

生命科学專攻

Department of Life Science

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、衣斐義一
Sakaguchi, M., 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ン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ンネルである 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。ビリルビンを例にとると、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。

① ABCC2 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。

③ 17 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。

④ OATP1B1 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

- 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)

生命科学専攻

博士前期課程

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 5 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 5 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

Spectroscopy

生体物質構造学Ⅱ

I 金属タンパク質の振動分光解析

Vibrational spectroscopy of metalloproteins

柳澤幸子・佐藤航・久保稔

Yanagisawa, S., Sato, W., 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、チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の活性増強機構を調べている。2023 年度は低酸素下で CcO の活性を増強するタンパク質 (CHCHD2) を集中的に研究し、活性増強時に引き起こされる CcO の構造変化箇所を同定した。また 2023 年度も引き続き、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実施した。

II タンパク質ダイナミクスの時間分解分光解析

Time-resolved spectroscopy of enzymatic reactions

柳澤幸子・佐藤航・久保稔

Yanagisawa, S., Sato, W., Kubo, M.

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、ヘムやフラビンといった補因子を有する酵素の反応機構を研究している。2023 年度は、損傷 DNA を光依存的に修復するフラビン酵素 (6-4 フォトリアーゼ) について、DNA の修復に必要な光子数が生物種によって異なることを明らかにした。現在、分子進化との関連を詳細に調べている。

一方で、SACLA 時間分解結晶構造解析 (分子動画法) を補完する時間分解分光研究を行っている。分子動画法はタンパク質の動きを時間軸上で観測できる新しい構造解析手法である。しかしこの手法は微結晶化したタンパク質を扱う制約上、観測された構造変化をどのように解釈し、溶液相の機能研究とどう結びつけるかが常に問題となる。当講座は微結晶を計測できる独自の顕微時間分解分光装置を開発し、結晶相と溶液相のタンパク質ダイナミクスを比較・評価することで、分子動画データの適切な解釈を導いてきた。2023 年度も引き続き、分子動画を補完する顕微分光研究を実施した。

Ⅲ 二機能性クリプトクロム天然変性領域の構造解析

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

佐藤航・柳澤幸子・長尾聡・久保稔
Sato, W, Yanagisawa, S., Nagao, S., Kubo, M.

クラミドモナス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) 光受容体としてはたらくクリプトクロム機能に加えて、(ii) DNA 光修復酵素としての酵素機能も保持している。CraCRY は C 末端に 99 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っているに違いない。2023 年度は、明状態 (FADH⁻型) CraCRY のメチル側鎖の NMR 測定に成功し、C 末端天然変性領域の構造分布や運動性の一端を明らかにした。暗状態 (FADH[•]) CraCRY については、引き続き試料調製条件を検討中である。

Ⅳ タンパク質のオペランド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

佐藤航・久保稔
Sato, W., 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。2023 年度はクリプトクロムの計測に適した金表面の作製条件を検討した。

Ⅴ 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 O₂ carrier

佐藤航・長尾聡・久保稔
Sato, W., Nagao, S., 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付与したミオグロビン二量体を分子設計する。2023年度は、ヘム遠位側に変異を加えたミオグロビン二量体を設計した。現在、その変異体のヘム周辺構造やリガンド結合特性を調べている。

発表論文 List of Publication

- I-1 **Sachiko Yanagisawa**: Application of resonance Raman spectroscopy to study an allosteric regulator of cytochrome *c* oxidase, 8th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-8), Parry Sound (Canada), 2023年5月26日。(招待講演)
- I-2 **亀井拓斗, 柳澤幸子**, 島田敦広(岐阜大), Stephanie Gladysck(ウェイン州立大学), Siddhesh Aras(ウェイン州立大学), Maik Huettemann(ウェイン州立大学), Lawrence Glossman(ウェイン州立大学), **久保稔**: Visible resonance Raman study to elucidate the action mechanism of CHCHD2 for activating cytochrome oxidase, 第61回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2023年11月16日。
- I-3 **佐藤航, 柳澤幸子**, 新澤-伊藤恭子(兵県大), 西田優也(国循セ), 長尾壮将(国循セ), 新谷泰範(国循セ), **久保稔**: シトクロム *c*酸化酵素のプロトンポンプ活性評価を通じた Higd1A の機能的意義の解明, 第49回生体分子科学討論会, 豊中, 2023年6月2日。
- I-4 **久保稔, 山田大智**: ラマン分光法の構造生物学的利用, *タンパク質の構造解析手法と In silico スクリーニングの応用事例(第1章 第6節)* (技術情報協会), 51-61 (2023).
- II-1 Li, H. (岡山大), **Yamada, D., Kubo, M.**, Suga, M.* (岡山大), Shen, J.-R.* (岡山大) et al.: Oxygen-evolving photosystem II structures during S₁-S₂-S₃ transitions, *Nature* 626, 670-677 (2024).
- II-2 Wolff, A. M. (カリフォルニア・マーセッド大), Nango, E.* (東北大), **Kubo, M., Nomura, T.**, Thompson, M. C.* (カリフォルニア・マーセッド大) et al.: Mapping protein dynamics at high spatial resolution with temperature-jump X-ray crystallography, *Nature Chem.* 15, 1549-1558 (2023).
- II-3 Ariyasu, S. (名大), **Kubo, M.**, Shoji, O.* (名大) et al.: Catalytic oxidation of methane by wild-type cytochrome P450BM3 with chemically evolved decoy molecules, *ACS Catal.* 13, 8613-8623 (2023).
- II-4 **Minoru Kubo**: Time resolved spectroscopy for monitoring the protein dynamics in microcrystals, UK-Japan meeting on dynamic and time-resolved crystallography 2023, Leicester (UK), 2023年9月14日。(招待講演)
- II-5 **Minoru Kubo**: Time-resolved IR characterization of the key intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase, 8th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-8), Parry Sound (Canada), 2023年5月26日。(招待講演)
- II-6 **久保稔**: 分光学から見た DNA 光修復のメカニズム, 第35回高速分子動画オンラインセミナー, オンライン, 2023年12月12日。(招待講演)
- II-7 **久保稔**: 光による DNA 修復のメカニズムと分子進化, 第1回 ATI コンファレンス バイオ単分子研究会, 北杜, 2023年11月13日。(招待講演)
- II-8 **久保稔**: 時間分解振動分光による酵素中間体の化学構造解析, 蛋白研セミナー“タンパク質のダイナミクスと機能”, 吹田, 2023年10月2日。(招待講演)
- II-9 **山田大智, 撈野亜衣, 前野達海**, 重田育照(筑波大), 山元淳平(阪大), **久保稔**: 損傷 DNA の光修復に関する分光学的研究, 第49回生体分子科学討論会, 豊中, 2023年6月1日。
- III-1 **貝出裕規, 長尾聡, 佐藤航, 久保稔**: NMR analysis of dynamics of the C terminal extension in bi-functional cryptochrome, 第61回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2023年11月15日。

III-2 乾翔太, 松田颯真, 長尾聡, 柳澤幸子, 久保稔: X線小角散乱を用いた明状態二機能性クリプトクロムの溶液構造解析, 第49回生体分子科学討論会, 豊中, 2023年6月1日.

生命科学専攻

博士前期課程

亀井拓斗(M2): 共鳴ラマン分光法を用いたチトクロム *c* 酸化酵素活性増強因子 CHCHD2 の作用機序解明

貝出裕規(M2): NMR を用いた二機能性クリプトクロム C 末端変性領域の構造ダイナミクスの解明

松田颯真(M2): 二機能性クリプトクロムの暗状態構造解析に向けた調製方法の確立

乾翔太(M1): X線小角散乱測定による二機能性クリプトクロムの溶液構造解析

科学研究費補助金等

- 1 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
- 2 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

柴田直樹・緒方英明
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、フラビント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B₁₂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・緒方英明
Shibata, N., 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 N. Chongdar, P. Rodríguez-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-2 T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, H. Ogata, Y. Hori, K. Kusaka, Y. Hirano, K. Kurihara, Y. Shigeta, T. Tamada, Y. Higuchi, New insights into the oixdiation process from neutron and X-ray crystal structures of an O₂-sensitive [NiFe]-hydrogenase, *Chemical Science*, 14, 9306-9315 (2023)
- I-3 A. Kobayashi, M. Taketa, K. Sowa, K. Kano, Y. Higuchi, H. Ogata, Structure and function relationship of formate dehydrogenases: an overview of recent progress, *IUCrJ*, 10, 544-554 (2023)
- I-4 T. Sakai, T. Mashima, N. Kobayashi, H. Ogata, L. Duan, R. Fujiki, K. Hengphasatporn, T. Uda, Y. Shigeta, E. Hifumi, S. Hirota, Structural and thermodynamic insights into antibody light chain tetramer formation through 3D domain swapping, *Nature Communications*, 14, 7807 (2023)
- I-5 西川幸志, 緒方英明, 第II編第4章 ヒドロゲナーゼの反応機構と産業利用に向けた構造化学, 独立栄養微生物によるCO₂資源化技術(新井博之, 亀谷将史, 石井正治監修), シーエムシー出版, pp 84-92 (2023)
- I-6 緒方英明, フラビンによる電子分岐酵素の構造解析, *日本結晶学会誌*, 65, 4, 220-221(2023)
- I-7 H. Ogata, Spectroscopic characterization of a sensory [FeFe] hydrogenase, 13th International Conference on Hydrogenases, アメリカ ワラワラ, 2023年6月27日【招待講演】
- I-8 緒方英明, 水素酸化還元酵素ヒドロゲナーゼの構造と反応機構, 京都大学大学院理学研究科セミナー, 京都, 12月21日【招待講演】
- I-9 M. Kinuyama, K. Fujiwara, T. Mashima, N. Kobayashi, H. Ogata, S. Hirota,

- Construction of porous crystals with supramolecular structures using heme protein cyclic trimer, 第 104 回日本化学会春季年会, 船橋, 2024 年 3 月 18-21 日【口頭発表】
- I-10 T. Sakai, S. Yamaguchi, T. Mashima, N. Kobayashi, L. Duan, R. Fujiki, H. Kowitz, Y. Shigeta, H. Ogata, E. Hifumi, T. Uda, S. Hirota, Elucidation of the association character and 3D domain-swapped structure of a tetramerizing antibody light chain, 第 104 回日本化学会春季年会, 船橋, 2024 年 3 月 18-21 日【口頭発表】
- I-11 酒井隆裕, 山口将平, 真島剛史, 小林直也, 段練, 藤木涼, Kowitz Hengphasatporn, 重田育照, 緒方英明, 一二三恵美, 宇田泰三, 廣田俊, ドメインスワッピングにより 4 量体化する抗体軽鎖の会合挙動と構造解析に関する研究, 第 23 回蛋白質科学会年会, 名古屋, 2023 年 7 月 5 日-7 日【ポスター】
- I-12 柴田直樹, エンド型ナイロンオリゴマー分解酵素 NylC の立体構造に基づく自己分断機構, 第 472 回ビタミン B 研究協議会, 徳島, 2023 年 9 月 1 日【口頭発表】
- I-13 小林直也, 吉田悠真, 緒方英明, 真島剛史, 廣田俊, 3D ドメインスワッピングに基づいた計算機設計による安定な c 型シトクロム 2 量体の創製, 第 61 回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2023 年 11 月 14 日-16 日【ポスター】
- I-14 濱田莉緒, 西川幸志, 緒方英明, 硫酸還元細菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来 APS 還元酵素の結晶構造, 第 61 回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2023 年 11 月 14 日-16 日【ポスター】
- I-15 酒井隆裕, 山口将平, 真島剛史, 小林直也, 段練, 藤木涼, Kowitz Hengphasatporn, 重田育照, 緒方英明, 一二三恵美, 宇田泰三, 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会合挙動と X 線結晶構造, 第 2 回日本抗体学会学術大会, 鹿児島, 2023 年 12 月 1-3 日【ポスター】
- I-16 濱田莉緒, 緒方英明, 硫酸還元に関わる金属酵素の構造解析, 兵庫県立大学播磨理学キャンパス 技術・人材マッチング交流会 2023, 兵庫, 2023 年 12 月 1 日【ポスター】
- I-17 濱田莉緒, 緒方英明, 硫酸還元菌由来 APS 還元酵素の X 線結晶構造解析 第 10 回バイオダイナミクス研究会, 兵庫, 2023 年 12 月 14 日【ポスター】

生命科学専攻

博士前期課程

濱田 莉緒

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

I 一酸化窒素還元酵素の構造と機能

Structural and Functional Studies on Nitric Oxide Reductases

當舎武彦
Tosha, T.

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、中間生成物として産生される細胞毒性の高い一酸化窒素 NO を亜酸化窒素 N_2O に変換・無毒化する酵素である。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。これまで、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来のキノール依存性 NOR (*NmqNOR*) の研究に取り組み、本酵素は単量体よりも二量体のほうが酵素活性が高く、生体内では二量体として機能するということを提案してきた。今年度は、*NmqNOR* の調製法や低温電子顕微鏡での測定グリッドの調子条件を検討することで、単量体と二量体の構造をいずれも 2.0 Å 程度の高分解能で決定できた。そして、両者の構造から、二量体形成に伴う界面での構造変化が活性部位に伝播することを見出し、二量体において酵素が活性化される分子機構を明らかにできた。また、緑膿菌由来シトクロム *c* 依存性 NOR (*PacNOR*) についても同様の検討を行った結果、これまで単量体で存在すると考えられてきた *PacNOR* が二量体としても存在することを突き止めた。こちらも電顕による構造解析に着手しており、*NmqNOR* とは異なる様式で二量体を形成していることが明らかにできている。今後は、単量体の構造解析を進めるとともに機能解析を進め、*PacNOR* 二量体と単量体の構造の違いと機能の関連を明らかにする。

II 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。CcO に対して強い阻害効果をもつことが知られているシアン化物イオン (CN^-) が結合したウシ心筋由来の酸化型 CcO と部分還元型 CcO の結晶構造、および CN^- 結合部分還元型・還元型 CcO 混合結

晶の構造をそれぞれ 1.6 Å、1.65 Å、1.45 Å 分解能で決定し、CN⁻の結合に伴う構造変化を論文で報告した。さらに、CN⁻結合還元型 CcO、アジ化物イオン結合再酸化型 CcO、一酸化炭素結合還元型 CcO、一酸化窒素結合還元型 CcO、亜酸化窒素結合酸化型および還元型 CcO の X 線結晶解析を進めた。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。

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

當舎武彦・城 宜嗣
Tosha, T., 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、生命機能の維持に関わっている。一方で、タンパク質に結合していない遊離の鉄は、反応性が高く活性酸素の発生源として細胞損傷を引き起こす側の側面を有する。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）の構造解析に向けた精製法の検討、および DMT1 と鉄還元酵素（Dcytb）との相互作用の検討を行った。これまでに確立してきた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、高純度に DMT1 を精製する手法を確立した。精製試料を用いて低温電子顕微鏡による単粒子解析に取り組んだが、試料濃度が薄く電顕像を確認することができなかった。今後は、試料を安定に高濃度に保つ方法を検討し、低温電子顕微鏡での構造解析に挑戦する。DMT1 と Dcytb の相互作用については、細胞内において、両蛋白質が近接して存在することを見出した。これら二つのタンパク質の CHO 細胞を用いた共発現系も構築できたので、今後は、両者を発現させた細胞から、形質膜を単離・可溶化することで、DMT1 と Dcytb の複合体が単離できないか検討する。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）についても研究を進め、PCBP が鉄貯蔵タンパク質フェリチンの H 鎖選択に結合することを発見した。今後は、PCBP とフェリチン複合体の構造解析にも挑戦する。

発表論文 List of Publications

- I-1 Bolton R, Machelett M, Stubbs J, Axford D, Caramello N, Catapano L, Maly M, Rodrigues M, Tizzard G, MacMillan F, Engilberge S, von Stetten D, Tosha T, Sugimoto H, Worrall J, Zubkov M, Coles S, Mathieu E, Steiner R, Murshudov G, Schrader T, Orville A, Royant A, Evans G, Hough M, Owen R, Tews I. : A redox switch allows binding of Fe(II) and Fe(III) ions in the cyanobacterial iron binding protein FutA from *Prochlorococcus*, Proc.

- Natl. Acad. Sci. USA, 121, e2308478121 (2024) doi: 10.1073/pnas.2308478121
- I-2 Li H, Nakajima Y, Nango E, Owada S, Yamada D, Hashimoto K, Luo F, Tanaka R, Akita F, Kato K, Kang J, Saitoh Y, Kishi S, Yu H, Matsubara N, Fujii H, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Kimura T, Thao T, Yonekura S, Yu L, Tosha T, Tono K, Joti Y, Hatsui T, Yabashi M, Kubo M, Iwata S, Isobe H, Yamaguchi K, Suga M, Shen J. : Oxygen-evolving photosystem II structures during S1-S2-S3 transitions, *Nature*, 626, 670-677 (2024) doi: 10.1038/s41586-023-06987-5
- I-3 Safari C, Ghosh S, Andersson R, Johannesson J, Bath P, Uwangue O, Dahl P, Zoric D, Sandelin E, Vallejos A, Nango E, Tanaka R, Bosman R, Borjesson P, Dunevall E, Hammarin G, Ortolani G, Panman M, Tanaka T, Yamashita A, Arima T, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Takeda H, Yamagiwa R, Oda K, Fukuda M, Tosha T, Naitow H, Owada S, Tono K, Nureki O, Iwata S, Neutze R, Branden G. : Time-resolved serial crystallography to track the dynamics of carbon monoxide in the active site of cytochrome c oxidase, *Sci. Adv.*, 9, eadh4179 (2023) doi: 10.1126/sciadv.adh4179
- I-4 Fadini A, Hutchison C, Morozov D, Chang J, Maghlai K, Perrett S, Luo F, Kho J, Romei M, Morgan R, Orr C, Cordon-Preciado V, Fujiwara T, Nuemket N, Tosha T, Tanaka R, Owada S, Tono K, Iwata S, Boxer S, Groenhof G, Nango E, van Thor J. : Serial Femtosecond Crystallography Reveals that Photoactivation in a Fluorescent Protein Proceeds via the Hula Twist Mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, 145, 15796-15808 (2023) doi: 10.1021/jacs.3c02313
- I-5 Ariyasu S, Yonemura K, Kasai C, Aiba Y, Onoda H, Shisaka Y, Ogasawara S, Sugimoto H, Tosha T, Kubo M, Kamachi T, Yoshizawa K, Shoji O. : Catalytic Oxidation of Methane by Wild-Type Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules, *ACS Catal.*, 13, 8613-8623 (2023) doi: 10.1021/acscatal.3c01158
- I-6 Tosha T. : Characterization of the short-lived reaction intermediate of NO reductase with caged substrate, *Dynamic Crystallography-XFELs and Synchrotrons to study enzyme reactions (英国レスタター)*, 2023
- I-7 Tosha T. : Mechanism of nitric oxide reduction by P450 in fungal denitrification, *日本薬物動態学会第38回年会/第23回シトクロムP450国際会議国際合同大会 (静岡)*, 2023
- I-8 Tosha T. : Mechanism of enzymatic nitric oxide reduction revealed by time-resolved structural analysis, *ESAB (European Society of Applied Biocatalysis) Webinar, Enzymatic Reaction Mechanisms and their Biocatalytic Applications (オンライン)*, 2023
- I-9 Tosha T. : Anaerobic X-ray diffraction data collection using oxygen barrier film for study on nitric oxide reductase, *"Molecular Movies" International Symposium 2023 (淡路)*, 2023
- I-10 當舎武彦・川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・西田優也・新谷泰範 : 嫌気呼吸酵素を標的とした緑膿菌の抗菌薬開発に向けて、*第2回生命金属科学シンポジウム (横浜)*, 2023
- I-11 Ishihara K, Tosha T. : Attempt to prepare the active form of ammonia monooxygenase from ammonia oxidizing *Nitrosomonas. sp.*, *日本生物物理学会 第14会中国四国支部大会 (鳥取)*, 2023
- I-12 當舎武彦・武田英恵・榛葉幹治・堀谷正樹・城 宜嗣 : ケージド基質の低温光解離を利用した

- 金属酵素反応中間体の捕捉、第49回生体分子科学討論会（豊中）、2023
- I-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に向けて、第49回生体分子科学討論会（豊中）、2023
- I-14 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・當舎武彦：シトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素二量体の構造解析、第49回生体分子科学討論会（豊中）、2023
- I-15 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・新谷泰範・當舎武彦：抗菌薬開発を指向した緑膿菌由来NO還元酵素-阻害剤複合体の構造解析の試み、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）、2023
- I-16 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・當舎武彦：シトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素二量体の構造解析、第35回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023、ポスター賞受賞
- I-17 Tosha T. : Characterization of reaction intermediates of nitric oxide reductases involved in denitrification、ThermusQ高度好熱菌研究を切り拓くネオテクノロジー（伊豆）、2023
- I-18 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・當舎武彦：クライオ電子顕微鏡によるシトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素二量体の構造解析、第96回日本生化学会大会（福岡）、2023
- II-1 Shimada A, Baba J, Nagao S, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Muramoto K, Tsukihara T, Yoshikawa S. : Crystallographic cyanide-probing for cytochrome c oxidase reveals structural bases suggesting that a putative proton transfer H-pathway pumps protons, *J. Biol. Chem.* 299, 105277 (2023) DOI: 10.1016/j.jbc.2023.105277
- II-2 島田敦広・村本和優・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也：シトクロム酸化酵素における金属中心の酸化状態変化によって駆動されるプロトン輸送機構の解明、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）、2023
- II-3 井出智博・伊藤-新澤恭子・村本和優：ウシ心筋シトクロム酸化酵素の一酸化窒素結合構造、第35回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023
- II-4 村本和優・伊藤-新澤恭子：ウシ心筋シトクロム酸化酵素のカルシウム結合構造、日本生物物理学会第61回年会（名古屋）、2023
- II-5 村本和優・伊藤-新澤恭子、ウシ心筋シトクロム酸化酵素のカルシウム結合構造、日本生体エネルギー研究会第49回討論会（山口）、2023
- II-6 森星志郎・村本和優・伊藤-新澤恭子、コール酸フリーシトクロム酸化酵素の活性測定、第9回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2023
- II-7 井出智博・伊藤-新澤恭子・村本和優、ウシ心筋シトクロム酸化酵素の阻害剤結合構造、第9回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2023
- III-1 Ura A, Yanatori I, Shiro Y, Tosha T, Sawai H. : Molecular mechanisms for the iron binding and transport by PCBP、日本生物物理学会 第14会中国四国支部大会（鳥取）、2023、若手発表賞受賞
- III-2 浦 敦人・築取いずみ・城 宜嗣・澤井仁美：鉄シャペロンタンパク質 PCBP による鉄イオン輸送機構の解明、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）、2023
- III-3 坂上正虎・柴田晃利・阪口智哉・藤宇将吾・高原教代・築取いずみ・城 宜嗣・當舎武彦・澤井仁美：ヒト由来鉄還元酵素 Dcytb と二価金属輸送体 DMT1 の相互作用解析に向けた恒常共発現系の構築、第35回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023

- III-4 大谷 豪・柴田晃利・藤宇将吾・高原教代・築取いずみ・城 宜嗣・當舎武彦・澤井仁美：
二価金属輸送体 DMT1 の構造解析に向けた精製法の検討、第 35 回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023
- III-5 浦 敦人・築取いずみ・當舎武彦・城 宜嗣・澤井仁美：細胞内での鉄の輸送と貯蔵の分子メカニズム、第 35 回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023、ポスター賞受賞
- III-6 阪口智哉・澤井仁美・城 宜嗣・鏑木基成・當舎武彦・木村哲就・杉本 宏：鉄還元機能を持つ 6 回膜貫通型タンパク質 101F6 の大腸菌での発現と機能解析、第 96 回日本生化学会大会（福岡）、2023
- III-7 Ura A, Yanatori I, Tosha T, Shiro Y, Sawai H. : Molecular mechanism of iron trafficking into ferritin via iron chaperone、20th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC20) (オーストラリア、アデレード)、2023

生命科学専攻

博士前期過程

- 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 の効率的な精製法の確立

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（令和 3-5） 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
- 2 科学研究費補助金（令和 4-5） 新学術領域研究（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
- 3 学術国際交流事業（令和 5-6） 二国間交流事業 課題番号：120233211
研究課題 高速分子動画が明らかにする光感受性タンパク質の作用機序
研究代表者 當舎武彦
- 4 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.

本プロジェクトと次項II「X線結晶構造解析関連応用技術開発」は、「あらゆる結晶の全自動構造解析の実現」を目的として行う研究であって、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。

プロジェクトIは、SPring-8 構造生物学用ビームラインの高度化研究である。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)」と高輝度光源および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、大量に得られるX線回折強度データと構造解析結果の利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、結晶内でも見られる構造の多様性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。

全自動構造解析以外にも、X線損傷を管理したX線回折実験法の開発高度化研究にも取り組んでおり、微小結晶を迅速に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)の開発などを進めている。またX線自由電子レーザー(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。これらとは別に、XFELの主要な応用対象である常温時分割構造解析を放射光でも実施可能にするための開発も行っている。

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.

本プロジェクトは、ビームラインの効果的な運用に資するビームライン周辺技術の開発である。具体例の一つは、効果的なビームライン運用上に向けた、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一方で、凍結条件の最適化実験や実際の結晶凍結作業の工程が時間と人的資源の両面で X 線結晶構造解析の律速となっている。これら工程の改善が効率的なビームライン運用につながる。

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、結晶に一切手を加えない X 線回折データ収集法であり、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品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解析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、真空中に結晶を保持し X 線回折像を記録する真空回折計の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、極小さな結晶からでも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 Imaizumi R., Matsuura H., Yanai T., Takeshita K., Misawa S., Yamaguchi H., Sakai N., Miyagi-Inoue Y., Suenaga-Hiromori M., Waki T., Kataoka K., Nakayama T., Yamamoto M., Takahashi S., Yamashita S. : Structural-Functional Correlations between Unique N-terminal Region and C-terminal Conserved Motif in Short-chain cis-Prenyltransferase

- from *Tomato, Chembiochem*, 25(7), e202300796 (2024)
- I-2 Matsuura H., Sakai N., Toma-Fukai S., Muraki N., Hayama K., Kamikubo H., Aono S., Kawano Y., Yamamoto M., Hirata K. : Elucidating polymorphs of crystal structures by intensity-based hierarchical clustering analysis of multiple diffraction data sets, *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 79(Pt 10), 909-924 (2023)
- I-3 Yanai T., Takahashi Y., Katsumura E., Sakai N., Takeshita K., Imaizumi R., Matsuura H., Hongo S., Waki T., Takahashi S., Yamamoto M., Kataoka K., Nakayama T., Yamashita S. : Structural insights into a bacterial beta-glucosidase capable of degrading sesaminol triglucoside to produce sesaminol: toward the understanding of the aglycone recognition mechanism by the C-terminal lid domain, *J Biochem*, 174(4), 335-344 (2023)
- I-4 松浦滉明、坂井直樹、河野能顕、山本雅貴、平田邦生 : タンパク質 X線結晶構造解析におけるビッグデータ化と構造生物学における新たな展開、*放射光*、36(5), 232-242 (2023)
- I-5 Ando R., Shimozono S., Ago H., Takagi M., Sugiyama M., Kurokawa H., Hirano M., Niino Y., Ueno G., Ishidate F., Fujiwara T., Okada Y., Yamamoto M., Miyawaki A. : StayGold variants for molecular fusion and membrane-targeting applications, *Nat Methods*, (2023)
- I-6 Tsutsumi E., Niwa S., Takeda R., Sakamoto N., Okatsu K., Fukai S., Ago H., Nagao S., Sekiguchi H., Takeda K. : Structure of a putative immature form of a Rieske-type iron-sulfur protein in complex with zinc chloride, *Commun Chem*, 6(1), 190 (2023)
- I-7 Lee Hye-Eun · Okumura Tomoyo · Ooka Hideshi · Adachi Kiyohiro · Hikima Takaaki · Hirata Kunio · Kawano Yoshiaki · Matsuura Hiroaki · Yamamoto Masaki · Yamamoto Masahiro · Yamaguchi Akira · Lee Ji-Eun · Nam Ki Tae · Ohara Yasuhiko · Hashizume Daisuke · McGlynn Shawn · Nakamura Ryuhei : Power Generation in Hierarchical Alkaline Hydrothermal Vents, *Water-Rock Interaction WRI17* (仙台), 2023, (Oral)
- II-1 Ueno Go · Kobayashi Kotori · Maeki Masatoshi · Sakai Naoki · Matsuura Hiroaki · Kawamura Takashi · Kumasaka Takashi · Yamamoto Masaki : Development of a new microfluidic device aiming at ligand screening with protein crystallography、*Twenty-Sixth Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (Melbourne/Austraria)*, 2023, (Poster)
- II-2 上野 剛 · 小林ことり · 真栄城正寿 · 西岡晶子 · 坂井直樹 · 河村高志 · 松浦滉明 · 竹下浩平 · 吾郷日出夫 · 熊坂 崇 · 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の開発、*第 37 回日本放射光学会年会 (姫路)*、2024、(口頭)
- II-3 小林ことり · 上野 剛 · 真栄城正寿 · 西岡晶子 · 坂井直樹 · 河村高志 · 松浦滉明 · 竹下浩平 · 山本雅貴 : マイクロ流路デバイスを用いた化合物スクリーニング系の構築、*第 23 回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)*、2023、(ポスター)
- III-1 Matsuura Hiroaki · Ago Hideo · Kobayashi Amane · Ueno Go · Hirata Kunio · Suzuki Akihiro · Yamamoto Masaki : Development of an in-vacuum diffractometer for protein micro-crystallography、*Molecular Movie International Symposium 2023 (淡路市)*, 2023, (Poster)
- III-2 松浦滉明 · 吾郷日出夫 · 上野 剛 · 平田邦生 · 鈴木明大 · 山本雅貴 : 極微小結晶からの構造解析に向けた真空回折計の開発、*令和 5 年(2023 年)度日本結晶学会年会 (宇部市)*、2023、(口頭)

- III-3 松浦滉明・吾郷日出夫・小林 周・上野 剛・平田邦生・鈴木明大・山本雅貴：極微小結晶からの高感度計測のための真空回折計の開発、第37回日本放射光学会年会（姫路市）、2024、（口頭）

生命科学専攻

博士前期過程

大恵千翔

小林ことり

中山 楓

馬場匠望

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・桜井一
Yoshida, H., Sasaki, K., Sakurai, H.

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（東京大学薬学研究所一条秀憲博士・名黒功博士との共同研究）。このうち、OMA1 や CALM3、TJAP について遺伝子破壊細胞を作製し、解析を進めている。

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 KLF2 と KLF4 や転写制御配列 PGSE を同定した。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り、その転写制御を担う転写因子の候補 FOXL2 を単離した。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。これらの遺伝子はいずれもトランスゴルジ領域での PI4P 産生に必要な遺伝子であるが、これらの遺伝子を破壊した細胞を作製したところ、ゴルジ体ストレスによる細胞死が抑制された。このことは、ゴルジ体ストレスによってトランスゴルジ領域に PI4P が蓄積することが細胞死の原因であると考えられる。ムチン経路に関しては、エンハンサー配列 MGSE を同定し、転写因子の候補として RelA を単離した。

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 CK2 α 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 Signal sequence-triage is activated by translocon obstruction sensed by an ER stress sensor IRE1 α . Ashuei Sogawa, Ryota Komori, Kota Yanagitani, Miku Ohfurudono, Akio Tsuru, Koji Kadoi, Yukio Kimata, Hiderou Yoshida, Kenji Kohno. *Cell Structure and Function* 48: 211-221, 2023.
- I-2 吉田秀郎 ゴルジ体内の化学環境摂動に対抗する恒常性維持機構 第96回日本生化学会大会 (2023)
- I-3 吉田秀郎 脂質輸送異常に起因するゴルジ体ストレスによって細胞死が引き起こされる分子機構 第75回日本細胞生物学会大会 (2023)
- I-4 Marika Toide, Sadao Wakabayashi, Hajime Sakurai, Toshiyuki Yamaji, Kaori Sakurai, Kanae Sasaki, Kentaro Hanada, Masahumi Yohda and Hiderou Yoshida The mechanism of cell death induction by the cholesterol pathway in the Golgi stress response 第75回日本細胞生物学会大会 (2023)
- I-5 田中伶知, 三宅衣織奈, 坂本美憂, 田中隆也, 田中梓, 寺見美咲, 小森亮太, 谷口麻衣, 若林貞夫, 桜井一, 佐々木桂奈江, 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答の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69回日本生化学会近畿支部例会 (2023)
- I-6 桜井一, 岩下秀文, 荒川聡子, Alifu Yikelamu, 草場みずき, 小藤智史, 仁科博史, 石山宗孝, 上野右一郎, 吉田秀郎, 清水重臣 ゴルジ体関連分解 GOMED を可視化する蛍光プローブの開発 第17回日本臨床ストレス応答学会大会 (2023)
- I-7 佐々木桂奈江, 都出茉莉花, 桜井一, 若林貞夫, 久住聡, 山地俊之, 櫻井香里, 甲賀大輔,

- 花田賢太郎、養王田正文、吉田秀郎 トランスゴルジ領域のイノシトールリン脂質代謝異常によるゴルジ体ストレス応答の活性化 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-8 Mirai Mukaida, Mohanmad Ikhwan Jamaludin, Sadao Wakabayashi, Ryota Komori, Hayataka Takase, Hiderou Yoshida. Search for Regulators of the Golgi Stress Response Mucin Pathway 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-9 桜井一、芳岡知樹、佐々木桂奈江、清水重臣、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答とGOMEDのクロストーク機構の解析 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-10 山口颯人、三宅衣織奈、坂本美憂、田中梓、小森亮太、谷口麻衣、若林貞夫、桜井一、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の転写誘導を制御する候補因子Fox familyの解析 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-11 Ryota Komori, Ashuei Sogawa, Kota Yanagitani, Miku Ohfurudono, Akio Tsuru, Koji Kadoi, Yukio Kimata, Hiderou Yoshida, Katsutomu Okamura, Kenji Kohno Signal sequence-triage and activation of IRE1 α during translocon obstruction 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-12 柱谷志織、若林貞夫、桜井一、名黒功、佐々木桂奈江、一條秀憲、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答TFE3経路におけるCALM3の機能解析 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-13 田中伶知、田中梓、小森亮太、谷口麻衣、若林貞夫、桜井一、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路を制御する転写因子KLF2とKLF4の標的遺伝子の探索 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-14 都出茉莉花、若林貞夫、桜井一、山地俊之、櫻井香里、佐々木桂奈江、花田賢太郎、養王田正文、吉田秀郎 PI4P代謝異常によるゴルジ体ストレスはゴルジ体の糖鎖修飾機能を阻害する 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-15 東美帆、柱谷志織、畔上秀太、若林貞夫、桜井一、名黒功、佐々木桂奈江、一條秀憲、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答TFE3経路の転写因子TFE3の核移行制御因子OMA1の解析 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-16 畔上秀太、岩崎洸介、岡本明日香、柱谷志織、佐藤麻也夏、東美帆、桜井一、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答TFE3経路におけるTJAP1の機能解析 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-17 芳岡知樹、桜井一、若林貞夫、佐々木桂奈江、清水重臣、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス状態におけるタンパク質品質管理機構の解析 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-19 本多一樹、都出茉莉花、桜井一、若林貞夫、山地俊之、櫻井香里、佐々木桂奈江、花田賢太郎、養王田正文、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答コレステロール経路の制御因子CDIPTの解析 第46回日本分子生物学会年会(2023)
- I-20 木村美紗子、桜井一、若林貞夫、佐々木桂奈江、細田一史、吉田秀郎 ゴルジストレスによるゴルジ体形態の定量化 第46回日本分子生物学会年会(2023)

生命科学専攻

博士前期課程

- 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
樫本武澄 : 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
都出茉莉花 : ゴルジ体ストレス応答 PI4P 経路の制御因子の解析

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5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5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5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2023-国内27 (令和5年度)
研究課題 遺伝子破壊マウスを用いたゴルジ体ストレス応答の解析と
抗がん剤開発への応用
研究代表者 吉田秀郎

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、翻訳伸張に関わる tRNA 群と異なり翻訳開始 tRNA^{Met} 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^{Trp}CCA についてシステマティックな多重欠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^{UUA}のintronが必要なアンチコドン修飾に必須であるだけで無く、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、我々のグループに属する林紗千子特任助教が中心となって、tRNA-Leu^{CAA}のintron欠失株において、intron欠失のmRNAレパ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。さらに、通常の酵母株では連続のLeu残基やLys残基の翻訳はその残基数が増えると翻訳が遅延、さらには、停滞するが、この効果がtRNA-Leu^{CAA}のintron欠失株で弱まっていることを見出し、その機構に関して研究を進めている。

III mRNAの翻訳制御機構の解析

Investigation of mechanisms for translational regulation in yeast.

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、我々のグループでは、林紗千子特任助教が主導して、以下の様な本制御に関する研究テーマの展開している。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を明らかとなった。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。加えて、ribosomeタンパク質Rps7はRPS7AとRPS7Bという2つのパラログ遺伝子から供給されるが、これらの発現制御は二者の間で異なる事を我々は明らかにした。現在、これらパラログの発現制御のクロストークに

関しても研究を進めている。

IV ミトコンドリアに局在する ペプチジル tRNA 加水分解酵素の機能解析

Analyses of functions of peptidyl-tRNA hydrolases localized to the mitochondria

井澤俊明・吉久徹
Izawa, T., Yoshihisa, T.

タンパク質の合成過程においては一定の頻度でリボソームの不安定化や異常停滞が引き起こされ、翻訳が途中で終了することがある。この際に産生される合成途上のペプチジル tRNA はペプチジル tRNA 加水分解酵素によってポリペプチド鎖と tRNA に分解され、tRNA はリサイクルされるとともにポリペプチド鎖は分解される。私たちはこれまでに、この機構に関わるサイトゾルのペプチジル tRNA 加水分解酵素である Vms1 を同定し、その機能がミトコンドリアタンパク質の恒常性維持に重要な役割を担うことを示してきた。しかしサイトゾルには Vms1 以外に、もう 1 つのペプチジル tRNA 加水分解酵素である Pth2 が存在する。興味深いことに、Pth2 はミトコンドリア外膜に局在する一回膜貫通タンパク質であることから、ミトコンドリア外膜上で機能すると考えられる。それでは、Pth2 がミトコンドリア外膜に局在することの生理的意義は何だろうか？本研究では Pth2 の機能を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、Pth2 がミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成に必要であること、Pth2 のミトコンドリア膜貫通ドメインがその機能に必須であることを見出した。現在は Pth2 の機能について詳細な解析を行っている。

また、ミトコンドリアは独自のゲノムを有するオルガネラであり、ミトコンドリアマトリクスにはサイトゾルの翻訳系とは異なる専用の翻訳系が存在する。ミトコンドリア翻訳系においても同様に翻訳の途中終了が一定の頻度で生じると考えられ、したがってミトコンドリア内にも複数のペプチジル tRNA 加水分解酵素が存在する。本研究ではミトコンドリアマトリクスのペプチジル tRNA 加水分解酵素である Pth1 の欠失細胞を作成し、ペプチジル tRNA の蓄積の検出を試みた。現時点ではペプチジル tRNA の検出には至っておらず、引き続き検出できる実験系の確立を進める。

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・井澤俊明・横田悦雄
Yoshihisa, T., Izawa, T., Yokota, E.

発表論文 List of Publications

- I-1 Matsui, M., Ikeda, A., Nagai, A., Taniwaki, M., Sasada, N., Irie, M., Hayashi, S., and Yoshihisa, T.: Regulation of tRNA repertoires in the budding yeast : 2023 Taiwan-Japan Bilateral Meeting on RNA and Biofunctions (国際会議) (2023)
- I-2 Hayashi, S., Kayo, H., Nakamura R., Shichino, Y., Iwasaki, S., and Yoshihisa, T.: Intricated connection of the tRNA^{LeuCAA} intron with cytosolic ribosomes and mitochondrial gene expression in budding yeast : 第 25 回日本 RNA 学会年会 (2023)
- II-1 中村龍二郎、加藤瞳、吉久徹、林紗千子：出芽酵母の tRNA^{LeuCAA}イントロン欠失株で生産されるリボソームに関する解析：第 46 回日本分子生物学会年会 (2023)
- III-1 Hayashi, S., Iwamoto, K., and Yoshihisa, T. : A non-canonical Puf3p-binding sequence regulates *CAT5/COQ7* mRNA under both fermentable and respiratory conditions in budding yeast : *PLoS One* **18**, e0295659 (2023)
- III-2 林紗千子、岩元夏純、吉久徹：出芽酵母 *CAT5/COQ7* mRNA は非典型的結合配列により、呼吸と発酵の両方で Puf3p に制御される : 第 46 回日本分子生物学会 (2023)
- IV-1 井澤俊明：リボソーム関連品質管理とオルガネロスタシス：第 3 回関西 RNA クラブ (2024)
- IV-2 井澤俊明：リボソームが立ち往生する時、細胞はどう対処するか？：県立大学理学部・県立健康科学研究所 合同研究発表会 (2024)

生命科学専攻

博士前期課程

田村 匠： 培地の炭素源に依存してミトコンドリアタンパク質の翻訳状況はどう変化するか？

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 5~6 年度) 挑戦的研究 課題番号 23K18100

研究課題 修飾状態を反映した RNA 可視化法の開発とその tRNA 動態解析への応用
研究代表者 吉久 徹

2 AMED 革新的先端研究開発支援事業 プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出 (令和 2~5 年度)

研究課題 新生ポリペプチド鎖の品質管理から理解するオルガネロスタシス
研究代表者 井澤俊明

3 公益財団法人 内藤記念科学振興財団 内藤記念科学奨励金・研究助成 (令和 5~7 年度)

研究課題 小胞体タンパク質品質管理における CAT テイリングの役割の解明
研究代表者 井澤俊明

4 公益財団法人 武田科学振興財団 2023 年度 ライフサイエンス研究助成 (令和 5 年度~7 年度)

研究課題 CAT テイリングと糖鎖修飾機構の協奏による新規タンパク質品質管理機構の解明
研究代表者 井澤俊明

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て倍加したのち、均等に分配されなければならない。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することも重要である。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) DNA 複製の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) 再複製の開始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続けている。

1) CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの機能制御の解析

Cdt1 は DNA ヘリカーゼ (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 期が開始すると速やかに分解され、よって再複製が抑制される。CRL4-Cdt2 はこの分解に働くユビキチンリガーゼで、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、一方、S 期以降に起こるリン酸化は Cdt2 と PCNA との結合を抑制し負に働くことを報告した。これらのモチーフ、領域、修飾が CRL4-Cdt2 の DNA 複製部位である PCNA フォーサイへの集積に及ぼす効果を調べるために、mCherry と融合した以下の 5 種類の発現プラスミドを作成し：Cdt2-WT (野生型)、-PIPm (PIP 変異体)、- Δ DBD (DNA 結合部位欠失変異体)、- Δ DBD PIPm (二重変異体)、-18A (リン酸化部位変異体)、これらを EGFP-PCNA 安定発現 U2OS 細胞に導入してライブイメージ観察を行った。Cdt2-WT は、予想通り S 期開始後に PCNA フォーサイへの集積が見られ、S 期中期以降消失した。 Δ DBD による影響はほとんど見られなかった。一方、予想に反して PIPm が S 期初期に集積する様子が観察された。興味深いことに PIPm と Δ DBD の二重変異体では、集積が見られなくなった。Cdt2 の N 末基質認識ドメインが PCNA に結合した Cdt1 を認識して捉える過程において、PIP と DBD が相互に寄与することが示唆された。また、Cdt2-18A 発現細胞では S 期後期においても PCNA に局在し S 期進行が遅延することが観察された。

2) 再複製の過程の解析

2 倍体細胞が 4C よりも多い DNA 量を有す場合、再複製が予測される。しかし、再複製がどのように開始するのか、そして、細胞は再複製に対してどのような応答を示すのかよく分かっていない。

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。これまでに EGFP-PCNA 細胞に MLN4924 を添加し、長時間タイムラプス撮影を行うと、通常の複製フォークを形成しながら S 期を終了した後、再複製特有のフォークが長時間続くことを示した。今回新規手法として、新たに複製された DNA に取り込まれるヒストン H4K20 は非メチル化状態(me0) であることから、H4K20me0 を認識する ARD ドメインの核局在を観察すると、再複製が開始するタイミングや部位を特定できると予想して、GFP 融合 ARD ドメイン発現細胞を構築しライブ観察で追跡した。通常の細胞周期進行時には GFP-ARD は S 期進行に伴い核内に斑点状の蛍光シグナルが現れて広がっていき、その後輝度が減少したのち M 期に入るが、MLN4924 を添加した場合は、通常と同様の輝度の変化を示したのち M 期には移行せず、一定期間において再び GFP シグナル強度が増加することがわかった。PCNA と ARD の解析を合わせて、S 期を終えたのち長い G2 期様の期間において再複製が開始すると推測された。

また、DNA 損傷時にカルシウム応答が起こ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 $[Ca^{2+}]$ の変化を解析している。これまでに Ca^{2+} センサー GCaMP6 安定発現 U20S 細胞にて、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。この時期に、 Ca^{2+} キレート剤で処理すると、細胞死が高頻度で発生することを見出した。おそらくアポトーシス誘導が促進したことによると推測された。カルシウム応答は再複製に伴う障害による細胞死から守る働きをすると考えられる。

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。

DNA からの PCNA 除去を担う Elg1-RFC について、その相互作用因子を質量分析で探索すると、WDR18 と STUB1 が新規相互作用因子としてみいだされた。そこで、これらの因子は Elg1-RFC の機能を制御する役割があるのではと考え、解析を進めている。

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 TRAIIP が PCNA 除去に寄与することがわかってきた。TRAIIP 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、TRAIIP 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、TRAIIP は S 期から M 期にかけて発現量が増加し、PCNA の除去に機能することが分かってきた。そこで、TRAIIP による M 期での PCNA 除去に連係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、高尾一仁、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：染色体再複製の開始と細胞応答について 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2023年6月5日～2023年6月7日
- 2 塩見泰史、松原和司、清水優輝、田所あすか、鐘巻将人、小布施力史、西谷秀男：DNAからPCNAを除去する反応経路の解析 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2023年6月5日～2023年6月7日
- 3 田所あすか、鐘巻将人、西谷秀男、塩見泰史：M期進行時のPCNA除去を介して安定な細胞周期進行に寄与するTRAIPの機能解析 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2023年6月5日～2023年6月7日
- 4 花崎聡太郎、高尾一仁、渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：MLN4924による核内再複製開始過程の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 5 飯田康介、林晃世、宇野未来、塩見泰史、西谷秀男：DNA再複製に伴う細胞内カルシウム応答の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 6 戸次龍哉、海老原溪、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：ライブイメージングによるDNA複製部位へのCRL4-Cdt2ユビキチンリガーゼの集積機構の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 7 松原和司、清水優輝、小布施力史、西谷秀男、塩見泰史：Elg1-RFCによるDNAからのPCNA除去の制御に関わる新規因子の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 8 清水優輝、松原和司、小布施力史、西谷秀男、塩見泰史：クロマチンPCNAの量的制御機構におけるSTUB1の機能解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 9 塩見泰史、清水優輝、松原和司、岩井結希、鐘巻将人、西谷秀男：クロマチンからのPCNA除去に連係したゲノム維持 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日

生命科学専攻

博士後期課程

田所あすか：PCNA新規除去機構におけるTRAIPの機能解析

博士前期課程

- 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 TRAIIP 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
花崎聡太郎 : 染色体再複製開始の機構の解析
戸次龍哉 : CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの PCNA foci 集積の細胞周期制御

科学研究費補助金等

- 1 令和 5 年度 兵庫県立大学 研究活動推進費 (若手)
研究課題 正確な DNA 複製を保證するタンパク質分解系の分子構造基盤の解明
研究代表者 林晃世
- 2 令和 5 年度 公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団
研究課題 DNA からの PCNA 除去に連係したゲノム維持機構
研究代表者 塩見泰史

Plant Cell and Developmental Biology 生体分子生合成

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して、その内部構造変化について解析を行なった。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、市販のお茶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分析すると、いくつかの製品でコンカナバリンAが検出されることを見出した。

V 種子発芽時における遺伝子発現機構の解析

Analysis of gene expression during seed germination

山内大輔・水島恒裕
Yamauchi, D., Mizushima, T.

種子貯蔵物質は、発芽時に分解され、芽や根の成長に利用される。この分解に関わる加水分解酵素の遺伝子発現は、植物ホルモンであるジベレリンに誘導される。オオムギのジベレリン応答発現に関わると予想される転写因子のcDNAを単離して、それらの塩基配列を決定した。

V 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 Defective import of mitochondrial metabolic enzyme elicits ectopic metabolic stress. Nishio, K., Kawarasaki, T., Sugiura, Y., Matsumoto, S., Konoshima, A., Takano, Y., Hayashi, M., Okumura, F., Kamura, T., Mizushima, T., Nakatsukasa, K. *Sci. Adv.* (2023) eadf1956
- I-2 粕谷航平、佐藤匡史、矢木宏和、吉田雪子、加藤晃一、水島恒裕 NGLY1 欠損症の発症に寄与するユビキチンリガーゼ Fbs2 の結晶構造解析、令和 5 年度兵庫県立大学理学部 技術・人材マッチング交流会、2023 年 12 月 1 日、兵庫
- I-3 粕谷航平、佐藤匡史、矢木宏和、吉田雪子、加藤晃一、水島恒裕 NGLY1 欠損症の発症に寄与するユビキチンリガーゼ Fbs2 の結晶構造解析、第 9 回バイオダイナミクス研究科、2023 年 12 月 14 日、兵庫
- II-1 中村真唯子、平木慶人、小杉将吾、Kim Minsoo、水島恒裕 病原細菌 NEL 型ユビキチンリガーゼの反応中間体構造解析、令和 5 年度日本結晶学会年会、2023 年 10 月 27-29 日、宇部
- II-2 馬場 拓海、平木 慶人、粕谷 航平、小倉 実、西出 旭、Kim Minsoo、水島 恒裕 Legionella 菌 Cif 様タンパク質の X 線結晶構造解析、令和 5 年度日本結晶学会年会、2023 年 10 月 27-29 日、宇部
- II-3 中村真唯子、平木慶人、小杉将吾、Kim Minsoo、水島恒裕 病原細菌 NEL 型ユビキチンリガーゼの反応中間体構造解析、第 9 回バイオダイナミクス研究科、2023 年 12 月 14 日、兵庫
- II-4 馬場 拓海、平木 慶人、粕谷 航平、小倉 実、西出 旭、Kim Minsoo、水島 恒裕 Legionella 菌 Cif 様タンパク質の X 線結晶構造解析、第 9 回バイオダイナミクス研究科、2023 年 12 月 14 日、兵庫
- III-1 Three-dimensional visualization of plant tissues and organs by X-ray micro-computed tomography. Karahara, I., Yamauchi, D., Uesugi, K., Mineyuki, Y. *Microscopy* **72**, 310–324 (2023)
- III-2 唐原一郎・若林孝尚・山浦遼平・若林孝尚・玉置大介・蒲池浩之・山内大輔・峰雪芳宣・星野真人・上杉健太郎・嶋津徹・笠原春夫・鎌田源司・鈴木智美・小野田雄介・日渡祐二・久米篤・藤田知道：スペースモス宇宙実験で得たヒメツリガネゴケ仮根系の X 線マイクロ CT による 3D 可視化、日本植物学会第 87 回大会 2023 年 9 月 4 日－9 日 札幌
- III-3 松本壮史・内海ゆづ子・小塚俊明・岩村雅一・黄瀬浩一・中井朋則・山内大輔・唐原一郎・峰雪芳宣・星野真人・上杉健太郎：ミヤコグサ種子胚の細胞間隙：CT 画像を用いたキクタンニギクの花配列の推定、電子情報通信学会 2024 年 3 月 3-4 日 東広島
- III-4 荒牧輪・中井朋則・上杉健太郎・星野真人・玉置大介・唐原一郎・峰雪芳宣・山内大輔：X 線マイクロ CT を用いたイネ種子吸水過程における内部構造変化の観察：タイムラプスイメージングによる解析、第 65 回日本植物生理学会年会 2024 年 3 月 17-19 日 神戸
- VII-1 飯塚駿作・玉置大介・安原裕紀・中井朋則・唐原一郎・峰雪芳宣：分裂準備帯周縁に出現するアクチンウォールは微小管帯の拡散を防ぐ、第 34 回日本植物形態学会 2023 年 9 月 4 日 札幌

生命科学専攻

博士前期課程

粕谷航平 : ヌビキチンリガーゼ SCF^{Fbs2} 基質認識サブユニットの結晶構造解析

米田早秀 : ミヤコグサ塩基性 7S グロブリンの種子における局在性の解析

荒牧 輪 : 種子発芽条件による遺伝子発現と種子内部構造変化への影響に関する研究

後藤柊哉 : 立体構造に基づいた NAD(H)を補酵素とする脱水素酵素の高機能化方法の検討

中村真唯子 : 病原細菌 NEL 型ヌビキチンリガーゼの反応中間体構造解析による解析

馬場拓海 : 病原細菌エフェクターCif の構造解析による基質認識および反応機構の解析

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- κ 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 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 experience-dependent neurobehavioral plasticity
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的としている。雄の求愛行動をトリガーする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遺伝子を、リボソーム親和性精製 (TRAP) の高感度化とそれによる RNA-seq 解析によって調べた。これまでに、50 余りの遺伝子が、雄成虫を集団生活させた場合に高発現することを明らかにした。これらが雄の求愛行動を制御する可能性を検討するため、RNA 干渉法によってひとつ一つの遺伝子を細胞特異的にノックダウンし、その雄が集団生活後に雌に対してどのくらい活発に求愛するかを調べた。その結果、特定された遺伝子の中に雄の求愛行動を制御する遺伝子が複数含まれることが示唆された。その進展を手がかりとして、どのような分子機序が司令ニューロンの神経活動を変化させ、それが延いては求愛活性の低下を導くかについて調べている。

II キイロショウジョウバエにおける 季節適応的な食性変化と低温耐性の関係

Contribution of seasonal dietary changes to cold tolerance
in *Drosophila melanogaster*

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を始めとする体の機能をどのように変化させ、季節適応に寄与するのか、そのメカニズムの解明を目指している。これまでに、新たに構築した低温耐性評価の実験系を用いて、食餌に含まれる脂肪酸のうち低温耐性の強化に作用する脂肪酸種の同定を試みた。その結果、特定の脂肪酸を摂取して育った成虫は雌雄共に顕著な低温耐性を示すことが明らかとなった。GAL4/UAS システムを用いた遺伝学的手法によりこの脂肪酸の体内合成を促進したところ、同様に低温耐性が向上することが明らかとなった。続いて、どの発育時期にその特定脂肪酸を摂取すると成虫の低温耐性が強化されるのかを調べたところ、幼虫期の摂取が重要であることが分かった。成虫の細胞膜を構成する脂肪酸の組成をリピドーム解析により調べたところ、その組成は確かに幼虫期に摂取した餌の脂肪酸組成を反映していた。これらの結果は、幼若期の食性の変化が成虫の低温ストレス耐性を劇的に変化させることを通じて季節的な環境変化への適応に寄与することを示すものであり、その細胞機構の解明に関して今後更なる発展が期待される成果である。

Ⅲ 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

大岩和弘・古田健也
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。従来、タンパク質モータの研究は試験管内再構成系を使って行われてきたが、実際の細胞内環境とはイオン組成やイオン強度、粘度などが大きく異なっている。この違いが、タンパク質モータの運動の本質を理解することを妨げている可能性がある。そこで試験管内で細胞内環境を実現することにより、運動機能に差異が生まれるかを比較する実験を行なっている。また、試験管内再構成系において、タンパク質フィラメントの濃度を上昇させたときに生じる集団運動の創発構造の解析を進めている。集団運動の基本モデルである Vicsek モデルに新たなパラメーターを加えることで、この集団運動の再現を目指している。

発表論文 List of Publications

- I-1 K. Sato* and D. Yamamoto* : Molecular and Cellular Origins of Behavioral Sex Differences: A Tiny Little Fly Tells a Lot. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16: 128437 (2023) (*co-corresponding authors) <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1284367>
- I-2 佐藤耕世・Rindner D. J. (東北大)・原 佑介 (NICT)・富原健太 (NICT)・山元大輔 (NICT) : 雄との同棲経験に依存したショウジョウバエ突然変異体サトリの雄-雄求愛は遺伝子発現変化を随伴する 第46回日本分子生物学会年会 (神戸) 2023
- I-3 樺澤朱里・Rindner D. J. (東北大)・富原健太 (NICT)・原 佑介 (NICT)・山元大輔 (NICT)・佐藤耕世 : ショウジョウバエ雄成虫の社会経験依存的な求愛行動可塑性を規定する分子神経機構の探索 第46回日本分子生物学会年会 サイエンスピッチ (神戸) 2023
- I-4 樺澤朱里・Rindner D. J. (東北大)・富原健太 (NICT)・原 佑介 (NICT)・山元大輔 (NICT)・佐藤耕世 : ショウジョウバエ雄成虫の社会経験依存的な求愛行動可塑性を規定する分子神経機構の探索 第46回日本分子生物学会年会 ポスター発表 (神戸) 2023
- II-1 原 佑介 (NICT)・佐藤耕世・郷康弘 (兵庫県立大)・山元大輔 (NICT) : Lipid-dependent physiological changes in brain insulin-producing cells as a climate acclimatization. 第45回日本比較生理生化学会大会 (大阪) 2023
- II-2 森岡穂乃花・原佑介 (NICT)・山元大輔 (NICT)・佐藤耕世 : Intake of linoleate in the larval stage enhances adult cold tolerance in *Drosophila melanogaster*. 第45回日本比較生理生化学会大会 (大阪) 2023
- II-3 原佑介 (NICT)・佐藤耕世・郷康弘 (兵庫県立大)・山元大輔 (NICT) : 脂質依存的な脳内インスリン産生細胞の機能変化とその環境ストレス応答への寄与 第46回日本神経科学大会 (仙台) 2023
- III-1 H. Sakuta (Tokyo Univ.), N. Nakatani, T. Torisawa (NIG), Y. Sumino (Tokyo Sci. Univ), K. Tsumoto (Mie Univ), K. Oiwa, K. Yoshikawa (Doshisha Univ.): Self-emergent vortex flow of microtubule and kinesin in cell-sized droplets under water/water phase separation. *Communications Chemistry*, 6(1), 80-88, doi: 10.1038/s42004-023-00879-5
- III-2 K. Oiwa, S. Tamai, K. Sato : The extremely long flagellum of *Drosophila melanogaster* spermatozoon beats with small helical waves superimposed on large helical waves. 第61回日本生物物理学会年会 2023
- III-3 S. Tamai, K. Sato, K. Oiwa : Helical bending waves superimposed on large helical waves

of an extremely long flagellum of *Drosophila melanogaster* spermatozoon. The 49th Naito Conference on Frontiers of Microtubule and Its-Related Motors: Atomic Structures, Cellular Functions, Development and Diseases (札幌) 2023

- III-4 Y. Harada, K. Oiwa : Emergence of polar streams and swirling patterns in microtubule ensembles driven by surface-granted cytoplasmic dynein constructs. Biophysical Society Annual Meeting, BPS2024, (アメリカ、フィラデルフィア) 2024

生命科学専攻

博士後期課程

佐川美咲：タンパク質モーターの協同的運動特性の創出メカニズム

博士前期課程

原田洋祐：細胞質ダイニンによる微小管滑り運動が創出する動的渦構造の創出原理

樺澤朱里：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

森岡穂乃花：寒冷耐性を制御する脳神経内分泌機構の解明

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

I R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質の中 枢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、HP1(heterochromatin protein 1)ファミリータンパク質をその候補因子として見出した。そこで、lamin A と各 HP1 ファミリータンパク質メンバー(HP1 α , HP1 β , HP1 γ)との相互作用の特異性を生細胞内でのたんぱく質間相互作用を検出できる Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析法調べたところ、HP1 β のみが lamin A と相互作用することが判明した。HP1 β 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 β 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。R5 年度は、lamin A が HP1 β とのみ相互作用する分子的根拠を示すために、lamin A との相互作用に関与する HP1 β タンパク質のアミノ酸配列を決定するための実験を開始した。具体的には、HP1 β の一部を HP1 α の相当領域と置き換えた HP1 α と HP1 β のキメラ変異体および HP1 ファミリータンパク質の中で HP1 β のみにユニークなアミノ酸残基を HP1 α/γ のそれと置換した一アミノ酸置換型 HP1 β を作成した。これらの HP1 β 変異体がそれぞれ lamin A と相互作用するか否かを BiFC 解析法および共免疫沈降実験で調べた。現在までに得られた結果からは lamin A との特異的相互作用に関わるアミノ酸領域を特定の場所に絞り込めていない。このことは、HP1 β タンパク質上の複数の領域(アミノ酸配列)が lamin A との特異的結合に関与している可能性を示唆する。現在、さらなる HP1 β 変異体を作成し検討中である。

Cellular Structural Physiology

細胞構造学

I 低温電子顕微鏡法を用いた液体含有試料の微細形態観察

Application of cryo-electron microscopy to the microstructure observation of various liquid-containing 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。この手法を用いると、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、高分子有機化合物または無機化合物がコロイド状に分散した液体試料についても、透過電子顕微鏡または走査電子顕微鏡での微細構造観察が可能である。この手法では、アルコール、カーボネート系溶媒、油脂をはじめとした、水以外の液体を含む試料についても観察が可能であることが実証された。水とは性質の異なるこれらの液体試料について、それぞれに適した凍結法、断面作製法、観察法の検討を行った。

II 培養細胞を用いた骨格筋細胞への分化の研究

Study of inducing differentiation from cultured cells into skeletal muscle cells

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

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

胚性幹細胞やマウス筋原細胞である C2C12 細胞から筋管細胞への分化誘導法が知られているが、筋管細胞からさらに分化成熟の進んだ骨格筋細胞へは、未だに安定した分化誘導法が確立されていない。これまでに、胚性幹細胞から作製した胚様体にポリアミンの一種であるスペルミンを一時的に添加することにより、骨格筋細胞を含む筋繊維シートを形成させることができた。この筋繊維シートの分化の状態を調べるために、筋特異的転写因子の発現パターンを調べた結果、胚性幹細胞からスペルミンを用いて分化誘導を行った細胞と、C2C12 細胞から血清枯渇により筋管細胞へ分化させた場合で類似した発現パターンが確認された。さらに、C2C12 細胞についても、ポリアミンの添加について検討したところ、ポリアミンが細胞の増殖や分化に作用することが明らかになった。

III ニコチン性アセチルコリン受容体の分子動態解析

Molecular dynamics 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や脂質と相互作用しながら構造変化してチャネル活性を調節している。これら分子との相互作用は非常に弱い結合であるため、複合体として細胞から取り出して解析することは困難である。本研究では、筋管細胞に発現している本来の複合体を形成した状態にある nAChR のリガンド依存的な構造変化を、一分子追跡法を用いて分子内運動として捉えることができた。

また、nAChR が複合体を形成する機構を解析するために、一般的な間接抗体法より精密な分子の位置を調べることができ、生細胞を用いた動態解析に利用可能な、抗 nAChR 抗体 Fab'フラグメント結合金コロイド粒子の調製を検討し、精製した nAChR および筋管細胞に発現している nAChR を特異的に標識できることを示した。

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知見に基づき、色素間の光エネルギー伝達を実験的に解析した。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 西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫：液状材料の微細構造研究(7)：液状材料観察におけるクライオ電子顕微鏡法の進展と課題、日本顕微鏡学会第 79 回学術講演会（島根）、2023
- I-2 高橋真一・伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：液状材料の微細構造研究(1)：クライオ電子顕微鏡法による燃料電池材料分散液の構造可視化、日本顕微鏡学会第 79 回学術講演会（島根）、2023
- I-3 在原一樹（日産自動車）・山本健介（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：液状材料の微細構造研究(3)：リチウムイオン電池性能に対するスラリー構造の影響解析、日本顕微鏡学会第 79 回学術講演会（島根）、2023
- I-4 島貫純一（日産アーク）・今井英人（FC-Cubic）・伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：液状材料の微細構造研究(4)：膨潤させた燃料電池触媒層のクライオ TEM 観察、日本顕微鏡学会第 79 回学術講演会（島根）、2023
- I-5 杉浦輝・村井卓也・伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：液状材料の微細構造研究(6)：クライオ SEM によるホイップクリームの構造観察、日本顕微鏡学会第 79 回学術講演会（島根）、2023
- I-6 杉浦輝（阪本薬品工業）・村井卓也（阪本薬品工業）・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）、2023
- I-7 兵頭俊輔（阪本薬品工業）・杉浦輝（阪本薬品工業）・村井卓也（阪本薬品工業）・伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：クライオ SEM によるホイップクリームの構造観察、第 61 回日本油化学会年会（高知）、2023
- I-8 Yuri Nishino・Kanako Miyazaki・Mizuho Kaise・Atsuo Miyazawa：Advantages of high-pressure freezing for cryo-SEM observation of the microstructure of O/W and W/O emulsions, 20th International Microscopy Congress (Busan, Korea) , 2023
- I-9 西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫：クライオ SEM を用いたエマルジョンの観察、日本顕微鏡学会 第 66 回シンポジウム（高崎）、2023
- I-10 北井悠樹・西野有里・宮澤淳夫：クライオ走査電子顕微鏡法による液状試料の微細構造解析、技術・人材マッチング交流会（赤穂郡）、2023
- II-1 Chinami Kinoshita・Maiko Aki・Atsuo Miyazawa：Generation of structurally-matured contractile muscle fiber sheets from mouse embryonic stem cells, 20th International Microscopy Congress (Busan, Korea) , 2023
- II-2 Chinami Kinoshita・Maiko Aki・Atsuo Miyazawa：C1C12 細胞の分化誘導におけるポリアミン関連物質の影響、日本顕微鏡学会第 79 回学術講演会（島根）、2023

- II-3 山端麻祐子・西野有里・宮澤淳夫：C2C12 細胞の分化誘導におけるポリアミン関連物質の効果、技術・人材マッチング交流会（赤穂郡）、2023
- 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')₂ 結合金コロイド粒子の作製、日本顕微鏡学会第 79 回学術講演会（島根）、2023
- III-2 Koichiro Oishi, Mayu Nagamori, Yasuhiro Kashino, Hiroshi Sekiguchi (JASRI), Yuji C. Sasaki (東京大), Atsuo Miyazawa, Yuri Nishino: Ligand-Dependent Intramolecular Motion of Native Nicotinic Acetylcholine Receptors Determined in Living Myotube Cells via Diffracted X-ray Tracking, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 12069, 2023
- IV-1 Joris Vasco (熊大)、浜勇二郎 (熊大)、板東(魚谷)未季 (熊大、放送大)、新澤(伊藤)恭子、井上(菓子野)名津子、菓子野康浩、川上恵典 (理研)、米倉功治 (理研)、小澄大輔 (熊大)：遠赤色光利用可能な光化学系 II の光捕集機能、第 17 回分子科学討論会 (阪大)、2023
- IV-2 小杉真貴子 (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)、工藤栄 (極地研)、菓子野康浩、小池裕幸 (中央大)、千田俊哉 (高エネ研)、大谷修司 (島根大)、豊田敦 (遺伝研)、西出浩世 (基生研)、皆川純 (基生研)：Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis performed by far-red light in an Antarctic alga、日本生物物理学会第 61 回年会 (招待講演) (名古屋国際会議場)、2023
- IV-3 Joris Vasco (熊大)、浜勇二郎 (熊大)、板東(魚谷)未季 (熊大、放送大)、新澤(伊藤)恭子、井上(菓子野)名津子、菓子野康浩、川上恵典 (理研)、米倉功治 (理研)、小澄大輔 (熊大)：遠赤色光利用可能な光化学系 II におけるカロテノイドからクロロフィルへのエネルギー伝達、2023 年光化学討論会 (広島国際会議場)、2023
- IV-4 小杉真貴子 (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)、工藤栄 (極地研)、菓子野康浩、小池裕幸 (中央大)、千田俊哉 (高エネ研)、大谷修司 (島根大)、豊田敦 (遺伝研)、西出浩世 (基生研)、皆川純 (基生研)：緑藻ナンキョクカワノリに見つかった赤外線利用型光合成のメカニズムと進化の道筋、日本植物学会第 87 回大会 (招待講演) (北大)、2023
- IV-5 小杉真貴子 (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)、工藤栄 (極地研)、菓子野康浩、小池裕幸 (中央大)、千田俊哉 (高エネ研)：南極緑藻に見つかった赤外線捕集アンテナタンパク質、第 23 回 日本光生物学協会年会 (招待講演) (京都大学)、2023 年
- IV-6 小杉真貴子 (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)、工藤栄 (極地研)、菓子野康浩、小池裕幸 (中央大)、千田俊哉 (高エネ研)、大谷修司 (島根大)、豊田敦 (遺伝研)、西出浩世 (基生研)、皆川純 (基生研)：トレブクシア藻綱における遠赤色光利用型光合成の潜在性、日本地衣学会第 22 回大会 (東京理科大)、2023
- IV-7 Miki Bando-Uotani (熊大、放送大), Kyouko Shinzawa-Itoh, Natsuko Inoue-Kashino, Yasuhiro Kashino, Keisuke Kawakami (理研), Koji Yonekura (理研), Nobuo Kamiya (大阪公立大) and Daisuke Kosumi (熊大)：Excitation energy transfer dynamics

of carotenoids in the far-red light utilizing photosystem II from *Acaryochloris marina*, 19th International Symposium on Carotenoids (富山国際会議場), 2023

- IV-8 Keisuke Kawakami (理研), Tasuku Hamaguchi (東北大), Kyoko Shinzawa-Itoh, Natsuko Inoue-Kashino, Shigeru Itoh (名大), Kentaro Ifuku (京大), Eiki Yamashita (阪大), Kou Maeda, Koji Yonekura (理研), Yasuhiro Kashino: Structure of the far-red light utilizing photosystem I of *Acaryochloris marina*, 11th International Conference on Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability (招待講演) (Istanbul, Turkey), 2023
- IV-9 川上恵典 (理研)、新澤 (伊藤) 恭子、眞木 (米倉) さおり (理研)、井上 (菓子野) 名津子、伊福健太郎 (京大)、伊藤繁 (名大)、米倉功治 (理研)、菓子野康浩: *Acaryochloris marina* 由来光化学系 II 複合体の構造、光合成セミナー (名工大)、2023
- IV-10 小杉真貴子 (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)、工藤栄 (極地研)、菓子野康浩、小池裕幸 (中央大)、千田俊哉 (高エネ研)、大谷修司 (島根大)、豊田敦 (遺伝研)、西出浩世 (基生研)、皆川純 (基生研): 緑藻ナンキョクカワノリの遠赤色光吸収型 LHC の構造と分子系統学解析、第13回日本光合成学会年会 (名大)、2023
- V-1 Minoru Kumazawa (京大), Noriko Ishikawa (京大), Shoko Tsuji (京大), Natsuko Inoue-Kashino, Yasuhiro Kashino, Kentaro Ifuku (京大): Photosynthetic properties of the lhcx1 knock-out mutant of the centric diatom *Chaetoceros gracilis* lacking energy-dependent NPQ, Molecular Life of Diatoms 7 (San Diego, California, USA), 2023

生命科学専攻

博士後期課程

大石鴻一郎: ニコチン性アセチルコリン受容体のリガンド依存的分子内部運動の解析

博士前期課程

上野真悠子: 光化学系 II 複合体の構築過程に関わる研究

木下知奈美: 異種細胞から分化誘導した筋細胞の解析

西田 基抗: nAChR 抗体 Fab' 結合金コロイド粒子の作製

安藝舞依子: マウス ES 細胞から骨格筋細胞への分化誘導条件の決定

小林希実花: ニコチン性アセチルコリン受容体複合体を含む膜断片調製法の検討

萩原奈那子: ニコチン性アセチルコリン受容体クラスター形成のための agrin の濃度検討とクラスターの分子局在解析

東森 碧月: ニコチン性アセチルコリン受容体ダイマーの精製およびナノディスクへの再構成条件の検討

山端麻佑子: C2C12 細胞の分化におけるポリアミン関連物質の影響

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 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

- 3 文部科学省科学研究費補助金（基盤 C） 令和 5 年度～令和 7 年度
研究課題 生体内環境に近い状態にあるニコチン性アセチルコリン受容体の構造と機能の
解析
研究代表者 宮澤淳夫

- 4 共同研究 トヨタ自動車（株） 令和 5 年度
研究課題 クライオ電子顕微鏡を用いたスラリ内部構造の評価
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里

- 5 共同研究 日産自動車（株） 令和 5 年度
研究課題 リチウムイオン電池用液系材料の構造観察
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里

- 6 共同研究 阪本薬品工業（株） 令和 5 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への添加効果
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里

- 7 共同研究 日産化学（株） 令和 5 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

- 8 文部科学省科学研究費補助金（基盤 B） 令和 5 年度～令和 7 年度
研究課題 遠赤色光のエネルギーレベルで駆動されるアカリオクロリス光化学系 II の構造
と機能
研究代表者 菓子野康浩

- 9 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）国立研究開発法人新エネルギー
・産業技術総合開発機構（NEDO） 令和 5 年度～令和 6 年度
研究課題 微細藻類由来バイオジェット燃料生産の産業化と CO2 利用効率の向上に資する
研究拠点及び基盤技術の整備・開発
研究代表者 日本微細藻類技術協会

I ゼブラフィッシュの脳における 神経細胞と特殊なグリアの発生・機能に関する イメージング解析

Imaging analysis of development and function of specialized neurons and glia in
the zebrafish brain

八田公平
Hatta K

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、脳の左右で交換する特殊な神経細胞の発生と機能について解析を進めている。また、魚類の後脳に存在し、逃避行動の制御に関わる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) において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、これを用いて、このグリア細胞の発生起源やマウスナー細胞との関係について調べている。また、終脳にある放射状グリアと GABA 作動性ニューロンとの関連についても解析を行なっている (松永)。

II 腸・心臓・浮袋、 及びそれらの自律神経系支配の発生・機能に関する ゼブラフィッシュをモデルとした 光遺伝学・イメージング解析

Optogenetic and imaging analysis of development and function of the gut, heart,
swim bladder, and their autonomic innervations in the zebrafish

八田公平
Hatta K

ゼブラフィッシュは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、ペースメーカー様細胞のカルシウム動態を GCaMP を用いて可視化して、蠕動反射と徐波関連運動の2種類の収縮波の解析を行なっている。また、光遺伝学的手法によって、腸の周りに存在する腸神経細胞や平滑筋、ペースメーカー様細胞、内胚葉細胞など1~数個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、さらに、脳腸相関 (川原)、心臓や肺の相同器官である浮袋 (山内) における副交感・交感神経系の発生について新しい知見が得られた。

Ⅲ 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

八田公平
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て、それらの発現部位や機能を解析している。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 (Nikaido et al. 2023)。また、平滑筋細胞とギャップ結合によって繋がっていると考えられている介在細胞の一種のマーカー *pdgfra* のゼブラフィッシュの腸における発現パターンを初めて報告した。一方、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ている (山本)。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) を単離して、その発現パターンを調べた。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。

Ⅳ 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. 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
Hatta K

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、スポットドガー、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、ハエトリソウがヨロピアン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、ウナギ目であるマウナギやアナゴ、タウナギ目、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、また、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、考察を進めている（長塚）。一方、砂を口から出すボラの特徴的な咽頭嚢とそれに付随する咽頭歯や、下顎咽頭骨に付随する鰓歯の詳しい構造について mCT と透明標本から明らかにした。また、スズキ目であるマナガツオの食道嚢にある食道歯の構造について、透明標本から、その詳しい構造を明らかにした（腰山）。

B: SPring-8における高解像度 nCT と共焦点顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡の技法や、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を行なっている。また、成魚の脳のグリア細胞（axon cap glia）の nCT による可視化にも成功している。

発表論文

- I-1 ○Maho Matsunaga, Shota Iwatani, Mio Aoki, Kohei Hatta Visualization of specialized glial cells in zebrafish larvae and their association with neurons (ポスター発表) 第46回日本分子生物学会 (2023年12月6-8日 神戸)
- II-1 ○Nozomi Yamauchi, Mari Oshima, Kohei Hatta Revealing the growth and function of neurons around heart and swim bladder in larval zebrafish (ポスター発表) 第46回日本分子生物学会 (2023年12月6-8日 神戸)
- III-1 ○Masataka Nikaido, Ayaka Shirai, Yumiko Mizumaki, Shuji Shigenobu (基礎生物学研究所), Naoto Ueno (基生研), ○Kohei Hatta Intestinal expression patterns of transcriptional factors and markers for interstitial cells in the larval zebrafish. *Dev Growth Differ* 65(7):418-428 (2023) (査読あり)
- IV-1 ○河野なつみ 脳から腸、そして顎へ ～ヒトに近いモデル生物「ゼブラフィッシュ」を用いた研究～ (ポスター発表) 令和5年度兵庫県立大学理学部・大学院理学研究科 技術・人材マッチング交流会 (2023年12月1日 兵庫県立先端科学技術支援センター 赤穂)

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

長塚美月：SPring-8を用いた骨鰾上目の咽頭顎の機能の解析

松永麻穂：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

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 プラナリア再生芽形成に関する研究

Molecular Analysis of Blastema Formation in Planarian Regeneration

梅園良彦・織井秀文
Umesono, Y., Orii, H.

扁平なプラナリアは切断すると傷口が収縮し背側と腹側の組織が隣接するようになる。その後、背腹の組織の相互作用により切断面に再生芽と呼ばれる新組織が形成される。この再生芽形成は、残された組織にある分化多能性幹細胞が増殖・移動することによるとされる。我々はこの再生芽の形成において分化多能性幹細胞がいつ、どこで、どのように増殖し、移動するか、について分子生物学的および実験発生学的手法を用いて明らかにしようとしている。

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

- I-1 梅園: プラナリア成体における Wnt/ β -catenin シグナル経路の恒常性維持機構. 日本動物学会第 94 回大会、2023
- II-1 福島, 梅園: プラナリアの摂食量制御に関わる神経細胞種の同定. 日本動物学会第 94 回大会、2023
- II-2 福島, 梅園: プラナリアの摂食量制御に関わる神経細胞種の同定. 第 1 回異分野融合若手研究者の会、2023
- IV-1 Mochii M, Akizuki K, Ossaka H, Kagawa N, Umesono Y, Suzuki KT. A CRISPR-Cas9-mediated versatile method for targeted integration of a fluorescent protein gene to visualize endogenous gene expression in *Xenopus laevis*. Dev Biol. 2024, 506:42-51-83.
- IV-2 Shibata Y, Okumura A, Mochii M, Suzuki KT. Protocols for transgenesis at a safe harbor site in the *Xenopus laevis* genome using CRISPR-Cas9. STAR Protoc. 2023, 4:102382.
- IV-3 香川, 梅園, 鈴木(基生研), 餅井: sonic hedgehog の内在発現を再現するノックイン・アフリカツメ ガエルの作製. 日本動物学会第 94 回大会、2023
- IV-4 餅井, 秋月, 越坂, 香川, 梅園, 鈴木(基生研): アフリカツメガエルの内在遺伝子発現を再現する新たなノックイン法. 日本動物学会第 94 回大会、2023

生命科学専攻

博士前期課程

- 秋月 海 : アフリカツメガエル幼生の脊索再生に関する研究
西川 はるる : 幼生の尾部再生における TGF β 受容体の役割

- 福島 礼一郎 : プラナリアの摂食行動に関する研究
今福 侑太郎 : プラナリアの再生芽形成に関する研究
越坂 陽彩 : アフリカツメガエル筋組織の再生に関する研究
香川 賢慧 : アフリカツメガエル *Sonic hedgehog* の発生・再生における役割
木村 成貴 : プラナリアピルビン酸脱水素酵素キナーゼ遺伝子に関する研究
野崎 龍星 : プラナリア乳酸脱水素酵素遺伝子に関する研究

Supramolecular Structural Biology

細胞膜超分子複合体 機能解析学

I イオンチャネルの構造生命学研究

Structural Biology of Ion channel

竹下浩平・杉本 宏

Takeshita, K., Sugimoto, H.

イオンチャネルは生命に必須の膜タンパク質であり、神経系では電気信号を生み出し神経伝導を担い、また筋収縮にも深く関わっている。我々は、貪食細胞に発現し生体内レドックス反応にも関与する電位依存性プロトンチャネル (Hv1) を研究対象としてプロトンを透過するメカニズムの解明に向けて精密構造情報の取得を目指している。2014年に世界に先駆けて Hv1 の X 線結晶構造を報告したが、現在はネイティブな 2 量体として活性化および不活性化機構の解明に向けて各ステップのスナップショット構造の解明を目指している。Hv1 は 35 kDa の膜タンパク質であり細胞質領域に長いコイルドコイル構造を持つため結晶化が困難であり、また CryoEM 単粒解析も困難であるため、本年度では特異的抗体の作製を進め、得られた 3 種の抗体 Fab 断片を用いて構造解析を進める予定である。また植物 P450 をプラットフォームとする小胞体膜上でのメタボロン超分子複合体形成に関する研究にも膜タンパク質研究を活かして取り組んでいる。

II ゲノム維持および編集の構造機能研究

Structural and Functional Studies of Genome maintenance and Editing

竹下浩平・杉本 宏

Takeshita, K., Sugimoto, H.

ゲノムは親から子へ DNA 配列として受け継がれている生物の形質を決定するために必要なワンセットの遺伝情報である。遺伝情報の継承のためには DNA が複製されることが必須であるが、多くの DNA はメチル化状態にあるためメチル化模様も受け継ぐ必要がある。このメチル化模様を維持する分子が DNA メチルトランスフェラーゼ 1 (Dnmt1) であり、2011 年にほぼ全長の Dnmt1 の結晶構造から、Dnmt1 が多段階的に活性化することで正確にメチル化模様を継承するといったエピジェネティクス研究のランドマーク的な構造生物学研究成果を報告した。また、近年では CRISPR システムを応用したゲノム編集技術の発展が目覚ましく、我々も Type I-E CRISPR-Cas3 に関してゲノム編集に有用な組み換えタンパク質の生産を基盤として構造機能研究を進めている。本年度は、Type I-E CRISPR-Cas3 において標的 DNA を認識する約 400 kDa の Cascade-RNP 超分子複合体の形成メカニズムの解明に向けて、in-mature な Cascade-RNP の構造解析などに着手した。

III 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

竹下浩平・杉本 宏

Takeshita, K., 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）の状態ですべて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機能を果たすことから、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 型の金属イオントランスポーターやヘムトランスポーターについて、X線結晶解析および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。ヘム ABC トランスポーターについては SPring-8 で稼働している低温電子顕微鏡を利用して単粒子解析用画像データを収集し、構造解析を進めてきた。駆動エネルギーとなる ATP あるいはそのアナログ化合物結合型の構造に加えて変異体の構造決定によって、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の一端を明らかにした。Fe/Mn イオンのトランスポーターについては大腸菌を用いた大量発現系の構築を行い、構造解析に適した試料調製方法の探索を行なった。いずれのタンパク質についても、今後さまざまなコンフォメーションでの構造解析とそれを基盤にした機能解析へと展開することで、輸送サイクルの分子メカニズムの全容を明らかにする計画である。

発表論文 List of publications

- I-1 R. Imaizumi, H. Matsuura, T. Yanai, K. Takeshita, S. Misawa, H. Yamaguchi, N. Sakai, Y. Miyagi-Inoue, M. Suenaga-Hiromori, T. Waki, K. Kataoka, T. Nakayama, M. Yamamoto, S. Takahashi, S. Yamashita: Structural-Functional Correlations between Unique N-terminal Region and C-terminal Conserved Motif in Short-chain cis-Prenyltransferase from Tomato, *ChemBioChem*. **25** (7), e202400160 (2024) (学術論文)
- I-2 T. Yanai, Y. Takahashi, E. Katsumura, N. Sakai, K. Takeshita, R. Imaizumi, H. Matsuura, S. Hongo, T. Waki, S. Takahashi, M. Yamamoto, K. Kataoka, T. Nakayama, S. Yamashita: Structural insights into a bacterial β -glucosidase capable of degrading sesaminol triglucoside to produce sesaminol: toward the understanding of the aglycone recognition mechanism by the C-terminal lid domain, *J. biochem.* **174** (4), (2024) (学術論文)
- I-3 A. Kawanabe, K. Takeshita, M. Takata, Y. Fujiwara: ATP modulates the activity of the voltage-gated proton channel through direct binding interaction, *J Physiol.* **601**(18), (2023) (学術論文)
- I-4 K. Takeshita, N. Sakai, G. Ueno, M. Horie, H. Tsujino, M. Arisawa, M. Yamamoto, M. Arai, T. Yamashita: A large pocket structure surrounding the catalytic center in the BCG protein

- from *Mycobacterium tuberculosis*, *bioRxiv*, doi.org/10.1101/2024.05.14.591795, (2024) (学術論文)
- I-5 馬場匠望、上野剛、大内田守、大守伊織、山本雅貴、竹下浩平：てんかん発作と関連するラットチオレドキシン変異体の結晶構造、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）2023年6月8日（ポスター発表）
- I-6 矢内太朗、高橋由季乃、坂井直樹、竹下浩平、今泉璃城、松浦滉明、宮原真、和氣駿之、高橋征司、山本雅貴、片岡邦重、中山亨、山下哲：セサミノール配糖体加水分解酵素のX線結晶構造解析によって示されたC末端ドメインの新奇機能、第96回日本生化学会大会（福岡市）2023年11月1日（ポスター発表）
- II-1 竹下浩平：簡便に扱える相互作用解析装置が新たな構造生物学を切り拓く 日本の研究.com (<https://research-er.jp/articles/tieup/view/125>) 2024年1月22日掲載（記事）
- II-2 竹下浩平：SPRING-8における構造生物学を支えるタンパク質生産基盤、「株式会社ニッポンジーン社内セミナー」株式会社ニッポンジーン 2024年2月15日（招待講演）
- II-3 大恵千翔、小杉慎吾、峯岸恭孝、吾郷日出夫、熊坂崇、山本雅貴、竹下浩平：汎用的P1'非依存TEVプロテアーゼの開発 第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）2023年6月8日（ポスター発表）
- II-4 浅野宏治、吉見一人、竹下浩平、Zhao Di、石田紗恵子、真下知士：CRISPR-Cas3を用いたリポト診断法の開発、日本ゲノム編集学会第8回大会（江戸川区）2023年6月8日（ポスター発表）
- II-5 特願2023-121605 「ガイドRNAおよびその利用」真下知士、吉見一人、竹下浩平、小堀俊吾（出願日：2023年7月26日）（特許出願）
- II-6 特願2023-219813 「TEVプロテアーゼ」竹下浩平、峯岸恭孝、小杉慎吾、松岡敬太、山本雅貴、熊坂崇（出願日：2023年12月26日）（特許出願）
- III-1 R. Bolton, M. M. Machelett, J. Stubbs, D. Axford, N. Caramello, L. Catapano, M. Malý, M. J. Rodrigues, C. Cordery, G. J. Tizzard, F. MacMillan, S. Engilberge, D. von Stetten, T. Tosha, H. Sugimoto, J. A. R. Worrall, J. S. Webb, M. Zubkov, S. Coles, E. Mathieu, R. A. Steiner, G. Murshudov, T. E. Schrader, A. M. Orville, A. Royant, G. Evans, M. A. Hough, R. L. Owen, I. Tews: A redox switch allows binding of Fe(II) and Fe(III) ions in the cyanobacterial iron-binding protein FutA from *Prochlorococcus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **121**, e2308478121 (2024) (学術論文)
- III-2 H. Inaba, Y. Shisaka, S. Ariyasu, E. Sakakibara, G. Ueda, Y. Aiba, N. Shimizu, H. Sugimoto, O. Shoji: Heme-substituted protein assembly bridged by synthetic porphyrin: achieving controlled configuration while maintaining rotational freedom, *RSC Adv* **14**, 8829 (2024) (学術論文)
- III-3 S. Ariyasu, K. Yonemura, C. Kasai, Y. Aiba, H. Onoda, Y. Shisaka, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo, T. Kamachi, K. Yoshizawa, O. Shoji: Catalytic Oxidation of Methane by Wild-Type Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules, *ACS Catal.* **13**, 8613 (2023) (学術論文)
- III-4 J. K. Stanfield, H. Onoda, S. Ariyasu, C. Kasai, E. M. Burfoot, H. Sugimoto, O. Shoji: Investigating the applicability of the CYP102A1-decoy-molecule system to other members of the CYP102A subfamily, *J. Inorg. Biochem.* **245**, 112235 (2023) (学術論文)

- III-5 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)
- III-6 Hiroshi Sugimoto, “Dynamics of hydrogen atom revealed by ultra-high resolution structure of the heme acquisition protein” Time-Resolved Crystallography Conference (Leicester UK) Sep 13-15, 2023 (招待講演)
- III-7 片岡 万知華、阿部 綾萌、Chai Gopalasingam、Christoph Gerle、山本 雅貴、重松 秀樹、杉本 宏「ABC 型ヘムトランスポーターの構造解析」生命金属科学 夏の合宿 (長崎) 2023 年 9 月 8-9 (口頭発表)
- III-8 杉本宏、長尾聡、桑野わ子、有安真也、Joshua Kyle Stanfield、笠井千枝、愛場雄一郎、山下恵太郎、村上博則、上野剛、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、當舎武彦、久保稔、荘司長三「シトクロムP450BM3の酸素化型中間体のXFEL無損傷結晶構造解析により明らかになった反応空間の制御機構」第37回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (姫路) 2024年1月10~12日 (口頭発表)
- III-9 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49回生体分子科学討論会 (大阪) 2023 年 5 月 (ポスター発表)
- III-10 片岡万知華、阿部綾萌、Chai Gopalasingam、Christoph Gerle、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2回生命金属科学シンポジウム (横浜) 2023 年 5 月 21 日 (優秀ポスター受賞)
- III-11 片岡万知華、阿部綾萌、Chai Goparsingam, 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による病原菌由来ヘムトランスポーターの構造解析」第23回日本蛋白質科学学会年会 (名古屋) 2023 年 7 月 5 日~7 日 (優秀ポスター受賞)
- III-12 阪口智哉、澤井仁美、城宜嗣、鏑木基成、當舎武彦、木村哲就、杉本宏 「鉄還元機能を持つ6回膜貫通型タンパク質 101F6 の大腸菌での発現と機能解析」 第96回日本生化学会大会 (福岡) 2023 年 10 月 31~11 月 1 日 (ポスター発表)

生命科学専攻

博士前期課程

石原 琴音

片岡 万知華

川上 凌平

科学研究費補助金等

1 科学研究費補助金 (令和 4~令和 6 年度) 基盤研究 (B) 課題番号 23K23533

研究課題 安全かつ効率的な Cas3 ゲノム編集ツール開発に資する機能構造相関研究

研究代表者 竹下浩平

- 2 科学研究費補助金（令和 5～令和 9 年度）基盤研究 S 課題番号 23H05470
研究課題 植物特化代謝マシナリの超分子解剖：膜アセンブル工学と多元構造解析による統合的理解
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：中山亨）
- 3 科学研究費補助金（令和 5～令和 9 年度）基盤研究 A 課題番号 23H00367
研究課題 Type I CRISPR ゲノム編集機構の解明に基づく新規遺伝子編集法の開発
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：真下知士）
- 4 科学研究費補助金（令和 3～令和 5 年度）基盤研究 C 課題番号 21K06555
研究課題 新規抗結核薬の創薬ターゲットの機能解明および検出キット作製への応用
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：山下沢）
- 5 AMED 肝炎等克服実用化研究事業（令和 4～令和 6 年度）課題番号 M1520003
研究課題 B 型肝炎ウイルスの全長 POL 発現技術を基盤とした POL 機能の解明と新規薬剤開発
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：杉山真也）
- 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
- 7 科学研究費補助金（令和 5～7 年度）基盤研究（B）課題番号 23K26836
研究課題 EPR・X 線による深海および南極海微生物由来酵素の高活性・高安定性機構の解明
研究分担者 杉本宏（研究代表者：堀谷正樹）
- 8 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（研究代表者：神戸大朋）

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

- I-1 Ichihara, H., Kasaya, T., Baba, K., Goto, T., & Yamano, M.(2023). 2D resistivity model around the rupture area of the 2011 Tohoku-oki earthquake (Mw 9.0). *Earth Planets Space*, 75, 82.
- III-1 Ohta, Y., Goto, T. N., Kashiwaya, K., & Koike, K. (2023). Multi-capacitance electric relaxation model for complex electrical conductivity of sulphide ores. *Exploration Geophysics*, 54(5), 463-473.
- V-1 Ishizu, K., Kasaya, T., Goto, T. N., Koike, K., Siripunvaraporn, W., Iwamoto, H., ... & Ishibashi, J. I. (2024). A marine controlled-source electromagnetic application using towed and seafloor-based receivers capable of mapping seafloor and embedded massive sulfides. *Geophysics*, 89(3), E87-E99.

生命科学専攻

博士後期課程

山下 風 : 活断層周辺の地下比抵抗構造と岩石の間隙との関係に関する研究

博士前期課程

岡田一真 : 脆弱部を有する岩盤の三次元破壊シミュレーション

櫻井未久 : 三陸沖日本海溝海側斜面における太平洋プレートの比抵抗構造の推定

天野 玲 : MCNMFを用いた電磁探査データ中の信号分離に関する研究

近藤将起 : 個別要素法を用いた活断層の数値シミュレーション

山本壮馬 : ニューラルネットワークを用いた地下比抵抗構造推定

科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金 (2022-2023年度) 基盤研究(B) 課題番号: 23K23285
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))
課題番号: 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 (2023-2026年度) 基盤研究(B) 課題番号: 23K25964
研究課題: 沈み込むプレート上部における水の流動の地域による違いと
プレート境界への影響の解明
研究代表者: 山野誠 研究分担者: 後藤忠徳
4. 科学研究費補助金 (2023-2024年度) 特別研究促進 課題番号: 23K17482

研究課題： 2023年5月5日の地震を含む能登半島北東部陸海域で
継続する地震と災害の総合調査

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（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

7. 科学研究費補助金（2023-2024年度）挑戦的研究(萌芽)

課題番号：23K17803

研究課題： 地表および空中電磁探査による予測困難な水蒸気噴火の切迫度評価

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