

# 生命理学研究科

Graduate School 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・木田祐一郎・衣斐義一  
Sakaguchi, M., Kida, Y., 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、生細胞の小胞体における膜タンパク質フォールディング挙動に対する膜透過関連遺伝子の作用の網羅的かつ定量的な解析に着手した。トランスロコン関連遺伝子で、その破壊によって小胞体標的化機構の変換が起きるもの、疎水性配列の透過に影響するもの、正電荷配列の透過に影響の出るものを複数種見出した。小胞体標的化については、リボソーム結合シャペロン複合体（RAC）欠損によって伸長共役型の標的化効率が格段に向上することが判明した。SSB1 遺伝子産物関連のシャペロン因子が SRP による認識機構を抑圧していることが示唆された。また、小胞体内腔の分子シャペロンネットワーク系が疎水性配列の動きに影響することを示した。②小胞体トランスロコンでの新生鎖ポリペプチド鎖の膜透過において、疎水性度が不十分な中度疎水性セグメントは、一方向的に移動するのみならず、前後に揺らぎながら、後方の疎水性配列の組み込みを許容することを見出した。単純な 1 回膜貫通型の膜貫通セグメントとは異なり、疎水性度が極端に低くとも膜貫通トポロジーを形成できるメカニズムの存在を示し、これらの配列のトランスロコンでの存在位置を特定した。③ペルオキシソーム膜タンパク質に存在する、疎水性膜タンパク質の小胞体標的化回避モチーフについて、結合因子を分画し、唯一候補（A）が 5 位のセリン特異的に架橋することを見出した。「A」について新規因子としての特性解析を進め、そのノックダウンによって、小胞体標的化が見られなくなることを実証した。

## 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、ホルモンなどの体内で合成される生理活性物質のほか、食物や水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。当研究室では、抱合反応に関わるグルクロン酸転移酵素(UGT)と排出ポンプである ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターに焦点を当て、それぞれのタンパク質の生合成や機能を制御するしくみや遺伝子発現を制御する機構を解き明かし、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ことが知られる。ABCC2 と同じファミリーC に分類される ABCC1 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同定する作業が進展中であり、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 がはたらいっ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 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。ABCC7 は上皮細胞の頂端側の細胞膜に局在化するが、ABCC7 の部分ペプチドとの共発現による競争的な攪乱作用や部位特異的の変異による局在に及ぼす影響を調べた結果、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 の局在化シグナルを同定する作業も進行中である。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 阪口雅郎：The N-terminal motif of peroxisomal membrane protein PMP70 is ER-targeting suppressor(ETS) (ペルオキシソーム膜タンパク質 PMP70 の N 末端モチーフは小胞体標的化抑制機能 (ETS) を持つ) (ポスター)、第 17 回日本蛋白質学会年会 (仙台)、2017
- I-2 木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコン配列認識部位の特定に向けて (口頭発表・ポスター)、第 17 回日本蛋白質科学会年会 (仙台)、2017
- I-3 菅 公秀・十倉麻友子・吉久 徹・阪口雅郎：新規フォールディングプローブを用い小胞体膜透過チャンネルでの新生鎖透過動態が変動する出芽酵母遺伝子の探索 (ポスター)、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台)、2017
- I-4 十倉麻友子・塩見裕子・菅 公秀・阪上春花・吉久 徹・阪口雅郎：新規フォールディングプローブで明らかになった小胞体膜透過因子 Sec71p/Sec72p の新たな機能 (ポスター)、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台)、2017
- I-5 阪口雅郎・高原教代・森川真衣・實澤雅也・阪上春花：膜タンパク質の小胞体標的化を抑制する機能モチーフ (ETS) と作用因子 (口頭発表・ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017
- I-6 十倉麻友子・小坂優里菜・中川知香・高原教代・菅 公秀・阪口雅郎：CP-フォールディングプローブによる小胞体トランスロコンにおける伸長透過共役因子の解析 (ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017
- I-7 木田祐一郎・阪口雅郎：通過途上の疎水性配列と相互作用する Sec61 トランスロコン内部位のマッピング (口頭発表・ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017
- II-1 衣斐義一・阪口雅郎：細胞内に取り込まれた ABCC2 の NECAP1 による apical 側細胞膜への再局在化 (口頭発表・ポスター)、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台)、2017
- II-2 衣斐義一・阪口雅郎：ABCC7/CFTR を細胞膜の apical 側への標的化させるシグナルの探索 (ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017

## 大学院生命理学研究科

博士後期課程

菅 公秀

博士前期課程

十倉麻友子

## 科学研究費補助金等

- 1 学術研究助成基金助成金（平成 28～30 年度） 挑戦的萌芽研究 課題番号：16K14730  
研究課題 膜タンパク質小胞体回避モチーフ作用因子の機能解明への挑戦  
研究代表者 阪口雅郎
- 2 科学研究費補助金（平成 28～30 年度） 基盤研究 B 課題番号：16H04766  
研究課題 膜タンパク質構造形成装置としての小胞体トランスロコンの機能解明  
研究代表者 阪口雅郎
- 3 科学研究費補助金（平成 29～30 年度） 新学術領域研究 課題番号：17H05673  
研究課題 膜タンパク質の伸長途上鎖をハンドリングする分子機構の解明  
研究代表者 阪口雅郎
- 4 学術研究助成基金助成金（平成 29～31 年度） 基盤研究 C 課題番号：17K07389  
研究課題 マルチスパン膜タンパク質構造形成における小胞体トランスロコン機能解析  
研究代表者 木田祐一郎

## I ミトコンドリア呼吸系膜タンパク質の化学構造の振動

### 分光学的研究

Vibrational Spectroscopic Study on Mitochondrial Respiratory Protein Complexes

小倉尚志・柳澤幸子・北川禎三\*・中島 聡\*・太田雄大\*  
(ピコバイオロジー研究所蛋白質振動分光学研究部門\*)

Ogura, T., Yanagisawa, S., Kitagawa, T. \*, Nakashima, S. \*, Ohta, T. \*  
(\*Division of Protein Vibrational Spectroscopy, Picobiology Institute)

ミトコンドリア呼吸系膜タンパク質複合体の詳細構造を、主としてラマン分光法および赤外分光法により分解能 1 pm 以上の精度で決定し、それを基に反応機構を解明する。チトクロム *c* 酸化酵素、複合体 I などに加え、ミオグロビンなどのヘムタンパク質、ヘムをセンサーとして持つタンパク質や金属タンパク質のモデルとしての金属錯体が研究対象である。

## II 超高精度赤外分光光度計の開発と酵素タンパク質の反応

### 機構解明への応用

Development of Ultra-sensitive Infrared Spectrophotometer based on Femtosecond Infrared Light Source and Its Application to Enzyme Reactions

小倉尚志・中島 聡\*  
(ピコバイオロジー研究所蛋白質振動分光学研究部門\*)

Ogura, T., Nakashima, S. \*  
(\*Division of Protein Vibrational Spectroscopy, Picobiology Institute)

タンパク質の機能発現のしくみを明らかにするためには、活性中心に存在するアミノ酸残基の反応性を明らかにし、その役割を解明する必要がある。この目的のためには、赤外分光法が有効である。

しかし、赤外領域では溶媒である水の吸収が極めて大きいため赤外分光法の酵素タンパク質への応用は限られてきた。本研究課題では、フェムト秒レーザーを光源とする、あらゆるタンパク質水溶液に適用可能な超高精度赤外分光光度計を開発した。それを用いて酵素反応におけるアミノ酸残基の役割を明らかにして反応機構を解明する。特にチトクロム *c* 酸化酵素による酸素還元反応とプロトンポンプ反応の共役機構の解明を目指す。

### III 酸素添加酵素の反応機構の解明

#### Resonance Raman Elucidation of Reaction Mechanism of Oxygenases

小倉尚志・柳澤幸子  
Ogura, T., Yanagisawa, S.

インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼは、ヒトのトリプトファン異化経路の最初に位置し、トリプトファンに分子状酸素由来の 2 個の酸素原子を添加して N-フォルミルキヌレニンを生成する反応を触媒する。反応機構を解明するために必要な反応中間体の捕捉と構造決定を行う。二核銅を活性中心に持つチロシナーゼも研究対象である。

### IV 核共鳴非弾性散乱分光による鉄含有生体分子の

#### 振動構造解析

#### Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Studies of Iron-containing Biomolecules

太田雄大\*  
Ohta, T.

核共鳴非弾性散乱分光法 (NRVS) は、原子核の共鳴準位のエネルギーに近い x 線を試料に照射し、固体のフォノンもしくは分子振動の生成・消滅をともなう原子核励起をおこさせることにより、振動の様子を調べる分光法である。金属蛋白質の振動分光法としては、共鳴ラマン分光法もしくは赤外吸収分光法が主たる手法であったが、NRVS は選択則無くすべての鉄原子の振動モードの観測を可能にするため、従来の分光法では得られなかった知見が得られる。本分光法を用いて、鉄蛋白質の分子機構の解明を目指す。

## 発表論文 List of Publication

- I-1 S. Nagatomo (筑波大), M. Okumura (筑波大), K. Saito (筑波大), T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai (法政大) : Interrelationship among the Fe-His bond strength, oxygen affinities and intersubunit hydrogen-bonding changes upon ligand binding in  $\beta$  subunit of human hemoglobin; the alkaline Bohr effect. *Biochemistry* 56, 1261-1273 (2017)
- I-2 S. Paria (大阪大), T. Ohta, Y. Morimoto (大阪大), H. Sugimoto (大阪大), T. Ogura, and S. Itoh (大阪大), "Structure and Reactivity of Copper Complexes Supported by a Bulky Tripodal N4 Ligand: Copper(I)/Dioxygen Reactivity and Formation of a Hydroperoxide Copper(II) Complex", *Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie*, 644 (14), 780-789 (2018).
- I-3 S. Paria (大阪大), Y. Morimoto (大阪大), T. Ohta, S. Okabe (大阪大), H. Sugimoto (大阪大), T. Ogura, and S. Itoh (大阪大), "Copper(I)-Dioxygen Reactivity in the Isolated Cavity of a Nanoscale Molecular Architecture", *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2018 (19), 1976-1983 (2018).
- I-4 Y. Morimoto (大阪大), Y. Takagi (大阪大), T. Saito (広島市大), T. Ohta, T. Ogura, N. Tohnai (大阪大), M. Nakano (大阪大), and S. Itoh (大阪大), "A Bis( $\mu$ -oxido)dinickel(III) Complex with a Triplet Ground State", *Angewandte Chemie International Edition*, 57 (26), 7640-7643 (2018).
- I-5 H. Kitagishi (同志社大), D. Shimoji (同志社大), T. Ohta, R. Kamiya (同志社大), Y. Kudo (同志社大), A. Onoda (大阪大), T. Hayashi (大阪大), J. Weiss (CNRS, Strasbourg), J. A. Wytko (CNRS, Strasbourg), and K. Kano (同志社大), "A Water-Soluble Supramolecular Complex that Mimics the Heme/Copper Hetero-Binuclear Site of Cytochrome c Oxidase", *Chemical Science*, 9(7), pp. 1989-1995 (2018).
- I-6 M. Guo (Ewha Womans Univ), Y.-M. Lee (Ewha Womans Univ), R. Gupta (Ewha Womans Univ), M. S. Seo (Ewha Womans Univ), T. Ohta, H.-H. Wang (South China Univ of Tech), H.-Y. Liu (South China Univ of Tech), S. N. Dhuri (Goa Univ), R. Sarangi (Stanford Univ), S. Fukuzumi (Ewha Womans Univ), and W. Nam (Ewha Womans Univ), "Dioxygen Activation and O-O Bond Formation Reactions by Manganese Corroles" *Journal of the American Chemical Society*, 139(44), pp. 15858-15867 (2017).
- I-7 S. Hong (Ewha Womans Univ), X. Lu (Ewha Womans Univ), Y.-M. Lee (Ewha Womans Univ), M. S. Seo (Ewha Womans Univ), T. Ohta, T. Ogura, M. Clémancey (Université Grenoble Alpes), P. Maldivi (Université Grenoble Alpes), J.-M. Latour (Université Grenoble Alpes), R. Sarangi (Stanford Univ), and W. Nam (Ewha Womans Univ), "Achieving One-Electron Oxidation of a Mononuclear Nonheme Iron(V)-Imido Complex", *Journal of the American Chemical Society*, 139(41), pp. 14372-14375 (2017).
- I-8 H. Noh (DGIST), D. Jeong (DGIST), T. Ohta, T. Ogura, J. S. Valentine (UCLA), and J. Cho (DGIST), "Distinct Reactivity of a Mononuclear Peroxocobalt (III) Species towards Activation of Nitriles", *Journal of the American Chemical Society*, 139(32), pp. 10960-10963 (2017).



- I-9 M. Sekino (金沢大), H. Furutachi (金沢大), R. Tojo (金沢大), A. Hishi (金沢大), H. Kajikawa (金沢大), T. Suzuki (金沢大), K. Suzuki (金沢大), S. Fujinami (金沢大), S. Akine (金沢大), Y. Sakata (金沢大), T. Ohta, S. Hayami (熊本大), and M. Suzuki (九州大), “New Mechanistic Insight into Intramolecular Aromatic Ligand Hydroxylation and Benzyl Alcohol Oxidation Initiated by Well-defined ( $\mu$ -peroxo) Diiron (III) Complex”, *Chemical Communications*, 53(63), pp. 8838-8841 (2017).
- I-10 S. Hong (Ewha Womans Univ), K. D. Sutherlin (Stanford Univ), A. K. Vardhaman (Ewha Womans Univ), J. J. Yan (Stanford Univ), S. Park (Ewha Womans Univ), Y.-M. Lee (Ewha Womans Univ), S. Jang (Ewha Womans Univ), X. Lu (Ewha Womans Univ), T. Ohta, T. Ogura, E. I. Solomon (Stanford Univ), and W. Nam (Ewha Womans Univ), “A Mononuclear Nonheme Iron (V)-Imido Complex”, *Journal of the American Chemical Society*, 139(26), pp. 8800-8803 (2017).
- I-11 Zhang, M. (奈良先端大), T. Nakanishi(奈良先端大), M. Yamanaka(奈良先端大), S. Nagao(奈良先端大), S. Yanagisawa, Y. Shomura, N. Shibata, T. Ogura, Y. Higuchi, and S. Hirota(奈良先端大), Rational Design of Domain-Swapping-Based c-Type Cytochrome Heterodimers by Using Chimeric Proteins. *Chembiochem*, 18(17): p. 1712-1715 (2017).
- I-12 Shimada, A., M. Kubo (理研), S. Baba(高度研), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Nomura (理研), T. Kimura (神戸大), K. Shinzawa-Itoh, J. Baba, K. Hatano, Y. Eto, A. Miyamoto, H. Murakami(高度研), T. Kumasaka(高度研), S. Owada (理研), K. Tono(高度研), M. Yabashi(高度研), Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, M. Sakaguchi, T. Ogura, R. Komiyama (慶応大), J. Yan (慶応大), E. Yamashita (蛋白研), M. Yamamoto (理研), H. Ago (理研), S. Yoshikawa, and T. Tsukihara, A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase. *Sci Adv*, 3(7): p. e1603042. (2017).
- I-13 Tsuji, T. (同志社大), A.A. Zaoputra (同志社大), Y. Hitomi (同志社大), K. Mieda, T. Ogura, Y. Shiota (九州大), K. Yoshizawa (九州大), H. Sato (株式会社リガク), and M. Kodera (同志社大), Specific Enhancement of Catalytic Activity by a Dicopper Core: Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol with Hydrogen Peroxide. *Angew Chem Int Ed Engl*, 56(27): p. 7779-7782. (2017).
- I-14 Nagatomo, S.(筑波大), K. Saito(筑波大), K. Yamamoto (福井大), T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai (法政大), Heterogeneity between Two  $\alpha$  Subunits of  $\alpha_2\beta_2$  Human Hemoglobin and O<sub>2</sub> Binding Properties: Raman, (1)H Nuclear Magnetic Resonance, and Terahertz Spectra. *Biochemistry*, 56(46): p. 6125-6136. (2017).
- I-15 Abe, T. (阪大), Y. Morimoto (阪大), K. Mieda, H. Sugimoto (阪大), N. Fujieda (阪大), T. Ogura, and S. Itoh (阪大), Geometric effects on OO bond scission of copper(II)-alkylperoxide complexes. *J Inorg Biochem*, 177: p. 375-383. (2017).

- I-16 Shimada S, Oosaki M, Takahashi R, Uene S, Yanagisawa S, Tsukihara T, Shinzawa-Itoh K. 'A unique respiratory adaptation in *Drosophila* independent of supercomplex formation'. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* Feb;1859(2):154-163. (2018)
- I-17 北川禎三：高次構造によるタンパク質の機能制御：ヒトヘモグロビンの協同的O<sub>2</sub>結合と四次構造変化、佐賀大学理工学部 集中講義、2017
- I-18 北川禎三：Unusual heme structure of soluble guanylate cyclase revealed with resonance Raman spectroscopy, 佐賀大学理工学部 特別講演、(2017)
- I-19 T. Ohta, P. Nagaraju (中部大), Y. Naruta (中部大): Efficient Oxygen Reduction Catalysis of Fe-Porphyrins, 5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC 2017), Kolkata, India, 招待講演、(2017)
- I-20 S. Yanagisawa, A. Yamasaki, T. Nakao, S. Shimada, H. Shimomura, K. Shinzawa-Itoh, and T. Ogura, 'Resonance Raman study on respiratory Supercomplex from bovine heart mitochondria,' 6<sup>th</sup> Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2017/5/23~27 招待講演
- II-1 Li, C., T. Nishiguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura, and S. Nakashima, Performance of a time-resolved IR facility for assessment of protonation states and polarity changes in carboxyl groups in a large membrane protein, mammalian cytochrome c oxidase, under turnover conditions in a sub-millisecond time resolution. *Biochim Biophys Acta*, 2018.
- III-1 S. Yanagisawa, M. S. Deshpande(奈良先端大), S. Hirota(奈良先端大), T. Nakagawa(ユニソク) and T. Ogura, 'Improved stopped-flow time-resolved resonance Raman spectroscopy device for studying enzymatic reactions,' *J. Raman Spectrosc.*, 48, 680-687, (2017)
- III-2 Matoba, Y. (広島大), S. Kihara, Y. Muraki, N. Bando, H. Yoshitsu, T. Kuroda, M. Sakaguchi, K. Kayama, H. Tai, S. Hirota, T. Ogura, and M. Sugiyama, Activation Mechanism of the *Streptomyces* Tyrosinase Assisted by the Caddie Protein. *Biochemistry*, 2017. 56(41): p. 5593-5603.
- IV-1 太田雄大, 「核共鳴非弾性散乱分光による鉄蛋白質活性中心の構造化学とダイナミックス」, 第11回 SPRUC核共鳴散乱研究会 (名古屋工業大学), 2018年3月2日 招待講演
- IV-2 T. Ohta, "Structural Basis and Dynamics for Gas Recognition of Myoglobin: A Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Study", Ewha Bioinorganic Chemistry Symposium 2017 (Seoul, Korea), 2017年12月2日 招待講演
- IV-3 太田雄大, 「核共鳴非弾性散乱分光により解き明かす鉄蛋白質活性点の構造化学とダイナミックス」, 第55回日本生物物理学会年会 (熊本大学), 2017年9月19日 招待講演
- IV-4 T. Ohta, "Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Study of Diatomic Gas Sensing Mechanism of

Myoglobin”, The 254th American Chemical Society National Meeting (Washington DC, USA), 2017年8月20日 招待講演

## 大学院生命理学研究科

### 博士前期課程

中尾知美：呼吸鎖超複合体中末端酵素の構造解析

西畑佳晃：時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の動的構造解析

村上裕紀：ケージド酸素化合物の時間分解結晶構造解析への応用

山内 舜：蛋白質赤外測定のための超薄型フローセルシステムの開発

### 博士課程（5年一貫）

Li Chen：時間分解赤外分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の構造ダイナミクスと反応機構

河原由佳：振動分光法による細胞内二原子分子の可視化をもとにした信号伝達機構の研究

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成 28～29 年度）新学術領域研究（研究領域提案型） 課題番号: 16H00848  
研究課題 液滴衝突法による微量タンパク質の反応追跡  
研究代表者 小倉尚志
- 2 科学研究費補助金（平成 27～29 年度）基盤研究(C) 課題番号:15K05393  
研究課題 新規時間分解振動分光法によるチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ共役機構の探求  
研究代表者 中島 聡
- 3 科学研究費補助金（平成 27～29 年度）若手研究(B) 課題番号:15K21295  
研究課題 ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系超複合体形成は末端酵素の反応性に影響を与えるか？  
研究代表者 柳澤幸子
- 4 科学研究費補助金（平成 28～30 年度）基盤研究(C) 課題番号:16K05850  
研究課題 核共鳴非弾性散乱分光によるセンサー蛋白質の気体感知機構の解明  
研究代表者 太田 雄大
- 5 科学研究費補助金（平成 29～31 年度）基盤研究(C) 課題番号: 17K05606  
研究課題 ヘモグロビン共同性発現へのタンパク質の大振幅ゆらぎと停波数振動の寄与の実験的検証  
研究代表者 長友重紀（筑波大学）  
研究分担者 北川禎三

## 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 Microorganism

西川幸志・廣本武史・柴田直樹・樋口芳樹  
Nishikawa, K., Hiromoto, T., Shibata, N., Higuchi, Y.

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、ヒドロゲナーゼ成熟化因子、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。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。また、一般的にヒドロゲナーゼは、酸素によりその機能を失う。我々は、酸素耐性をもつヒドロゲナーゼの構造を解明し、酸素耐性の構造基盤を明らかにしてきた。さらに、水素の還元力を利用して $\text{NAD}^+$ - $\text{NADH}$ 変換機能をもつ酵素や翻訳システムの制御に関わる酵素の構造生物学も進めている。

ビタミン $\text{B}_{12}$ 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。酸化ストレス、金属イオンの細胞外排出に関わるマルチ銅酵素や、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・廣本武史・西川幸志・樋口芳樹  
Shibata, N., Hiromoto, T., Nishikawa, K., Higuchi, Y.

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シグナル伝達経路のうち、特に $\beta$ -カテニン経路に関わるAxin, Dishevelled, Coiled-coil DIXタンパク質がもつDIXドメインの結晶解析を通して、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. 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

- I-1. Y. Sugimoto, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Nishikawa, Y. Higuchi, M. Yamamoto, K. Kano  
Electrostatic Roles in Electron Transfer from [NiFe] hydrogenase to Cytochrome  $c_3$  from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1865** (5), 481-487 (2017)
- I-2. H. Tai, L. Xu, K. Nishikawa, Y. Higuchi, S. Hirota  
Equilibrium between Inactive Ready Ni-SIr and Active Ni-SIa States of [NiFe] Hydrogenase Studied by Utilizing Ni-SIr-to-Ni-SIa Photoactivation  
*Chem. Commun.*, **53**, 10444-10447 (2017)
- I-3. Y. Shomura, M. Taketa, H. Nakashima, H. Tai, H. Nakagawa, Y. Ikeda, M. Ishii, Y. Igarashi, H. Nishihara, K-S. Yoon, S. Ogo, S. Hirota, Y. Higuchi  
Structural Basis of the Redox Switches in the NAD<sup>+</sup>-reducing Soluble [NiFe]-hydrogenase  
*Science*, **357** (6354), 928-932 (2017)
- I-4. K. Nishikawa, S. Mochida, T. Hiromoto, N. Shibata, Y. Higuchi  
Ni-elimination from the Active Site of the Standard [NiFe]-hydrogenase upon Oxidation by O<sub>2</sub>  
*J. Inorg. Biochem.*, **177**, 435-437 (2017)
- I-5. T. Hiromoto, F. Meilleur, R. Shimizu, C. Shibasaki, M. Adachi, T. Tamada, R. Kuroki  
Neutron structure of the T26H mutant of T4 phage lysozyme provides insight into the catalytic activity of the mutant enzyme and how it differs from that of wild type  
*Protein Sci.*, **26**, 1953-1963 (2017)
- I-6. 樋口芳樹  
[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素分子の触媒反応機構の解明  
分子研研究会 (分子科学研究所, 愛知県, 岡崎市, 2017/6/14) 招待講演
- I-7. 太虎林, 許力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊  
[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性準備状態Ni-SIrと活性状態Ni-SIa間の酸塩基平衡機構の光照射を利用した研究  
第17日本蛋白質科学会年会 (仙台国際センター, 宮城県, 仙台市, 2017/6/22)  
ポスター発表
- I-8. 西川幸志, 持田理子, 植木美月, 樋口芳樹  
硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸化による活性中心の構造変化に関する研究  
第44回生体分子科学討論会 (カレッジプラザ, 秋田県, 秋田市, 2017/6/23-24)

口頭発表

- I-9. 中川由佳, 西川幸志, 垣本敦子, 樋口芳樹, 小倉尚志  
ラマン分光によるヒドロゲナーゼ活性測定法の開発  
第44回生体分子科学討論会 (カレッジプラザ, 秋田県, 秋田市, 2017/6/23-24)  
口頭発表
- I-10. 常盤恭樹, 庄司光男, 柴田直樹, 樋口芳樹, 片岡邦重, 重田育照, 美齊津文典  
ビリルビンオキシダーゼの構造と酸化還元電位に関する理論的研究  
第11回分子科学討論会 (東北大学, 宮城県, 仙台市, 2017/9/16) 口頭発表
- I-11. 窪田慎太郎, 山崎徹, 矢澤哲夫, 樋口芳樹  
水素利用のためのヒドロゲナーゼの電極への応用  
兵庫県立大学・知の交流シンポジウム, (神戸商工会議所, 兵庫県, 神戸市  
2017/9/19) ポスター発表
- I-12. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota  
Elucidation of the acid-base equilibrium mechanism between the ready Ni-SIr and active Ni-SIa states of [NiFe] hydrogenase  
第55回日本生物物理学会年会 (熊本大学, 熊本県, 熊本市, 2017/9/20)  
ポスター発表
- I-13. Takai Tokiwa, Mitsuo Shoji, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Kunishige Kataoka, Yasuteru Shigeta, Fuminori Misaizu  
QM/MM Study on the T1 Cu site structures and the Redox Potentials in Bilirubin Oxidase (BOD)  
CPMD2017 Workshop (EPOCHAL, Tsukuba, Ibaraki, 2017/10/18-20) ポスター発表
- I-14. 松浦滉明  
Picobiology of hydrogenase  
博士課程教育リーディングプログラムフォーラム2017 (名古屋マリオットアソシアホテル, 愛知県, 名古屋市, 2017/10/20-21) ポスター発表
- I-15. 今西隆浩  
Structural study on hydrogenase for realization of hydrogen society  
博士課程教育リーディングプログラムフォーラム2017 (名古屋マリオットアソシアホテル, 愛知県, 名古屋市, 2017/10/20-21) ポスター発表
- I-16. 松浦滉明, 西川幸志, 太虎林, Noor Dina Muhd Noor, 金在炫, 姜志梗, 舘野賢, 尹基石, 小江誠司, 廣田俊, 庄村康人, 樋口芳樹  
*Citrobacter* sp. S-77株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの構造化学的研究  
日本結晶学会平成29年度年会 (JMSアステールプラザ, 広島県, 広島市, 2017/11/23-24) ポスター発表
- I-17. Hiroaki Matsuura, Lars Lauterbach, Koji Nishikawa, Takeshi Hiromoto, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Oliver Lenz, Yoshiki Higuchi  
Heterologous Overexpression of S-77 Hydrogenase in *Ralstonia eutropha*  
リーディング国際シンポジウム (兵庫県立先端科学技術支援センター, 兵庫県,

上郡町, 2017/12/4-5) ポスター発表

- I-18. Takahiro Imanishi, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi  
Crystallographic studies on tetrameric complex of Hyd-2 type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77  
リーディング国際シンポジウム (兵庫県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2017/12/4-5) ポスター発表
- I-19. Takeshi Hiromoto, Flora Meilleur, Rumi Shimizu, Chie Shibazaki, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Ryota Kuroki  
Neutron structure analysis of the T26H mutant of T4 phage lysozyme  
リーディング国際シンポジウム (兵庫県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2017/12/4-5) ポスター発表
- I-20. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota  
Elucidation of the activation/inactivation mechanism between the Ni-SIr and Ni-SIa states of [NiFe] hydrogenase utilizing Ni-SIr-to-Ni-SIa photoactivation  
The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (Kihada Hall, Kyoto University, 京都府, 京都市, 2017/12/14-18) ポスター発表
- I-21. Takai Tokiwa, Mitsuo Shoji, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Kunishige Kataoka, Yasuteru Shigeta, Fuminori Misaizu  
A Theoretical Study on T1Cu Site in Bilirubin Oxidase (BOD):Relation between Structural Changes and Redox Potentials  
Sanibel Symposium 2018 (Gainesville, FL, USA, 2018/2/20) ポスター発表
- I-22. 常盤恭樹、庄司光男、柴田直樹、樋口芳樹、片岡邦重、重田育照、美齊津文典  
QM/MM法によるビリルビンオキシダーゼにおける構造変化と酸化還元電位に関する理論的研究  
第7回日本生物物理学会関東支部会 (東京大学駒場キャンパス, 東京都, 2018/3/13-14) 口頭発表
- I-23. Hiroaki Matsuura, Lars Lauterbach, Koji Nishikawa, Takeshi Hiromoto, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Oliver Lenz, Yoshiki Higuchi  
Construction of the expression system of S77Hyd2 in *Ralstonia eutropha*  
The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)  
ポスター発表
- I-24. Takahiro Imanishi, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi  
Crystallographic studies on tetrameric complex of Hyd-2 type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77  
The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)  
ポスター発表
- I-25. Katsuhiro Higuchi, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi

Crystallization of [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 for a High Resolution Crystal Structure Analysis

The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)  
ポスター発表

- I-26. Yuka Nakagawa, Koji Nishikawa, Satoru Nakashima, Yoshiki Higuchi, Takashi Ogura

Development of Raman spectroscopic measurement system for analyzing the reaction mechanism catalyzed by Hydrogenase

The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)  
ポスター発表

- I-27. Takeshi Hiromoto, Flora Meilleur, Rumi Shimizu, Chie Shibasaki, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Ryota Kuroki

Neutron structure analysis of the T26H mutant of T4 phage lysozyme

The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)  
ポスター発表

- I-28. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Elucidation of the Activation/Inactivation Mechanism between the Inactive Ni-SIr and Active Ni-SIa States of [NiFe] Hydrogenase

日本化学会第98回春季年会 (日本大学理工学, 千葉県, 船橋市, 2018/3/20)  
口頭発表

## 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

- II-1. M. Yamanaka, M. Hoshizumi, S. Nagao, R. Nakayama, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota

Formation and Carbon Monoxide-dependent Dissociation of *Allochromatium vinosum* Cytochrome *c'* Oligomers Using Domain-swapped Dimers  
*Protein Science*, **26(3)**, 464-474 (2017)

- II-2. M. Zhang, T. Nakanishi, M. Yamanaka, S. Nagao, S. Yanagisawa, Y. Shomura, N. Shibata, T. Ogura, Y. Higuchi, S. Hirota

Rational Design of Domain-Swapping-Based c-Type Cytochrome Heterodimers by Using Chimeric Proteins  
*ChemBioChem*, **18**, 1-5 (2017)

- II-3. S. Terawaki, S. Fujita, T. Katsutani, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, K. Wakamatsu, N. Shibata, Y. Higuchi

Structural Basis for Ccd1 Autoinhibition in the Wnt Pathway through Homomerization of the DIX Domain  
*Scientific Reports*, **7(1)**, 7739 (2017)

- II-4. Masaru Yamanaka, Ryoko Nakayama, Satoshi Nagao, Makoto Hoshizumi, Naoki



- Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota  
CO-Dependent Control of Oligomer Association/Dissociation Using Domain-Swapped Dimers of Cytochrome c  
第17回日本蛋白質科学会年会 (仙台国際センター, 宮城県, 仙台市, 2017/6/23)  
ポスター発表
- II-5. 小田祥也, 上田一凱, 山中優, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊  
シトクロム c555 をベースに設計した人工タンパク質を用いたナノ構造体構築  
第11回バイオ関連化学シンポジウム (東京大学農学部, 東京都, 2017/9/8)  
ポスター発表
- II-6. 山中優, 中山諒子, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊  
シトクロム c' ドメインスワップ2量体を用いたCO依存的な多量体形成・解離  
日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会 (大阪府立大学, 大阪府, 堺市, 2017/9/21) 口頭発表
- II-7. 中込蒼一郎, 藤田祥平, ザムザリナ ビンティ タリブディン, 梶正幸, 樋口芳樹, 若松馨, 寺脇慎一  
Wnt シグナル伝達を制御する動的ヘテロオリゴマーのX線結晶構造解析  
日本結晶学会平成29年度年会 (JMS アステールプラ, 広島県, 広島市, 2017/11/23-24) ポスター発表
- II-8. Kumpei Yamanishi, Naoki Shibata, Marc Fiedler, Mariann Bienz, Yoshiki Higuchi  
Direct interaction via DIX domain is necessary and sufficient for recruiting Axin by Dishevelled upon Wnt/ $\beta$ -catenin signaling  
Wnt 研究会 (神戸大学医学部 神緑会館多目的ホール, 兵庫県, 神戸市, 2017/12/10) 口頭発表
- II-9. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi  
Construction of heme protein oligomers by 3D domain swapping  
The second International Symposium on Biofunctional Chemistry (Kihada Hall, Kyoto University, 京都府, 京都市, 2017/12/14-18) 招待講演
- II-10. Masaru Yamanaka, Ikki Ueda, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota  
Construction of a Supramolecule with an Artificial Protein Based on Cytochrome c555  
日本化学会第98回春季年会 (日本大学理工学部, 千葉県, 船橋市, 2018/3/20)  
口頭発表
- II-11. Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota  
Design and Properties of Domain-swapped Myoglobin Dimer  
日本化学会第98回春季年会 (日本大学理工学部, 千葉県, 船橋市, 2018/3/20)  
口頭発表

## 大学院生命理学研究科

### ピコバイオロジー専攻

山西勲平： DAX-DIX 複合体の構造生物学

松浦滉明： Spectroscopic and crystallographic studies on [NiFe]-hydrogenases

今西隆浩： Structural and biochemical studies on Hyb-type [NiFe]-hydrogenase

### 生命科学専攻

博士前期課程

柴田大樹： 軟骨形成に関わる転写因子 Sox9 の構造解析

樋口雄大： S-77 ヒドロゲナーゼの高分解能結晶解析

### 科学研究費補助金等

1. 独立行政法人科学技術振興機構（平成 24-29 年度）CREST  
研究課題：生物酵素による水素エネルギー利用システムの構造基盤解明  
研究代表者（樋口芳樹）
2. 一般財団法人 蛋白質研究奨励会 金子・成田研究奨励金（平成 29 年度）  
研究課題：[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒機能解明を目指した中性子結晶構造解析  
研究代表者（西川幸志）
3. 公立大学法人兵庫県立大学 平成 29 年度特別研究助成金  
研究課題：膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼの組換え体調製とその構造解析  
研究代表者（廣本武史）

## I 一酸化窒素還元酵素の構造と機能

### Structural and Functional Studies on Nitric Oxide Reductases

城 宜嗣・村本和優・澤井仁美

Shiro, Y., Muramoto, K., Sawai, H.

一酸化窒素還元酵素 (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  $N_2O$  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で注目されている酵素である。NOR による NO 変換の分子機構を議論する為に、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* RM495) を宿主とした NOR 発現系および *in vivo* スクリーニング系によって見いだした、いくつかの重要なアミノ酸残基 (Glu57、Asp198、Val206) の変異体を調製、精製し、それらの酵素活性・分光測定ならびに結晶化を行った。また、時分割赤外分光紫外レーザー照射によりマイクロ秒の時間領域で NO を発生できる「ケージド NO」と解析により、NOR 酵素反応中に 2 種類の短寿命 (数マイクロ秒と数ミリ秒の寿命) 反応中間体が現れる事をみだし、それらの構造・電子状態解析を開始した。

キノール依存性一酸化窒素還元酵素 (qNOR) の活性型構造を決定するため、髄膜炎菌 qNOR の発現、精製、X 線結晶解析に取り組み、解析の分解能が 3.5 Å に向上した。キノールアナログ分子 (メナジオール) を基質として髄膜炎菌 qNOR による NO 消費活性の速度論的解析を開始した。精製した髄膜炎菌 qNOR の再構成系を用いた測定により、qNOR の反応が起電性であることを明らかにした。

## II 酸素センサータンパク質の構造機能解析

### Structural and Functional Studies on Oxygen-Sensor Proteins

澤井仁美・城 宜嗣

Sawai, H., Shiro, Y.

豆科植物の根に共生する根粒菌は窒素固定を行う事で有名である。根粒菌の窒素固定はニト

ロゲナーゼにより触媒される。しかし、ニトロゲナーゼは酸素に対して不安定な為、酸素センサータンパク質 FixL/FixJ が酸素濃度を感知し、ニトロゲナーゼの発現を遺伝子レベルで調節している。FixL は酸素センサードメインとヒスチジンキナーゼドメインを有し、低酸素濃度を酸素センサー部位が感知した際に、ATP のリン酸基を用いて自己の His をリン酸化し、さらに FixJ にそのリン酸基を移す。リン酸化された FixJ は転写因子としてニトロゲナーゼ遺伝子の発現を促進する。この FixL から FixJ への一連の酸素感知の分子機構の解明を目的に、昨年、X 線小角散乱法で決定した FixL-J 複合体の構造モデルを基盤に、FixL の分内情報伝達に重要と思われるアミノ酸残基の変異体を調製し、そのリン酸化活性を測定した。

### 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 Iron Dynamics in Cell

澤井仁美・城 宜嗣

Sawai, H., Shiro, Y.

鉄は、酸素の運搬貯蔵・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機能し、ほぼ全ての生物が生命維持に利用されている。一方、タンパク質に結合していない鉄は、活性酸素源として酸化ダメージを誘起する「細胞毒」でもある。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を厳密に制御するシステムが存在する。ヒトにおいては、食餌・生合成・赤血球分解による再利用により、鉄を獲得することが明らかになっているが、獲得した鉄が生体内でどのように輸送されるのかは全く明らかではない。食餌中の鉄のほとんどは酸化鉄であるが、それが十二指腸の絨毛で吸収される際、絨毛の細胞膜に局在する鉄還元酵素 *Dcytb* によって還元鉄に変換され、細胞内に取り込まれる。本年度は、酵母を用いた *Dcytb* の機能評価系を構築した。昨年成功した *Dcytb* の結晶構造を基盤に、鉄の結合、アスコルビン酸の結合、分子内電子伝達に関係するアミノ酸残基の機能を評価した。さらに、この評価系を用いて、食餌中に含まれるクエン酸などが鉄のキレーターとして、*Dcytb* による鉄還元の重要な働きをしている事を見いだした。

さらに、病原菌（溶連菌）の鉄獲得機構で、へム鉄のセンサーとして機能する転写調節因子についても、X線結晶構造解析によりへム結合型／非結合型ならびに DNA 結合型の立体構造を決定した。

## IV 呼吸鎖末端酵素の構造と機能

### Structural and Functional Studies on Respiratory Terminal Enzymes

村本和優

Muramoto, K.

呼吸鎖電子伝達系末端酵素であるヘム・銅酸素還元酵素（HCOR）スーパーファミリーを対象として効率的なエネルギー変換機構の解明を目指して研究を進めてきた。AタイプHCORのプロトン輸送経路に関わる酵素内部のイオン結合部位について、リガンドであるアミノ酸残基のpKaを計算により解析した。AタイプHCORのアジ化物結合酸化型構造を決定した。

#### 発表論文 List of Publications

- I-1 Takehiko Tosha, Takashi Nomura, Takuma Nishiada, Naoya Saeki, Kouta Okubayashi, Raika Yamagiwa, Michihiro Sugahara, Takanori Nakane, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Go Ueno, Tetsunari Kimura, Tamao Hisano, Kazumasa Muramoto, Hitomi Sawai, Hanae Takeda, Eiichi Mizohata, Ayumi Yamashita, Yusuke Kanematsu, Yu Takano, Eriko Nango, Rie Tanaka, Osamu Nureki, Osami Shoji, Yuka Ikemoto, Hironori Murakami, Shigeki Owada, Kensuke Tono, Makina Yabashi, Masaki Yamamoto, Hideo Ago, So Iwata, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Minoru Kubo: “Capturing an initial intermediate during the P450nor enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate” *Nature Communications*, 8, e1585 (2017)
- I-2. Erina Terasaka, Kenta Yamada, Po-Hung Wang, Kanta Hosokawa, Raika Yamagiwa, Kimi Matsumoto, Shoko Ishii, Takaharu Mori, Kiyoshi Yagi, Hitomi Sawai, Hiroyuki Arai, Hiroshi Sugimoto, Yuji Sugita, Yoshitsugu Shiro, Takehiko Tosha: “Dynamics of nitric oxide controlled by protein complex in bacterial system” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 9888-9893 (2017)
- I-3 Raika Yamagiwa, Takuya Kurahashi, Mariko Takeda, Mayuho Adachi, Hiro Nakamura, Hiroyuki Arai, Yoshitsugu Shiro, Hitomi Sawai, Takehiko Tosha: “*Pseudomonas aeruginosa* overexpression system of nitric oxide reductase for *in vivo* and *in vitro* mutational analyses” *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1859, 333-341 (2018)
- I-4 O. Shoji, S. Yanagisawa, J. K. Stanfield, K. Suzuki, Zhiqi Cong, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: “Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered

- by Amino Acid Derivatives” *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 10324-10329 (2017)
- I-5 K. Suzuki, J. K. Stanfield, O. Shoji, S. Yanagisawa, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: “Control of Stereoselectivity of Benzylic Hydroxylation Catalysed by Wild type Cytochrome P450BM3 Using Decoy Molecules” *Catal. Sci. Technol.* **7**, 3332-3338 (2017)
- I-6 Gonska N, Young D, Yuki R, Okamoto T, Hisano T, Antonyuk S, Hasnain SS, Muramoto K, Shiro Y, Tosha T, Ädelroth P. “Characterization of the quinol-dependent nitric oxide reductase from the pathogen *Neisseria meningitidis*, an electrogenic enzyme.” *Scientific Reports* **8**, 3637 (2018).
- I-7 山際 来佳、澤井 仁美、當舎 武彦、中村 寛夫、新井 博之、城 宜嗣: “一酸化窒素還元酵素の基質輸送経路に存在するアミノ酸残基の役割” 「物質階層原理研究」第1回春期研究会御殿場高原ホテル、2017年5月12-13日
- I-8 山際 来佳、澤井 仁美、當舎 武彦、中村 寛夫、新井 博之、城 宜嗣: “膜内在性一酸化窒素還元酵素における効率的なNO還元反応のための仕組み” 第17回日本蛋白質科学会年会 仙台国際センター、2017年6月20-22日
- I-9 R. Yamagiwa, H. Sawai, T. Tosha, H. Nakamura, H. Arai, M. Yamamoto, Y. Shiro: “Mechanism for efficient NO reduction in nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*.” RIKEN Summer School, Kazusa Arc, September 1-2 (2017)
- I-10 山際 来佳、澤井 仁美、當舎 武彦、中村 寛夫、新井 博之、城 宜嗣: “膜内在性一酸化窒素還元酵素cNORの保存されたバリリン残基の役割” 第55回生物物理学会年会、熊本大学、2017年9月19-21日
- I-11 倉橋 拓也、山際 来佳、武田 真理子、新井 博之、澤井 仁美、當舎 武彦、城 宜嗣: “緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の保存されたグルタミン酸残基の役割” 2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸ポートアイランド、2017年12月6-9日
- I-12 岡本拓也、Arif Jamali、村本和優、當舎武彦、城宜嗣 髄膜炎菌由来一酸化窒素還元酵素の結晶化と速度論的解析 日本生体エネルギー研究会第42回討論会 京都産業大学むすびわざ館 2017年12月19日～21日
- II-1 H. Sawai, Y. Shiro: “Haem-based sensors of dioxygen” Chapter 3 of RSC Metallobiology Series No. 11, *Gas Sensing in Cells*, Edited by Shigetoshi Aono, The Royal Society of Chemistry, pp. 47-83 (2017)
- II-2 Hitomi Sawai “Intra- and inter-molecular signal transduction mechanisms of heme sensing systems” 7<sup>th</sup> Congress of the International BioIron Society Conference, University of California Los Angeles (USA), May 7-11 (2017)
- II-3 澤井 仁美 “完全な酸素センシングシステムにおける分子内および分子間のシグナル伝達

機構” 第17回蛋白質科学会年会 新学術領域研究「酸素生物学」共催ワークショップ「酸素センシングの蛋白質科学」、仙台国際センター、2017年6月20日

- III-1 Y. Naoe, N. Nakamura, Md. M. Rahman, T. Tosha, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural Basis for the Capture and Transfer of Heme by Periplasmic Heme-Binding Proteins in a Bacterial Heme-Acquisition System” *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* **85**, 2217- 2230 (2017)
- III-2 H. Uehara, Y. Shisaka, T. Nishimura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Miyake, H. Shinokubo, Y. Watanabe, O. Shoji: “Structure of the Heme Acquisition Protein HasA with Iron(III)-5, 15-Diphenyl-Porphyrin and Derivatives Thereof as an Artificial Prosthetic Group” *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 1-6 (2017)
- III-3 M. Ganasen, H. Sawai, H. Togashi, H. Takeda, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural insights into ascorbate-dependent ferric reductase, Dcytb, in human” 7<sup>th</sup> Congress of the International BioIron Society Conference, University of California Los Angeles (USA), May 7-11 (2017)
- III-4 M. Ganasen, H. Sawai, S. Nagatoishi, H. Togashi, H. Takeda, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural analysis of a human duodenal ferric reductase, Dcytb.” The 17<sup>th</sup> annual meeting of the protein science society of Japan, Sendai International Center, June 20-22 (2017)
- III-5 西永 恵、村木 則文、杉本 宏、青野 重利、城 宜嗣、澤井 仁美 “新規なヘムセンサータンパク質による転写調節の分子メカニズム” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、2017年12月9日
- III-6 M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: “Structural insights into ferric reduction mechanism by a human duodenal ferric reductase, Dcytb.” Leading program conference “Science and Society: Roles of Basic Science in Drug Discovery”, CAST, December 4-5 (2017)
- IV-1 村本和優 pKa analysis of the proton transfer pathway in respiratory A-type heme-copper oxygen reductase. 日本生物物理学会第55回年会 熊本大学 黒髪北地区 2017年9月19日～9月21日

## 大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Menega Ganasen : ヒト由来鉄還元酵素 Dcytb の構造機能解析

Muhamad Arif Mohanmad Jamali : キノール依存性一酸化窒素還元酵素の結晶化

#### 博士後期課程

山際来佳：一酸化窒素還元酵素の変異体調製とそれらの機能構造解析

武田英恵：緑膿菌一酸化窒素還元酵素の短寿命反応中間体の構造機能解析

#### 博士前期課程

岡本拓也：髄膜炎菌由来キノール依存性一酸化窒素還元酵素の精製、速度論的解析

西園陽子：二成分情報伝達酸素センサータンパク質の構造解析

細川寛太：脱窒菌酵素群の複合体構造解析：電子顕微鏡用試料の調製法の確立

倉橋拓也：一酸化窒素還元酵素の変異体調製とそれらの結晶化

### 科学研究費補助金等

- 1 文部科学省科学研究費補助金（平成 27～29 年度）基盤研究 C  
研究課題：呼吸鎖末端酵素における効率的エネルギー変換機構の普遍性と多様性の構造基盤  
研究代表者：村本和優
- 2 文部科学省科学研究費補助金（平成 26-30 年度）基盤研究 S  
研究課題：一酸化窒素の生体内動態の分子科学  
研究代表者：城 宜嗣  
研究分担者：澤井仁美
- 3 共同研究費（理化学研究所）（平成 27-32 年）  
研究課題：統合的脂質科学「脂質-タンパク質の分子間相互作用の研究」  
研究代表者：澤井仁美
- 4 分子科学研究所との協力研究費 平成 29 年度  
研究課題：溶連菌由来ヘムセンサータンパク質による遺伝子発現制御機構の解明  
研究代表者：澤井仁美
- 5 共同研究費（理化学研究所）（平成 29-34 年）  
研究課題：物質階層原理研究  
研究代表者：城 宜嗣



## I SPring-8 蛋白質結晶構造解析ビームラインの高度化研究

Research and Development for SPring-8 Structural Biology Beamlines

山本雅貴・吾郷日出夫  
Yamamoto, M., Ago, H.

タンパク質結晶からの高精度構造解析のために SPring-8 構造生物学用ビームラインでは、微小結晶や超分子複合体の巨大格子結晶など解析対象の拡大と構造決定の簡便・迅速化を目指したビームラインの高度化研究を進めている。微小結晶構造解析では、1 $\mu$ m 集光ビームを実現しミクロンオーダーの微小結晶からでも構造決定が可能な BL32XU において、微小結晶の全自動構造解析を目指している。現在、試料交換ロボットによる様々な微小結晶マウント条件の試料自動交換、X 線ビーム位置への自動結晶センタリング、放射線損傷と測定分解能を考慮した最適測定条件の自動設定と自動データ収集、さらには複数結晶からの回折データ自動処理システムを統合した全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO) を構築して、2~3 ミクロンの微小タンパク質結晶からの迅速かつ高精度での全自動データ収集・処理法の研究開発を進めている。これらの迅速高精度測定法の開発により、大量のミクロンオーダーサイズ微小結晶からの測定・解析のレベル向上に努めると同時に、X 線結晶構造解析における高難度ターゲットへの応用と構造解析を推し進めている。さらに、時空間的広がりを持つ分子機能発現過程の多面的構造解析により、機能発現の構造基盤のより深い理解を目指す相関構造解析研究に向けた技術開発の一環として、反応中間体の構造解析などへの応用が期待されるタンパク質 - 基質複合体のスクリーニング法や結晶試料の電子状態の *in situ* 分光観察で用いるビームライン組込型顕微分光装置、室温で結晶内環境を制御する湿度制御結晶マウント法 (HAG 法) の開発を進めている。また、遠隔地からの SPring-8 利用の促進に、インターネット環境を利用しビームライン機器を操作するリモートアクセス技術と試料交換ロボットの大容量化により実現した効率的なユーザー利用実験環境の提供を進めている。

## II 蛋白質結晶構造解析での新規解析手法の開発

Research and Development for Protein Crystallography

山本雅貴・吾郷日出夫  
Yamamoto, M., Ago, H.

SPring-8 の超高輝度放射光は、タンパク質微小結晶からの構造解析やタンパク質の機能解明に向けた精密構造解析を可能にした。しかし、超高輝度放射光によるタンパク質の放射線損傷は構造解析にとって最大の障害となっている。そこで、放射線損傷を低減した回折強度測定を可能にするため、X

線ビームの大きさに比べ十分に大きな結晶の上で X 線照射位置を変更しつつ X 線回折像を収集するヘリカルデータ収集法に加え、X 線ビームと相同な大きさの微小結晶を多数交換しながら測定を行う Serial Synchrotron Crystallography (SSX)の技術開発を進めている。また、X 線自由電子レーザー施設 SACLA の超高輝度極短パルス X 線を活用し、既存の放射光を使った構造解析では放射線損傷の影響が無視できないタンパク質について、機能的構造を反映した無損傷結晶構造が決定できる serial femtosecond rotation crystallography (SF-ROX) を開発するとともに、これらの新規技術を応用して酵素反応の中間体構造を捉えるためポンプ - プローブ法やクライオトラップ法による反応中間体の構造解析にも取り組んでいる。

## 発表論文 List of Publications

- I -1 M. Yamamoto, K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), K. Hasegawa (JASRI), G. Ueno (理研), H. Ago, T. Kumasaka (JASRI) : Protein microcrystallography using synchrotron radiation, *IUCrJ* 4, 529 (2017)
- I -2 H. Hirai (阪大), N. Yasui (岡大), K. Yamashita (理研), S. Tabata (阪大), M. Yamamoto, J. Takagi (阪大), T. Nogi (横市大) : Structural basis for ligand capture and release by the endocytic receptor ApoER2, *Embo Reports* 18, 982-999 (2017)
- I -3 R. Suno (京大), K.T. Kimura (京大), T. Nakane (東大), K. Yamashita (理研), J. Wang (ピッツバーグ大), T. Fujiwara (京大), Y. Yamanaka (京大), D. Im (京大), S. Horita (京大), H. Tsujimoto (京大), M. S. Tawaramoto (京大), T. Hirokawa (AIST), E. Nango (理研), K. Tono (理研), T. Kameshima (理研), T. Hatsui (理研), Y. Joti (理研), M. Yabashi (理研), K. Shimamoto (サントリー), M. Yamamoto, D. M. Rosenbaum (テキサス南西大), S. Iwata (京大), T. Shimamura (京大), T. Kobayashi (京大) : Crystal Structures of Human Orexin 2 Receptor Bound to the Subtype-Selective Antagonist EMPA, *Structure* 2018, 26, 7-19 e5.
- I -4 M. Yamamoto, "Towards the next generation of protein micro-crystallography", Second Workshop: Science at PETRA IV, DESY, Hamburg, May (2017)
- I -5 M. Yamamoto, "The Roles of High-brilliant Synchrotron Radiation in Macromolecular Crystallography", 5th Asia Pacific Protein Association Conference & 12th International Symposium of the Protein Society of Thailand, Bangsaen Thailand, July (2017).
- I -6 T. Hori (理研), T. Okuno (順天堂大), K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), Y. Kawano (理研), M. Yamamoto, M. Hato (理研), M. Nakamura (東大), T. Shimizu (東大), T. Yokomizo (順天堂大), M. Miyano (理研), S. Yokoyama (理研) : "Crystal structure of leukotriene B4 receptor BLT1", GPCR Workshop 2017, Kona USA, December (2017)
- I -7 田辺弘明 (理研), 藤井佳史 (理研), 岩部-岡田美紀 (東大), 岩部真人 (東大), 羽藤正勝 (理研), 中村祥浩 (理研), 可野邦行 (東北大), 川名浩己 (東北大), 寺田貴帆 (理研), 平田邦生 (理研), 山下恵太郎 (理研), 河野能顕 (理研), 山本雅貴, 染谷友美 (理研), 白水美香子 (理研), 青木淳賢 (東北大), 山内敏正 (東大), 門脇孝 (東大), 横山茂之 (理研) : イソプレノイド脂質を用いたアディポネクチン受容体の X 線結晶構造解析, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台市, 6月 (2017)
- I -8 G. S. A. Wright (リバプール大), 佐伯茜子, 引間孝明 (理研), 西園陽子 (理研), 久野玉雄 (理研), 山本雅貴, S. Antinyuk (リバプール大), S. S. Hasnain (リバプール大), 城宜嗣, 澤井仁美 : 完全な酸素センシングシステムにおける分子内および分子間のシグナル伝達機構, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台市, 6月 (2017)

- I -9 田辺弘明 (理研), 藤井佳史 (理研), 岩部-岡田美紀 (東大), 岩部真人 (東大), 羽藤正勝 (理研), 可野邦行 (東北大), 川名裕己 (東北大), 中村祥浩 (理研), 寺田貴帆 (理研), 平田邦生 (理研), 山下恵太郎 (理研), 河野能顕 (理研), 山本雅貴, 染谷友美 (理研), 白水美香子 (理研), 青木淳賢 (東北大), 山内敏正 (東大), 門脇孝 (東大), 横山茂之 (理研): イソプレノイド脂質を用いたアディポネクチン受容体のX線結晶構造解析, 平成29年度 膜タンパク質研究会, 淡路島, 10月 (2017) I-7 山本雅貴: 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォーム, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 12月 (2017)
- I -10 山本雅貴: 生命機能に迫る相関構造解析における結晶構造解析, 第30回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, つくば市, 1月 (2018)
- II -1 T. Tosha (理研), T. Nomura (理研), T. Nishida, N. Saeki, K. Okubayashi, R. Yamagiwa, M. Sugahara (理研), T. Nakane (東京大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Kimura (神戸大), T. Hisano (理研), K. Muramoto, H. Sawai, H. Takeda, E. Mizohata (阪大), A. Yamashita (理研), Y. Kanematsu (広島市大), Y. Takano (広島市大), E. Nango (理研), R. Tanaka (理研), O. Nureki (東大), O. Shoji (名大), Y. Ikemoto (JASRI), H. Murakami (JASRI), S. Owada (理研), K. Tono (JASRI), M. Yabashi (理研), M. Yamamoto, H. Ago, S. Iwata (京大), H. Sugimoto (理研), Y. Shiro, M. Kubo (理研): Capturing an initial intermediate during the P450<sub>nor</sub> enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate, *Nature Comm.* 8, 1585 (2017)
- II -2 K. Yamashita (理研), N. Kuwabara (KEK), T. Nakane (東大), T. Murai (京大), E. Mizohata (大阪大), M. Sugahara (理研), D. Pan (京大), T. Masuda (京大), M. Suzuk (大大), T. Sato (京大), A. Kodan (京大), T. Yamaguchi (京大), E. Nango (理研), T. Tanaka (理研), K. Tono (JASRI), Y. Joti (JASRI), T. Kameshima (JASRI), T. Hatsui (理研), M. Yabashi (理研) H. Many (東京健康長寿C), T. Endo (東京健康長寿C), R. Kato (KEK), T. Senda (KEK), H. Kato (京都大), S. Iwata (京大), H. Ago, M. Yamamoto, F. Yumoto (KEK), T. Nakatsua (京大): Experimental phase determination with selenomethionine or mercury-derivatization in serial femtosecond crystallography, *IUCrJ* 4, 639-647 (2017)
- II -3 T.P. Halsted (リバプール大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), H. Ago, G. Ueno (理研), T. Tosha (理研), R.R. Eady (リバプール大), S.V. Antonyuk (リバプール大), M. Yamamoto, S.S. Hasnain (リバプール大): An unprecedented dioxygen species revealed by serial femtosecond rotation crystallography in copper nitrite reductase, *IUCrJ* 5, 22 (2018)
- II -4 M. Oide (慶應大), K. Okajima (慶應大), H. Nakagami (理研), T. Kato (阪大), S. Y. Sekiguchi (慶應大), T. Oroguchi (慶應大), T. Hikima (理研), M. Yamamoto, M. Nakasako (慶應大): Blue light-excited LOV1 and LOV2 domains cooperatively regulate the kinase activity of full-length phototropin2 from Arabidopsis, *J. Biol. Chem.* 293, 963-972 (2018)
- II -5 A. Shimada, M. Kubo (理研), S. Baba (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Nomura (理研), T. Kimura (神戸大), K. Shinzawa-Itoh, J. Baba, K. Hatano, Y. Eto, A. Miyamoto, H. Murakami (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), S. Owada (理研), K. Tono (JASRI), M. Yabashi (JASRI), Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, M. Sakaguchi, T. Ogura, R. Komiya (慶応大), J. Yan (慶応大), E. Yamashita (阪大), M. Yamamoto, H. Ago, S. Yoshikawa, T. Tsukihara: A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase. *Sci Adv* 3, e1603042 (2017)

- II-6 M. Yamamoto, H. Ago, K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), G. Ueno (理研), M. Kubo (理研), S. Baba (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), A. Simada, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, M. Suga (岡大), F. Akita (岡大), J.-R. Shen (岡大), “Fixed target serial crystallography at SACLA”, 2017 American Crystallographic Association Annual Meeting, New Orleans USA, May (2017)
- II-7 M. Kubo (理研), A. Shimada, S. Baba (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto, K. Shinzawa-Itoh, H. Ago, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, “Observation of water-channel opening of cytochrome c oxidase by time-resolved XFEL crystallography.”, 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress and 11th European Biophysics Congress, Edinburgh UK, July (2017)
- II-8 M. Kubo (理研), A. Shimada, S. Baba (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto, K. Shinzawa-Itoh, H. Ago, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, “Time-resolved XFEL crystallography and spectroscopy of cytochrome c oxidase.”, 24th Congress & General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr 2017), Hyderabad India, August (2017)
- II-9 山本雅貴 : Towards the next generation protein micro-crystallography at SPring-8 and SACLA, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本市, 9月 (2017)
- II-10 吾郷日出夫, 島田敦広, 久保稔 (理研), 馬場清喜 (JASRI), 山下恵太郎 (理研), 平田邦生 (理研), 上野剛 (理研), 山本雅貴 : X線自由電子レーザーを光源とするフェムト秒X線結晶構造解析, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 12月 (2017)

## 大学院生命理学研究科

博士後期過程

伊藤翔 : タンパク質 - 基質複合体の構造解析を加速させるスクリーニング系の構築

## 科学研究費補助金等

- 1 (国研) 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (平成29~33年度)  
研究課題 創薬等ライフサイエンス研究のための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 (独) 日本学術振興会 科学研究費助成事業基盤研究 (B) (平成 27~29 年度)  
研究課題 脂質性情報伝達物質を産生する膜タンパク質の脂溶性分子認識機構の解明  
研究代表者 吾郷日出夫

## 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・若林貞夫・谷口麻衣

Yoshida, H., Wakabayashi, S., Taniguchi, M.

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。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。現在は、TFE3 を脱リン酸化する脱リン酸酵素や TFE3 経路のセンサー分子を Genome-wide siRNA library screening によって同定しようとしている。

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、転写制御因子や転写制御配列を同定しようとしている。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 を同定した。現在は、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を GeCKO screening によって同定しようとしている。

## II 小胞体ストレス応答を調節する 制御因子の機能と構造の解析

### Functional and Structural Analysis of Regulatory Factors Controlling the Endoplasmic Reticulum Stress Response

吉田秀郎・若林貞夫

Yoshida, H., Wakabayashi, S.

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。これまでに、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 $\alpha$  の解析を中心に研究を進めている。

### III 血液凝固線溶制御調節タンパク質の 構造と機能の解析

#### Analysis of Structure-Function Relationship of Regulatory Proteins of Blood Coagulation and Fibrinolysis

若林貞夫  
Wakabayashi, S.

血液凝固線溶の制御調節因子の生理機能の解明を目指して研究を行っている。特に、血中の主要タンパク質の 1 つであるヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG) の凝固および線溶反応における制御調節因子としての生理機能の解明を目指し、HRG とフィブリノゲンおよびフィブリンとの相互作用部位の解析、および相互作用による凝固反応制御の機構の解析を進めている。また、HRG による T 細胞分化促進に関わる T 細胞表層の HRG 受容体の同定、機構解析も進めている。

#### 発表論文 List of Publications

- I -1 Taniguchi M. and Yoshida H. TFE3, HSP47 and CREB3 pathways of the mammalian Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.* 42, 27-36, 2017.
- I -2 谷口麻衣、小森亮太、奥田知穂、田中隆也、中川幸大、濱田響、佐々木桂奈江、若林貞夫、吉田秀郎 プロテオグリカンの糖鎖修飾酵素遺伝子の転写を調節するゴルジ体ストレス応答経路の解析 (第 68 回日本細胞生物学会大会、東北大学、宮城県)
- I -3 小森亮太、Ikhwan Jamaludin、佐々木桂奈江、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎 プロテオグリカン産生の制御機構 (兵庫県立大学 知の交流シンポジウム 2017、神戸商工会議所、兵庫県)
- I -4 吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答：細胞の需要に応じてゴルジ体機能を制御する機構 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -5 若林貞夫、岸本夕季、池崎美穂、谷口麻衣、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答によって転写が制御されるシアル酸転移酵素遺伝子 SIAT7B のプロモーター解析 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -6 佐々木桂奈江、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎 ゴルジ体におけるカルシウム恒常性破綻に

- 対するストレス応答制御 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -7 谷口麻衣、小森亮太、奥田知穂、田中隆也、高木菜耶、糸井雄基、佐々木桂奈江、若林貞夫、吉田秀郎 プロテオグリカン型糖鎖修飾酵素遺伝子の転写を制御するゴルジ体ストレス応答経路の解析 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -8 小森亮太、向井美穂、若林貞夫、佐々木桂奈江、谷口麻衣、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による糖鎖修飾酵素遺伝子 HS6ST1 の転写誘導機構 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -9 Jamaludin Mohamad Ikhwan<sup>o</sup>, Hirota Kawamura, Tomohito Tsukamoto, Kazuhiro Yoshikawa, Yuki Kishimoto, Kanae Sasaki, Mai Taniguchi, Sadao Wakabayashi and Hiderou Yoshida  
Analysis of the Molecular Mechanism Regulating Expression of Golgi Glycosylation Enzymes by the Golgi Stress Response. ((2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -10 河村優忠、吉川和宏、村田あゆみ、佐々木桂奈江、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答ムチン経路と TFE3 経路のクロストーク (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -11 奥田知穂、緑佐智子、山本真由、若林貞夫、小森亮太、向井美穂、若林貞夫、佐々木桂奈江、谷口麻衣、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によって転写が誘導される糖鎖修飾遺伝子 GLCE のプロモーター解析 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -12 田中隆也、山本真由、緑佐智子、若林貞夫、佐々木桂奈江、谷口麻衣、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路によって転写が誘導される糖鎖修飾遺伝子 NDST2 の発現制御機構 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -13 高木菜那、濱田響、尾上ひかる、若林貞夫、谷口麻衣、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によって転写が誘導される糖鎖修飾遺伝子 B3GAT3 の転写制御機構の解析 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -14 西谷健人、荒川佳穂、村田あゆみ、久保田圭祐、佐々木桂奈江、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎 グリア細胞分化過程におけるゴルジ体ストレス応答 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -15 井上ちひろ、谷口麻衣、若林貞夫、佐々木桂奈江、齊藤美知子、Boaz Tirosh、吉田秀郎 抗体産生細胞の分化過程におけるゴルジ体ストレス応答 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫県)
- I -16 村上奈々、佐々木桂奈江、若林貞夫、谷口麻衣、養王田正文、櫻井香里、吉田秀郎 抗癌活性化合物 OSW-1 によるゴルジ体ストレス応答の活性化 (2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会) 神戸国際会議場、兵庫

県)

- I -17 糸井雄基、中川幸大、西田真実、太田香織、若林貞夫、谷口麻衣、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の標的遺伝子 CSGALNACT2 の発現制御機構  
(2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)神戸国際会議場、兵庫県)
- I -18 木村真優、山田里佳、福谷洋介、野口恵一、吉田秀郎、櫻井 香里、養王田正文 オキシステロール結合タンパク質 OSBP と OSW-1 の相互作用解析 (2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)神戸国際会議場、兵庫県)
- II-1 上田美里、岩佐奈実、樋田耕平、佐々木佳奈江、谷口麻衣、若林貞夫、吉田秀郎 小胞体ストレス応答を制御する因子 pXBP1(U)の機能解析 (2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)神戸国際会議場、兵庫県)

## 大学院生命理学研究科

博士前期課程

小森 亮太：プロテオグリカン経路の標的遺伝子 HS6ST1 のプロモーター解析

奥田 知穂：プロテオグリカン経路の標的遺伝子 GLCE のプロモーター解析

河村 優忠：ムチン経路の標的遺伝子 SIAT9B と GCNT4、TFE3 のプロモーター解析

Ikhwan Jamaludin : Transcriptional regulation of the human GALNT5 and 18 genes  
by the mucin pathway of the Golgi stress response.

田中 隆也：プロテオグリカン経路の標的遺伝子 NDST2 のプロモーター解析

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金(新学術領域研究) 課題番号17H06414 (平成29年度)  
研究課題 ミトコンドリア、ゴルジ体に関連する応答ゾーン、連携ゾーン解析  
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 16K07356 (平成 29 年度)  
研究課題 プロテオグリカンの糖鎖修飾を制御するゴルジ体ストレス応答経路の解析  
研究代表者 吉田秀郎
- 3 日本学術振興会 二国間交流事業 (平成29年度)  
研究課題 抗体産生細胞分化におけるゴルジ体ストレス応答の解析  
研究代表者 吉田秀郎
- 4 科学研究費補助金(若手研究B) 課題番号17K15122 (平成29年度)  
研究課題 プロテオグリカンのO型糖鎖修飾能を強化するゴルジ体ストレス応答の転写制御機構  
研究代表者 佐々木桂奈江
- 5 科学研究費補助金(特別研究員奨励費) 課題番号15J05492 (平成29年度)  
研究課題 初期分泌経路オルガネラにおけるカルシウム恒常性破綻に対する



ストレス応答制御

研究代表者 佐々木桂奈江

6 科学研究費補助金（特別研究員奨励費）課題番号17J00067（平成29年度）

研究課題 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の解析

研究代表者 小森亮太

## I 出芽酵母を用いた核-細胞質間輸送をはじめとする tRNA 動態の解析

Analyses of tRNA kinesis, including nuclear-cytoplasmic transport of tRNAs, in budding yeast

吉久徹

Yoshihisa, T.

真核生物の tRNA は、核で転写された後、様々な修飾を受けて成熟化し、最終的には細胞質で翻訳因子として機能する。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 の 1 塩基隣に挿入されており、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 酵素群が核内ではなく、細胞質、特にミトコンドリア表面で働くことを明らかにした。さらに我々は、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も見出している。現在、この過程を司る、または、制御す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、様々な条件下での tRNA 量の絶対定量法の開発や、積極的な tRNA 量の改変を通じ、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。

## 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。現在、intron の無いことが tRNA の成熟化や翻訳にどう影響するのかについて、特に tRNA-Ile<sup>U<sub>AU</sub></sup> のアンチコドン修飾とその働きや、核小体の形態に影響が出た tRNA-Leu<sup>CAA</sup> のイントロン欠失株が示す翻訳や ribosome 形成への影響を中心に解析している。

## 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 mRNA 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。一方、複数のリボソームが同じ mRNA 分子上に複数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。

## 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 植物の形態形成に関与する分子機械

Studies on biomolecules responsible for morphogenesis in plants

園部誠司・吉久徹  
Sonobe, S., Yoshihisa, T.

植物の形は個々の細胞の形と細胞の配列により決定されている。前者は膨圧による細胞伸長が細胞壁とその配向を制御する微小管によってなされており、後者は細胞質分裂時の細胞板位置決定によりなされている。現在は細胞板位置決定機構を

タバコ培養細胞を用いて解析しており、アクチン繊維の構築が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

## VI 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。

## VII 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 吉久 徹：核を巡る tRNA のダイナミクス：第 81 回日本植物学会（招待講演）（東京理科大学・野田市）（2017）
- I-2 永井 陽久、塩見 由麻、森 滉平、佐藤 友衣子、河野 龍之進、林 紗千子、吉久 徹：プロテオーム形成を支える tRNA レパートリーを解析する。：植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム（招待講演）（国立遺伝学研究所・三島市）（2017）
- I-3 Akihisa Nagai, Ryunoshin Kohno, Sachiko Hayashi, Tohru Yoshihisa : Analysis and manipulation of the tRNA repertoire affecting protein synthesis in yeast cells. : International Symposium on Protein Quality Control (東大寺総合文化センター・奈良市) (2017)
- I-4 Tohru Yoshihisa : Analysis of dynamics of tRNAs in yeast, where and how much. : 理研シンポジウム「Recent Progress in tRNA Biology and Translation」(招待講演) (理化学研究所・和光市) (2018)
- I-5 永井 陽久、森 滉平、吉久 徹：出芽酵母を用いた tRNA イントロンの持つ生理的意義の解明：第 19 回日本 RNA 学会年会（富山国際会議場大手町フォーラム・富山市）（2017）
- I-6 Akihisa Nagai, Kouhei Mori, Tohru Yoshihisa : Absolute quantification of tRNA isodecoders in *Saccharomyces cerevisiae*. : 生命科学系学会合同年会（神戸ポートアイランド・神戸市）（2017）
- I-7 Yuiko Sato, Tohru Yoshihisa : Do No-Go Decay (NGD) factors compete with minor tRNAs to occupy the ribosomal A-site in translation? : 生命科学系学会合同年会（神戸ポートアイランド・神戸市）（2017）
- II-1 林 紗千子、吉久 徹：出芽酵母を用いた tRNA イントロンの持つ生理的意義の解明：第 19 回日本 RNA 学会年会（富

山国際会議場大手町フォーラム・富山市) (2017)

- II-2 Sachiko Hayashi, Tohru Yoshihisa : Impact of intron removal from tRNA genes in *S. cerevisiae* : 生命科学系学会合同年会 (神戸ポートアイランド・神戸市) (2017)
- III-1 吉見 理子、山本 智加、吉久 徹 : 酵母 *HAC1* mRNA の安定化・翻訳再開に関する tRNA ligase、Rlg1 の遺伝的解析 (富山国際会議場大手町フォーラム・富山市) (2017)
- IV-1 Yanase, R., Nishigami, Y., Ichikawa, M., Yoshihisa, T., Sonobe, S.: The neck deformation of *Lacrymaria olor* depending upon cell states. *J. Protistology*, **51**, e001 (2018)
- VII Donald Voet, Judith Voet, Charlotte Pratt 著、田宮 信雄、八木 達彦、遠藤 斗志也 (京都産業大学)、吉久 徹 訳 : ヴォート基礎生化学・第5版、東京化学同人 (2017)

## 大学院生命理学研究科

博士後期課程

在間 健悟 : 植物細胞の分裂面決定機構

博士課程 (5年一貫)

梁瀬 隆二 : ラクリマリアの運動機構

博士前期課程

永井 陽久 : 出芽酵母における isodecoder tRNA の絶対定量

佐藤 友衣子 : 出芽酵母の No-Go Decay (NGD) の効率、minor tRNA と NGD 因子との量比の変化で影響を受けるか

山本 智加 : *HAC1* mRNA の翻訳制御・NGD 回避制御の機構解明

吉見 理子 : *rlg1* 変異を利用した *HAC1* mRNA の翻訳制御・NGD 回避制御に関わる新規因子の遺伝学的探索

## 科学研究費補助金等

- 1 文部省科学研究費補助金 (平成29~30年度) 新学術領域研究 課題番号 17H05672  
研究課題 機動的翻訳速度制御と tRNA レポートリー  
研究代表者 吉久徹
- 2 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成29~31年度) 基盤研究(C)一般 課題番号 17K07289  
研究課題 真核生物における tRNA 組成の可塑性を導く tRNA 遺伝子の個別制御の検討  
研究代表者 吉久徹
- 3 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成29~31年度) 基盤研究(C)特設分野研究 課題番号 17KT0113  
研究課題 核膜孔を介した RNA 輸送のボトムアップ型再構築に向けての基盤整備  
研究代表者 吉久徹

## 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.

細胞周期において、染色体 DNA が正確に一度だけ複製されたのち均等に分配されることにより遺伝情報が維持される。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。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、Cdt1 の M 期における新規機能、そして、クロマチン複製時に機能する DNA ポリメラーゼや CRL4-Cdt2 などの諸因子の足場となる PCNA の機能を、正に負に制御する RFC 複合体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リン酸化による制御機構の解析

染色体の再複製を抑制するため、DNA 複製のライセンス化因子 Cdt1 は S 期開始後、2 種のユビキチンリガーゼ CRL1-Skp2 と CRL4-Cdt2 によりポリユビキチン化を受け速やかに分解される。CRL4-Cdt2 の機能はクロマチンに結合した PCNA に依存しており、PCNA に結合した Cdt1 を始めとする基質 (Set8, p21, TDG など) を認識する。また、紫外線などによる DNA 損傷によっても分解が誘導される。ヒト細胞において Cdt2 のリン酸化状態が細胞周期において大きく変化する。G1 期は低リン酸化状態であるが、S 期からリン酸化され M 期に最もリン酸化される。このリン酸化に細胞周期進行を制御する CDK が関与すると考え、Cdt2 の C 末に存在する 18 箇所の CDK リン酸化予想部位に変異を導入し解析を進めた。変異型 Cdt2-18A では、S 期以降から M 期に見られるリン酸化が抑制された。そして、この変異 Cdt2-18A は、PCNA と強く結合し、ユビキチン化活性が向上することが分かった。その結果、S 期後期から G2 期に本来蓄積し始める Set8 や TDG タンパク質の蓄積が抑制された。また、精製タンパク質を用いて、Cdt2 がサイクリン A-Cdk2、サイクリン B-Cdk2 でリン酸化されることを確認した。よって、CRL4-Cdt2 は、CDK によるリン酸化により PCNA との結合が低下することにより負に制御されていると結論した。

## 2) Cdt1 の M 期機能の解析

Cdt1 は、G1 期において DNA 複製のためのライセンス化 (DNA ヘリカーゼである MCM2-7 のクロマチンへのローディングに対応) に必須な因子として同定したが、近年、新たに M 期において染色体整列と分配にも機能することが報告された。そこで、Cdt1 をノックダウンした細胞をタイムラプ

スで観察したところ、M 期初期から中期までの過程が遅延することを見出した。これらの細胞では、紡錘体の広がりや未整列の染色体の増加が認められた。M 期進行過程での Cdt1 の局在を免疫染色法によって詳細に調べたところ、中心体近傍の紡錘体やキネトコアを染色する抗体が確認されたが、今後は別の手法で詳細な解析が必要である。Cdt1 をノックダウンした細胞では M 期中期以降は影響なく進行したことから、Cdt1 は、M 期初期から中期にかけて、紡錘体形成や染色体整列に重要な役割を担っていると考えている。

### 3) PCNA 制御因子、RFC 複合体ファミリーの解析

ゲノム維持の過程では、複製をはじめとして修復や組換えの反応に DNA 結合した PCNA が要求される。PCNA の DNA 結合と除去を行うのが RFC 複合体ファミリーである。これまでの解析で、RFC1-RFC と Ctf18-RFC が PCNA の DNA 結合を担っており、PCNA に結合する因子の DNA 集合とその反応促進を制御している事が明らかにされている。もう一つの RFC 複合体、Elg1-RFC についてはこれまでにその生化学的機能は不明であったが、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明らかになった。ヒト細胞内 Elg1 をノックダウン(KD)すると、細胞周期 S 期における過剰なクロマチン結合 PCNA と周期進行の遅延が見られ、間期核内クロマチン構造や分裂期染色体構造の異常が見られた。このことから、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を示した。

しかし、その解析過程では、Elg1-KD 細胞でも G2 から M 期にかけては PCNA が DNA から除去されることが明らかとなった。また、CRISPR/Cas9 法で Elg1 ノックアウト(KO)細胞を作成しても、細胞周期の進行が遅延するのを除けば正常に生育した。これらは、Elg1-RFC が唯一の PCNA 除去因子ではないことを示唆している。そこで現在は、未知の PCNA 除去機構を探索し、これに関わる PCNA 除去因子のゲノム維持や細胞恒常性への寄与を明らかにしていきたいと考えている。

## 発表論文 List of Publications

1 Nakamura T (神戸大), Murakami K (神戸大), Tada H (神戸大), Uehara Y (東北大), Nogami J (九州大), Maehara K (九州大), Ohkawa Y (九州大), Saitoh H (熊本大), Nishitani H, Ono T (東北大), Nishi R (神戸大), Yokoi M (神戸大), Sakai W (神戸大), Sugawara K (神戸大) : Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. *Genes Cells*. 2017 Apr;22(4):392-405. doi: 10.1111/gtc.12481.

2 Niida H (浜松医科大), Matsunuma R (浜松医科大), Horiguchi R (浜松医科大), Uchida C (浜松医科大), Nakazawa Y (長崎大), Motegi A (京都大), Nishimoto K (浜松医科大), Sakai S (浜松医科大), Ohhata T (浜松医科大), Kitagawa K (浜松医科大), Moriwaki S (大阪医科大), Nishitani H, Ui A (聖マリアンナ医科大), Ogi T (名古屋大), Kitagawa M (浜松医科大) : Phosphorylated HBO1 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair *Nat Commun*. 2017 Jul 18;8:16102. doi: 10.1038/ncomms16102.

3 Nukina K, Hayashi A, Shiomi Y, Sugawara K (神戸大), Ohtsubo M (別府大), Nishitani H. : Mutations

at multiple CDK-phosphorylation consensus sites on Cdt2 increase the affinity of CRL4<sup>Cdt2</sup> for PCNA and its ubiquitination activity in S phase. *Genes Cells*. 2018 Mar;23(3):200-213. doi: 10.1111/gtc.12563.

- 4 塩見 泰史、夏目 豊彰(遺伝研)、鐘巻 将人(遺伝研)、西谷 秀男：Elg1-RFCによるPCNAアンロードと連係した細胞内機能の解析 第24回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2017年11月27日-29日 長良川国際会議場 (岐阜県)
- 5 羽多野達也、前田武志、村上裕輔、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：DNA複製ライセンス化因子Cdt1のM期における機能の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 6 根岸泰明 (関西学院大学)、荒木啓吾 (関西学院大学)、西谷秀男、大谷清 (関西学院大学)：転写因子E2F1のN末端領域に対する新規相互作用因子WDR1の機能解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 7 高原教代、田中美如、貫名康平、林晃世、酒井恒、菅澤薫 (神戸大)、塩見泰史、西谷秀男：紫外線照射によるG1期CRL4Cdt2の活性化におけるミスマッチ修復系の関与 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 8 荻野寛行、植田麻紗子、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：Cdt2-PCNA融合体は CRL4Cdt2の抑制制御を損なう 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 9 貫名康平、塩見泰史、西谷秀男：ゲノム維持に関わる E3ユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2の基質認識サブユニットCdt2のリン酸化による制御の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 10 林晃世、石井健士、末永尚弘、高原教代、塩見泰史、西谷秀男：ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2はPCNAと直接結合して機能する 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 11 塩見泰史、織田里美、佐藤護、夏目豊彰(遺伝研)、鐘巻将人(遺伝研)、西谷秀男：RFC複合体によるDNAへのPCNA着脱と連係した細胞内機能の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 12 林晃世、石井健士、末永尚弘、高原教代、塩見泰史、西谷秀男：ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2はPCNAと直接結合して働く 第35回染色体ワークショップ第16回核ダイナミクス研究会 2017年12月20日-22日 (愛知県)
- 13 羽田野達也、前田武志、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：DNA複製ライセンス化因子Cdt1のM期における機能の解析 第35回染色体ワークショップ第16回核ダイナミクス研究会 2017年12月20日-22日 (愛知県)

## 大学院生命理学研究科

### 博士前期課程

羽田野達也：ライセンス化因子 Cdt1 の M 期における機能

荻野寛行：ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の基質認識サブユニット Cdt2 の機能解析

### 5年一貫制博士課程



貫名康平 : Function analysis of substrate recognition subunit Cdt2 of ubiquitin ligase CRL4-Cdt2  
Muadz Bin Ahmad Mazian : Mechanism and cell cycle control of Cdt1 proteolysis by ubiquitin ligase  
CRL4-Cdt2

### 科学研究費補助金等

- 1 文部科学省研究費補助金（平成 29 年度）基盤研究（B）課題番号：26291025  
研究課題 PCNA サイクルと連動したタンパク質分解による複製制御  
研究代表者 西谷秀男 分担者 塩見泰史
- 2 文部科学省研究費補助金（平成 29 年度）基盤研究（C）課題番号：16K07257  
研究課題 DNA からの PCNA クリアランス機構の多様性の解析  
研究代表者 塩見泰史

## I 分裂準備帯の形成機構と機能の解析

Analyses of development and function of preprophase bands

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

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。今年度は、分裂準備帯における微小管と核周期との関連についての解析を行った。

## II 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

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

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。特に微小管を束ねるアクチン繊維と関連分子について興味を持ち研究を行っている。

## 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 BL20XU および BL47XU で X 線 CT 撮影を行い、細胞の並びと細胞間隙の発達を調べた。細胞間隙形成の解析には免疫学的手法も試みた。また、吸水種子の観察方法についてイオン液体が使えるかどうか検討も行った。

## IV 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.

なたまめ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、種子貯蔵タンパク質に対する抗体を用いてなたまめ茶に含まれるペプチドの解析を行った。

## 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、カニクサよりジベレリン受容体やその結合タンパク質である DELLA タンパク質をコードした cDNA を単離し、それらの機能を解析した。それと並行して、ジベレリンがなくても造精器を形成する突然変異体を得て、その解析を進めた。

## VI 細菌由来セルロースの合成機構

Mechanism of cellulose production from bacteria

中井朋則・峰雪芳宣  
Nakai, 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を用いてトモグラムを作製し、3次元構造解析を進めている。

## VII 微細形態科学研究装置共同利用ネットワーク運用

Service as a member of Network for Collaborative Use of Microscopy (CUMNET)

峰雪芳宣・中井朋則  
Mineyuki, Y., Nakai, T.

認定 NPO 法人総合画像研究支援が運営する微細形態科学研究装置共同利用ネットワーク (Network for Collaborative Use of Microscopy (CUMNET)) に、兵庫県立大学理学部書写生物イメージング室の名称で参加し、当研究室の GLIM 顕微鏡や電子顕微鏡関連装置を使った共同利用サービスを行った。

### 発表論文 List of Publications

- I-1 K. Arima, D. Tamaoki (富山大), Y. Mineyuki, H. Yasuhara (関西大), T. Nakai, T. Shinmen, T. Yoshihisa, S. Sonobe: Displacement of the mitotic apparatuses by centrifugation reveals cortical actin organization during cytokinesis in cultured tobacco BY-2 cells, *Journal of Plant Research*, 131: 803-815, 2018
- I-2 Y. Mineyuki, D. Tamaoki(富山大), K. Umano (三谷商事), K. Ishikawa (ニコンインステック) : Global-local live imaging microscope (GLIM) system to record the local molecular dynamics and the whole cell events in parallel at a one-minute time resolution, *Microscopy* 66 suppl1: i135, doi 10.1093/jmicro/dfx107, 2017
- I-3 A. Smertenko (Washington state University), F. Assaad (Universität München), F. Baluška (University of Bonn), M. Bezanilla (University of Massachusetts), H. Bushmann (Osnabrück University), G. Drakakaki (University of California Davis), M. -T. Hauser (University of Natural Resources and Life Sciences), M. Janson (Wageningen University), Y. Mineyuki, I. Moore (University of Oxford), S. Müller (University of Tübingen), T. Murata (基生研), M. S. Otegui (University of Wisconsin-Madison), E. Panteris (Aristotle University of Thessalonki), C. Rasmussen (University of California), A. -C. Schmit (Université de Strasbourg), J. Šamaj (Palacký University), L. Samuels (University of British Columbia), L. A. Staehelin (University of Colorado), D. Van Damme (Ghent University), G. Wasteneys (University of British Columbia), V. Žárský (Charles University and Institute of Experimental Botany): Plant cytokinesis: Terminology for structures and processes, *Trends in Cell Biology* 27: 885-894, 2017
- I-3 Y. Otsuka, T. Nakai, D. Yamauchi, Y. Mineyuki: Preprophasic cytoskeletal organization under conditions inhibiting nuclear cycle progression in onion root tips: In 2017 leading Program Evaluation Conference (Kamigori-cho), 2018
- I-5 大塚礼己、藪内隆俊、山内大輔、中井朋則、峰雪芳宣：薬剤を使ったタマネギ根端分裂組織の分裂準備帯形成と核周期進行の部分的脱共役の誘導、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台市)、2017
- I-6 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、峰雪芳宣：タマネギ根端分裂組織の分裂準備帯形成過程と核周期進行の関係の解析、日本植物学会第 81 回大会 (野田市)、2017
- I-7 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、峰雪芳宣：タマネギ根端分裂組織の分裂準備帯形成と核周期進行の部分的脱共役を薬剤で誘導した時の分裂準備帯形成過程の解析、日本植物形態学会第 29 回総会・大会 (野田市)、2017
- I-8 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、峰雪芳宣：タマネギ根端分裂組織の分裂準備帯形成と核周期の進行の部分的脱共役を薬剤で誘導した時の分裂準備帯形成過程の解析、細胞骨格研究会 (岡山市)、2017
- II-1 M. Takeuchi (東京大), L. A. Staehelin (University of Colorado), Y. Mineyuki: Actin-Microtubule Interaction in Plants, *Cytoskeleton-Structure, Dynamics, Function and Disease*, (eds by J. C. Jimenez-Lopez) In Tech, 33-54

- II-2 峰雪芳宣：植物細胞分裂面のネガティブメモリー候補アクチン排除域 (actin depleted zone) 再考、2018 年生体運動合同班会議 (東京)、2018
- II-3 峰雪芳宣：光学顕微鏡と電子顕微鏡との対比観察、山科正平、高田邦昭 (eds)、ライフサイエンス顕微鏡学ハンドブック、朝倉書店、212-216、2018
- III-1 峰雪芳宣、山内大輔、金子康子 (埼玉大)、唐原一郎 (富山大)：マイクロ CT と SEM で拓く植物の空洞研究 New insights on plant aerenchyma development revealed by micro-CT and SEM、公益社団法人日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会 (札幌市)、2017
- III-2 I. Karahara (富山大), M. Muramoto (富山大), S. Sujishi (富山大), D. Tamaoki (富山大), S. Yano (宇宙航空研究開発機構), F. Tanigaki (宇宙航空研究開発機構), T. Shimazu (宇宙航空研究開発機構), H. Kasahara (有人宇宙システム株式会社), H. Kasahara (東海大), D. Yamauchi, K. Uesugi (高輝度光科学研究センター), K. Hoshino (高輝度光科学研究センター), A. Takeuchi (高輝度光科学研究センター), Y. Suzuki (高輝度光科学研究センター), Y. Mineyuki, S. Kamisaka (富山大): Morphological analysis of tissues in the peduncle of Arabidopsis grown under microgravity by conventional microscopy and X-ray micro-CT: The 3rd East-Asia Microscopy Conference (Busan, Korea), 2017
- III-3 唐原一郎 (富山大)、篠筈公隆 (富山大)、黒金智文 (富山大)、村本雅樹 (富山大)、玉置大介 (富山大)、矢野幸子 (宇宙航空研究開発機構)、谷垣文章 (宇宙航空研究開発機構)、嶋津徹 (宇宙航空研究開発機構)、笠原春夫 (有人宇宙システム株式会社)、山内大輔、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)、峰雪芳宣、蒲池浩之 (富山大)、久米篤 (九大)、西内巧 (金沢大)、曾我康一 (大阪市立大)、吉田久美 (名大)、的場祐子 (京工繊大)、藤田知道 (北大)、神阪盛一郎 (富山大)：宇宙における植物の生活環 - 茎の組織形成に対する長期過重力影響および根系形態可視化の試み-、第 32 回宇宙環境利用シンポジウム (相模原市)、2018
- III-4 唐原一郎 (富山大)、黒金智文 (富山大)、松井亮 (富山大)、玉置大介 (富山大)、矢野幸子 (宇宙航空研究開発機構)、谷垣文章 (宇宙航空研究開発機構)、嶋津徹 (宇宙航空研究開発機構)、笠原春夫 (有人宇宙システム株式会社)、山内大輔、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)、峰雪芳宣、神阪盛一郎 (富山大)：宇宙における植物の生活環 - 根系形態解析の試み-、日本宇宙生物化学会第 31 回大会 (前橋市)、2017
- III-5 黒金智文 (富山大)、松井亮 (富山大)、玉置大介 (富山大)、矢野幸子 (宇宙航空研究開発機構)、谷垣文章 (宇宙航空研究開発機構)、嶋津徹 (宇宙航空研究開発機構)、笠原春夫 (有人宇宙システム株式会社)、山内大輔、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)、峰雪芳宣、神阪盛一郎 (富山大)、唐原一郎：X 線マイクロ CT によるシロイヌナズナ根系形態解析の試み、日本植物形態学会第 29 回総会・大会 (野田市)、2017
- III-6 黒金智文 (富山大)、唐原一郎 (富山大)、松井亮 (富山大)、玉置大介 (富山大)、矢野幸子 (宇宙航空研究開発機構)、谷垣文章 (宇宙航空研究開発機構)、嶋津徹 (宇宙航空研究開発機構)、笠原春夫 (有人宇宙システム株式会社)、山内大輔、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)、峰雪芳宣、神阪盛一郎 (富山大)：シンクロトロン放射光を用いた X 線マイクロ CT によるシロイヌナズナ根系の可視化の試み、第 46 回根研究集会 (富山市)、2017
- III-7 黒金智文 (富山大)、唐原一郎 (富山大)、松井亮 (富山大)、玉置大介 (富山大)、矢野幸子 (宇宙航空研究開発機構)、谷垣文章 (宇宙航空研究開発機構)、嶋津徹 (宇宙航空研究開発機構)、笠原春夫 (有人宇宙システム株式会社)、山内大輔、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)、峰雪芳宣、神阪盛一郎 (富山大)：X 線マイクロ CT によるシロイヌナズナ根系の可視化の試み、日本植物学会第 81 回大会 (野田市)、2017
- VI 中井朋則、村田和義 (生理研)、山内大輔、峰雪芳宣：電子線トモグラフィー法で観察した酢酸菌のセルロースリボン構造、日本農芸化学会 2018 年度 (平成 30 年度) 大会 (名

古屋市)、2018

## 大学院生命理学研究科

博士前期課程

大塚礼己 : タマネギ根端分裂組織における PPB 形成と核周期進行の関係の解析

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金 (平成 29~31 年度) 基盤研究 (B) 課題番号: 26281042  
研究課題 湖沼底層部の低酸素化が誘導するメタロゲニウム粒子生成の分子機構と  
駆動システム解明  
研究分担者 池谷仁里

## I 鞭毛軸糸と軸糸ダイニンの構造と運動機構の解明

Molecular structure and mechanism of flagellar axonemes and axonemal dyneins

桐間惇也・白髪美咲・松田祐佳・榊原 齊・小嶋寛明・大岩和弘  
Kirima, J., Shiraga, M., Matsuda, Y., Sakakibara, H., Kojima, H., Oiwa, K.

軸糸ダイニンは、微小管との間で滑り力を発生する ATPase であり、真核生物の繊毛や鞭毛の運動の原動力である。ダイニンの構造をクライオ電子線トモグラフィ、クライオ電子顕微鏡解析、X線小角散乱や X 線繊維回折法を用いて解析するとともに、力学的・酵素学的特性に関して単一分子レベルでの計測や試験管内再構成実験を行ない、ダイニンの運動機構と協働性を解析している。これまでに、*Chlamydomonas* の鞭毛を材料として、この鞭毛軸糸から単離精製した内腕ダイニン亜種 c、e、f が連続的に微小管上を運動する事や、ダイニン亜種 c、e、f が他の典型的なタンパク質モータとは極めて異なる機能を持つ事を明らかにした。また、特性の異なるこれらの亜種を混合したときに生じる協働的運動の解析を行い、軸糸内でのダイニン亜種の協働性に関する知見を積み上げている。

ダイニン分子の構造解析では、ヌクレオチド状態によるダイニンの分子構造変化を見出し、ダイニンの微小管滑り運動機構に関するモデルを提唱している。また、軸糸を対象としたクライオ電子線トモグラフィによって軸糸内のダイニン腕の 3 次元構造を明らかにし、ヌクレオチド状態に依存したダイニン腕のグローバルな構造変化を明らかにしてきた。さらに、生理学的条件下での構造解析を可能とする X 線繊維回折法を鞭毛軸糸に適用する実験系を開発、これを用いて軸糸構成要素の構造周期を精密に測定することに成功した。また、周辺微小管の構造安定化に関わる因子として FAP85 を見出し、これが微小管内壁に結合する MIPs の一つであることを明らかにした。

## II 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

指宿良太・古田健也・古田茜・小嶋寛明・大岩和弘  
Ibusuki, R., Furuta, K., Furuta, A., Kojima, H., Oiwa, K.

タンパク質モータによる ATP 加水分解過程を単一分子レベルで可視化するためにエバネッセント光を利用した蛍光顕微鏡システムを開発、さらにその高性能化・高機能化を進めてきた。蛍光 ATP を独自に合成、これを用いて蛍光 ATP の結合・解離と  $F_1$ -ATPase の回転運動とを同時計測することに成功、 $F_1$ -ATPase の運動機構の一端を明らかにしてきた。また、光ピンセット法を用いた単一分子レベルの力学測定との組み合わせによって、植物ミオシンや細胞質ダイニンの張力発生、ステップ距離を測定、その分子機構に関する新たな知見を得ている。

近年では、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、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のタンパク質モータが創出する協働性を評価する研究を行った。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 に特定の数を結合させることで、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他、細胞質ダイニンの運動活性の自己制御機構を明らかにした。細胞質ダイニンの 2 つのモータ領域が密接に結合した状態を取ることによって自己抑制的に運動活性が低下するが、外部からの力が加わるとこの抑制状態は解除されて、再帰的に活性化が進むことを明らかにした。

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と置換することで、アクチンフィラメントを滑走させることができるダイニンを創出、アクチンフィラメント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。

### III 生体分子を用いたバイオ情報処理技術の研究開発

Molecular signal processing technology inspired by cellular and protein functions

田中裕人・東佑一朗・森下達矢・佐川貴志・小嶋寛明・大岩和弘  
Tanaka, H., Higashi, Y., Morishita, T., Sagawa, T., Kojima, H., Oiwa, K.

分子通信技術は、バイオサイエンス、ナノテクノロジー、および情報技術を融合する技術開発の一つであり、生体構成要素（細胞など）に見られる情報伝達や信号発信のメカニズムを応用して、ナノスケール機器間の情報伝達の実現を目標とする研究開発である。ナノスケール機器間の情報伝達においては、このサイズの電気装置、光学装置および動力源を作製することは極めて困難であり、現行の情報伝達技術を直接応用することは難しい。そこで生体構成要素のメカニズムの応用が有望なアプローチの一つとなる。本研究分野では、生体信号および生体情報伝達のメカニズムを理解して、生体材料や非生体材料もしくはバイオフィレンドリな材料を用いて、ナノスケールコミュニケーションに必要な生体信号や生体情報伝達のメカニズムを人工的に再現、さらにナノスケールコミュニケーションに向けて、新しい理論的基礎を確立することを目指している。この研究開発は、分子コンピュータにおけるナノスケールのゲート間での情報伝達、ピンポイントでの薬物送達など、医学的応用、現行の情報伝達技術では伝えられない感情や現象をも伝える情報伝達などの応用を視野に入れたものである。

### IV タンパク質モータとタンパク質フィラメントの相互作用による自己組織的パターン形成

Self-organized pattern formation of protein motors and protein filaments

鳥澤嵩征・目戸綾乃・大岩和弘  
Torisawa, T., Medo, A., Oiwa, K.

ダイニンの運動機能の評価法としての試験管内再構成実験を進展させて、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明らかにする試みを行っている。再構成系のガラス表面での微小管密度を上げて微小管同士の衝突頻度を向上させた。軸糸ダイニンで駆動される微小管は、衝突時にネマティック相互作用を示す。この相互作用の結果、直径 400  $\mu\text{m}$  にも及ぶメゾスコピックな渦構造が array 状に形成されることを見出した。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を、ネマティック相互作用に拠って集団として共有する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、かつ集団挙動を観測できるもので、複雑系物理学の理論と実験を結ぶ橋渡しの研究と捉えられ、注目されている。また、「回転運動を行う自己駆動粒子による空間パターン創出の実験系」として、単細胞緑藻クラミドモナスの単鞭毛変異体である uni1-1 を様々な細胞密度で遊泳させて、それが創出する時空間パターンを観察した。高細胞密度条件下では、粒子が密になっている領域(クラスター)と疎になっている領域が出現し、さらにクラスターの動的な変形、分裂、集合が観察された。詳細な解析の結果、これらのパターンの素過程が回転運動による近傍粒子の重心運動にあることが明らかとなった。



## 発表論文 List of Publications

- I-1. J. Kirima, K. Oiwa: Flagellar-associated protein FAP85 is a microtubule inner protein that stabilizes microtubules. *Cell Structure and Function* **43**, 1-14, (2018) DOI: 10.1247/csf.17023 (査読あり)
- I-2. K. Oiwa, H. Sakakibara (NICT), K. Furuta (NICT): Electron microscopy of isolated dynein complexes and the power stroke mechanism. In “Dyneins: Dynein Mechanics, Dysfunction, and Disease”, ed. S. King (2017). ISBN: 9780128094709
- I-3. J. Kirima, H. Kojima (NICT), K. Oiwa: The flagellar associating protein FAP85 of *Chlamydomonas* is one of the inner microtubule proteins. 2017 Annual Meeting of American Society for Cell Biology, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2017
- I-4. M. Shiraga, Y. Matsuda, J. Kirima, K. Oiwa : High-speed atomic force microscopic observations on demembrated *Chlamydomonas* axoneme and dynein arms. The 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California, USA, 2018
- I-5. M. Shiraga, Y. Matsuda, J. Kirima, K. Oiwa: Repetitive buckling of microtubules driven by dynein arms reconstituted on singlet microtubules, 第 55 回日本生物物理学会 年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-6. M. Shiraga, Y. Matsuda, J. Kirima, K. Oiwa : Repetitive buckling of microtubules driven by axonemal dynein arrays reconstituted on a microtubule, , Annual Meeting of American Society for Cell Biology, 2017.12.5-8, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2017
- I-7. K. Oiwa, M. Shiraga, J. Kirima, H. Iwamoto (JASRI): Structural responses of *Chlamydomonas* flagellar axonemes to  $Ca^{2+}$  studied with X-ray fiber diffraction. 第 55 回日本生物物理学会 年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-8. 大岩 和弘: 微小針・軸糸・軸糸ダイニン, 真行寺先生ご退職記念ミニシンポジウム, 東京大学理学部, 東京, 2018
- I-9. K. Oiwa: Helical arrangement of axonemal components is a key for determination and  $Ca^{2+}$ -dependent switching of waveforms of *Chlamydomonas* flagella. International Workshop Dynein 2017, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 2017
- I-10. J. Kirima, H. Kojima (NICT), K. Oiwa: Flagellar-associated protein in *Chlamydomonas* flagella,, FAP85 is one of the microtubule inner proteins (MIPs). 第 55 回日本生物物理学会 年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-11. 榊原 斉(NICT): The CTF correction of negative-staining electron micrographs by using the CTF extracted from the background image. 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-12. H. Sakakibara (NICT): The CTF correction of negative-staining electron micrographs of dyneins by using background image. International Workshop Dynein2017, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 2017
- I-13. M. Kikumoto (Nagoya Univ), R. Nakamori (NICT), H. Kojima (NICT), H. Sakakibara (NICT): The contribution of electrostatic interactions to the processivity of inner-arm dynein c. The 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California, USA, 2018
- II-1. A. Furuta (NICT), M. Amino (NICT), M. Yoshio (NICT), K. Oiwa, H. Kojima (NICT), K. Furuta (NICT): Creating biomolecular motors based on dynein and actin-binding proteins. *Nature nanotechnology* **12**, 233 (2017). DOI:10.1038/nnano.2016.238
- II-2. E.B. Krementsova (Univ.Vermont), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, K.M. Trybus (Univ.Vermont), M.Y. Ali (Univ.Vermont): Small teams of myosin Vc motors coordinate their stepping for efficient cargo transport on actin bundles. *Journal of Biological Chemistry*, **M117**. 780791 (2017). DOI: 10.1074/jbc.M117.780791(査読あり)
- II-3. K. Furuta (NICT), A. Furuta (NICT) : Re-engineering of protein motors to understand mechanisms biasing random motion and generating collective dynamics. *Current Opinion in Biotechnology*, **51**, 39-46 (2017) DOI: 10.1016/j.copbio.2017.11.009 (査読あり)

- II-4. S. Toba (NICT), M. Jin (Osaka City Univ), M. Yamada (Osaka City Univ), K. Kumamoto (Osaka City Univ), S. Matsumoto (Osaka City Univ), T. Yasunaga (Kyushu Inst. Technol), Y. Fukunaga, A. Miyazawa, S. Fujita(NIST), K. Itoh (Kyoto Prefect.Univ), S. Fushiki(Kyoto Prefect. Univ), H. Kojima(NICT), H. Wanibuchi (Osaka City Univ), Y. Arai (Osaka Univ), T. Nagai (Osaka Univ), S. Hirotsune (Osaka City Univ) : Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport, *Scientific Reports*, **7**, 16386 (2017)  
DOI:10.1038/s41598-017-15575-3 (査読あり)
- II-5. K. Taikopaul (Kyoto Univ), K. Sasakura (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ): Integration of Au nano-pillars and SAM enables protein patterning with designed spacing at single molecule level. 17th IEEE International Conference on Nanotechnology, Pittsburgh, USA, 2017
- II-6. Kaneko Taikopaul(京都大学), 大庭 将太郎(京都大学), 古田 健也(NICT), 大岩 和弘, 新宅 博文(京都大学), 小寺 秀俊(京都大学), 横川 隆司(京都大学): 分子パターンニングを用いたキネシンの協働性の評価, 分子パターンニングを用いたキネシンの協働性の評価, 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム論文集, 広島国際会議場, 広島, 2017
- II-7. S. Toba (NICT), M. Jin (Osaka City Univ), M. Yamada (Osaka City Univ), K. Kumamoto (Osaka City Univ), S. Matsumoto (Osaka City Univ), T. Yasunaga (Kyushu Inst. Technol), Y. Fukunaga, A. Miyazawa, S. Fujita(NIST), K. Itoh (Kyoto Prefect.Univ), S. Fushiki (Kyoto Prefect. Univ), H. Kojima(NICT), H. Wanibuchi (Osaka City Univ), Y. Arai (Osaka Univ), T. Nagai (Osaka Univ), S. Hirotsune (Osaka City Univ) : Alpha-synuclein binds unconventional microtubules that have a unique function, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- II-8. 指宿 良太, 大岩 和弘, 古田 茜 (NICT), 古田健也 (NICT): 新しいタンパク質モーターを創り運動メカニズムについて考える, 2018 年 生体運動研究合同班会議, 法政大学市谷キャンパス, 東京, 2018
- II-9. 古田 健也 (NICT): Designing a biomolecular motor that directly drives unidirectional movement of synthetic DNA nanotubes, 日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 仙台, 2017
- II-10. 古田 健也 (NICT): Designing a biomolecular motor that directly drives unidirectional movement of synthetic DNA nanotubes, 第 7 回分子モーター討論会, 東京大学本郷キャンパス, 東京, 2017
- II-11. K. Furuta (NICT): Engineering dynein to move along different tracks: to understand the mechanisms generating directional movement. International Workshop Dynein2017, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 2017
- II-12. R. Ibusuki, K. Oiwa, H. Kojima (NICT), A. Furuta (NICT), K. Furuta (NICT): Creating protein-based molecular motors that move along DNA nanotubes. The 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California., USA, 2018
- III-1. T. Sagawa (NICT), R. Mashiko (Nagaoka Univ. Technol.), Y. Yokota (NICT), Y. Naruse (NICT), M. Okada (Univ. Tokyo), H. Kojima(NICT): Logistic regression of ligands of chemotaxis receptors offers clues about their recognition by bacteria, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **5**, 88 (2018) DOI:10.3389/fbioe.2017.00088
- III-2. 田中 裕人(NICT), 小嶋 寛明(NICT): 生きた細胞で化学物質を識別する, 応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会 3 月研究会, **29**, 16 - 19, (2017)
- III-3. 田中 裕人 (NICT), 数田 恭章 (NICT): Construction of aqueous solution discrimination method based on analysis of bacterial chemotactic response. バクテリア走化性応答の解析に基づく水溶液識別法の構築, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2017

## 大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻博士課程

桐間惇也 : Reconstitution of structure and functions of an eukaryotic flagellum with bottom-up strategies

博士課程後期

指宿良太：構成論的手法によるタンパク質モーターの運動メカニズムの探求

博士課程前期

白髪美咲：構成論的手法を用いた鞭毛運動の必須要素の特定

東佑一朗：ウェアラブル脳波計を用いた実環境での脳波計測

学部4年生

松田 祐佳：*Chlamydomonas* のゲノム編集のためのビジュアルスクリーニング系の確立

目戸 綾乃：自己駆動回転粒子の集団運動による空間パターン

森下 達矢：細胞内分子進化によるべん毛モーターの機能改変

## 科学研究費補助金等

1 CREST 戦略的創造研究推進事業（平成25年度～平成30年度）研究分担者

「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域

研究課題名 細胞間接着・骨格の秩序形成メカニズムの解明と上皮バリア操作技術の開発

研究代表者 月田早智子（大阪大学大学院）

2 科学研究費補助金（平成29年度～平成31年度）基盤研究(C) 課題番号 17K07376

研究課題名 軸糸ダイニンの構造ダイナミクスと協働性

研究代表者 大岩和弘（兵庫県立大学、情報通信研究機構）

## I 脳構築におけるアクチン足場蛋白質の選択的スプライシングの時空間制御の生理的意義の解明

Elucidation of physiological roles for the spatiotemporal production of alternative splicing variants of the actin-binding scaffold molecules during brain development

生沼泉  
Oinuma, I.

アクチン細胞骨格の再構成は神経細胞の発達過程において重要な役割を果たしている。発達過程の大脳皮質内において、神経軸索は決められた時期に決められた場所で分枝形成することで、的確な神経回路を形成しており、分枝形成の制御は神経機能発揮に極めて重要である。軸索分枝形成のメカニズムの研究が盛んに行われ、アクチン細胞骨格依存的な軸索分枝形成を担う数々の因子が同定されている。しかしながら、神経発達期に時期・部位特異的に軸索分枝を形成するメカニズムの説明には至っていない。われわれは、「細胞をとりまく場」あるいは「細胞内」の変化によって駆動されるアクチン足場蛋白質の選択的スプライシングの時空間的制御を想定し、その機構の解明並びに可視化と操作を行うことを目的として研究を進めている。

高次脳機能の発現には、神経細胞が生まれた後、標的細胞を認識して周辺の場の様々な誘引性・反発性の誘導（ガイダンス）因子に応答し、ダイナミックに突起の伸長・退縮を繰り返しつつ的確な標的細胞とシナプス形成する必要がある。これまでの研究で、軸索ガイダンス因子の細胞内情報伝達機構を解明し、低分子量 G 蛋白質の 1 つ、R-Ras の活性が様々な外界因子の駆動で共通に制御され、R-Ras の軸索内での活性制御が軸索の動的形態制御において普遍的役割を果たしていることが明らかになっている。また、R-Ras の結合分子として、PI3-kinase (*J. Cell Biol.*, 2006, *J. Biol. Chem.*, 2007) やアクチン抗キャッピングタンパク質 Ena/VASP のリガンドタンパク質である Lamellipodin (*J. Neurosci.*, 2012)、そしてアクチン足場蛋白質である afadin を同定しており (*MBoC.*, 2012)、そのうち、afadin は、初代培養大脳皮質神経細胞において、その C 末端の F-actin 結合ドメインを介し、軸索分枝形成を担う。

われわれの最近の誌上成果で、afadin の選択的スプライシングが、神経細胞発達過程で変化しており、さらに、短いバリエント (S 体) が長いバリエント (L 体) に対してドミナントネガティブ体として働くことで、L 体の細胞膜での集積によるアクチン重合足場形成を阻害するという報告をした (*MBoC.*, 2015)。それを踏まえ、「選択的スプラ

イシングが脳構築の場で時空間的に制御され、afadin の各アイソフォームの発現が制御されることで、的確な神経分化・神経回路形成を引き起こされている」という新奇システムの存在を想定し、その機構の解明並びに可視化と操作を目的として研究を進めている。昨年度までの研究で、マウス大脳皮質 2/3 層神経細胞の発達過程で、S 体の発現量が適切に制御されることが的確な脳神経回路の構築に必要であるということを確認した。マウス大脳皮質において、発達時期普遍的に発現している L 体に対し、内在性の S 体タンパク質の発現量は胎生期には低く抑えられており、出生後に急峻に発現が増加する。そこで、胎生期から CAG プロモーター下で S 体を過剰発現させることで、脳梁軸索の脱束化、対側皮質内での層特異的な分枝の抑制等が観察された。

平成 29 年度の研究では内在性の S 体および L 体のノックダウン実験を行った。まず、S 体を特異的に認識するウサギペプチド抗体を作成し、大脳皮質組織内および初代培養神経細胞内の S 体の局在を調べた。その結果、大脳皮質内において、時期・部位普遍的に発現している L 体に対し、S 体は 2/3 層の神経細胞に高発現していた。また、培養神経細胞内における局在も大きく異なっており、時期普遍的に軸索先端に局在が見られる L 体に対して、S 体の神経細胞内局在は軸索発達過程初期のステージ 2～3 初期には軸索先端部には見られず、ステージ 3 晩期からステージ 4 初期の時期にかけて次第に先端部に集積していった。さらに、L 体および S 体を生じる選択的スプライシングを可視化するレポータープラスミドを作製し、培養神経において各アイソフォームが産生されるタイミングを調べたところ、L 体を産生するスプライシングが培養初期から観察されたのに対し、S 体を産生するスプライシングはそれより遅れて、培養 3 日目以降に観察された。これらのデータは、S 体の発現量や局在が時空間的にダイナミックに制御されていることを示している。大脳皮質 2/3 層由来の脳梁軸索は、生後 3 日目 (P3) までの間に束化した状態で脳梁を通過し、その後、生後 7 日 (P7)～9 日 (P9) の間に、束化をゆるめ、皮質表層部へ上行することにより皮質内の投射を行うという、ダイナミックな形態変化や軸索の方向性の転換を特徴とする。L 体のノックダウンにより P3 で脳梁軸索の脱束化が引き起こされ、内在性の L 体が軸索の束化を正に制御することが明らかになった。逆に、S 体のノックダウンは P7～P9 で必要な軸索の脱束化が阻害され、皮質内投射が著しく減少した。以上の結果から、大脳皮質神経回路構築において、アクチン足場蛋白質 afadin の選択的スプライシングが適切な時期・場所で起こることが的確な神経回路構築を担うことが示唆された。

今後、afadin で制御される軸索束化の分子メカニズムについて、ガイダンス因子などの細胞外因子や、軸索間の細胞接着因子との関係性の観点から検証を進めるとともに、皮質脊髄路、前交連、視床皮質路などといった的確な場所での束化と脱束化が顕著な他の神経投射経路についても解析し、afadin が担う軸索束化のメカニズムの普遍性を検証する。

## II SUMO 修飾による核ラミナの機能調節機構

### Regulation of nuclear lamina dynamics by SUMOylation

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/C) 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。なかでも、核膜直下でのヘテロクロマチンの形成に深く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、核ラミナとクロマチンの相互作用に関わる因子の同定を試みている。核ラミナは細胞分裂のたびに崩壊と再構築を繰り返す。我々は、核ラミナとクロマチンとの特異的な相互作用は、核ラミナの構築と分裂期染色体の脱凝縮が起こる分裂期終盤に起こるであろうと想定し、この時期に lamin A と相互作用する因子を検索している。まず、核ラミナや核膜の構築をドミナントネガティブに阻害する lamin A 変異体の作成を行った。作成した変異体のうちのひとつ (SIM3 変異体) は lamin A の C 末端近くに存在する SUMO interacting motif (SIM) コンセンサス様配列内の 2 つのアミノ酸置換変異体であった。SIM は、SUMO (small ubiquitin-like modifier) タンパク質が、標的タンパク質のリジン残基の側鎖にイソペプチド結合によって付加された状態 (SUMO 化) を認識して結合する疎水性の短いアミノ酸配列である。SIM3 変異体を発現させた細胞では、分裂期終期における lamin A の脱リン酸化が遅延し、その後の核ラミナの再構築の破たんや核の形態異常が起こった。そこで、lamin A の SIM 様配列と相互作用する SUMO 化タンパク質を探索し、候補因子としてセリンスレオニン型脱リン酸化酵素である PP1 $\gamma$ /RepoMan 複合体を見出した。

平成 29 年度の研究では、RepoMan/PP1 $\gamma$  と lamin A の相互作用が SUMO-SIM 相互作用を介したものであるかどうかを、SUMO-SIM 相互作用をドミナントネガティブに阻害する SUMO 変異体や SUMO 修飾が起らなくなる PP1 $\gamma$ /RepoMan 変異体を用いて検証した。また、FRET 法を利用して細胞内での RepoMan/PP1 $\gamma$  と lamin A の相互作用の時空間的な解析も行った。これらの実験から、RepoMan/PP1 $\gamma$  は SUMO-SIM 相互作用を介して lamin A を分裂期終期の染色体上にリクルートし、lamin A の M 期特異的なリン酸化を除く脱リン酸化酵素として働くことを明らかにした。

最近、RepoMan/PP1 $\gamma$  が分裂期の終わりに特定のヒストンコードを認識して特定のクロマチン領域に結合し、このことが核膜直下のヘテロクロマチンの形成に深く関わっ

ていることが報告された。一方、我々は lamin A が核膜直下のヘテロクロマチン形成に関与することを示す予備的な証拠を得ている。今後は、分裂期の終わりに起こるヘテロクロマチンの核膜直下への再配置の分子機構を明らかにするつもりである。平成29年度は、そのための実験系の準備を行った。具体的には、ヘテロクロマチンと lamin A の核内ダイナミクスを追跡するための蛍光たんぱく質を利用したライブセルイメージングの系を立ち上げた。さらに、lamin A とヘテロクロマチンの相互作用を解析するための FRET 解析の系を立ち上げた。今後は、この2つの実験系を利用して、核膜直下へのヘテロクロマチンの再配置に関わる lamin A の役割と機能を明らかにしていく予定である。

### Ⅲ 神経発達・回路形成を担うアクチン足場蛋白質の選択的スプライシング制御機構の分子基盤の解明

The molecular mechanism of the alternative splicing regulation of the actin-binding scaffold proteins in neural development and circuit formation

北川宏信  
Kitagawa, H.

脳神経系の発達において、選択的スプライシングは複雑かつ緻密な神経回路のネットワーク形成に不可欠であり、組織・細胞や発達時期によって厳密にコントロールされている。このスプライシング機構の破綻は様々な脳発達異常や神経疾患の発症に関与しているため、その制御メカニズムを解明することは重要な課題である。神経系で選択的スプライシングが盛んなタンパク質であるイオンチャネルや細胞接着分子に関して数多くの研究が蓄積されているが、神経細胞の形態形成を直接担う細胞骨格制御分子に関する研究については萌芽的段階である。アクチン足場蛋白質 afadin は選択的スプライシング制御により、長いバリエーション (l-afadin) と短いバリエーション (s-afadin) を生成し、神経細胞の軸索分岐に対してそれぞれ正と負の制御をすることが明らかにされている。発現パターンに着目すると、l-afadin は組織広範に発現している一方で、s-afadin は脳・神経細胞特異的に発現している。また、大脳皮質の培養神経細胞において、l-afadin は培養初期から普遍的に発現しているが、s-afadin は培養3日目から発現がみられることを見出している。このように、s-afadin は組織特異的かつ発達時期特異的な発現を示すが、この時空間的な発現パターンがどのように制御されるのか、また神経回路の形成に果たす役割は不明である。そこで、我々は s-afadin の発現及びスプライシング制御に関連する因子と制御メカニズムを解明し、神経発達や回路形成における機能的意義を解明する目的に研究を進めている。

平成29年度の研究では、s-afadinの選択的スプライシング制御因子を同定するために、既知の遺伝子データベースから神経細胞特異的に発現するRNA結合タンパク質に焦点を当て、候補遺伝子を18遺伝子まで絞り込んだ。さらに、神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞は分化レベルに関わらず s-afadin が恒常的に発現している事を見出し、RT-PCR 法により Neuro2a 細胞及びマウス大脳皮質で共通して発現する遺伝子を探索し、候補遺伝子をさらに10遺伝子まで絞り込んだ。そして、この10遺伝子の過剰発現ベクター及び shRNA によるノックダウンベクターを作製した。今後は、これらのベクターを Neuro2a 細胞に遺伝子導入し、Western blot 法や RT-PCR 法で s-afadin の発現変化を検出することで、候補遺伝子の中から s-afadin の発現制御を担うキーファクターを同定する。そして初代培養神経細胞及び生体マウスを用いて、同定した遺伝子が大脳皮質の神経回路構築にどのような役割を果たすかを調べていく。また、s-afadin のスプライシング機構の上流シグナルにも着目する予定である。そのため準備段階として、マウス胚性腫瘍細胞 EC 細胞の神経細胞への分化誘導系を立ち上げ、分化誘導した P19 細胞とマウス初代培養神経細胞と比較したところ、発達段階に伴う s-afadin の発現パターンが類似していることを見出した。この実験系を活用し、s-afadin の組織特異的・発達段階依存的な選択的スプライシング機構を生み出すメカニズムを明らかにしていく。

## 発表論文等 List of Publications

- I-1 Daiki Ohama, Takahiko Matsuda, and Izumi Oinuma: Differential regional and subcellular localization patterns of afadin splice variants in the mouse central nervous system. *Brain Res.* 1;1692:74-86. doi: 10.1016/j.brainres.2018.05.004. (2018)
- I-2 岩田彩、松田孝彦、生沼泉：軸索分岐制御因子 afadin のアイソフォームの脳神経系での発現の時空間的差異の検証. 第 64 回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表 (平成 29 年 5 月、大阪大学豊中キャンパス)
- I-3 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：細胞骨格制御因子 afadin の神経特異的スプライスバリエーションの産生機構解明の試み. 第 64 回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表 (平成 29 年 5 月、大阪大学豊中キャンパス)
- I-4 大浜大揮、生沼泉：軸索形態制御因子 afadin の 2 つのアイソフォームの大脳皮質神経回路構築における生理機能の解明. 第 64 回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表 (平成 29 年 5 月、大阪大学豊中キャンパス)
- I-5 生沼泉、大浜大揮：神経回路構築における afadin の選択的スプライシングバリエーションの発現タイミングの制御とその意義. 脳構築における発生時計と場の連携第 2 回領域会議 口頭発表およびポスター発表 (平成 29 年 7 月、神戸ニチイ学館)
- I-6 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：神経細胞の形態形成を担う afadin の選択的スプラ



イシシングを制御する因子の探索. 第 57 回生命科学夏の学校 ポスター発表 (平成 29 年 9 月、滋賀県白浜荘)

- I-7** 大浜大揮、生沼泉：大脳皮質神経回路構築におけるアクチン足場蛋白質 afadin の 2 つのアイソフォームの発現時期と機能の検証. 第 57 回生命科学夏の学校 ポスター発表 (平成 29 年 9 月、滋賀県白浜荘)
- I-8** 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：アクチン足場タンパク質 afadin の 2 つのスプライスバリエーションの発現差異の解析. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表 (平成 29 年 12 月、神戸国際展示場)
- I-9** 大浜大揮、生沼泉：マウス大脳皮質 2/3 層神経細胞の発達における長短 2 つの afadin アイソフォームの機能差異. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表および一般口頭発表 (平成 29 年 12 月、神戸国際展示場)
- I-10** 大浜大揮、生沼泉：Spatio-temporal production of alternative splicing variants of an actin-binding scaffold protein afadin is required for callosal circuit formation. International Young Scientists Workshop on Neural Development and Stem Cells. ポスター発表 (平成 29 年 12 月、関西セミナーハウス)
- II-1** 廣瀬富美子：Dephosphorylation of lamin A at the end of mitosis is regulated by SUMOylation. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表 (平成 29 年 12 月、神戸国際展示場)
- II-2** 長栄良平、廣瀬富美子：Analysis of SUMO interacting motif in the lamin A polypeptide. Leading Program International Symposium 2017. ポスター発表 (平成 29 年 12 月、光都 CAST)
- II-3** 廣瀬富美子：Dephosphorylation of lamin A at the end of mitosis is regulated by RepoMan/PP1 $\gamma$ . Leading program evaluation conference. ポスター発表 (平成 30 年 3 月、光都 CAST)
- II-4** 河合淳史、廣瀬富美子：Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. Leading program evaluation conference. ポスター発表 (平成 30 年 3 月、光都 CAST)

## 科学研究費補助金等

1. 科学研究費助成事業 (基盤 C) (平成 29-31 年度)  
研究課題 低分子量 G 蛋白質 R-Ras によるガイダンス因子シグナル統合の分子機序の解明  
研究代表者 生沼 泉

2. 科学研究費助成事業（新学術領域研究）（平成 29-30 年度）  
研究課題 神経回路構築におけるアクチン足場蛋白質の選択的スプライシングの時空間制御機構  
研究代表者 生沼 泉
3. 研究助成金 公益財団法人 ノバルティス科学振興財団研究奨励金（平成 29 年度）  
研究課題 分化後神経細胞への直接的遺伝子治療法確立のための基盤技術開発  
研究代表者 生沼 泉
4. 研究助成金 兵庫県立大学特別研究助成金 若手研究者研究支援（平成 29 年度）  
研究課題 神経伸長因子の人為的賦活化による中枢神経繊維再生への挑戦  
研究代表者 生沼 泉
5. 研究助成金 公益財団法人 ひょうご科学技術協会学術研究助成（平成 29 年度）  
研究課題 神経再生医療基盤技術としての、分化後神経細胞での遺伝子置換技法の確立  
研究代表者 生沼 泉
6. 研究助成金 公益財団法人 武田科学振興財団薬学系研究奨励（平成 28-29 年度）  
研究課題 低分子量 G 蛋白質 R-Ras によるガイダンスシグナル統合のメカニズムの解明  
研究代表者 生沼 泉
7. 研究助成金 公益財団法人 双葉電子記念財団自然科学研究助成（平成 29 年度）  
研究課題 分化後神経細胞への直接的遺伝子治療法確立のための基盤技術開発  
研究代表者 生沼 泉
8. 研究助成金 公益財団法人 加藤記念バイオサイエンス振興財団研究助成（平成 29-30 年度）  
研究課題 分化後神経細胞における遺伝子置換技術の開発  
研究代表者 生沼 泉
9. 科学研究費助成事業（基盤 C）（平成 27-29 年度）  
研究課題 分裂期染色体上に存在する lamin A 相互作用因子の同定  
研究代表者 廣瀬 富美子

## I 含水試料観察のための低温電子顕微鏡法に関する研究

Study of electron microscopy for observation of intracellular proteins

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫  
Nishino, Y., Kashino, Y., Miyazawa, A.

含水率の高い細胞や水溶液中のタンパク質の微細構造を観察するためには、試料を急速凍結して凍結状態のまま観察する低温電子顕微鏡法が有効である。液体窒素冷却ステージを用いた低温走査型電子顕微鏡法や液体ヘリウムを用いて 4K での観察が可能な極低温透過型電子顕微鏡法を用いた含水試料観察法の可能性について検討を行った結果、細胞やタンパク質だけでなく幅広い含水材料や水以外の液体試料についても急速凍結を行い、凍結状態での微細構造観察が可能であることを明らかにした。

## II ニコチン性アセチルコリン受容体を介したシナプス 情報伝達機構の研究

Study of synaptic signal transduction by nicotinic acetylcholine receptors

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫  
Nishino, Y., Kashino, Y., Miyazawa, A.

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、神経筋接合部や神経シナプスでの情報伝達に重要な役割を担っているタンパク質であり、nAChR のリガンド依存的なチャンネル開閉機構やシナプスにおける分子局在を明らかにすることはシナプスにおける情報伝達機構を解明する上で重要な課題である。そこで、神経筋接合部ポストシナプスの培養細胞モデルを用いて nAChR および nAChR と相互作用し nAChR の活性に関わるタンパク質の分子局在を調べるために、nAChR と筋特異的受容体チロシンキナーゼ (MuSK) を、抗体および特異的なリガンドを用いて蛍光と金コロイド粒子を用いてそれぞれ標識した。蛍光顕微鏡を用いて細胞が生きている状態でそれらの局在を観察した後、続いて、電子顕微鏡観察用の試料調製を行い、蛍光が観察された部位を特定して、nAChR と MuSK の分子局在を電子顕微鏡を用いて観察し、シナプス形成時の nAChR の動態について解明を進めた。

### Ⅲ 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ふた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、ある種の藻類に見出される光化学系 I の第二次電子受容体となるナフトキノン誘導体の立体化学的構造を特定した。光合成電子伝達によって生産される還元力を他の反応に利用する系の開発にも取り組んだ。

### Ⅳ 珪藻についての生理・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が、その堅い珪酸質の被殻のために、生理生化学的研究は限定的であった。本研究では、珪藻の光合成について生理生化学的解析を進め、珪藻類が光環境に応じてアンテナを柔軟に調節することにより、ふたつの光化学系の励起バランスを調整している仕組みの解析を進めた。さらに、その詳細な調節機構を解明するため、ゲノムの解読も行った。

また、珪藻類は光合成産物を油滴として蓄積する。増殖と油滴蓄積に関する各種の環境要因の影響を詳細に検討した。その一環として、増殖過程における蓄積油脂に含まれる脂肪酸組成の解析を行い、対数増殖期から定常期に至るまで脂肪酸組成は大きくは変わらないことを明らかにした。そして、解読中のゲノム情報から、代謝系に関与するとみられる遺伝子の特定を進めた。また、その特質を温暖化抑止に利用し、社会実装を目指して野外での大量培養技術の構築に努めるとともに、その油滴を低エネルギー投入で回収するための技術開発を行った。その一環として、野外の開放系で野生株珪藻の培養技術確立を進め、ツノケイソウの環境変動に対する堅牢さを見出した。大量培養後の細胞から有用物質を回収するための低コストで簡便な技術開発にも取り組んだ。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 宮崎加奈子・西野有里・貝瀬瑞穂・久保渕啓（資生堂）・西居可奈（資生堂）・吉川徳信（資生堂）・宮澤淳夫：エマルジョンをクライオ SEM で観察するために最適な急速凍結法の検討、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- I-2 久保渕啓（資生堂）・吉川徳信（資生堂）・西居加奈（資生堂）・西野有里・宮澤淳夫：高圧凍結法および cryo FIB - SEM を用いたエマルジョンの凍結断面観察、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- I-3 犬塚郷子（トヨタ自動車）・波多野和宏（トヨタ自動車）・宮澤淳夫・西野有里・伊藤喜子・垣花大（トヨタ自動車）・菅田裕之（トヨタ自動車）・前川諒介（トヨタ自動車）・駒林健太郎（トヨタ自動車）：Cryo-TEM による燃料電池触媒インク中の金担持カーボンへのアイオノマ吸着状態の観察、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- I-4 J. Shimanuki（日産アーケ）、S. Takahashi（日産自動車）、H. Tohma（日産アーケ）、A. Ohma（日産自動車）、A. Ishihara, Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Microstructural observation of fuel cell catalyst inks by Cryo-SEM and Cryo-TEM, *Microscopy*, *Microscopy*, 66, 204-208 (2017)
- I-5 清家奈央・桑原健太・福田恭子・仲宗根爽乃・野末馨・柴田今日子・大久保真理・森川作志・岡本晋一・垣口貴沙・米村重信・西野有里・野間有加里・宮澤淳夫・上杉健太郎・竹内晃久・鈴木芳生・八田公平：極限環境耐性生物クマムシの組織・細胞・細胞小器官レベルでの放射光 CT・光顕・電顕による統合・相関 3D 解析、第 2 回クマムシ学研究会（東京）、2017
- I-6 杉森秀一（FC-Cubic）・寺尾剛（FC-Cubic）・西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫・鴻巣祐一（東工大）・古賀舞都（東工大）・松本英俊（東工大）・植村豪（東工大）・亀谷雄樹（東工大）・笹部崇（東工大）・吉田利彦（東工大）・篠原和彦（FC-Cubic）・平井秀一郎（東工大）：クライオ電子顕微鏡法による固体高分子型燃料電池用触媒インク乾燥過程におけるアイオノマーのナノ構造観察、第 67 回高分子討論会（札幌）、2017
- I-7 高橋真一（日産自動車）・古谷佳久（日産自動車）・山本健介（日産自動車）・大間敦史（日産自動車）・伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：リチウムイオン電池電極スラリーの分散状態が電極構造および電池性能に与える影響、化学工学会第 49 回秋季大会（名古屋）、2017
- I-8 H. Sugimori（FC-Cubic）、T. Terao（FC-Cubic）、Y. Nishino, Y. Ito, A. Miyazawa, Y. Konosu（東工大）、M. Koga（東工大）、H. Matsumoto（東工大）、S. Uemura（東工大）、Y. Kameya（東工大）、T. Sasabe（東工大）、T. Yoshida（東工大）、K. Shinohara（FC-Cubic）、S. Hirai（東工大）、Nanostructural Evolution during Catalyst Layer Formation Studied via Cryo-Electron Microscopy, 232nd ECS Meeting, Washington, 2017
- I-9 Y. Ito, A. Ishihara, Y. Nishino, A. Miyazawa, Cryo-electron Microscopy for Hydrated Materials (Emulsion and Fuel Cell) Prepared by Rapid and High-pressure Freezing Techniques, *Frontiers in cryo-electron microscopy*, Leicester, 2017
- I-10 杉森秀一（FC-Cubic）・寺尾剛（FC-Cubic）・篠原和彦（FC-Cubic）・西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫・鴻巣祐一（東工大）・古賀舞都（東工大）・松本英俊（東工大）・植村豪（東工大）・亀谷雄樹（東工大）・笹部崇（東工大）・吉田利彦（東工大）・平井秀一郎（東工大）：クライオ電子顕微鏡法による燃料電池触媒インク乾燥過程におけるナノ構造観察、プラスチック成形加工学会第 25 回秋季大会成形加工シンポジウム'17（大阪）、2017

- I-11 Y. Nishino, M. Kaise, Y. Ito, A. Ishihara, A. Miyazawa, Cryo-electron Microscopy for Hydrated Materials (Emulsion and Fuel Cell) Prepared by Rapid and High-pressure Freezing Techniques, The 3rd East-Asia Microscopy Conference, Busan, 2017
- I-12 K. Miyazaki, M. Kaise, Y. Nishino, Y. Kashino, A. Miyazawa, Examination of the most suitable rapid freezing method to observe emulsions by cryo-SEM, University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho, 2017
- I-13 T. Kamigaki (雪印メグミルク) , Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Microstructural observation of casein micelles in milk by cryo-electron microscopy of vitreous sections (CEMOVIS), *Microscopy*, 67, 164-170 (2018)
- I-14 M. Shiota (雪印メグミルク) , T. Kamigaki (雪印メグミルク) , R. Wakui (雪印メグミルク) , Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Nanostructured Fat Crystal and Solid Fat Content Effects on the Physical Properties of Water-in-Oil Semisolid Fat Blends, *Journal of Oleo Science*, in press
- II-1 野間有加里・西野有里・宮澤淳夫：相関顕微鏡法を用いた nAChR クラスターの分子局在解析、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- II-2 Y. Noma, Y. Nishino, A. Miyazawa, Endosomal localization analysis of nAChR and MuSK by correlative light-electron microscopy, The 3rd East-Asia Microscopy Conference, Busan, 2017
- II-3 Y. Noma, Y. Nishino, Y. Kashino, A. Miyazawa, Molecular localization analysis of internalized nAChR and MuSK by correlative light-electron microscopy, University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho, 2017
- III-1 菓子野康浩・磯部明日香・富家佑妃・井上（菓子野）名津子：光化学系 II の構築過程および関与因子、第 6 回近畿植物学会講演会（神戸）、2017
- III-2 M. Kosugi (中央大) , C. Lee, T. Misaki, Y. Kashino, M. Fujita & T. Sugimura "Stereochemical assignment of the unique electron acceptor 5'-hydroxyphyllanthrone, a polar analog of vitamin K1 in photosystem I", *Biosci. Biotech. Biochem.* 81(12), 1-9 (2017)
- III-3 A. Nishizawa (茨城大) , A. Otsuka (茨城大) , Y. Kashino, T. Suzuki (茨城大) , M. Senda (高エネ研) , T. Senda, M. Fukuda (長岡技科大) , S. Kimura (茨城大) "Biphenyl degradation by recombinant cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in oligotrophic environment" 19th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Groningen, The Netherlands, 2017
- III-4 深沢涼子 (茨城大) ・鈴木崇章 (茨城大) ・有川淳 (茨城大) ・西澤明人 (茨城大) ・菓子野康浩・生城真一 (富山県立大) ・木村成伸 (茨城大) : 光誘導型発現プロモーターを用いたシアノバクテリア細胞内での NADPH-P450 還元酵素および P450 遺伝子の共発現、ConBio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会) (神戸)、2017
- III-5 K. Maeda, A. Miyazawa, Y. Nishino, N. Kashino, Y. Kashino "Toward the structural understanding of reaction machinery photosystem II containing far-red light absorbing chlorophyll", University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho , 2017
- IV-1 Y. Endo, T. Hatanaka, K. Maeda, K. Arafune, T. Yamamoto, K. Itoh, H. Kuramochi (国立環境研) , Y. Kashino, K. Ifuku (京大) "Use of ethanol with triolein for fatty acid ethyl ester as biodiesel fuel in a Novozym® 435 fixed-bed reactor" *Biomass and Bioenergy*, vol. 108, pp.433-438, 2017

- IV-2 R. Yamasaki, Y. Nishino, A. Miyazawa, N. Inoue-Kashino, K. Ifuku (京大) and Y. Kashino, "Analysis of triacylglycerol metabolism in a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-3 R. Yamasaki, N. Inoue-Kashino, K. Ifuku (京大), Y. Nishino, A. Miyazawa, Y. Kashino, "Analysis of Triacylglycerol Metabolism in a Marine Centric Diatom, *Chaetoceros gracilis*", University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho, 2017
- IV-4 H. Tokushima, N. Inoue-Kashino, Y. Nakazato, A. Masuda (玉川大), K. Ifuku (京大) and Y. Kashino "Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-5 N. Inoue-Kashino, H. Tokushima, A. Masuda (玉川大), K. Ifuku (京大) and Y. Kashino "Outdoor cultivation of a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-6 K. Ifuku (京大), D. Yan (京大), H. Nishide (基生研), N. Inoue-Kashino, Y. Y. Yamamoto (岐阜大), I. Uchiyama (基生研), Y. Kashino "Genome Analysis and Genetic Engineering in the Diatom *Chaetoceros gracilis*" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-7 前田光治・伊藤和宏・菓子野康浩・伊福健太郎・新船幸二・山本拓司：ツノケイソウ液の凍結濃縮操作、化学工学論文集, vol. 44, No. 1, 18-22, 2018
- IV-8 伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩：実用珪藻 *Chaetoceros* 属の新しい応用利用に向けた技術開発、ケミカルエンジニアリング, vol.62, No. 9, pp 15 - 21, 2017
- IV-9 菓子野康浩・伊福健太郎 (京大)：珪藻のバイオファクトリー化を目指した基盤技術の開発、化学と生物, vol.55, No. 11, pp 759-766, 2017
- IV-10 菓子野康浩：先端的低炭素化技術開発 (ALCA) への帯電性ナノバブル技術の実導入、日本マイクロ・ナノバブル学会 第6回総会 (東京)、2017
- IV-11 山崎瑠衣・西野有里・宮澤淳夫・井上(菓子野)名津子・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩：珪藻 *Chaetoceros gracilis* における脂肪酸の解析、近畿植物学会 (神戸)、2017
- IV-12 山崎瑠衣・西野有里・宮澤淳夫・井上(菓子野)名津子・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩：珪藻 *Chaetoceros gracilis* の脂質に含まれる脂肪酸の解析、第4回分子珪藻研究会 (大阪)、2017
- IV-13 梶川昌孝 (京大)・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩・福澤秀哉 (京大)：リシノール酸生産により促進される実用珪藻ツノケイソウの脂質蓄積、第19回マリンバイオテクノロジー学会大会 (仙台)、2017
- IV-14 本庄智也 (京大)・梶川昌孝 (京大)・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩・福澤秀哉 (京大)：リシノール酸生産により促進される実用珪藻の脂質蓄積、日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋)、2018
- IV-15 菓子野康浩：大量培養微細藻類からの直接的迅速な有用物質回収技術、イノベーションジャパン 2017 (東京)、2017
- IV-16 菓子野康浩：珪藻のフィジオロミクスに基づく褐色のエネルギー革命～珪藻を軸にした太陽エネルギーにより大気中の CO<sub>2</sub> をリサイクル利用するクリーンで持続的な社会へ～、兵庫県立大学知の交流シンポジウム 2017 (神戸)、2017

IV-17 「PCT 出願」 出願番号：PCT/JP2018/005317、出願日：2018 年 2 月 15 日、発明の名称：有用物質回収方法及び有用物質回収装置、発明者：菓子野康浩・伊藤和宏・前田光治・伊福健太郎、発明者所属：兵庫県立大学・京都大学、出願人：兵庫県立大学・京都大学

## 科学研究費補助金等

- 1 文部科学省科学研究費補助金（新学術領域研究（研究領域提案型）） 平成 26～30 年度  
研究課題 バイオロジーにおける 3D 活性サイト科学  
研究代表者 佐々木裕次（東京大学）、分担研究者 宮澤淳夫
- 2 文部科学省科学研究費補助金（新学術領域研究（研究領域提案型）学術研究支援基盤形成）  
平成 28～33 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 狩野方伸（生理学研究所）、分担研究者 宮澤淳夫
- 3 文部科学省科学研究費補助金（若手 B） 平成 28～30 年度  
研究課題 アセチルコリン受容体のリガンド依存的構造変化の動的な解明  
研究代表者 西野有里
- 4 共同研究 雪印メグミルク(株) 平成 29 年度  
研究課題 乳および乳製品の電子顕微鏡による微細構造観察  
研究担当教員 宮澤淳夫
- 5 共同研究 シスメックス(株) 平成 29 年度  
研究課題 最先端バイオイメージング技術を活用したタンパク質の品質評価手法の確立  
研究担当教員 宮澤淳夫
- 6 共同研究 トヨタ自動車(株) 平成 29 年度  
研究課題 FC 電極触媒インク中のゲルダマ構造解析技術の検討  
研究担当教員 宮澤淳夫
- 7 共同研究 日産自動車(株) 平成 29 年度  
研究課題 リチウム電池電極および電極スラリーの構造解析に関する研究  
研究担当教員 宮澤淳夫
- 8 共同研究 (株)日産アーク 平成 29 年度  
研究課題 燃料電池触媒層および触媒インクの微細構造解析に関する研究  
研究担当教員 宮澤淳夫



- 9 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) 平成 23～31 年度  
研究課題 珪藻のフィジオロミクスに基づく褐色のエネルギー革命  
研究代表者 菓子野康浩
- 10 国立極地研究所共同研究 平成 28～30 年度 課題番号 : 28-35  
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
- 11 文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) 平成 27～29 年度  
研究課題 光化学系 2 複合体の構築過程の解明  
研究代表者 菓子野康浩
- 12 地域企業連携型大学院研究 平成 29 年度  
研究課題 CO<sub>2</sub> 削減とバイオ燃料生産性強化を狙った珪藻の油脂代謝機構の研究  
研究担当教員 菓子野康浩
- 13 兵庫県立大学特別研究助成 (先導研究 A) 平成 29 年度  
研究課題 実用珪藻を用いた温暖化抑止のための再生資源生産・污水处理の技術開発研究  
研究代表者 菓子野康浩
- 14 (公財)ひょうご震災記念 21 世紀研究機構 兵庫海外研究ネットワーク (HORN) 事業  
平成 29 年度  
研究課題 微細藻類バイオマス回収に向けた費用効果の高いバイオ凝集法の開発  
研究担当教員 菓子野康浩

## 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・中川将司  
Hatta K, Nikaido M, Nakagawa 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。現在は、主として Cre 組み替え技術や光転換蛍光蛋白質 Kaede や KikGR 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。

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、神経細胞、ペースメーカー細胞での GCaMP3 を用いたカルシウム動態の可視化に成功し、蠕動反射と徐波に由来するの2つの収縮波をカルシウム動態によって区別できることを発見した。また、腸神経細胞その他のカルシウム動態の一部も明らかとなった。一方、ChR2 を用いた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。

## II ゼブラフィッシュ腸神経堤およびプラコードの発生・分化の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development of the enteric neural crest and placode 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 1 億個）の神経細胞から成り、中枢から半ば独立して活動する事から第2の脳とも呼ばれる腸神経の神経サブタイプの分化機構の解明を行っている。まずその前駆細胞である神経堤細胞一つが何種類の神経細胞を生じるのか解明するため、細胞ごとにユニークな蛍光色でマークする Brainbow のシステムを導入した。また腸神経の重要な神経伝達物質であるアセチルコリンの合成酵素の転写制御領域を利用して作成した遺伝子導入魚を利用して、腸神経細胞の発生過程の観察を行なった結果、腸神経細胞の分化は、単純に口側から肛門側へと進むのでは

なく、パイオニア的に分化した一部の神経細胞の間を埋めるように分化し、腸全体を覆うことが明らかとなった。加えて各種神経細胞の発生期の特異化に関わる転写制御因子等を単離する目的で開始したトランスクリプトーム解析では、いくつか興味深い遺伝子が得られてきた。一方、成体の腸神経細胞の発生・再生研究のための幹細胞の探索については、腸神経系の再生を解析する実験系を用い、神経幹細胞のマーカー (Sox2, Sox10) 陽性の細胞からの神経新生を確認する実験を進めている。

### III ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系

Photo-signal transduction in ascidian larval photoreceptors

中川将司・八田公平  
Nakagawa M, Hatta K

動物の眼は多種多様である。しかし、脊椎動物内ではその器官の構造、視細胞の形態、そして視細胞内信号伝達系等の性質は、最も下等な円口類からヒトまで殆ど同じである。脊椎動物型眼が進化の過程でどのように確立されてきたのか、まだ殆ど分かっていない。ホヤは脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物であり、そのオタマジャクシ幼生は脊椎動物の基本体制を備えている。従って、ホヤの視細胞の機構を明らかにすることによって、脊椎動物型眼が確立される進化の過程に関する知見が得られると期待される。本研究では、ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系に着目し研究を進めている。また、光遺伝学的手法を用いて、ホヤ幼生の単純な脊椎動物様中枢神経系の機能解析を行っている。

### IV SPring-8 におけるマイクロ CT と X 線ライブイメージング : A. 古代魚における第 2、第 3 の顎の形態と進化の解析, B. 乾燥耐性生物の細胞小器官の相関顕微鏡解析

A. Synchrotron microCT and live imaging analysis of the second and third jaws in ancient fish by using SPring-8; B. High resolution phase-contrast mCT and correlative microscopic analysis of organelle in Tardigrada under anhydrobiosis

八田公平・二階堂昌孝  
Hatta K, Nikaido M

多くの魚は口にある顎 (口腔顎: 第 1 の顎) のほかに、のどに咽頭顎 (第 2 の顎) をもっている。今年度は、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歯 (第 3 の顎) をもつもの、また、ベニイロカエルアンコウなど特徴的な形態を持つものについて、それぞれのもつ複数の顎の形態と摂食時における特徴的な運動様式を、SPring-8 におけるマイクロ CT や高速 X 線ライブイメージングによって捉えることに成功した。

緩歩動物クマムシの一部や、節足動物であるネムリユスリカは、体や細胞から水がほとんど失われた乾燥状態でも生き続けることができる。しかし、乾燥状態における組織や細胞の形態について

はほとんどわかっていない。私たちは、SPring-8 における高解像度マイクロ CT と共焦点顕微鏡や電子顕微鏡観察を組み合わせた相関顕微鏡の技法を用いて、乾燥状態にある体腔細胞（クマムシ）や脂肪細胞（ネムリユスリカ）の中の細胞小器官、脂肪滴の 3D 形態を生きたまま定量的に観察することに成功した。さらに Zernike 法を用いて、乾眠状態にある個体内部の折れたたまった表皮、筋肉、神経節などの可視化に成功している。

## V SERS ナノビーコンを用いた ゼブラフィッシュの *in vivo* イメージング

*In vivo* live-imaging of zebrafish with SERS nano-beacon

八田公平・二階堂昌孝  
Hatta K, Nikaido M

粒子径約 50nm の金ナノ粒子コロイドにレポータ分子 4,4'-bipyridine を加えて金ナノ粒子自己集合体をつくり、これをゼブラフィッシュ幼生の脳室に注入し、Thermo Scientific DXR2xi イメージング顕微ラマン（785nm, 35mW）を用いて、10  $\mu$  m ピクセルごとに露光時間 300Hz でラマンスペクトルを取得した。その結果、約 4 分間で金ナノ粒子自己集合体が脳室の中に局在していることが、1610 $\text{cm}^{-1}$  (897nm)のイメージング像によって示された。将来的に、生体内の腸において抑制的な神経伝達物質としての役割を担う一酸化窒素 (NO) の動態を高感度の表面増強ラマン散乱 (SERS) をナノビーコンとして検出することを目指している。(高度研 福岡隆夫氏、山口明啓氏らとの共同研究)

### 発表論文 List of Publications

- I-1 Shin-ichi Okamoto & Kohei Hatta :  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging and photo-manipulation of the simple gut of zebrafish larvae *in vivo*. 10th European Zebrafish Meeting, 2017 年 7 月 3-7 日 Budapest, Hungary (ポスター)
- I-2 岡本 晋一、 〇八田公平 ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸の生体内カルシウムイメージングと光操作 第 50 回 日本発生生物学会 2017 年 5 月 10-13 日 船堀、東京 (口頭発表)
- I-3 〇八田公平、岡本 晋一 ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸における蠕動運動の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングおよび光遺伝学解析 第 40 回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 2017 年 7 月 20-23 日 幕張、東京 (口頭発表)
- I-4 岡本 晋一、高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、〇八田 公平 ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸のカルシウムイメージングと光遺伝学解析 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第 40 回日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 3-6 日 神戸 (ポスター)
- I-5 〇高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、岡本 晋一、八田 公平 ゼブラフィッシュ幼生の腸の運動と関連して活動する細胞の同定 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第 40 回日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 3-6 日 神戸 (ポスター)
- I-6 馬場 俊平、〇青木 滯、井上 智裕、東 毅、角本 貴進、池永 隆徳、二階堂 昌孝、八田 公平 ゼブラフィッシュのマウスナー細胞を抑制する GABA 作動性ニューロンのシナプスの解析 生

- 命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会) 2017年12月3-6日 神戸 (ポスター)
- II-1 Nikaido, M., Izumi, S., Ohnuki, H. (埼玉大), Takigawa, Y., Yamasu, K. (埼玉大) and Hatta, K. Early development of the enteric nervous system visualized by using a new transgenic zebrafish line harboring a regulatory region for choline acetyltransferase a (chata) gene. *Gene Expression Patterns*. vol. 28 p12-21. (2018). 査読あり
- II-2 Nikaido, M., Acedo, JN. (Stowers Institute), Hatta, K. and Piotrowski T. (Stowers Institute) Retinoic acid is required and Fgf, Wnt, and Bmp signalling inhibit posterior lateral line placode induction in zebrafish. *Developmental Biology*. vol.431(2) p215-225. (2017). 査読あり
- II-3 D. D. Nogare (NIH), M. Nikaido, K. Somers (NIH), J. Head (NIH), T. Piotrowski (Stowers Institute), A. B. Chitnis (NIH): In toto imaging of the migrating Zebrafish lateral line primordium at single cell resolution. *Dev Biol*. vol.422(1) p14-23 (2017). 査読あり
- II-4 M. Delfino-Machín (U. of Bath), R. Madelaine (U. de Toulouse), G. Busolin (U. of Padova), M. Nikaido, S. Colanesi (U. of Bath), K. Camargo-Sosa (U. of Bath), E. W. Law (U. of Bath), S. Toppo (U. of Padova), P. Blader (U. de Toulouse), N. Tiso (U. of Padova), R. N. Kelsh (U. of Bath): Sox10 contributes to the balance of fate choice in dorsal root ganglion progenitors. *PLoS One*. vol.12(3) e0172947 (2017). 査読あり
- II-5 ○二階堂 昌孝、泉 早紀、大貫 穂乃佳、瀧川 雄基、弥益 恭、八田 公平 コリンアセチルトランスフェラーゼ調節領域を使用した遺伝子導入魚による腸神経系の初期発生過程の可視化 第40回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 2017年7月20-23日 幕張、東京 (口頭発表)
- II-6 ○桑田 舞、八田 公平、二階堂 昌孝 迷走神経堤の可視化による腸神経分化過程の細胞動態の解明 第40回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 2017年7月20-23日 幕張、東京 (ポスター)
- II-7 ○大野 真理愛、堀内 奈津美、二階堂 昌孝、八田 公平 ゼブラフィッシュを用いた腸神経系傷害後の機能回復機構の解明 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会) 2017年12月3-6日 神戸 (ポスター)
- II-8 ○桑田舞、大野 真理愛、青木滯、兒島卓也、古森大樹、高御堂大慈、西田さやか、本多美瑛、二階堂昌孝、中川将司、八田公平 2つの脳の作り方：～いろいろな色の光と遺伝子による挑戦～ 知の交流シンポジウム 2017年9月19日 神戸 (ポスター)
- III-1 桑原 健太、杉本 健太郎、○中川 将司 ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系 第88回 日本動物学会 2017年9月21日 富山 (口頭発表)
- IV-1 ○八田公平、○古森大樹 身近にいるエイリアン？ 魚がかくし持つ第2のあごのなぞを SPring-8 でときあかす やさしいサイエンスセミナー 播磨科学公園都市まちびらき 20周年記念事業 2017年10月29日 光都オプトピアシアター 赤穂 (口頭発表)
- IV-2 Taiki Komori, Saki Shiimoto, Shota Nomura, Kenta Kuwabara, Tomohiro Inoue, Takanori Ikenaga (鹿児島大), Kentaro Uesugi (JASRI), Masato Hoshino (JASRI), Masataka Nikaido, Mai Kuwata, Maria Ohno, Mio Aoki, Takuya Kojima, Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Mie Honda, & ○Kohei Hatta. Synchrotron mCT and live-imaging analysis of pharyngeal jaws of ancient fish, arowana, gar, polypterus and lungfish, in feeding. The Joint Symposium between The 2nd Brain Research Institute Monash University of Toyama International Symposium 'Recent Updates on Neurobehavioral

Studies and The 12th Domestic Symposium on Behavior and Nervous System in Aquatic Animals' 富山 2017年12月16-17日 (口頭発表)

- IV-3 清家 奈央, 桑原 健太, 福田 恭子, 仲宗根 爽乃, 野末 馨, 柴田 今日子, 大久保 真理, 森川 作志, 岡本 晋一, 柿口貴沙, 米村 重信, 西野 有理, 野間 有加里, 宮沢 淳夫, 上杉 健太郎 (JASRI), 竹内 晃久 (JASRI), 鈴木 芳生 (JASRI), ○八田 公平 極限環境耐性生物クマムシの組織・細胞・細胞小器官レベルでの放射光 mCT・光顕・電顕による統合・相関 3D 解析 第2回クマムシ学研究会 2017年8月5日 東京大学本郷キャンパス (口頭発表)
- V-1 ○福岡 隆夫 (高度研、アーカイラス)、二階堂 昌孝、山口 明啓 (高度研)、春井 里香 (サーモフィッシャーサイエティフィック (株))、奈良 明司 (サーモフィッシャーサイエティフィック (株))、内海 裕一 (高度研)、八田 公平 SERS ナノビーコンを用いたゼブラフィッシュの *in vivo* イメージング。日本分析化学会 第66年会 2017年9月10日 東京 (口頭発表)

## 大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 桑田 舞：腸神経細胞の多様性獲得機構の解明  
大野 真理愛：腸神経系の再生機構の研究

## 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 (平成 28~30 年度) 基盤研究 (C) 課題番号 16K06998  
研究課題 単純な脊椎動物の腸神経系機能の可視化と光遺伝学による腸運動の制御  
研究代表者 八田公平  
共同研究者 二階堂昌孝  
共同研究者 中川将司
- 2 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 26~29 年度) 挑戦的萌芽研究 課題番号 26650122  
研究課題 光遺伝学と単一細胞光刺激装置を用いて、ホヤ幼生中枢神経回路の機能解析  
研究代表者 中川将司

## 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 プラナリアの体細胞系幹細胞から生殖系細胞への分化機構の研究

### Molecular Analysis of Differentiation from Somatic Stem Cells to Germline in Planarians

梅園良彦・織井秀文

Umesono, Y., Orii, H.

プラナリアは、通常、自ら切断・再生を繰り返し無性生殖で増殖する。このとき、体中に分布する体細胞系幹細胞は神経や筋など様々な細胞へと分化する。一方、特殊な条件下で飼育すると体細胞系幹細胞から生殖系幹細胞を経て卵や精子へと分化し有性生殖を行うようになる。この無性から有性への生殖様式の転換機構について分子生物学的手法で解析している。

## III 多眼プラナリアの眼の再生の研究

### Molecular Analysis of Eye Regeneration in the Multiple-eyed Planarian

梅園良彦・織井秀文

Umesono, Y., Orii, H.

プラナリアの仲間には一対の眼をもつ双眼プラナリアの他に数十の個眼をもつ多眼プラナリアがいる。この個眼は1つの視神経と1つの色素細胞から構成されるため、眼の再生を細胞レベルで容易に観察することができる。この多眼種プラナリアを用いて、視神経細胞と色素細胞がどのようにして再生するのか、個々の視神経が脳へどのように投射しているのか等を明らかにする。

## 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に特有な構造である傷表皮および先端傷表皮キャップの形成とその機能に関わる遺伝子を単離し解析する。また、カエル幼生とイモリの尾部再生を比較することから、イモリで完全な再生がおきるしくみを明らかにする。

#### 発表論文 List of Publications

- I-1 Hattori M, Miyamoto M, Hosoda K, Umesono Y. (2018) Usefulness of multiple chalk-based food colorings for inducing better gene silencing by feeding RNA interference in planarians. *Dev. Growth Differ.*, 60: 76-81. doi: 10.1111/dgd.12413
- I-2 Hosoda K, Motoishi M, Kunimoto T, Nishimura O, Hwang B, Kobayashi S, Yazawa S, Mochii M, Agata K, Umesono Y. (2018) Role of MEKK1 in the anterior-posterior patterning during planarian regeneration. *Dev. Growth Differ.*, 60: 341-353. doi: 10.1111/dgd.12541
- I-3 梅園: プラナリアの前後軸に沿った体のプロポーシオン形成を司る分子基盤. ConBio2017 (神戸)、2017
- I-4 服部・宮本・細田・梅園: プラナリアにおける脳を介さない摂食行動の解析. 日本動物学会第88回大会 (富山)、2017
- III-1 村井・細田・西谷(箕面東高校)・梅園・織井: 多眼のプラナリア、カズメウズムシの視神経の投射と再生の解析. 日本動物学会第88回大会 (富山)、2017
- IV-1 Sato K, Umesono Y, Mochii M. (2018) A transgenic reporter under control of an *es1* promoter/enhancer marks wound epidermis and apical epithelial cap during tail regeneration in *Xenopus laevis* tadpole. *Dev Biol.* 433(2): 404-415. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.012

#### 大学院生命理学研究科

博士後期課程

奥村 晃成: 尾部再生過程で発現する遺伝子に関する研究

博士課程 (5年一貫)

Mohammad Abdul Auwal: プラナリアの再生制御機構に関する研究



#### 博士前期課程

興梠 克仁：プラナリアの後方化シグナル制御機構に関する研究

村井 寿々華：多眼プラナリアの視神経に関する研究

服部 美希：摂食器官の付加再生制御機構に関する研究

#### 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 基盤研究（C）

研究課題 FGF 活性調節を可能にする新たなゲノム戦略の解明

研究代表者 梅園良彦

### 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.

微量金属元素は生体内の多くのタンパク質に結合して活性中心として利用されており、生理活性物質の生合成・代謝やエネルギー・情報変換などの様々な生体内反応に関与している。病原菌では増殖に必要な鉄を宿主（感染先）の体内に多量に含まれる赤血球のヘモグロビンからヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を奪い取って補給している。このことから、病原菌のヘム獲得戦略に関する研究は、感染症の予防や治療法の確立に貢献するとして、近年注目されている。病原菌および好熱菌のペリプラズム層に存在するヘム輸送タンパク質（PBP）について、本年度は共鳴ラマン分光解析および等温滴定型熱量測定法によってヘムの結合の特性を明らかにした。また、前年度までに行ったこれらの PBP の立体構造と他の菌種由来の PBP との構造比較により、ヘム結合に関与する配位子、疎水性残基、極性残基の構造的な多様性を明らかにした。

ヒトの非ヘム鉄の吸収には小腸の上皮細胞で発現している膜内在性の鉄還元酵素である Duodenal cytochrome *b*<sub>561</sub> (Dcytb) が関与している。Dcytb による鉄還元反応における分子内電子伝達や鉄イオン認識の分子機構を解明するために共鳴ラマン分光実験を行った。前年度に決定した結晶構造や生化学実験による解析と合わせ、食物に含まれるアスコルビン酸や有機酸が鉄分の吸収効率を向上させる仕組みを原子レベルで明らかにした。

### 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.

大型放射光施設 SPring-8 や X 線自由電子レーザー施設 SACLA を利用した種々の金属タンパク質の結晶構造や分光法を利用した時間分解構造解析、構造に基づいた生化学的な解析に基づいて触媒反応機構を明らかにする研究を行っている。本年度は、脱窒菌の脱窒過程に関与するタンパク質複合体の構造解析による細胞内連続化学反応機構の解明を目的として、脂質二重膜であるナノディスク内で安定に膜タンパク質が複合体を形成する条件の探索を行った。

また、SACLA の X 線自由電子レーザーを用いて、カビ由来一酸化窒素還元酵素 (チトクロム P450<sub>nor</sub>) の酵素反応中に現れる反応中間体の構造解析を行った。昨年度に解析を行った第一の反応中間体に加えて、第二の反応中間体の配位構造を決定するためにデータ収集を行い、構造解析を進めている。そのほか、種々のヘム酵素の立体構造解析を行った。

#### 発表論文 (List of publications)

- I-1 Y. Naoe, N. Nakamura, Md. M. Rahman, T. Tosha, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural Basis for the Capture and Transfer of Heme by Periplasmic Heme-Binding Proteins in a Bacterial Heme-Acquisition System” *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* **85**, 2217- 2230 (2017)
- I-2 H. Uehara, Y. Shisaka, T. Nishimura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Miyake, H. Shinokubo, Y. Watanabe, O. Shoji: “Structure of the Heme Acquisition Protein HasA with Iron(III)-5, 15-Diphenyl-Porphyrin and Derivatives Thereof as an Artificial Prosthetic Group” *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 1-6 (2017)
- I-3 杉本宏, 城宜嗣: ヘム輸送体の立体構造と基質輸送メカニズム、*生物物理* 335, 5-8 (2018)
- I-4 杉本宏: バクテリアにおけるヘムの獲得と輸送の構造生物学、*日本結晶学会誌* 59, 166-173 (2017)
- I-5 杉本宏: ヘム輸送タンパク質の立体構造、*感染・炎症・免疫* 47, 41 (2017)
- I-6 杉本宏 「結晶構造から明らかになった病原菌ヘムトランスポーターの分子メカニズム」 第17回日本蛋白質科学会年会 (仙台)、2017年6月22日 (招待講演)
- I-7 杉本宏 「病原菌のヘム輸送タンパク質の立体構造と機能」 第41回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (東京)、2017年9月23日 (招待講演)
- I-8 H. Sugimoto: “Structural basis of the ABC heme transporter in iron uptake system of pathogenic bacteria.” 7th FEBS Special Meeting on ABC Proteins - ABC2018, Innsbruck, March 7, 2018 (招待講演)
- I-9 M. Ganasen, H. Sawai, H. Togashi, H. Takeda, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural insights into ascorbate-dependent ferric reductase, Dcytb, in human.” 7<sup>th</sup> Congress of the International BioIron Society Conference, May 7-11, 2017, Los Angeles (Poster)
- I-10 M. Ganasen, H. Sawai, S. Nagatoishi, H. Togashi, H. Takeda, K. Tsumoto, Y. Shiro, H.

- Sugimoto: "Structural analysis of a human duodenal ferric reductase, Dcytb." The 17<sup>th</sup> annual meeting of the protein science society of Japan, June 20-22, Sendai (Poster)
- I-11 M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: "Structural insights into ferric reduction mechanism by a human duodenal ferric reductase, Dcytb." Leading program conference "Science and Society: Roles of Basic Science in Drug Discovery", June 20-22, 2017, Akou (Poster)
- II-1 E. Terasaka, K. Yamada, P.-H. Wang, K. Hosokawa, R. Yamagiwa, K. Matsumoto, S. Ishii, T. Mori, K. Yagi, H. Sawai, H. Arai, H. Sugimoto, Y. Sugita, Y. Shiro, T. Tosha: "Dynamics of Nitric Oxide Controlled by Protein Complex in Bacterial System" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 9888-9893 (2017)
- II-2 T. Tosha, T. Nomura, T. Nishida, N. Saeki, K. Okubayashi, R. Yamagiwa, M. Sugahara, T. Nakane, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, T. Kimura, T. Hisano, K. Muramoto, H. Sawai, H. Takeda, E. Mizohata, A. Yamashita, Y. Kanematsu, Y. Takano, E. Nango, R. Tanaka, O. Nureki, Y. Ikemoto, H. Murakami, S. Owada, K. Tono, M. Yabashi, M. Yamamoto, H. Ago, S. Iwata, H. Sugimoto, Y. Shiro, M. Kubo: "Capturing an Initial Intermediate during Enzymatic Reaction of P450nor using Time-Resolved XFEL Crystallography and Caged-Substrate" *Nat. Commun.* **8**, 1585 (2017)
- II-3 H. Onoda, O. Shoji, K. Suzuki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "α-Oxidative decarboxylation of fatty acids catalysed by cytochrome P450 peroxygenases yielding shorter-alkyl-chain fatty acids." *Catal. Sci. Technol.* **8**, 434 (2018)
- II-4 Shoji, S. Yanagisawa, J. K. Stanfield, K. Suzuki, Z. Cong, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "Direct hydroxylation of benzene to phenol by cytochrome P450BM3 triggered by amino acid derivatives" *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 10324-10329 (2017)
- II-5 K. Suzuki, J. K. Stanfield, O. Shoji, S. Yanagisawa, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "Control of stereoselectivity of benzylic hydroxylation catalysed by wild type cytochrome P450BM3 using decoy molecules" *Catal. Sci. Technol.* **7**, 3332-3338 (2017)
- II-6 K. Oohora, H. Meichin, Y. Kihira, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Hayashi: "A manganese(V) porphycene complex responsible for inert C–H bond hydroxylation in myoglobin matrix" *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18460 (2017)
- II-7 K. Yasuda, Y. Yogo, H. Sugimoto, H. Mano, T. Takita, M. Ohta, M. Kamakura, S. Ikushiro, K. Yasukawa, Y. Shiro, T. Sakaki: "Production of an active form of vitamin D<sub>2</sub> by genetically engineered CYP105A1" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**, 336-341 (2017)
- II-8 K. Yasuda, H. Sugimoto, K. Hayashi, T. Takita, K. Yasukawa, M. Ohta, M. Kamakura, S. Ikushiro, Y. Shiro, T. Sakaki: "Protein Engineering of CYP105s for Their Industrial Uses" *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **1866**, 23-31 (2017)

- II-9 R. Yamagiwa, T. Kurahashi, M. Takeda, M. Adachi, H. Nakamura, H. Arai, Y. Shiro, H. Sawai, T. Tosha “*Pseudomonas aeruginosa* overexpression system of nitric oxide reductase for *in vivo* and *in vitro* mutational analyses” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1859**, 333-341 (2018)
- II-10 N. Gonska, D. Young, R. Yuki, T. Okamoto, T. Hisano, S. Antonyuk, S. S. Hasnain, K. Muramoto, Y. Shiro, T. Tosha, P. Ädelroth “Characterization of the quinol-dependent nitric oxide reductase from the pathogen *Neisseria meningitidis*, an electrogenic enzyme” *Scientific Reports* **8**, 3637 (2018)
- II-11 T. Halsted, K. Yamashita, K. Hirata, H. Ago, G. Ueno, T. Tosha, R. Eady, S. Antonyuk, M. Yamamoto, S. Hasnain “An unprecedented dioxygen species revealed by serial femtosecond rotation crystallography in copper nitrite reductase” *IUCrJ* **5**, 22-31 (2018)
- II-12 T. Tosha “Time-resolved XFEL crystallography and in crystallo spectroscopy for probing reaction dynamics of respiratory metalloenzymes” 5th BioXFEL International Conference, Feb. 13-15, 2018, New Orleans, USA (招待講演)
- II-13 當舎武彦「X線自由電子レーザーを用いた時間分解結晶構造解析による酵素反応の追跡」日本化学会第98春季年会(船橋)2018年3月20-23日(招待講演)
- II-14 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本 宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田 想、城 宜嗣、久保 稔「X線自由電子レーザーを利用した時間分解 X線結晶構造解析による酵素反応の観測」第44回生体分子科学討論会(秋田)、2017年6月23-24日(口頭発表)
- II-15 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本 宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田 想、城 宜嗣、久保 稔“Time-resolved X-ray crystallography at SACLA: Application to enzymatic reaction” 錯体化学会第67回討論会(札幌)、2017年9月16-18日(口頭発表)
- II-16 當舎武彦「X線自由電子レーザーを用いた時間分解結晶構造解析：酵素反応への応用」第55回日本生物物理学会年会(熊本)、2017年9月19日(招待講演)
- II-17 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本 宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田 想、城 宜嗣、久保 稔「酵素反応機構解明のためのX線自由電子レーザーを利用した時間分解X線結晶構造解析」第50回酸化反応討論会(横浜)、2017年11月11-12日(口頭発表)

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金(平成29~32年度)基盤研究B 課題番号17H03092  
 研究課題 酵素超分子複合体形成による効率的な細胞内連続化学反応機構の解明  
 研究代表者 當舎武彦
- 2 科学研究費補助金(平成29~30年度)新学術領域研究「動的構造生命」 課題番号17H05896  
 研究課題 ヘムトランスポーターの動的結晶構造解析  
 研究代表者 杉本 宏

## I 地球惑星構成物質の研究

### Terrestrial Rock Science

佐藤博樹

Sato, H.

地球や惑星を構成している鉱物および岩石の物理的な性質や化学的な性質を実験室で調べ、地球や惑星について観察あるいは観測されているデータと比較検討する研究である。具体的には、鉱物や岩石の地震波速度を温度・圧力・含水量の関数として測定する、地震波の減衰の程度を測定する、詳細な化学組成の分布を決定する、鉱物の吸収スペクトルや岩石の組織を解析する、等々、鉱物や岩石の種々の性質を実験室で測定する。

## II 大型鉱物単結晶の合成と評価、物性

### Synthesis and Properties of Large Single Crystal Minerals

佐藤博樹

Sato, H.

地球や惑星を構成している鉱物について、自然界では得られないような大型かつ均質の単結晶を実験室で合成し、鉱物の物理的あるいは化学的諸性質を正確に決定するために欠かせない標準鉱物試料を得る研究である。特にマントルの構成鉱物について、化学組成を人為的にコントロールした単結晶の合成を試みており、これによって、地球のみならず惑星マントルの鉱物を地上で合成する実験を行う。また、合成した鉱物単結晶を実験室で評価し、その物性を測定する。

## III 地球惑星内部構造の研究

### Science of the Earth and Planetary Interiors

佐藤博樹

Sato, H.

前述の実験室で温度・圧力・含水量を変化させて測定した地震波速度を、地球内部について決定されている3次元地震波速度構造（地震波トモグラフィ）と比較検討し、地球内部の温度や含水量を見積もる研究である。地下の熱水の挙動は地震活動と密接に関係しており、地球内部の含水量を定量的に見積もることは大変重要な研究課題である。将来は月や惑星の内部構造についても検討を加えたい。

## 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 相平衡岩石学 Phase Petrology

後藤 篤  
Goto, A.

相平衡岩石学は、変成岩岩石学の研究での主流の一つであった。岩石の固体部分の化学組成が変化しない場合の鉱物組み合わせの変化は、温度や圧力などの物理条件の変化と変成作用の時に共存した流体相の化学組成の連続的な変化を用いた解析が可能である。一方、温度や圧力の変化に加えて、流体相の流入や岩石の化学組成の不連続な変化が伴う場合には、交代作用となり扱いは複雑になる。しかし、どちらの場合も、基本的には、顕微鏡観察、全岩分析、鉱物の局所分析で、解析は可能な場合が多い。年代学は、変成作用などの地質学的な事件の起きた時期を決めるための手法である。

### 発表論文 List of Publications

- II-1 植田和利(広島市立美鈴が丘高)・伊東和彦(京都学園大)・上原誠一郎(九州大)・佐藤博樹：  
太陽炉を利用したマグネシウムによる二酸化ケイ素の還元とその教材化。  
科学教育研究, 40巻, 39-45 (2016).
- II-2 植田和利(広島市立沼田高)・伊東和彦(京都学園大)・上原誠一郎(九州大)・佐藤博樹：  
ミニ太陽炉の製作と金属化合物の還元への利用。  
科学教育研究, 40巻, 334-340 (2016).
- IV-1 K. Hagiya, T. Mikouchi (東大), K. Ohsumi, Y. Terada (JASRI), N. Yagi (JASRI), M. Komatsu (総研大),  
H. Ozawa, Y. Taki, Y. Yamatsuta, A. Takenouchi (東大), H. Hasegawa (東大), H. Ono (東大),  
K. Higashi (東大) & M. Zolensky (NASA-JSC): Crystallographic Characterization of Extraterrestrial  
Materials by Energy-Scanning X-ray Diffraction. SPring-8 シンポジウム 2017 (広島, 2017)
- IV-2 M. Zolensky, 他 19 名 (含 K. Hagiya) :  
Measuring the Shock Stage of Asteroid Regolith Grains by Electron Back-Scattered Diffraction.  
49th Lunar and Planetary Science Conference (Texas, 2018).
- V-1 K. Kunugiza (富山大), E. Nakamura (岡山大), A. Goto, K. Kobayashi (岡山大), T. Ota (岡山大),  
H. Miyajima (フォッサマグナミュージアム) & K. Yokoyama (茨城県自然博物館) :  
In-situ U-Pb zircon age dating deciphering the formation event of the omphacite growth over relict edenitic  
pargasite in omphacite-bearing jadeitite of the Itoigawa-Omi area of the Hida-Gaien belt, central Japan.  
Journal of Mineralogical and Petrological Sciences, 112, 256-270. (2017)
- V-2 A. Goto, K. Kunugiza (富山大) & H. Miyajima (フォッサマグナミュージアム) : Phase relation in the  
NaAlSi<sub>3</sub>O<sub>8</sub>-SiO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O system for the hydrothermal precipitation of jadeite, natrolite, and analcime in  
jadeitite of the Itoigawa-Omi area, Japan.  
Journal of Mineralogical and Petrological Sciences, 112, 271-280. (2017)

### 出願中の特許 Patent Application

- III-1 佐藤博樹・興梠敬典(株式会社Nextremer) :  
地震予測マップ作成。  
特願2017-154109 (2017).