能発現において、細胞骨格は重要な役割を果たしている。原形質流動におけるアクチン-ミオシン系の役割について、研究を行ってきた。植物特異的なミオシン XI による小胞体流動により、原形質流動が引き起こされること、また原形質流動の速度が植物のサイズに影響を及ぼすことを明らかにした。そして輸送だけではなく、小胞体の形態形成機構におけるアクチン-ミオシン系や、小胞体膜タンパク質である RHD3 の役割について解析を行っている。その結果 RHD3 が小胞体膜融合因子であり、リン酸化によりその活性が調節されることが示された。

## VI その他の共同研究

Other collaborations

吉久徹・園部誠司・横田悦雄  
Yoshihisa, T., Sonobe, S., Yokota, E.

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Hayashi, S., Matsui, M., Ikeda, A., and Yoshihisa, T. : Six identical tRNA<sup>TrpCCA</sup> genes express a similar amount of mature tRNA<sup>TrpCCA</sup> but unequally contribute to yeast cell growth. : *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* **86**, 1398–1404 (2022)
- I-2 吉久 徹、笹田 奈友子、入江 百香 : 出芽酵母における tRNA のオートファジー : tRNAutophagy : 第 74 回日本細胞生物学会大会 (2022)
- I-3 Yoshihisa, T., Sasada, N., Irie, M., Taniwaki, N., and Nagai, A. : Multiphasic regulation of tRNA repertoires in budding yeast. : 第 23 回日本 RNA 学会年会 (2022)
- I-4 Sasada, N., Irie, M., Taniwaki, M., Matsui, M., Ikeda, A., Hayashi, S., Nagai, A., and Yoshihisa, T. : Formation and Maintenance of tRNA Repertoires in *Saccharomyces cerevisiae* : The 30th Tokyo RNA Club (招待講演) (2022)
- I-5 林紗千子、松井将也、池田彩乃、吉久徹 : 酵母の 6 つの完全に相同な tRNA<sup>TrpCCA</sup> 遺伝子は、等しく成熟 tRNA<sup>TrpCCA</sup> を供給するものの、生育に遺伝子座固有の影響を持つ。 : 第 45 回日本分子生物学会年会 (2022)
- I-6 Sasada, N., Irie, M., Nagai, A., Taniwaki, M., Hayashi, S., and Yoshihisa, T. : Regulation of tRNA repertoires in the budding yeast. : CSH Asia RNA Biology (国際学会) (2022)
- II-1 林紗千子、吉久徹 : *tL(CAA)* 遺伝子のイントロンの有無との奇妙な繋がり : 出芽酵母での Rps7 パラログ選択性と関連した細胞質及びミトコンドリアでの翻訳 : 第 45 回日本分子生物学会年会 (2022)
- III-1 Hayashi, S. and Yoshihisa, T. : Paralogue-specific regulation of *RPS7eS7* mRNAs via the 3'-UTR in budding yeast. : 第 23 回日本 RNA 学会年会 (2022)
- III-2 Pumilio homologue Puf3p coordinates *CAT5/COQ7* expression noncanonical binding-sequence dependently. : CSH Asia RNA Biology (国際学会) (2022)

## 科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会科学研究費補助金 (令和 2~4 年度) 基盤研究(C) (一般) 課題番号 20KT06490  
 研究課題 tRNA レパートリー形成のための tRNA 遺伝子の発現制御機構の解明  
 研究代表者 吉久徹
- 2 日本学術振興会科学研究費補助金 (令和 3~4 年度) 学術変革研究(A)・公募研究 課題番号 21H05726  
 研究課題 tRNA レパートリーの変化が与えるタンパク質の多面性  
 研究代表者 吉久徹

## Biological Signaling

## 生体情報学Ⅱ

## 細胞周期におけるゲノム維持機構の解明

## Cell Cycle control on genome maintenance

西谷秀男・塩見泰史・林晃世

Nishitani, H., Shiomi, Y., Hayashi, A.

遺伝情報を維持するため、染色体 DNA は細胞周期において一度だけ正確に複製され倍加したのち、均等に分配される。また、細胞増殖の過程においてエピジェネティックな情報を維持するため DNA 複製に伴うクロマチン形成も正確に遂行されなければならない。我々は、このような遺伝情報の維持継承の基本となる制御機構の解析として、染色体の複製を“一回のみ”に制御する機構（ライセンス化制御）について解析を進めてきた。現在、1) ライセンス化制御の中心的な因子である Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作用機構、2) 再複製の誘導過程と細胞応答の解析、そして、3) ゲノムの維持と制御に必須な PCNA の機能を正に負に制御する反応機構について研究を展開している。

## 1) CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの制御機構の解析

Cdt1 は、DNA ヘリカーゼである MCM2-7 のクロマチンローディングを担う DNA 複製のライセンス化因子で、S 期が開始すると、再複製を抑制するために速やかに分解される。この時に働く CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼは、クロマチンにロードされた PCNA に Cdt1 が結合するとポリユビキチン化する。我々はこれまでに、Cdt2 の C 末領域に存在する PIP ボックス及び DNA 結合領域が Cdt1 の分解を正に制御することを明らかにした。一方、Cdt2 は S 期以降にリン酸化され M 期にピークとなる。C 末に存在する 18 ヶ所の CDK リン酸化コンセンサス配列に変異を導入すると(Cdt2(18A))、ほぼリン酸化が抑制される。このリン酸化は Cdt2 と PCNA との結合に抑制的に働く。PCNA との結合は PIP ボックスに依存したことから、リン酸化により PIP ボックスと PCNA の結合が抑制されると考えられた。そこでまず、C 末領域のみで PCNA との結合がリン酸化により制御されることを、C 末(390-730)領域の 18A 変異体にて免疫沈降し PCNA との結合が増強することで確かめた。続いて、18 ヶ所から重要な部位を同定するため、リン酸化が報告された 6 ヶ所の変異 Cdt2(6A)および PIP ボックス近傍変異 Cdt2(5A)を作成し、細胞にて発現させ、PCNA のモノユビキチン化レベルで調べると、Cdt2(18A)に比較して Cdt2(6A)および Cdt2(5A)ともモノユビキチン化レベルが半減しており、抑制的リン酸化の一部に関わると考えられた。Cdt2(6A)の安定発現細胞を確立し PCNA との結合を調べると、一部の S 期細胞にて PCNA に Cdt2(6A)が強く結合することがわかった。これらの細胞は PCNA のパターンより S 期初期のものと考えられ、Cdt2 のリン酸化は S 期を通して増加するので、S 期後期になると 6A 以外の部位のリン酸化が関与することが考えられた。

## 2) 再複製の過程の解析

細胞が再複製を開始する過程において、どの様に再複製が開始し、また、細胞はどのような応答を示すのかも重要な課題である。細胞を Nedd8 化阻害剤である MLN4924 で処理すると、CRL4 を含む Cullin ファミリーユビキチンリガーゼが抑制され、通常分解されるライセンス化因子 Cdt1 が S 期以降においても蓄積し、DNA の過剰な複製が起こる。この系を用いて再複製の過程を解析した。MLN 投与後、3 時間程度で Cdt1 は安定に蓄積が見られ、12 時間後に再複製によると推測される DNA 損傷である  $\gamma$  H2AX がほぼ全ての細胞で検出された。一方、再複製と捉えられる 4C 以上の DNA を有する細胞は 24 時間後に見られた。EGFP-PCNA 発現 U2OS 細胞でライブ観察すると、通常の S 期様の foci が観察されたのち G2 期に移行し、かなりの時間を経たのち (M 期には進行せず)、再複製を反映すると推測される S 期初期様の PCNA foci が観察された。今後、MCM2-7 の結合を調べることでより再ライセンス化がどの様に確立するのか解析する必要がある。

また、DNA 損傷時にカルシウム応答が寄与することが報告されたことを受けて、再複製誘導時における  $[Ca^{2+}]$  の変化を調べた。カルシウムセンサー GCaMP6 の安定発現 U2OS 細胞を作成し MLN4924 投与後、再複製が観察される 24 時間にて核内での顕著な  $[Ca^{2+}]$  の増加を観察した。再複製に伴う障害による細胞死から守ろうとする応答ではないかと考えられる。

### 3) PCNA の機能を制御する反応機構の解析

ゲノムの維持と細胞増殖の過程では、複製をはじめとした修復や組換えの反応に DNA 結合した PCNA が必須であり、様々な因子の DNA 集合と、その反応制御に機能する。PCNA の DNA 結合と除去を行うのが RFC 複合体ファミリーで、RFC1-RFC と Ctf18-RFC が PCNA の DNA 結合を担っている。もう一つの RFC 複合体である Elg1-RFC については、PCNA の DNA からの除去を特異的に行っていることが私たちの解析から示された。ヒト細胞内の Elg1 発現を抑制すると、複製期の DNA に過剰に結合した PCNA や細胞周期進行の遅延、核内クロマチン構造や染色体構造の異常が見られた。以上のことから、PCNA の DNA 結合だけでなく、積極的な PCNA 除去もゲノム維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

一方、Elg1 発現抑制細胞でも複製が終了した G2 から M 期にかけて PCNA が DNA から除去されることが示され、M 期への進行過程で機能する新規 PCNA 除去機構の存在が示唆された。これについて解析を進めると、ユビキチンリガーゼの TRAIP が PCNA 除去に寄与することがわかってきた。TRAIP 発現抑制細胞の DNA 画分では、対照細胞と比較して複製期中の PCNA 量に差はないが、M 期では PCNA が DNA に残存していたことから、TRAIP は M 期進行時に Elg1-RFC とは独立したタイミングで機能する因子であることがわかった。さらに解析を進めたところ、TRAIP は S 期から M 期にかけて発現量が増加すると共に、CDK1 によるリン酸化で PIP box を介した PCNA との相互作用が安定化し、PCNA の除去に機能することが分かってきた。そこで、TRAIP による M 期での PCNA 除去に関連したゲノム維持について解析を進めると、次の G1 期における複製開始複合体の形成に要求されることが示唆されたので、現在さらに詳細な解析を進めている。

## 発表論文 List of Publications

- 1 飯田康介、渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：DNA再複製に伴う細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度変化の解析 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30日～2022年12月2日

- 2 田所あすか、西谷秀男、塩見泰史：新規PCNA除去機構におけるTRAIPの機能解析 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30日～2022年12月2日
- 3 塩見泰史、田所あすか、鐘巻将人、西谷秀男：クロマチンからのPCNA除去に関連したDNA複製制御 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30日～2022年12月2日

## 生命科学専攻

### 博士前期課程

- 飯田康介 : 再複製に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの解析
- 田所あすか : PCNA 新規除去機構における TRAIP の機能解析
- 野原 颯 : リン酸化による Cdt2 の PCNA 結合制御の解析
- 清水優輝 : 共に PCNA のクロマチンからの除去に機能する、ELG1 と TRAIP の関係性
- 松原和司 : Elg1-RFC の PCNA 除去機能制御に関わる新規因子の解析

## 科学研究費補助金等

- 1 令和4年度 学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C)
  - 研究課題 DNA 複製により起動する選択的タンパク質分解によるゲノム維持機構
  - 研究代表者 西谷秀男

## I ユビキチン-プロテアソーム経路反応機構の解明

X-ray structural analysis of the ubiquitin proteasome pathway

水島恒裕・中井朋則・西尾和也

Mizushima, T., Nakai, T., Nishio, K.

ユビキチンによる翻訳後修飾は、特異的タンパク質分解・DNA 修復・転写・免疫応答等を調節するシグナル伝達経路の制御において中核的な役割を担っている。本経路において不要タンパク質を認識しユビキチンを付加するユビキチンリガーゼはヒトでは約 600 種類存在し、状況に応じ適切なシグナル伝達の役割を担う。また、ユビキチン化修飾されたタンパク質は分子量 250 万、66 サブユニットからなる超分子複合体タンパク質 26S プロテアソームにより特異的に分解される。これら高度なシステムで機能するタンパク質群の立体構造を決定することによりその反応機構の解明を目指す。

## II 病原菌エフェクタータンパク質の構造解析による感染機構の解明

Structural analysis of bacterial effector proteins to reveal the pathogenic mechanism

水島恒裕・中井朋則・西尾和也

Mizushima, T., Nakai, T., Nishio, K.

病原細菌は感染に際しエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞に分泌し、宿主の持つ防御機構を妨げることにより感染を拡大する。その際、病原細菌エフェクターは宿主の炎症応答・細胞接着・オートファジー等を制御するタンパク質に作用し防御応答を阻害する。病原細菌エフェクターと宿主内標的タンパク質の複合体構造を、構造生物学的手法を用いて解析することにより感染機構の理解を目指す。

## III 種子内部構造の X 線 CT による解析

Analysis of internal structure of seeds using X-ray computed tomography

山内大輔・中井朋則・峰雪芳宣

Yamauchi, D., Nakai, T., Mineyuki, Y.

種子は乾燥していて休眠状態にあり、吸水するとその中の胚は生命活動を再開して発芽する。その過程に起こる種子中での構造変化を観察する時に、種皮が種子の周りを覆っており、支障となっている。しかし、X線CT技術を用いれば、固定や切片作製をしなくても種子内部構造を観察可能である。SPRING-8のBL20B2を利用してイネ種子の吸水過程を連続撮影する方法について検討を行った。また、富山大学などとの共同研究で植物のX線CTの画像解析法についても検討を行った。

## VI なたまめ茶成分の解析

Analysis of peptides in a tea from roast sword bean seeds

山内大輔  
Yamauchi, D.

ナタマメは漢方薬として利用され、その種子を煎って、お茶（なたまめ茶）として飲まれている。しかしながら、このお茶に含まれる成分に関する研究はほとんど行われていない。そこで、なたまめ茶を実際に作って、その中に含まれるペプチドを種子貯蔵タンパク質に対する抗体を用いて解析した。

## V シダの前葉体における造精器形成機構の解析

Analysis of formation of antheridium in prothallia of fern

山内大輔・峰雪芳宣  
Yamauchi, D., Mineyuki, Y.

シダの前葉体における造精器形成の誘導が、カニクサではジベレリンによって行われていることがよく知られているが、その機構についてはよくわかっていない。そこで、ジベレリンがなくても造精器を形成する突然変異体等について形態的な観察を行った。

## VI 分裂準備帯の形成機構と機能の解析

Analyses of development and function of preprophase bands

中井朋則・山内大輔・水島恒裕・峰雪芳宣  
Nakai, T., Yamauchi, D., Mizushima, T., Mineyuki, Y.



分裂準備帯 (preprophase band) は、高等植物体細胞分裂の分裂面挿入位置決定に関与する微小管でできた装置である。この装置は G2 期に出現し、前期に完成するが核膜崩壊前後に消失する。しかし、この装置が存在した位置になんらかの位置情報が残され、細胞分裂の最後で、確実に細胞板はこの位置に向かって伸長する。我々は、どのようにして微小管が将来の分裂面の位置に分裂準備帯として並ぶのか、分裂準備帯が消失した後に残るメモリーは何か、また、そのメモリーの蓄積機構は何か、を明らかにすることを目的として研究を行っている。現在は、分裂前期に発現するサイクリン依存リン酸化酵素、CDKB1 について解析を行っている。

## Ⅶ 植物の細胞分裂と細胞質分裂に関与するナノマシンの解析

Analyses of nano-machines involved in plant cell division and cytokinesis

中井朋則・山内大輔・峰雪芳宣

Nakai, T., Yamauchi, D., Mineyuki, Y.

生命体を構成する生体分子は集合してナノマシン、あるいはより高次のナノシステムを形成し生命活動を行っている。植物の細胞質分裂に関与する微小管・アクチン繊維・膜系からなるナノマシン・ナノシステムの構築と制御機構を様々な顕微鏡を使って解析している。特に、国内外の幾つかの研究室と共同で、加圧凍結・2 軸電子線トモグラフィー法を使ったナノマシンの～7 nm レベルでの解析を行っている。昨年度に引き続き、分裂準備帯以外のアクチンシステムの解析を行った。

## Ⅷ 細菌由来セルロースの合成機構

Mechanism of cellulose production from bacteria

中井朋則・水島恒裕・峰雪芳宣

Nakai, T., Mizushima, T., Mineyuki, Y.

酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* が生産するセルロースは、他の細菌が合成するセルロースと比較して、高等植物のセルロースと結晶構造が近く、その合成機構の解明は植物由来セルロースの合成機構の解明にも直結している。特に、セルロース分解酵素であるセルラーゼが植物でも細菌でもセルロースの合成に深く関与していることが知られている。このセルラーゼの機能を調べるにあたり、セルラーゼ遺伝子破壊株の合成するフィブリルの形態を観察する必要がある。セルラーゼ遺伝子破壊株及び野生株の合成するセルロース繊維について、ネガティブ染色を行った試料から電子線トモグラムを作製し、3次元構造解析を進めている。

## 発表論文 List of Publications

I-1 西尾和也・中務邦雄・嘉村巧・水島恒裕：X 線結晶構造解析による赤痢菌エフェクター

- IpaH1.4/2.5 の LUBAC 阻害機構の解析、第 5 回ピコバイオロジー研究会 2022 年 12 月 8 日 兵庫
- II-1 Structural insight into the recognition of the linear ubiquitin assembly complex by Shigella E3 ligase IpaH1.4/2.5. Hragi, K., Nishide, A., Takagi, K., Iwai, K., \*Kim, M., Mizushima T., *J. Biochem.* **173**, 317-326. (2023)
- II-2 平木慶人・西出旭・高木賢治・Kim Minsoo・水島恒裕：X 線結晶構造解析による赤痢菌エフェクター IpaH1.4/2.5 の LUBAC 阻害機構の解析、令和 4 年度日本結晶学会年会、2022 年 11 月 26 日－27 日 兵庫
- II-3 平木慶人・西出旭・高木賢治・Kim Minsoo・水島恒裕：赤痢菌エフェクター IpaH1.4/2.5 基質認識ドメインの構造及び基質認識機構の解析、第 5 回ピコバイオロジー研究会 2022 年 12 月 8 日 兵庫
- III-1 山内大輔・中井朋則・金子康子・佐藤繭子・豊岡公徳・上杉健太郎・星野真人・玉置大介・唐原一郎・峰雪芳宣：ミヤコグサ種子胚の細胞間隙：発芽には吸水過程でのエアースペース保持が必要、第 86 回日本植物学会 2022 年 9 月 15 日－19 日 京都
- III-2 米田早秀・中井朋則・玉置大介・上杉健太郎・星野真人・唐原一郎・峰雪芳宣・山内大輔：X 線マイクロ CT を用いたミヤコグサ種子吸水過程における形態変化の観察：タイムラプスイメージングによる解析、日本植物形態学会第 34 回大会 2022 年 9 月 16 日 京都
- III-3 Three-dimensionally visualized rhizoid system of moss, *Physcomitrium patens*, by refraction-contrast X-ray micro-computed tomography. Yamaura, R., Tamaoki, D., Kamachi, H., Yamauchi, D., Mineyuki, Y., Uesugi, K., Hoshino, M., Suzuki, T., Shimazu, T., Kasahara, H., Kamada, M., Hanba T. Y., Kume, A., Fujita, Y., Karahara, I. *Microscopy* **71**, 364–373 (2022)
- III-4 唐原一郎・山浦遼平・若林孝尚・平井泰蔵・矢野敦也・小出みなみ・玉置大介・蒲池裕之・山内大輔・峰雪芳宣・曾我康一・藤井伸治・若林和幸・星野真人・上杉健太郎・中井勇介・中野明正・西内巧・高尾泰昌・田浦太志・嶋津徹・笠原春夫・鎌田源司・鈴木智美・小野田雄介・日渡祐二・半場祐子・久米篤・藤田知道：宇宙における植物の生活環－根系の三次元形態の評価を通じた低重力植物栽培条件の最適化を目指して－、第 37 回宇宙環境利用シンポジウム 2023 年 1 月 17 日－18 日 WEB
- IV-1 山内大輔・須藤慶太：なたまめ茶に含まれるコンカナバリン A およびカナバリンの免疫学的検出に関する研究、日本食生活学会誌 **33**, 199–204 (2023)
- VII-1 飯塚駿作・玉置大介・中井朋則・唐原一郎・峰雪芳宣：分裂準備帯形成過程に現れるアクチンウォールとその役割、第 34 回日本植物形態学会 2022 年 9 月 16 日 京都

## 大学院生命科学研究科

博士後期課程

平木慶人：病原細菌エフェクターによる宿主防御経路阻害機構の解析

## 生命科学専攻

博士前期課程

粕谷航平：病原細菌エフェクターの選択的基質認識機構の解析

米田早秀：ミヤコグサ塩基性 7S グロブリンの種子内局在性とその機能の解析

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費助成事業（令和 2～令和 5 年度）基盤研究（B） 課題番号：20H03198  
研究課題 病原細菌エフェクターによる NF- $\kappa$ B 経路を標的とした感染機構の解析  
研究代表者 水島恒裕
- 2 科学研究費助成事業（令和 2～令和 4 年度）基盤研究（B） 課題番号：20H03790  
研究課題 もやもや病や脳梗塞の遺伝性リスク因子の機能解析  
研究代表者 手塚徹、研究分担 水島恒裕
- 3 科学研究費助成事業（令和 2～令和 5 年度）基盤研究（B） 課題番号：20H02878  
研究課題 病原因子の分解を誘導する分子標的型新規抗菌剤の開発基盤の構築  
研究代表者 Kim Minsoo、研究分担 水島恒裕

## Functional Nanometry of Biological Macromolecules

## 生体高分子超精密計測学

### I ショウジョウバエの性行動に対する 社会経験の作用機構の解明

Social modulation of courtship behavior in *Drosophila* males

山元大輔・佐藤耕世  
Yamamoto, D., Sato, K.

キイロショウジョウバエ野生型の雄成虫が、羽化後の集団生活経験に依存して雌への求愛活性を低下させる現象に着目して、その背後にある神経機構を分子および細胞レベルで明らかにすることを目指している。雄の求愛行動をトリガーする能力をもつ脳の介在ニューロン P1 が、羽化後の集団生活経験に依存して膜電流プロファイルを変化させる現象に着目して、その現象を制御する分子を、リボソーム親和性精製 (TRAP) の高感度化とそれによる RNA-seq 解析を通して明らかにする実験を進めている。

### II 寒冷耐性を制御する神経内分泌機構の解明

Neuroendocrine system for the regulation of cold tolerance in *Drosophila*

原 佑介・山元大輔・佐藤耕世  
Hara, Y., Yamamoto, D., Sato, K.

キイロショウジョウバエの雌成虫が示す温度依存的な食性の変化が、脳の機能をどのように変え、季節適応的な寒冷耐性の強化に作用するのか、そのメカニズムの解明を目指している。これまでに、寒冷耐性評価のための新たな実験系を構築した。本実験系を用いて、食餌中に含まれる脂肪酸のうちどの脂肪酸が寒冷耐性強化に重要であるのかを解析した。その結果、寒冷耐性強化に重要な脂肪酸種を特定することに成功した。

### III タンパク質モータ・ダイニンの運動機構の解明

Molecular mechanism of the molecular motor dyneins

石橋健太・榊原 斉・大岩和弘  
Ishibashi, K., Sakakibara, H., Oiwa, K.

タンパク質モータの機能解析に用いてきた試験管内再構成実験を発展させて、自己駆動粒子の集団運動など自己組織的パターン形成のメカニズムを解明している。試験管内再構成系において、発現系細胞質ダイニンで駆動される微小管はネマティック相互作用の結果、束化し、さらに束が蛇行することで渦構造を創出する。数値計算によるシミュレーションから、微小管が示すわずかな運動軌跡のバイアスが、ネマティック相互作用を介して集団として共有されていく過程を明らかにした。この実験系は、個々の素過程(微小管同士の衝突)を正確に記述することが可能であり、かつ集団的挙動も観測できるため、複雑系物理学の理論と実験を結ぶ橋渡的研究と捉えられて注目されている。また、軸

糸断片から重合させた微小管束に軸糸から抽出した外腕ダイニンを加えて、24nm の構造周期を持つダイニン配列を自己組織的に微小管上に形成させた。これによって ATP 添加によってこの微小管束が繰り返し座屈運動を行う系を確立した。この微小管束座屈システムを“synthoneme”と名付け、この数値モデル化を進めた。これらの研究は、集団運動やアクティブマターと呼ばれる物理学の新分野の研究に、生物学の視点から関わるができる実験系を構築したものである。

## IV 単一分子観察・測定技術によるタンパク質モータの運動機構の解析

Single-molecule enzymology and nanometry of protein motors

古田 茜・大岩和弘・古田健也  
Furuta, A., Oiwa, K., Furuta, K.

光ピンセットや全反射励起蛍光顕微鏡システムなどの単一分子計測技術を駆使して、タンパク質モータ・ダイニンやキネシンの運動発生機構の解明を目指している。DNA の相補的結合を利用してナノメートルスケールの高次構造を設計・構築できる DNA origami 技術を活用して、立体的に配置されたタンパク質モータの集団的挙動を解析する実験系を構築して、構造的束縛や数的束縛下でダイニンが創出する協働性を評価する研究を行っている。運動方向の異なるキネシン 1 とキネシン 14 を一本の DNA tube に特定の数結合させることで、分子間綱引きを行わせる実験系を確立、タンパク質モータの運動特性に新たな知見を見出した。また、タンパク質モータの運動機能を構成論的に解析する実験系として、細胞質ダイニンの微小管結合部位 (MTBD) をアクチン結合タンパク質や DNA 結合タンパク質と置換することで、アクチンフィラメントや DNA チューブを滑走させることができる新奇ダイニン分子を創出、アクチンフィラメントや DNA チューブの運動方向も簡易に操作することができることを示した。この結果は、タンパク質モーター一般が方向性のある運動を創出するメカニズムに迫るために重要な知見を与えている。

### 発表論文 List of Publications

- I-1 佐藤耕世・原 佑介 (NICT)・Rindner D. J. (東北大)・伊藤弘樹 (東北大)・山元大輔 (NICT) : 超高感度な遺伝子発現解析システム STRAP による経験依存的な行動発現を制御する遺伝子の解明 第 45 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「多様な病因に潜む共通メカニズムから探る神経発達障害のネオパソロジー」 (千葉) 2022
- I-2 佐藤耕世・原 佑介 (NICT)・Rindner D. J. (東北大)・伊藤弘樹 (東北大)・山元大輔 (NICT) : 超高感度な遺伝子発現解析システム STRAP による経験依存的な行動発現を制御する遺伝子の解明 第 45 回日本分子生物学会年会 サイエンスピッチ (千葉) 2022
- I-3 佐藤耕世・原 佑介 (NICT)・Rindner D. J. (東北大)・伊藤弘樹 (東北大)・山元大輔 (NICT) : 超高感度な遺伝子発現解析システム STRAP による経験依存的な行動発現を制御する遺伝子の解明 第 45 回日本分子生物学会年会 ポスターセッション (千葉) 2022
- I-4 佐藤耕世・山元大輔 (NICT) : 遺伝子解析方法 特願 2022-189772 2022
- II-1 原 佑介 (NICT)・佐藤耕世・郷康弘 (自然科学研究機構)・山元大輔 (NICT) : Diet-dependent electrical and transcriptional changes in brain insulin-producing cells for adaptation to environmental stresses. 第 15 回日本ショウジョウバエ研究集会 (名古屋) 2022
- II-2 原佑介 (NICT)・田中良弥 (名古屋大)・古波津創 (NICT)・佐藤耕世・山元大輔 (NICT) : *Drosophila subobscura* の脳内インスリン産生ニューロンは吻運動を制御して種特異的な求愛行動を生み出す 第 45 回日本神経科学大会 (沖縄) 2022

- III-1 I. Guido (MPI), A. Vilfan(MPI), K. Ishibashi(NICT), H. Sakakibara(NICT), M. Shiraga, E. Bodenschatz(MPI), R. Golestanian(MPI), K. Oiwa : A Synthetic Minimal Beating Axoneme, *Small* **18**, 2107854 (2022) <https://doi.org/10.1002/smll.202107854>
- III-2 K. Oiwa : Creation of novel molecular motors and chemo-sensors on the basis of motor proteins' function and bacterial chemotaxis behavior. The 2nd "Molecules, Materials, Devices and Systems" Workshop at Columbia University (New York, USA) 2022
- III-3 S. Tamai, K. Sato, H. Sakakibara (NICT), K. Oiwa : The waveform and beat frequency of a sperm flagellum of *Drosophila melanogaster*. 第60回日本生物物理学会年会 (札幌) 2022
- III-4 I. Guido (MPI), K. Ishibashi (NICT), E. Bodenschatz (MPI), A. Vilfan (MPI), R. Golestanian (MPI), H. Sakakibara (NICT), K. Oiwa : Reconstitution of the axonemal beating by bottom-up strategy. 第60回日本生物物理学会年会 (札幌) 2022
- III-5 S. Tamai, H. Sakakibara (NICT), K. Sato, K. Oiwa : Helical bending waves superimposed on large helical waves of an extremely long sperm flagellum of *Drosophila melanogaster*. 第67回米国生物物理学会年会 (San Diego CA, USA) 2023
- III -6 S. Tamai, K. Sato, K. Oiwa : Helical bending waves superimposed on large helical waves of an extremely long sperm flagellum of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Asia, CILIA & CENTROSOMES (Awaji, Japan) 2023

## 生命科学専攻

博士後期課程

佐川美咲：タンパク質モータの協同的運動特性の創出メカニズム

博士前期課程

中山慎太郎：タンパク質モータが一方向性を生み出すメカニズムの解明

中村公祐：繊毛虫類 *Spirostomum ambiguum* の伸長運動メカニズムの解明

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金(令和4年度～令和6年度) 基盤研究(B) 課題番号 22H02726  
研究課題名 行動発現のポテンシャルを作り出すニューロン操作技術の創出  
研究代表者 佐藤耕世
- 2 科学研究費補助金(令和2年度～令和5年度) 挑戦的研究(開拓) 課題番号 20K20583  
研究課題名 クシクラゲ櫛板の分子構造の解明と運動性フォトニック結晶開発に向けた基盤研究  
研究代表者 稲葉一男(筑波大学)  
研究分担者 大岩和弘
- 3 科学研究費補助金(令和3年度～令和6年度) 基盤研究(B) 課題番号 21H02455  
研究課題名 昆虫精子鞭毛の運動解析から明らかにする鞭毛波形成・伝播の普遍的メカニズム  
研究代表者 大岩和弘

## Cell and Molecular Biology

## 細胞機能学

I R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質の中  
神経系における役割の解析

Role of R-Ras subfamily small GTPases in the central nervous system

生沼 泉  
Oinuma, I.

神経細胞により構築される複雑かつ緻密な神経ネットワークによって、高次脳機能が発揮される。海馬や大脳皮質の神経細胞は、*in vitro* の初代培養系において時系列順に、細胞体の初期接着、ラメリポディアの萌出、マイナープロセスの形成と伸長、マイナープロセスの中からの軸索決定、軸索の伸長および分枝化、樹状突起の伸長と分枝化を伴った成熟、樹状突起スパインの形成および成熟という段取りで発達していく。その各々の過程で、低分子量 G 蛋白質は、様々な介在タンパク質を用いて神経細胞の形態制御を行うことが知られている。

R-Ras サブファミリーは、R-Ras (R-Ras1)、TC21 (R-Ras2)、および M-Ras (R-Ras3) の3つの構成因子から成る低分子量 G 蛋白質サブグループである。われわれのこれまでの研究で、R-Ras は神経軸索の決定やその後の伸長や分枝の過程に関与していること (Oinuma *et al.*, 2007; Iwasawa *et al.*, 2012)、また、M-Ras が樹状突起の伸長と分枝を伴った成熟の過程に関与している (Saito and Oinuma *et al.*, 2009; Tasaka *et al.*, 2012) ことが明らかになっている。しかしながら、TC21 の生理的役割や、上流・下流のシグナル経路はあまり解明されていない。そこで、今年度は主に、TC21 の脳神経系の構築における生理的役割を解明することを目的として研究を行った。

中枢神経系における各 R-Ras サブファミリーの発現パターンを調べるために、昨年度までは RT-PCR 法や *in situ* hybridization 法を用いた実験アプローチを用いていたが、さらに各遺伝子間の発現量比較における定量性を高めた評価をするために、「エピトープタグノックイン法」の実験システム構築を行った。具体的には、CRISPR/Cas9 システムを用いた受精卵に対するゲノム編集法を用いて、全身の組織において HA タグ配列を R-Ras、TC21、M-Ras それぞれの遺伝子座の開始 ATG の直後に付加することで各低分子量 G タンパク質の時空間的発現量を同一の HA タグの量で定量することを可能とした。現在、この実験システムを用い、各臓器間、各発達時期における TC21 の発現パターンと他の R-Ras ファミリーの発現パターンとの比較解析を進めている。

発現部位の空間的解析の過程で、TC21 は特に網膜神経系において高い発現が見られることが明らかとなった。それを踏まえ、マウス網膜の発達過程における TC21 の役割について、*in utero* electroporation 法 (子宮内電気細孔法) を用いて検証した。TC21 に対して特異的にノックダウン効果を発揮する shRNA ベクターを作成し、新生仔網膜に対しての特異的遺伝子操作により内在性の TC21 に RNA 干渉を用いたノックダウン

を行い、その表現型を解析した。その結果、未分化網膜前駆細胞から視細胞への分化過程に TC21 が必要であることが明らかとなった。

現在、TC21 がどのようなエフェクターを介して上記機能を発揮するかの分子メカニズムについて、引き続き研究を進めている。

## Ⅱ 核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析

### Interaction between nuclear lamina and heterochromatin

廣瀬富美子

Hirose, F.

核膜の裏側に存在する核ラミナは A-type lamin (lamin A) と B-type lamin (lamin B) タンパク質が重合した網目状の繊維構造である。核ラミナは、核膜とクロマチンの両者と相互作用し、転写・DNA 複製・DNA 修復など多岐にわたる核内反応の調節に関わっていることが知られているが、これに関わる因子やその制御メカニズムについては、解明されていない。我々はこの問題を解決するために、核ラミナと相互作用するクロマチン結合因子の精製を試み、lamin A と HP1(heterochromatin protein 1)が相互作用することを見出した。まず、lamin A と HP1 ファミリータンパク質(HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , HP1 $\gamma$ )との相互作用の特異性を調べたところ、HP1 $\beta$ のみが lamin A と相互作用した。HP1 $\beta$  はヘテロクロマチン特異的に結合することが報告されていることを考慮すると、lamin A が HP1 $\beta$ との結合を介してヘテロクロマチンと相互作用している可能性が考えられる。R4 年度は、ヘテロクロマチンの核膜直下への配置に lamin A-HP1 間相互作用が関与しているかどうかを調べることを目的に、HP1 と lamin A の核内ダイナミクスを追跡するために、両者の相互作用を生細胞で検出できる Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析システムを樹立し、この方法を用いて両タンパク質の生細胞内での相互作用の時期と場のライブイメージング撮影を行った。さらに、免疫沈降法による両者の相互作用を検出した。ところで、よく保存されたファミリータンパク質の中で HP1 $\beta$ のみが lamin A と相互作用することは HP1 ファミリータンパク質の機能分担を知る手がかりとして興味深い。そこで、このことを明らかにするために、lamin A との特異的な結合に関わる HP1 $\beta$  上のアミノ酸配列を決定する試みをはじめた。そのために、HP1 $\beta$  の欠失変異体、アミノ酸置換変異体、他の HP1 ファミリータンパク質ファミリーとのキメラ HP1 $\beta$  変異体の発現系の準備を開始した。これらの変異体を用いて lamin A との相互作用を BiFC および免疫沈降法で解析する予定でいる。

### 発表論文等 List of Publications

- I-1 松田孝彦、生沼泉：エピトープタグノックインマウスを用いた R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質の発現解析。ポスター発表 第 95 回日本生化学会大会（令和 4 年 11 月、Web 開催）



## 科学研究費補助金等

### 1. 科学研究費助成事業（基盤 B）（令和 2 年度-令和 4 年度）

研究課題      ガイダンスシグナルのハブ分子としての低分子量 G 蛋白質 R-Ras  
                         の機能解析

研究代表者    生沼    泉

### 2. 公益財団法人    島津科学技術振興財団    研究開発助成（令和 3 年度-令和 4 年度）

研究課題      遺伝子機能の *in vitro* ならびに *in vivo* における定量的比較計測法  
                         の開発

研究代表者    生沼    泉

## Cellular Structural Physiology

## 細胞構造学

### I 液体試料微細形態観察への低温電子顕微鏡法の応用

Application of cryo-electron microscopy to the microstructure observation of liquid samples

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

Nishino, Y., Kashino, Y., Miyazawa, A.

低温電子顕微鏡法では、細胞や生体分子をはじめとした含水生物試料を非晶質に凍結して、凍結状態のまま電子顕微鏡で観察することにより、化学固定や脱水による構造アーティファクトのない、含水状態のままの微細構造を解析することができる。2種類以上の混ざり合わない液体成分から成るエマルジョン溶液や、溶媒中でコロイド状に分散した高分子化合物、無機化合物などの液体試料について、低温透過電子顕微鏡法または低温走査電子顕微鏡法を用いた微細構造観察の検討を行った。その結果、生物試料を観察するための試料調製法を応用することにより、様々な液体試料に対して幅広く、低温電子顕微鏡法により微細構造が観察できることが示された。

### II 胚性幹細胞から骨格筋細胞への分化誘導の研究

Study of inducing differentiation from embryonic stem cells into skeletal muscle cells

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

Nishino, Y., Kashino, Y., Miyazawa, A.

胚性幹細胞から様々な組織細胞への分化誘導法が知られているが、骨格筋細胞については未だに再現性の高い分化誘導法が確立されていない。これまでに、接着培養した胚様体に、スベルミンを一時的に添加して培養することにより、骨格筋を含む筋繊維シートを形成させる方法が報告されているが、シートの形成率が低く、胚様体の20~30%程度に留まっていた。そこで、この方法を最適化するために、胚様体の大きさ、スベルミンを添加するタイミングや濃度、培養日数の検討を行った。その結果、約50%の胚様体から骨格筋を含む筋繊維シートを形成させることができた。また、電子顕微鏡を用いて筋繊維シートを観察したところ、細胞内にサルコメアを確認することができた。

### III ニコチン性アセチルコリン受容体の分子局在解析に向けた標識用金コロイド粒子の研究

## Study on the colloidal gold labelling for molecular localization analysis of nicotinic acetylcholine receptor

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

Nishino, Y., Kashino, Y., Miyazawa, A.

神経筋接合部のポストシナプス膜では、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) が、様々なタンパク質と相互作用しながら集積してクラスターを形成することにより、効率の良い情報伝達が行われている。クラスター形成時における nAChR の分子局在の変化を調べるために、一般的な間接抗体法より精密な分子の位置を調べる事が可能な、抗 nAChR 抗体 Fab'フラグメント結合金コロイド粒子の調製法を検討した。その結果、筋管細胞表面の nAChR を特異的に標識することが可能な金コロイド標識分子を作製することができた。

## IV 光合成初期過程と電子伝達超複合体の構造と 機能の研究

Structure and function of super complexes of photosynthetic  
electron transport systems

菓子野康浩・西野有里・宮澤淳夫

Kashino, Y., Nishino, Y., Miyazawa, A.

光合成における光エネルギーの化学的エネルギーへの変換を担う2つの光化学反応中心複合体(光化学系 I および II)のうち、光化学系 II 複合体の構築過程および構成タンパク質機能の解析を進めた。また、クロロフィル *d* を主要色素とし、可視光よりもエネルギーレベルの低い遠赤色光を使って酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアの光化学系複合体の構造解明に向けた解析を進めた。解明した光化学系 I 複合体の構造から得られた各色素の位置情報を利用して理論計算を進め、色素間の光エネルギー伝達を解析した。南極に自生する緑藻の一種が、南極の自然環境下で遠赤色光を捕集して光合成に利用するための光捕集色素タンパク質の構造を解明した。

## V 珪藻などの微細藻類についての生理・生化学的研究 およびその利用

Physiological and biochemical study on diatom and its application

菓子野康浩・西野有里・宮澤淳夫

Kashino, Y., Nishino, Y., Miyazawa, A.

海洋の珪藻は地球の光合成の約 25% を担っている重要な光合成生物である。そのような珪藻の特質を温暖化抑止のために利用するための開発研究を進めた。そのために、珪藻の野外光下での光合

成特性を解析するとともに、社会実装を目指した野外での安定高密度大量培養技術の構築に努めた。そして、大量培養後の珪藻のバイオ燃料生産以外の利用について検討を進めた。組換え藻類の第一種利用に向けた共同研究を進めた。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Takeaki Shibata (東京大), Hiroki Kawana (東京大), Yuri Nishino, Yoshiko Ito, Hiroyasu Sato (東京大), Hirofumi Onishi (東京大), Kuniyuki Kano (東京大), Asuka Inoue (東北大), Yoshitaka Taketomi (東京大), Makoto Murakami (東京大), Satoshi Kofuji (東京医科歯科大), Hiroshi Nishina (東京医科歯科大), Atsuo Miyazawa, Nozomu Kono (東京大), Junken Aoki (東京大) : Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme Lpgat1 in zebrafish, *Scientific reports*, **12**, 7312 (2022)
- I-2 西野有里・田村佳穂・木下知奈美・宮澤淳夫：クライオ SEM による含水生物試料の微細形態観察、日本顕微鏡学会第 78 回学術講演会（福島）、2022
- I-3 西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫：エマルションの安定化のための新しい調製技術と評価、第 4 章 第 12 節 クライオ電子顕微鏡法を用いたエマルションの観察法、13 節 観察試料のポイント：非品質凍結について、技術情報協会、481-496 (2022)
- I-4 在原一樹（日産自動車）・渡邊学（日産自動車）・大間敦史（日産自動車）・川本宇子（日産アーク）・島貫 純一（日産アーク）・伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：LiB 用スラリーのミクロ構造と電池性能との相関性解析、第 63 回電池討論会（福岡）、2022
- I-5 杉浦輝（阪本薬品）・村井卓也（阪本薬品）・伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：クライオ SEM 観察によるホイップクリームの保水性に関する構造的要因の検証、日本食品科学工学会第 70 回記念大会（京都）、2022
- I-6 西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫：クライオ SEM を用いた含水・液体試料の観察、顕微鏡, **57**, 139-144 (2022)
- I-7 Junichi Shimanuki (日産アーク), Hideto Imai (日産アーク), Yoshiko Ito, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa : Microstructural observation of the swollen catalyst layers of fuel cells by cryo-TEM, *Microscopy (Oxford, England)*, **8**, 60-63 (2023)
- II-1 木下知奈美・西野有里・宮澤淳夫：万能細胞から筋肉を作る～様々な組織になれる能力を持つ細胞を、筋肉にする方法の研究～、知の交流シンポジウム（姫路）、2022
- II-2 Chinami Kinoshita・Yuri Nishino・Atsuo Miyazawa : Generation of multilayer myotube sheets from mouse ES cells for an in vitro model of neuromuscular junction、日本顕微鏡学会若手研究部会 2022 年度シンポジウム（京都）、2022
- II-3 木下知奈美・西野有里・宮澤淳夫：In vitro 神経筋接合部作製に向けた ES 細胞由来の筋管シートの作製、日本顕微鏡学会第 65 回シンポジウム（倉敷）、2022
- III-1 西田基・西野有里・宮澤淳夫：抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体 F(ab')<sub>2</sub> 結合金コロイド粒子の作製、日本顕微鏡学会第 65 回シンポジウム（倉敷）、2022
- III-2 西田基・西野有里・宮澤淳夫：Preparation of colloidal immunogolds conjugated with anti-nicotinic acetylcholine receptor F(ab')<sub>2</sub>、日本顕微鏡学会若手研究部会 2022 年度シンポジウム（京都）、2022
- III-3 西田基・西野有里・宮澤淳夫：抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体 F(ab')<sub>2</sub> 結合金コロイド粒子の作製、技術・人材マッチング交流会（赤穂郡）、2022

- IV-1 Makiko Kosugi (アストロバイオロジーセンター、基生研)・Masato Kawasaki (高エネ研)・Yutaka Shibata (東北大)・Kojiro Hara (秋田県立大)・Shinichi Takaichi (東京農大)・Toshio Moriya (高エネ研)・Naruhiko Adachi (高エネ研)・Yasuhiro Kamei (基生研)・Yasuhiro Kashino, Sakae Kudoh (極地研)・Hiroyuki Koike (中央大)・Toshiya Senda (高エネ研) (2022) Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in an Antarctic alga. *Nat Commun* **14**: 730 (<https://doi.org/10.1038/s41467-023-36245-1>)
- IV-2 Akihiro Kimura (名大)・Hirotaka Kitoh-Nishioka (近大)・Toshimichi Aota (名大)・Tasuku Hamaguchi (理研)・Koji Yonekura (理研)・Keisuke Kawakami (理研)・Kyoko Shinzawa-Itoh・Natsuko Inoue-Kashino・Kentaro Ifuku (京大)・Eiki Yamashita (阪大)・Yasuhiro Kashino・Shigeru Itoh (名大) (2022) Theoretical Model of the Far-Red-Light-Adapted Photosystem I Reaction Center of Cyanobacterium *Acaryochloris marina* Using Chlorophyll *d* and the Effect of Chlorophyll Exchange, *The Journal of Physical Chemistry B* **126**(22): 4009-4021 (<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c00869>)
- IV-3 川上 恵典・伊藤 繁・菓子野 康浩 (2022) Chl *d* を持つ *Acaryochloris marina* の新型光化学系 I 複合体の構造；光合成研究 **32**(2); 95-106
- IV-4 木村明洋 (名大)・鬼頭宏任 (近大)・青田俊道 (名大)・浜口祐 (理研)・米倉功治 (理研)・川上恵典 (理研)・新沢(伊藤)恭子・井上(菓子野)名津子・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩・山下栄樹 (阪大)・伊藤繁 (名大) (2022) クロロフィル *d* を持つ遠赤色光型反応中心 *A. marina* PSI の光捕集機構に関する理論解析:クロロフィル *a*-型 PSI との比較、日本物理学会講演概要集(CD-ROM) 7(1)
- IV-5 小杉真貴子 (アストロバイオロジーセンター、基生研)・川崎政人 (高エネ研)・柴田穰 (東北大)・原光二郎 (秋田県立大)・高市真一 (東京農大)・安達成彦 (高エネ研)・守屋俊夫 (高エネ研)・亀井保博 (基生研)・菓子野康浩・工藤栄 (極地研)・小池裕幸 (中央大)・千田俊哉 (高エネ研) (2022) ナンキョクカワノリに見つかった新規遠赤色光吸収型アンテナ蛋白質の構造と機能；第 34 回カロテノイド研究談話会、関西学院大学、2022 年 9 月 17、18 日
- IV-6 木村明洋 (名大)・鬼頭宏任 (近大)・青田俊道 (名大)・浜口祐 (理研)・米倉功治 (理研)・川上恵典 (理研)・新沢-伊藤恭子・井上-菓子野名津子・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩・山下栄樹 (阪大)・伊藤繁 (名大) (2022) クロロフィル *d* を持つ *A. marina* PSI に関する遠赤色光の光捕集機構解明：色素交換仮想実験による *T. elongatus* PSI との機能的差異；第 29 回「光合成セミナー2022」、2022 年 6 月 25 日、名工大 (オンライン開催)
- IV-7 小杉真貴子 (アストロバイオロジーセンター、基生研)・川崎政人 (高エネ研)・柴田穰 (東北大)・原光二郎 (秋田県立大)・高市真一 (東京農大)・安達成彦 (高エネ研)・守屋俊夫 (高エネ研)・亀井保博 (基生研)・菓子野康浩・小池裕幸 (中央大)・千田俊哉 (高エネ研) (2022) 南極藻類に見つかったアップヒル型励起エネルギー移動による遠赤色光利用メカニズム；第 22 回日本蛋白質科学会年会、2022 年 6 月 7-9 日、つくば国際会議場
- IV-8 木村明洋 (名大)・鬼頭宏任 (近大)・青田俊道 (名大)・浜口祐 (理研)・米倉功治 (理研)・川上恵典 (理研)・新沢-伊藤恭子・井上-菓子野名津子・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩・山下栄樹 (阪大)・伊藤繁 (名大) (2022) 遠赤色光型反応中心 *A. marina* PSI の光捕集におけるクロロフィル *d* の役割：クロロフィル *a* を持つ *T. elongatus* PSI との比較；第 12 回日本光合成学会年会およびシンポジウム、2022 年 5 月 20-21 日、東工大 (オンライン開催)

- V-1 Hidetoshi Inoue (NITE) ・ Kumiko Tajima (NITE) ・ Cristina Mitsumori (NITE) ・ Natsuko Inoue-Kashino ・ Takamasa Miura (NITE) ・ Kentaro Ifuku (京大) ・ Ryuichi Hirota (広大) ・ Yasuhiro Kashino ・ Katsutoshi Fujita (NITE) , Hiroshi Kinoshita (NITE) (2022) Biodiversity risk assessment of genetically modified *Chaetoceros gracilis* for outdoor cultivation, *The Journal of General and Applied Microbiology* **68(3)**: 151-162 (doi 10.2323/jgam.2021.11.001)
- V-2 熊沢穰 (京大) ・ 西出浩世 (基生研) ・ 長尾遼 (岡大) ・ 井上(菓子野)名津子 ・ 沈建仁 (岡大) ・ 中野雄司 (京大) ・ 内山郁夫 (基生研) ・ 菓子野康浩 ・ 伊福健太郎 (京大) (2022) 珪藻の集光性色素タンパク質の分子系統と多様性; 光合成研究 **32(1)** 18-24
- V-3 藍川晋平 (国際農林水産研) ・ 菓子野康浩 ・ 秋本誠志 (神戸大) ・ 植野嘉文 (東京理科大) ・ 和泉自泰 (九大) ・ 小杉昭彦 (国際農林水産研) (2023) 光質・光量が藍藻・微細藻の光合成におよぼす影響; 第 70 回 日本生態学会大会、2023 年 3 月 17-21 日、仙台 (オンライン開催)
- V-4 菓子野康浩 (2023) 光合成研究から発展する珪藻バイオマス産業; 鹿児島連大 分野別セミナー(農芸化学分野)、2023 年 3 月 2 日、佐賀大
- V-5 Minoru Kumazawa (京大) ・ Hiroyo Nishide (基生研) ・ Ryo Nagao (岡大) ・ Natsuko Inoue-Kashino ・ Ikuo Uchiyama (基生研) ・ Yasuhiro Kashino ・ Jian-Ren Shen (岡大) ・ Takeshi Nakano (京大) ・ Kentaro Ifuku (京大) (2022) Molecular characterization of fucoxanthin-chlorophyll a/c proteins in the diatom *Chaetoceros gracilis*: the unique diversification process of the light-harvesting complexes in red-algal lineage ; International Congress on Photosynthesis Research 2022、2022 年 7 月 31-8 月 21 日、New Zealand
- V-6 熊沢穰 (京大) ・ 石川規子 (京大) ・ 辻祥子 (京大) ・ 井上(菓子野)名津子 ・ 菓子野康浩 ・ 伊福 健太郎 (京大) (2022) ゲノム編集によるツノケイソウ Lhcx1 遺伝子の機能破壊と表現型解析; 第 12 回日本光合成学会年会およびシンポジウム、2022 年 5 月 20-21 日、東工大 (オンライン開催)

## 生命科学専攻

### 博士後期課程

大石鴻一郎: アセチルコリン受容体の分子内運動解析

### 博士前期課程

小畑由紀子: ポストシナプスにおけるアセチルコリン受容体の分子動態解析

上野真悠子: 光化学系 II 複合体の構築過程の研究

木下知奈美: 幹細胞を用いた *in vitro* 神経筋接合部形成の研究

西田基: タンパク質標識金コロイド粒子の作製研究

## 科学研究費補助金等

### 1 文部科学省科学研究費補助金 (学術変革領域研究 (学術研究支援基盤形成))

令和 4 年度～令和 10 年度

研究課題 先端バイオイメージング支援プラットフォーム

研究代表者 鍋倉 淳一 (生理学研究所)

分担研究者 宮澤淳夫

- 2 共同研究 トヨタ自動車（株） 令和 4 年度  
研究課題 溶液中高分子のナノ構造観察に関する研究  
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 3 共同研究 日産自動車（株） 令和 4 年度  
研究課題 リチウムイオン電池材料の構造観察に関する研究  
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 4 共同研究 阪本薬品工業（株） 令和 4 年度  
研究課題 ホイップクリームの構造に及ぼすポリグリセリン脂肪酸エステルの添加効果  
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 5 共同研究 日産化学（株） 令和 4 年度  
研究課題 幹細胞培養用培地・保存液の開発  
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 6 国立極地研究所共同研究 令和 4 年度～令和 5 年度  
研究課題 極域の光合成生物の生理応答機構の解析  
研究代表者 菓子野康浩
- 7 独立行政法人 科学技術振興機構(JST)先端的低炭素化技術開発(ALCA) 令和元年度～  
研究課題 亜リン酸を用いたロバスト且つ封じ込めを可能とする微細藻類の培養技術開発  
研究代表者 廣田隆一（広島大学）、分担研究者 菓子野康浩
- 8 文部科学省科学研究費補助金（基盤 B） 令和 2 年度～令和 4 年度  
研究課題 実用モデル珪藻の光環境応答・適応機構の最適化  
研究代表者 伊福健太郎（京都大学）、分担研究者 菓子野康浩
- 9 ひめしん研究開発支援助成金 令和 4 年度  
研究課題 持続可能社会実現のための珪藻由来機能性食品の開発  
研究代表者 山下和彦（ヤエガキ醗酵技研株式会社）、分担研究者 菓子野康浩
- 10 共同研究 （株）日本海水 令和 4 年度  
研究課題 珪藻を用いた事業的有用物質生産  
研究タント教員 菓子野康浩
- 11 兵庫県立大学 特別研究プロジェクト 令和 4 年度  
研究課題 藻類・水生植物バイオフィアウンドリーの構築と計算科学によるその DX 促進  
研究代表者 武尾正弘（兵庫県立大学大学院工学研究科）、分担研究者 菓子野康浩

## Biological Information

## 生体情報学 I

### I 脳と腸の機能発生の、ゼブラフィッシュをモデルとした 光遺伝学およびイメージング解析

Optogenetic and imaging analyses of development and function of the brain and  
gut in the zebrafish

八田公平・二階堂昌孝  
Hatta K, Nikaido M

ゼブラフィッシュは胚が透明で発生が早く、遺伝学的手法に優れた、ヒトを含む脊椎動物のモデルである。私たちは、魚類後脳に存在し、逃避行動の制御に関わるマウスナー細胞におけるグリシンや GABA 作動性の抑制メカニズムについて、組織化学的、分子遺伝学、および、イメージング技術を用いた解析を行ってきた。Cre 組み替え技術を用いて、マウスナー細胞に投射する複数の GABA 作動性のシナプス末端を、生きた個体の中で区別して可視化することにより解析を進めている。また、マウスナー細胞の軸索起始部を覆う特殊なグリア細胞 (axon cap glia) で蛍光を発するトランスジェニックゼブラフィッシュを発見し、これによって、特殊なグリア細胞の発生起源を追跡することが初めて可能になった。

一方、ゼブラフィッシュは第2の脳とも呼ばれる腸神経系の機能や発生の解析にも優れたモデルとなりうると考えられる。私達は、腸の蠕動運動に伴う平滑筋、腸神経細胞、ペースメーカー細胞での GCaMP を用いたカルシウム動態の可視化して、蠕動反射と徐波関連運動の2種類の収縮波をカルシウム動態によって区別できることを示し、光遺伝学的手法によって、腸神経細胞や平滑筋を局所的に刺激することにより、光で生きた個体内の腸の動きをコントロールすることに成功している。本年度は、これらに関わる細胞・分子の同定や、脳腸関連の発生について進展が見られた。

### II ゼブラフィッシュ腸神経系の 発生・再生の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development and regeneration of the enteric  
nervous system in the zebrafish

二階堂昌孝・八田公平  
Nikaido M, Hatta K

多種、多数 (ヒトでは 20 種以上で約 1 億個) の神経細胞から成り、感覚神経系から運動神経系までの神経回路を有しているため中枢から半ば独立して活動できる腸神経系は第2の脳とも呼ばれる。我々はこの腸神経系を構成する各種神経細胞や、それらが存在する腸の各領域を規定する遺伝子を



単離する目的でトランスクリプトーム解析を行っている。この結果、分化した腸神経細胞に強い発現が見られる転写因子群、腸神経細胞の前駆細胞に強い発現を示す転写因子群のリストを得ることができた。これらから特に発現量の多い遺伝子をクローニングしたので、今後はそれらの発現部位や機能を解析する。また、腸の前後軸に応じて異なる発現パターンを示す転写因子も 13 種特定することができ、こちらは発現領域についてまとめた論文を投稿中である。一方、昨年度我々は、Fgf をはじめとする各種分泌タンパク質の下流因子である ERK が、神経細胞除去後の神経細胞前駆体や分化した神経細胞で活性化することを示した。今年度は、実際どのような分泌タンパク質が、再生のどの過程に必要なのか解明するため、候補となる分泌タンパク質遺伝子 (*Fgf3,8* など) を単離した。また、Fgf シグナルを操作できる遺伝子導入魚を用いて、再生への影響を解析中である。

### Ⅲ SPring-8 における放射光イメージングの

#### 動物学・神経生物学への応用：

#### A. 硬骨魚類における第 2、第 3 の顎の形態・機能と進化の解析、 B. マルチスケール CT による個体内神経細胞の相関顕微鏡観察

Synchrotron microCT and live imaging analysis of the second and third jaws in teleost by using SPring-8; Micro-nano multi-scale CT and correlative microscopic analysis of identified neurons or cells in an intact animal

八田公平・二階堂昌孝  
Hatta K, Nikaido M

A: 多くの魚は口にある顎（口顎：第 1 の顎）のほかに、咽頭顎（第 2 の顎）をもっている。私達は、その形態・機能の進化過程を調べるため、SPring-8 におけるマイクロ CT と高速 X 線動画撮影によって、様々な硬骨魚類の咽頭歯の形態と摂食時における運動の解析を行なっている。これまでに、スポッテドガー、ポリプテルス、ハイギョなどの古代魚、シルバーアロワナやバタフライフィッシュなど、舌にも歯をもっている（3 つの顎をもつ）もの、ベニイロカエルアンコウなど特徴的な形態を持つもの、また、その比較対照となる陸上脊椎動物（コーンスネイク）、脊椎動物の祖先である棘皮動物（ウニ、ニセクロナマコ）などについて、解析を行った。また、咽頭顎進化の鍵と考えられるアミアカルヴァ／アミメウナギをはじめとする計 4 種のポリプテルス、陸上爬虫類（ヒョウモントカゲモドキ）の口顎の動き、鳥類（ニワトリの雛）の摂食時における特徴的な舌の動き、また、ミナミトビハゼが水から上がった状態で魚を捕食する様子の立体ライブイメージング、カラシン目、シマドジョウが砂と餌を吸い込み、砂を鰓蓋から排出する様子のほか、クランウェルツノガエルが眼と舌を使って餌を飲み込む様子、ハエトリソウがヨーロッパイエコオロギを捕まえる様子を撮影することに成功している。本年度は、ウナギ目、タウナギ目、砂を口から出すボラや、ウナギ目の近縁のカライワシ目に属するターポン（イセゴイ）の mCT、解剖、透明標本などの結果を解析し、比較することで、咽頭顎とその周辺の形態・機能・進化について仮説を立てることができた。

B: SPring-8 における高解像度マイクロ CT と共焦点顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡の技法を用いて、マイクロ・ナノ・マルチスケール位相 CT 法を用いて、個体内にあるゼブラフィッシュの脳や腸の細胞ひとつひとつ（CEMAPOC、マウスナー細胞、中腸と後腸の粘膜にある内外分泌細胞）を同定し高解像度観察することに成功している。本年度はさらに、成魚の脳のグリア細胞のマイクロ CT による可視化に進展が見られた。

## 発表論文

- I-1 Shota Iwatani, Mio Aoki, Masataka Nikaido, ○Kohei Hatta Developmental origin of the Axon Cap Glia which surround the initial segment of the Mauthner axon in zebrafish (口頭発表 ; Web 参加) The 17th International Zebrafish Conference (2022 年 6 月 22-26 日 Montreal, Canada)
- I-2 ○Shota Iwatani, Mio Aoki, Masataka Nikaido, Kohei Hatta Development of the axon cap glia, specialized structure surrounding the initial segment of the Mauthner cell, from larval to adult in zebrafish. (口頭発表) 第 45 回日本神経科学大会 (2022 年 7 月 3 日 沖縄)
- I-3 Daiji Takamido, Hikaru Minamide, Shin-ichi Okamoto, Koudai Shimomura, Shiori Satoh, Ayumu Jimpo, Risa Wada, Yumiko Mizumaki, Koichi Kawakami (遺伝研), ○Kohei Hatta Functional imaging and photo-manipulation of cells derived from three germ layers in the larval zebrafish gut (ポスター発表 + ショートトーク ; Web 参加) The 17th International Zebrafish Conference (2022 年 6 月 22-26 日 Montreal, Canada)
- II-1 ○山本果歩、二階堂 昌孝、八田 公平 Involvement of ERK signaling in the regeneration processes of the enteric nervous system in zebrafish (口頭・ポスター発表) 第 55 回日本発生生物学会 (2022 年 6 月 2 日 金沢)
- II-2 ○山本果歩、二階堂 昌孝、八田 公平 Involvement of ERK signaling in the regeneration processes of the enteric nervous system in zebrafish (口頭発表) 第 28 回小型魚類研究会 (2022 年 9 月 2 日 大阪)
- III-1 仲野 友太、吉尾 悠暉、○長塚 美月、塩本 咲希、上杉 健太郎 (高輝度光科学研究センター)、星野 真人 (高輝度光科学研究センター)、高田 将真、岡田 央人、八田 公平 ウナギ目とタウナギ目の咽頭顎の相違 (口頭発表) 第 93 回日本動物学会 (2022 年 9 月 10 日 東京)
- III-2 ○谷口 夏輝、岩谷 将太、上杉 健太郎 (高輝度光科学研究センター)、安武 正展 (高輝度光科学研究センター)、八田 公平 マウスナー細胞の軸索起始部を取り囲む特殊なグリア構造の  $\mu$ CT による可視化 Visualization of a specialized glial structure surrounding the initial segment of the Mauthner cell with the synchrotron radiation X-ray micro computed tomography (SR- $\mu$ CT) (ポスター発表) 第 45 回日本神経科学大会 (2022 年 6 月 30 日 沖縄)

## 生命科学専攻

### 博士前期課程

山本果歩：ゼブラフィッシュ腸神経細胞の再生機構の解析

岩谷将太：逃避行動の指令ニューロンの軸索起始部を囲む特殊なグリアの発生起源

下村晃大：ゼブラフィッシュ腸神経細胞の単細胞レベルでの形態解析

高田将真：SPRING-8を用いた骨鰾上目の咽頭顎の機能の解析

## Regeneration Biology

## 細胞制御学 I

### I プラナリア再生の分子生物学

#### Molecular Biology of Planarian Regeneration

梅園良彦・餅井真・織井秀文

Umesono, Y., Mochii, M., Orii, H.

プラナリアは再生能力が強く、小断片からでも1個体を再構成する。プラナリアを用いて、再生原理を明らかにするために、1.体軸、領域の決定機構、2.分子マーカーを用いた組織再構築の分子機構、3.分化多能性幹細胞の解析を進めている。

### II プラナリア摂食行動に関する研究

#### Molecular Analysis of Planarian Feeding Behavior

梅園良彦・餅井真・織井秀文

Umesono, Y., Mochii, M., Orii, H.

プラナリアは胴部に摂食器官である咽頭が存在するために、非常にユニークな摂食行動を示す。分子生物学的手法により、咽頭の摂食開始から摂食停止に至る運動制御に関わる神経細胞種の同定を進めている。

### III プラナリアの体のプロポーション変化の研究

#### Molecular Analysis of Body Proportioning in Planarians

梅園良彦・織井秀文

Umesono, Y., Orii, H.

プラナリアは前後2つに自切し各々の断片が再生することにより増殖する。再生直後の体のプロポーションは断片により様々であるが、数週間経つとほぼ同一になることが知られている。このプロポーション変化は体のどの領域の成長/退縮で生じるのか、また、どのようなメカニズムによって生じるのかについて明らかにしようとする。

## IV 両生類を用いた再生能の分子生物学的研究

### Molecular Analysis of Regeneration Potential in Amphibia

餅井 真  
Mochii, M.

両生類は、ほ乳類に比べ高い再生能を持つ。この再生能をうむ分子的基盤を明らかにすることを目的として研究する。具体的には、両生類の四肢や尾部の再生過程でどのようなシグナル因子が、どこでどのように働くのかを、遺伝子発現解析と機能解析により明らかにしようとする。

### 発表論文 List of Publications

- IV-1 Shibata Y, Suzuki M, Hirose N, Takayama A, Sanbo C, Inoue T, Umesono Y, Agata K, Ueno N, Suzuki KT, Mochii M. CRISPR/Cas9-based simple transgenesis in *Xenopus laevis*. Dev Biol. 2022 489:76-83.
- IV-2 柴田（基生研）、餅井、鈴木（基生研）：アフリカツメガエルの新たなトランスジェニック動物作出法 ～NEXTrans (New and Easy *Xenopus* Transgenesis at a safe harbor site)～. 日本動物学会第93回大会、2022

### 生命科学専攻

#### 博士前期課程

- 齋藤 あみ : プラナリア有性生殖器官の退縮
- 平岩 優佳 : プラナリア再生過程における創傷治癒と組織再生に関する研究
- 本多 和真 : プラナリアの成長と退縮におけるプロポーションの変化に関する研究
- 中村 悠 : プラナリア成体の体軸パターンの維持機構に関する研究
- 福島 礼一郎 : プラナリアの摂食行動に関する研究
- 秋月 海 : 脊索の再生に関する研究
- 西川 はるる : 尾部再生における TGF $\beta$  受容体の役割の研究

### 科学研究費補助金等

- 1 兵庫県立大学特別研究助成金 基礎研究支援
- 研究課題 アフリカツメガエル再生研究のための実用的ノックイン法の開発
- 研究代表者 餅井 真

## Supramolecular Structural Biology

## 細胞膜超分子複合体 機能解析学

### I 生体金属輸送システムの構造生物学研究

#### Structural Biology of Proteins in Metal Transport System

當舎武彦・杉本 宏  
Tosha, T., Sugimoto, H.

病原微生物が感染後に増殖していくためには鉄イオンの獲得が必須であり、感染先である宿主（ヒト）の体内に含まれるヒト赤血球ヘモグロビンからヘム（鉄-ポルフィリン錯体）の状態鉄を獲得することが知られている。鉄取り込みを阻害すれば感染防御の第一線として機能を果たすと期待されることから、鉄イオンやヘムの輸送に関与するタンパク質分子は新たな抗生物質やワクチン開発のターゲットとして注目されてきた。本研究室では病原菌の細胞膜で発現している ABC 型ヘムトランスポーターについて、X 線結晶解析や低温電子顕微鏡による高分解能立体構造解析に取り組んでいる。トランスポーター試料が安定化する界面活性剤を見出しており、SPRING-8 で稼働している低温電子顕微鏡を利用して画像データを収集し、構造解析を進めてきた。ATP あるいはそのアナログ化合物結合型の構造決定を行うことで、タンパク質の大規模なコンフォメーションの変化のメカニズムが原子レベルで明らかになった。今後はさらに多状態での構造解析とそれを基盤にした機能解析を進展させることで、ヘム輸送サイクルの分子メカニズムの詳細を明らかにする計画である。

### II 金属タンパク質の構造機能解析

#### Structural and Functional Studies of Metalloproteins

當舎武彦・杉本 宏  
Tosha, T., Sugimoto, H.

タンパク質の多くは、鉄、亜鉛、銅、ニッケルなどの金属イオンを活性部位に補因子として結合し、さまざまな生体内反応の触媒などの機能を発揮している。この金属タンパク質は温和な条件下で高選択的かつ高効率に触媒反応を行うことができるため、そのメカニズムが注目されてきた。本研究室では、大型放射光施設 SPRING-8 や X 線自由電子レーザー施設 SACLA を利用し、いくつかの金属タンパク質の結晶構造解析や時間分解構造解析に取り組んでおり、得られた構造情報を基盤に分光計測や生化学的解析を組み合わせることで、金属タンパク質の反応機構の解明を目指している。本年度は、嫌気条件下での時間分解構造解析を見据えた基盤技術開発や、光解離性ケージド化合物の光反応を利用した金属酵素反応中間体の分光・構造解析を進めた。SACLA での構造解析の手法は今後も引き続き様々なタンパク質の解析に応用する。

## 発表論文 List of publications

- I-1 K. Suzuki, J. K. Stanfield, K. Omura, Y. Shisaka, S. Ariyasu, C. Kasai, Y. Aiba, H. Sugimoto, O. Shoji: A Compound I Mimic Reveals the Transient Active Species of a Cytochrome P450 Enzyme: Insight into the Stereoselectivity of P450-Catalysed Oxidations, *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202215706 (2023) (学術論文)
- I-2 M. Lučić, M. T. Wilson, T. Tosha, H. Sugimoto, A. Shilova, D. Axford, R. L. Owen, M. A. Hough, J. A. R. Worrall: Serial Femtosecond Crystallography Reveals the Role of Water in the One- or Two-Electron Redox Chemistry of Compound I in the Catalytic Cycle of the B-Type Dye-Decolorizing Peroxidase DtpB, *ACS Catal.* **12**, 13349 (2022) (学術論文)
- I-3 T. Moreno-Chicano, L. M. Carey, D. Axford, J. H. Beale, R. B. Doak, H. M. E. Duyvesteyn, A. Ebrahim, R. W. Henning, D. C. F. Monteiro, D. A. Myles, S. Owada, D. A. Sherrell, M. L. Straw, V. Srajer, H. Sugimoto, K. Tono, T. Tosha, I. Tews, M. Trebbin, R. W. Strange, K. L. Weiss, J. A. R. Worrall, F. Meilleur, R. L. Owen, R. A. Ghiladi, M. A. Hough: Complementarity of neutron, XFEL and synchrotron crystallography for defining the structures of metalloenzymes at room temperature, *IUCrJ* **9**, 610 (2022) (学術論文)
- I-4 Y. Shisaka, E. Sakakibara, K. Suzuki, J. K. Stanfield, H. Onoda, G. Ueda, M. Hatano, H. Sugimoto, O. Shoji: Tetraphenylporphyrin Enters the Ring: First Example of a Complex Between Highly Bulky Porphyrins and a Protein, *ChemBioChem* e202200095 (2022) (学術論文)
- I-5 Y. Yogo, K. Yasuda, T. Takita, K. Yasukawa, Y. Iwai, M. Nishikawa, H. Sugimoto, S. Ikushiro, T. Sakaki: Metabolism of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by *Streptomyces griseolus* CYP105A1 and its variants, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **45**, 100455 (2022) (学術論文)
- I-6 A. Takiguchi, E. Sakakibara, H. Sugimoto, O. Shoji, H. Shinokubo: A Heme-Acquisition Protein Reconstructed with a Cobalt 5-Oxaporphyrinium Cation and Its Growth-Inhibition Activity Toward Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **61**, e202112456 (2022) (学術論文)
- I-7 H. Nakamura, T. Hisano, M. Rahman, T. Tosha, M. Shirouzu, Y. Shiro: Structural insight into heme detoxification by an ABC-type efflux pump in Gram-positive bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2123385119 (2022) (学術論文)
- I-8 杉本宏: バクテリアのヘムトランスポーター, 「ヘムタンパク質の科学 ～生理機能の理解とその展開に向けて～」 株式会社エヌ・ティー・エス 2022 年 (分担著書)
- I-9 杉本 宏「中性子・XFEL・シンクロトロン結晶学を駆使したヘムタンパク質の精密構造解析」第 31 回 iBIX 研究会 オンライン (茨城) 2022 年 9 月 20 日 (招待講演)
- I-10 H. Sugimoto: X-ray and Cryo-EM structures of bacterial heme ABC transporter BhuUV-T, 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC10, Kobe), 2022 Nov 28- Dec 3 (招待講演)

- I-11 片岡 万知華、阿部 綾萌、Chai Gopalasingam、Christoph Gerle、城 宜嗣、山本 雅貴、重松 秀樹、杉本 宏「クライオ電子顕微鏡を用いた病原菌ヘムトランスポーターの構造解析」第 48 回生体分子科学討論会（鳥取） 2022 年 6 月 30 日-7 月 1 日（ポスター発表）
- I-12 片岡 万知華、阿部 綾萌、Gopalasingam Chai、Gerle Christoph、城 宜嗣、山本 雅貴、重松 秀樹、杉本 宏「病原菌ヘム ABC トランスポーターのクライオ電子顕微鏡解析／Cryo-EM analysis of bacterial heme ABC transporter」第 60 回生物物理学会年会（函館） 2022 年 9 月 28-30 日（ポスター発表）
- II-1 S. L. Rose, S. Baba, H. Okumura, S. V. Antonyuk, D. Sasaki, T. M. Hedison, M. Shanmugam, D. J. Heyes, N. S. Scrutton, T. Kumasaka, T. Tosha, R. R. Eady, M. Yamamoto, S. S. Hasnain: Single crystal spectroscopy and multiple structures from one crystal (MSOX) define catalysis in copper nitrite reductases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2205664119 (2022) (学術論文)
- II-2 F. Kawai, Y. Furushima, N. Mochizuki, N. Muraki, M. Yamashita, A. Iida, R. Mamoto, T. Tosha, R. Iizuka, S. Kitajima: Efficient depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and polyfuranoate by engineered PET hydrolase Cut190, *AMB Express*, **12**, 134 (2022) (学術論文)
- II-3 Y. Nishida, S. Yanagisawa, R. Morita, H. Shigematsu, K. Shinzawa-Itoh, H. Yuki, S. Ogasawara, K. Shimizu, T. Iwamoto, C. Nakabayashi, W. Matsumura, H. Kato, C. Gopalasingam, T. Nagao, T. Qaqorh, Y. Takahashi, S. Yamazaki, K. Kamiya, R. Harada, N. Mizuno, H. Takahashi, Y. Akeda, M. Ohnishi, Y. Ishii, T. Kumasaka, T. Murata, K. Muramoto, T. Tosha, Y. Shiro, T. Honma, Y. Shigeta, M. Kubo, S. Takashima, Y. Shintani: Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases, *Nat. Commun.*, **13**, 7591 (2022) (学術論文)
- II-4 Takeda, K. Shimba, M. Horitani, T. Kimura, T. Nomura, M. Kubo, Y. Shiro, T. Tosha: Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide, *J. Phys. Chem. B*, **127**, 846 (2023) (学術論文)
- II-5 T. Tosha: NO reduction chemistry at heme/non-heme binuclear active center proved by methods using photo-sensitive caged NO, 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (Kobe, Japan), Nov. 28-Dec. 3, 2022 (招待講演)
- II-6 T. Tosha: Mechanism of biological nitric oxide reduction proved by time-resolved structural analysis, REDOX WEEK IN SENDAI 2022, 4th International conference on persulfide and sulfur metabolism in biology and medicine (Sendai, Japan), Oct. 28-Nov. 1, 2022 (招待講演)
- II-7 T. Tosha: Elucidation of Mechanisms for Catalytic Reaction of Nitric Oxide Reductases by Time-resolved Techniques, International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP)-12 (Madrid, Spain), Jul. 10-15, 2022 (招待講演)
- II-8 當舎武彦：光解離性基質の低温光解離を利用した金属酵素短寿命反応中間体の同定、第 61 回電子スピンサイエンス学会年会（熊本市民会館）2022 年 12 月 3-4 日（招待講演）
- II-9 當舎武彦：光解離性ケージド基質を用いた金属酵素反応機構の解明、メタルバイオサイエンス研究会 2022（京都テルサ）2022 年 10 月 19-20 日（招待講演）



- II-10 當舎武彦、榛葉幹治、松浦滉明、平田邦生、山本雅貴、城宜嗣：酸素バリア性フィルムを利用した嫌気下での構造解析の試み、第 60 回日本生物物理学会年会（函館アリーナ・函館市民会館）2022 年 9 月 28 -30 日（ポスター発表）
- II-11 當舎武彦：金属酵素活性中心における一酸化窒素還元反応の分子機構、物性研短期研究会「理論タンパク質物性科学の最前線：理論と実験との密な協働」（東大物性研）2022 年 7 月 26 - 27 日（招待講演）
- II-12 當舎武彦：各種分光計測を駆使した鉄活性中心における一酸化窒素還元酵素の反応機構の解明、第 22 回日本蛋白質科学会年会（多彩な分野からなる「生命金属科学」の最前線）（つくば国際会議場）2022 年 6 月 7 日-9 日（招待講演）
- II-13 石原琴音、當舎武彦：アンモニア酸化細菌由来アンモニア酸化酵素の単離、第 48 回生体分子科学討論会（とりぎん文化会館）2022 年 6 月 30 日-7 月 1 日（ポスター発表）

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（令和 4～令和 8 年度）学術変革領域研究（A）（計画班）課題番号 22H05129  
研究課題 酸素を誤作動させる分子による酸化反応の遷移状態設計  
研究分担者 當舎武彦（研究代表者：莊司長三）
- 2 科学研究費補助金（令和 3～令和 5 年度）基盤研究（B）課題番号 21H02064  
研究課題 核共鳴散乱分光を駆使した鉄複核中心と気体分子の化学の解明  
研究代表者 當舎武彦
- 3 科学研究費補助金（令和 4～5 年度）新学術領域（研究領域提案型）課題番号 22H04760  
研究課題 金属酵素活性中心による一酸化窒素還元反応の高速分子動画撮影  
研究代表者 當舎武彦
- 4 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業公募（令和 4～5 年度）  
研究課題 薬剤耐性淋菌・緑膿菌に有効な新規抗菌剤の開発  
研究分担者 當舎武彦（研究代表者：新谷泰範）
- 5 科学研究費補助金（令和 1～5 年度）新学術領域研究（研究領域提案型）課題番号 19H05768  
研究課題 細胞内生命金属動態を制御するタンパク質メタレーション  
研究分担者 杉本宏
- 6 科学研究費補助金（令和 3～5 年度）基盤研究（B）課題番号 21H02421  
研究課題 生体金属イオンの輸送システムで機能する膜タンパク質の構造解析  
研究代表者 杉本宏

## Earth Science

## 地球科学

### I 地球内部の物理探査技術の開発

#### Development of Geophysical Exploration Technology

後藤 忠徳  
Goto, T.N.

非破壊技術（物理探査）により地球内部の物性分布を把握できれば、地球の進化や地震・火山噴火現象に関する知見、エネルギー資源・環境問題等に資する情報が取得できる。特に、地下水やガスなどの把握に不可欠な「電気・電磁探査」に注目し、装置の開発や情報科学を駆使したデータ解析法の研究を行っている。調査対象は、人工ノイズの多い都市域、人間が立ち入ることが難しい海域・山岳地域や月・火星、あるいは人体内部のような小領域である。実際に開発した新技術を用いて、陸上地熱探査や海底探査を行っている。

### II 数値シミュレーションを通じた地球内部現象の可視化

#### Visualization of Earth's Interior based on Numerical Simulations

後藤 忠徳  
Goto, T.N.

地上や海底での観測データから3次元的な地下構造を求め、地下での変動現象を考えるためには、数値計算が必要である。仮想的な地下構造上での観測データを予測する技術、後述する逆解析技術、さらに岩盤の変形・破壊や地下水流動などを計算機中で再現する技術などが、地下で起きる諸現象を理解する上で必要である。そこで、地表浅部構造の影響の補正などを新たに提案し、活断層や地熱地域の地下構造解析の高度化を行っている。また、地下水流動の影響を取り入れた岩盤変形・破壊シミュレーションを開発中である。

### III 地下構造の統合解析に関する研究

#### Joint Analysis of Geological/Geophysical structure

後藤 忠徳  
Goto, T.N.

物理探査情報や岩石試料の物質・物性測定情報に基づいて、3次元的な地質構造・地下

水分分布を求めることは、地下の科学的理解と社会利用において欠かせない。これまでに例えば、海底熱水地域での岩石試料・物理探査データ・熱水対流数値シミュレーションを用いた統合解析を行った。その結果、海底金属資源の新たな生成モデル提案を行うことに成功した。このようなマルチスケール情報の融合を実施することで、定性的ではなく定量的な地下構造解釈を目指している。

## IV SR を用いた微小領域回折法による鉱物の

### 結晶学的評価

Crystallographic Characterization of Minerals by micro-area  
diffraction methods using SR.

萩谷 健治  
Hagiya, K.

岩石の構成単位である鉱物結晶の成長・冷却に際して生じる微細組織や微細析出物の研究は、その生成過程を知る上で重要である。X線回折実験を行う場合、組織中から対象となる鉱物試料を取り出す必要があり、このことが結晶学的評価を行う上での妨げとなってきた。このような試料に対し非破壊で測定する方法として放射光（SR）を用いた微小領域回折法を開発し利用研究を行っている。

## V 地下比抵抗構造のイメージングソフトウェアの開発

Development of imaging software for subsurface resistivity structures

石須 慶一  
Ishizu, K.

地下は、10cm 下でも目で直接見ることはできない。物理探査技術を用いることで、地下を掘削せずに調べることができる。当研究室では、電磁波を用いた物理探査技術に着目している。この電磁探査を用いることで、地下数 cm から数 100km にわたる比抵抗構造を推定できる。比抵抗とは、物質の電気の流れにくさを表す物性値である。金属を含む岩石は、比抵抗が低い傾向があり、一方乾燥岩石は高い比抵抗を示すという特徴がある。このような特徴を利用して、比抵抗情報から地質情報を抽出できる。電磁探査によって、陸上の地下のみならず、海底下構造の調査も可能になる。電磁探査の観測データを解析して、地下比抵抗構造をイメージングするためには、電磁探査データの逆解析が必要となっている。そこで、電磁探査データから地下構造のイメージングを行うための逆解析ソフトウェアの開発を行ってきた。開発したソフトウェアは、従来手法に比べて、計算スピードが速

いという特徴がある。本ソフトウェアの有効性は金属鉱床探査などで実証されている。

## 発表論文 List of Publications

- [1] 木村健太, 後藤忠徳, 前田智輝, 山田尊生, & 萩谷健治. (2022). 高粘性流体を含む堆積物の比抵抗と飽和度の関係. 物理探査, 75, 64-69.  
<https://doi.org/10.3124/segj.75.64>
- [2] Ohta, Y., Goto, T. N., Kashiwaya, K., & Koike, K. (2023). Multi-capacitance electric relaxation model for complex electrical conductivity of sulphide ores. Exploration Geophysics, 1-11.  
<https://doi.org/10.1080/08123985.2023.2189584>
- [3] Zolensky, M., Martinez, J., Sitzman, S., Mikouchi, T., Hagiya, K., Ohsumi, K., Komatsu, M., Nakamura, T., Takenouchi, A., Ono, H., Hasegawa, H., Higashi, K., Terada, Y., Yagi, N., Takata, M., Ozawa, H., Taki, Y., Yamatsuta, Y., Hirata, A., Kurokawa, A., & Yamaguchi, S. (2022). Measuring the shock stage of Itokawa and asteroid regolith grains by electron backscattered diffraction, optical petrography, and synchrotron X - ray diffraction. Meteoritics & Planetary Science, 57(5), 1060-1078.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/maps.13808>
- [4] Zolensky, M., Mikouchi, T., Hagiya, K., Ohsumi, K., Komatsu, M., Cheng, A., & Le, L. (2022). Evidence for impact shock and regolith transportation on CM, CI, and CV chondrite parent asteroids. Meteoritics & Planetary Science, 57(10), 1902-1919.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/maps.13909>
- [5] Nakamura T. et al. (著者数 221 名, 含 Hagiya K.) (2022). Formation and evolution of carbonaceous asteroid Ryugu: Direct evidence from returned samples. Science, 379.  
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abn8671>
- [6] Yamaya, Y., Suzuki, Y., Murata, Y., Okamoto, K., Watanabe, N., Asanuma, H., Hase, H., Ogawa, Y., Mogi, T., Ishizu, K. & Uchida, T. (2022). 3-D resistivity imaging of the supercritical geothermal system in the Sengan geothermal region, NE Japan. Geothermics, 103, 102412.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0375650522000645>

## 生命科学専攻

博士前期課程

大島 由有希  
松浦 優介

骨折治癒判定における電気インピーダンスの活用に関する研究  
正方晶 boleite の X 線結晶構造解析

## 科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金（2022-2024 年度）基盤研究(B) 課題場号： 22H02017  
研究課題： 現在・過去の広域熱水流動系推定による鉱床生成プロセスの解明と  
鉱床存在可能性の評価  
研究代表者：小池克明（研究分担者 後藤忠徳）
2. 科学研究費補助金（2021-2025 年度）国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B))  
課題場号： 21KK0090  
研究課題： 地熱発電の大幅利用促進を可能にする貯留層臨界スポット検出を  
目指した先端的共同研究  
研究代表者：小池克明（研究分担者 後藤忠徳）
3. 科学研究費補助金（2020-2022 年度）基盤研究(B) 課題場号： 20H01974  
研究課題： 琵琶湖深部湖底湧水の地下構造との関係解明および湖底環境  
への影響評価  
研究代表者：小泉尚嗣（研究分担者 後藤忠徳）
4. 科学研究費補助金（2022-2023 年度）特別研究促進費 課題場号： 22K19949  
研究課題： 能登半島北東部において継続する地震活動に関する総合調査  
研究代表者：平松良浩（研究分担者 後藤忠徳）
5. 科学研究費補助金（2022-2023 年度）若手研究 課題場号： 22K14104  
研究課題： 水蒸気噴火発生の危険性がある地下発見のためのドローン空中電磁  
探査法開発  
研究代表者：石須慶一
6. 科学研究費補助金（2020-2022 年度）基盤研究(B) 課題番号： 20H01992  
研究課題： 人工電磁周波数コム信号による火山の精密モニタリングシステムの  
構築  
研究代表者：小川康雄（研究分担者 石須慶一）
7. 科学研究費補助金（2021-2023 年度）国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B))  
課題番号： 21KK0081  
研究課題： 人工電磁周波数コム信号による火山の精密モニタリングシステム  
の構築  
研究代表者：小川康雄（研究分担者 石須慶一）
8. 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構受託研究（2021-2023 年度）  
研究課題： 地熱発電導入拡大研究開発/地熱発電高度利用化技術開発  
/ AI を利用した在来型地熱貯留層の構造・状態推定  
研究代表者：国立研究開発法人産業技術総合研究所（研究分担者 石須慶一）
9. ひょうご科学技術協会 学術研究助成  
研究課題： 電気インピーダンスに着目した骨折治癒判定システムの試作  
研究代表者：後藤忠徳