

# 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、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。特に **SSZ1** 欠損によって標的化効率が向上することを見出した。また、小胞体内腔で **Hsp70** である **Kar2p** の存在量によって疎水性セグメントの動きが向上することを見出し、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「第2サイト」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、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。候補AはN-末端ミリスチル化酵素であることを明らかにした。

## 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、排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターに焦点を当て、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。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 (WDKE) を見出した。

## 発表論文 List of Publications

I-1 Kida, Y., Sakaguchi, M.

Interaction mapping of the Sec61 translocon identifies two Sec61a regions interacting with hydrophobic segments in translocating chains.

J. Biol. Chem., 293 (44), 17050-17060 (doi: 10.1074/jbc.RA118.003219), 2018

I-2 阪口雅郎・高原教代・藤田英伸 : Two independent modes of recognition of hydrophobic segment at the endoplasmic reticulum translocon (小胞体トランスロコンでの膜タンパク質の構造形成における膜貫通セグメント識別の2つの容態) (口演)、第18回日本蛋白質学会年会(新潟)、2018

I-3 藤田英伸・高原教代・阪口雅郎 : Dynamic motion of nascent chain through the ER translocon with back and forth movement (ポスター)、国際シンポジウム Proteins (滋賀)、2018

I-4 菅公秀、吉久徹、阪口雅郎 : Folding probe reveals effects of translocon-related genes knockout on co-translational protein translocation in budding yeast cells (ポスター)、国際シンポジウム Proteins (滋賀)、2018

I-5 藤田英伸, 高原教代, 木田 祐一郎, 阪口 雅郎:小胞体トランスロコンでのポリペプチド鎖の動き制限要因と駆動要因 (口演・ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-6 菅公秀, 十倉麻友子, 吉久徹, 阪口雅郎:小胞体膜透過因子 Sec71p/Sec72p の作用機序の解明(ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-7 中川知香, 菅公秀, 吉久徹, 阪口雅郎 : リボソーム結合型分子シャペロン Hsp70 の合成共役型膜透過に対する作用 (口演・ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-8 森川真衣, 高原教代, 阪口雅郎 : 膜タンパク質小胞体標的化抑制 (ETS) 因子としてのミリスチル転移酵素 NMT1 (口演・ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-9 小坂優里菜, 菅公秀, 吉久徹, 阪口雅郎:粗面小胞体での合成共役型タンパク質膜透過に内腔シャペロンネットワークが関与する (ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-10 菅公秀、吉久徹、阪口雅郎 : 出芽酵母小胞体におけるフォールディングプローブを用いた新生鎖膜透過動態解析 (ポスター)、第41回分子生物学会年会(横浜)、2018

II-1 衣斐義一・阪口雅郎 : ファミリーCに属するABCトランスポーターの異なる分子種を細胞膜の異なる領域に極性局在化させるシグナル配列 (ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

II-2 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 (ポスター)、第41回日本分子生物学会年会(横浜)、2018

## 大学院生命理学研究科

准研究員

菅 公秀

高原教代

博士前期課程

小坂優里菜

中川知香

森川真衣

## 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 兵庫県立大学特別研究助成金（平成 30 年度）先導研究 A

研究課題 上皮細胞において異物排出ポンプ ABCCC2 を頂端部細胞膜に極性局在化させる機構の解明

研究代表者：衣斐 義一

## I 金属タンパク質の振動分光研究

### Raman Spectroscopy of Metalloproteins

久保 稔・柳澤幸子・北川禎三

Kubo, M., Yanagisawa, S., Kitagawa, T.

活性中心に Fe や Cu などの遷移金属を有する金属タンパク質は、アミノ酸残基が金属イオンの電子状態を精緻に制御することによって機能している。本研究では、金属タンパク質の機能メカニズムを明らかにするために、活性中心や基質・リガンドの構造、電子状態を振動分光解析する。ミトコンドリア呼吸系膜タンパク質複合体や種々のヘムタンパク質、チロシナーゼ、ヒドロゲナーゼ、金属タンパク質のモデル錯体等を研究対象とする。

## II SACLA を用いた酵素反応の時分割構造解析

### Time-Resolved Structural Analysis of Enzymatic reactions using SACLA

久保 稔・柳澤幸子

Kubo, M., Yanagisawa, S.

酵素反応の可視化は、生命科学研究における大きな夢の一つである。この実現に向けて本研究では、X線自由電子レーザー-SACLA と、光により基質小分子を放出するケージド化合物を組み合わせた時分割 X線結晶構造解析を行ない、酵素反応を原子レベルで追跡する。チトクロム P450<sub>nor</sub> やチトクロム *c* 酸化酵素等が研究対象である。

## III ストップフローラマン分光法による 二原子酸素添加酵素の反応解析

### Stopped-Flow Raman Reaction Analysis of Dioxygenase

久保 稔・柳澤幸子

Kubo, M., Yanagisawa, S.

インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 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するヘム酵素で

ある。IDO の反応機構を解明するために、ストップフローラマン分光装置を開発し、ヘム中間体や基質中間体を捕捉する。

## 発表論文 List of Publication

- I-1 Yuka Kawahara-Nakagawa, K.N., Satoru Nakashima, Shota Inoue, Takehiro Ohta, Takashi Ogura, Yasuteru Shigeta, Katsuyuki Fukutani, Tatsuhiko Yagi and Yoshiki Higuchi: New assay method based on Raman spectroscopy for enzymes reacting with gaseous substrates, *Protein Science*, 28, 663-670, (2019)
- I-2 Mio Sekino(金沢大), Hideki Furutachi(金沢大), Kyosuke Tasaki(金沢大), Takanao Ishikawa(金沢大), Shohei Fujinami(金沢大), Shigehisa Akine(金沢大), Yoko Sakata(金沢大), Masatatsu Suzuki(金沢大), T. Nomura, T. Ogura, and T. Kitagawa: Crystal Structure of Bis( $\mu$ -hydroxo)diiron(II) Complex with a Dinucleating Ligand Having a Butyl Linker, *X-ray Structure Analysis Online*, 35, 5-7. (2019)
- I-3 Yuichi Yasuda(金沢大), Hideki Furutachi(金沢大), Yosuke Hayashi (金沢大), Kana Ishizaki(金沢大), Shuhei Fujinami(金沢大), Shigehisa Akine(金沢大), Masatatsu Suzuki(金沢大), Shigenori Nagatomo(筑波大), and Teizo Kitagawa: Crystal Structure of  $\mu$ -Phenoxo- $\mu$ -benzoate-bridged Dinuclear Fe(II) Complex with a Dinucleating Ligand Having a Sterically Bulky Imidazolyl Group, *X-ray Structure Analysis Online*, 35, 11-13, (2019)
- I-4 Chen Li, Tatsuhito Nishiguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, and Satoru 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*, 1859, 1045-1050, (2018)
- I-5 Miho Watanabe(筑波大), Yuki Kanai(筑波大), Shunpei Nakamura(筑波大), Ryu Nishimura(筑波大), Tomokazu Shibata(筑波大), Atsuya Momotake(筑波大), Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura, Takashi Matsuo(奈良先端大), Shun Hirota(奈良先端大), Saburo Neya(千葉大), Akihiro Suzuki(長岡高専), and Yasuhiko Yamamoto(筑波大): Synergistic Effect of Distal Polar Interactions in Myoglobin and Their Structural Consequences, *Inorg. Chem.*, 57, 14269-14279, (2018)
- I-6 Ryosuke Shinomiya(筑波大), Yuya Katahira(筑波大), Haruka Araki, Tomokazu Shibata(筑波大), Atsuya Momotake(筑波大), Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura, Akihiro Suzuki(長岡高専), Saburo Neya(千葉大), Yasuhiko Yamamoto(筑波大): Characterization of Catalytic Activities and Heme Coordination Structures of Heme-DNA Complexes Composed of Some Chemically Modified Hemes and an All Parallel-Stranded Tetrameric G-Quadruplex DNA Formed from d(TTAGGG), *Biochemistry*, 57, 5930-5937, (2018)
- I-7 Yasuyuki Matoba(広島大), Shogo Kihara(広島大), Naohiko Bando(広島大), Hironari Yoshitsu(広島大), Miyuki Sakaguchi, Kure'e Kayama, Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura, Masanori Sugiyama(広島大): Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the Tyr98 residue in the caddie protein, *PLoS Biol*, 16, (12), e3000077, (2018)
- I-8 Minoru Kubo: Time-resolved IR analysis of the catalytic reaction pathway of NO reductase. The international symposium on Bioinorganic Chemistry (Okazaki), 2018 (招待講演)

- II-1 久保稔 X線自由電子レーザーを用いたタンパク質のダイナミクス計測. 神戸大学先端融合研究環ワークショップ“非共有結合系の分子科学:計測技術から探る生体分子科学の新展開”(神戸) 2019 (招待講演)
- II-2 久保稔 X線自由電子レーザーによる蛋白質の時分割・無損傷結晶構造解析. 光学 47, 431-434 (2018) (解説)
- II-3 久保稔 動的な構造生物学研究と創薬貢献への展望. 神戸大学・徳島大学・兵庫県立大学合同シンポジウム“産学連携による国際的卓越研究拠点の創設とその未来”(神戸)、2018 (招待講演)
- II-4 久保稔 構造生物学における SACLA 時分割構造解析の展望と課題. SPring-8 シンポジウム“時間軸でみる SPring-8/SACLA の利用研究”(姫路) 2018 (招待講演)
- II-5 久保稔 時分割 XFEL 構造解析による蛋白質機能サイト間の相互作用ダイナミクスの観測. 蛋白研セミナー“生体分子内情報伝達機構の新展開”(吹田) 2018 (招待講演)
- II-6 久保稔 SACLA 時分割構造解析の展望と課題. 蛋白研セミナー“構造生物学と計算科学の融合による動的構造生物学の新しい展開”(吹田) 2018 (招待講演)
- II-7 Minoru Kubo Time-resolved XFEL crystallography for capturing reaction intermediates of respiratory metalloenzymes. 15th Conference of the Asian Crystallographic Association and 32nd Conference of the Society of Crystallographers in Australia and New Zealand (AsCA 2018/Crystal32), (Auckland) 2018 (招待講演)

## 大学院生命理学研究科

### 博士前期課程

魚崎凌生: ストップフローラマン分光法によるインドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼの反応機構の解明

高坂瞭汰: ケージド酸素を用いたチトクロム *c* 酸化酵素の時分割結晶構造解析

### 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 平成 30 年度兵庫県立大学特別研究助成金

研究課題 ストップフローラマン分光法を用いたタンパク質の構造ダイナミクス研究

研究代表者 柳澤幸子

### 2 科学研究費補助金 (2017 年 4 月～2020 年 3 月) 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低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



- 3 理化学研究所 Pioneering Project (2016年4月～2021年3月)  
研究課題 Dynamic Structural Biology by Integrating Physics, Chemistry,  
and Computational Science  
研究代表者 杉田有治 (理化学研究所)  
研究分担者 久保 稔
- 4 科学研究費補助金 (2016年4月～2019年3月) 基盤研究(C) 課題番号: 16K07261  
研究課題 中性子構造解析を中心とした多角的な手法によるビリジン還元酵素の  
反応機構解明  
研究代表者 海野昌喜 (茨城大学)  
研究分担者 久保 稔

## I 微生物の細胞機能を維持するタンパク質群のX線構造化学

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

西川幸志・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NAD<sup>+</sup>→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B<sub>12</sub>補酵素 (Co原子含有) の関与するジオールデヒドラターゼやエタノールアミンアンモニアリアーゼの構造解析を行い、酵素の触媒するラジカル反応機構を提唱している。他にナイロンオリゴマー分解酵素やデカルボキシラーゼ、フェレドキシン→NADP還元酵素、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反応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β-カテニン経路に関わるAxin, Dishevelled, Coiled-coil DIXタンパク質がもつDIXドメイン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-1 H. Tai, Y. Higuchi and S. Hirota: Comprehensive Reaction Mechanisms at and Nearby the Ni-Fe Active Sites of [NiFe] Hydrogenases, *Dalton Transactions*, 47, 4408-4423 (2018)
- I-2 S. Shiraiwa, K. So, Y. Sugimoto, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Nishikawa, Y. Higuchi, K. Kano: Reactivation of Standard [NiFe]-hydrogenase and Bioelectrochemical Catalysis of Proton Reduction and Hydrogen Oxidation in a Mediated-electron-transfer System, *Bioelectrochem*, 123, 156-161 (2018)
- I-3 N. Shibata, Y. Sueyoshi, Y. Higuchi and T. Toraya: Direct Participation of a Peripheral Side Chain of a Corrin Ring in Coenzyme B<sub>12</sub> Catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 7830-7835 (2018)
- I-4 H. Arai, Y. Shomura, Y. Higuchi and M. Ishii: Complete Genome Sequence of a Moderately Thermophilic, Facultative Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1, *Microbiology Resource Announcements*, 7, e00857-18 (2018)
- I-5 M. Akter, T. Tokiwa, M. Shoji, K. Nishikawa, Y. Shigeta, T. Sakurai, Y. Higuchi, K. Kataoka and N. Shibata: Redox Potential-dependent Formation of an Unusual His-Trp Bond in Bilirubin Oxidase, *Chem. Eur. J.*, 24, 1-8 (2018)
- I-6 N. D. M. Noor, H. Matsuura, K. Nishikawa, H. Tai, S. Hirota, J. Kim, J. Kang, M. Tateno, K-S. Yoon, S. Ogo, S. Kubota, Y. Shomura and Y. Higuchi: Redox-dependent Conformational Changes of a Proximal [4Fe-4S] Cluster in Hyb-type [NiFe]-hydrogenase to Protect the Active Site from O<sub>2</sub>, *Chem. Commun.*, 54, 12385-12388 (2018)
- I-7 T. Tokiwa, M. Shoji, V. Sladek, N. Shibata, Y. Higuchi, K. Kataoka, Y. Shigeta and F. Misaizu: Structural Changes in the Trinuclear Copper Center upon the Reduction of Bilirubin Oxidase (BOD), *Molecules*, 24, 76, (2018)
- I-8 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼの構造化学, 第18回日本蛋白質科学会年会, 2018/6/28, 朱鷺メッセ (新潟市, 新潟県) 【招待講演】
- I-9 Yoshiki Higuchi: Aiming towards comprehensive structural chemistry on [NiFe]-hydrogenases -Molecular mechanism of O<sub>2</sub>-tolerance, FGSB2018 (3rd International Symposium and Workshop on Functional genomics and Structural Biology) 【基調講演】, 2018/7/23, University of Putra Malaysia (クアラルンプール, マレーシア)
- I-10 Yoshiki Higuchi: Structural chemistry on O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe]-hydrogenases, ICC2018 (43rd International Conference on Coordination Chemistry), 2018/8/2, 仙台国際センター (仙台市, 宮城県) 【招待講演】
- I-11 ○西川幸志, 中川由佳, 樋口芳樹, 小倉尚志: Development of Raman spectroscopic measurement system for analyzing the enzymatic reaction with gaseous substrate, 日本生物物理学会第56回年会, 2018/9/16, 岡山大学 (岡山市, 岡山県) 【招待講演】
- I-12 ○松浦滉明, 西川幸志, 金在炫, 姜志始, 館野賢, 庄村康人, 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼにおける新規の酸素防御機構—水素エネルギー社会の実現に向けて, 兵庫県立大学知の交流シンポジウム 2018, 2018/9/20, 姫路商工会議所 (姫路市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- I-13 ○Hulin Tai, Shun Hirota, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Liang-nian Ji, Zong-wan Mao: Activation/inactivation mechanism between the Ni-SIr and Ni-SIa states of [NiFe] hydrogenase studied by utilizing Ni-SIr-to-Ni-SIa Photoactivation, 中国化学会第14回全国生物無機化学会, 2018/10/18, 南京大学 (南京, 中国) 【ポスター発表】
- I-14 Mahfuza Akter, 常盤恭樹, 庄司光男, 西川幸志, 重田育照, 櫻井 武, 片岡邦重, 樋口芳樹, ○柴田直樹: ビリルビンオキシダーゼで見つかった Trp-His 共有結合と Type I Cu の酸化還元電位との相関, 日本結晶学会平成 30 年度年会, 2018/11/10-11, 東京工業大学・大岡山キャンパス (目黒区, 東京都) 【ポスター発表】
- I-15 ○廣本武史・西川幸志・緒方英明・樋口芳樹: 水素分解を伴う不活性酸化型[NiFe]ヒドロゲナーゼの再活性化, 日本結晶学会平成 30 年度年会, 2018/11/10-11, 東京工業大学・大岡山キャンパス (目黒区, 東京都) 【ポスター発表】
- I-16 樋口芳樹: タンパク質分子内部の水ネットワークの構造と機能—ヒドロゲナーゼを例に, iBIX 将来構想検討会 (茨城県中性子利用研究会中性子産業利用推進協議会), 2018/11/20, エッサム神田ホール (千代田区, 東京都) 【招待講演】

- I-17 ○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の三核銅中心における構造変化に関する理論的研究, 第 32 回分子シミュレーション討論会, 2018/11/28, 産業技術総合研究所 (つくば市, 茨城県) 【ポスター発表】
- I-18 ○松浦滉明, 窪田慎太郎, 廣本武史, 竹田翠, 西川幸志, 柴田直樹, 樋口芳樹: 生物の力で水素をつくるー水素エネルギー利用システムへの応用に向けたヒドロゲナーゼの構造化学, 技術・人材マッチング交流会, 2019/2/12, 兵庫県立先端科学技術支援センター (上郡町, 兵庫県) 【ポスター発表】
- I-19 ○松浦滉明, 窪田慎太郎, 西川幸志, 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性化ー再活性化機構の電気化学的解析, 2019 年電気化学会第 86 回大会, 2019/3/28, 京都大学吉田キャンパス (京都市, 京都府) 【ポスター発表】
- I-20 ○T. Tamada, T. Hiromoto., K. Nishikawa, S. Inoue, Y. Hirano, and Y. Higuchi: Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. 12th International Conference on Hydrogenases, 2019/3/31, Universidade NOVA de Lisboa (リスボン, ポルトガル) 【ポスター発表】
- I-21 ○廣本武史, 西川幸志, 井上誠也, 平野優, 樋口芳樹, 玉田太郎: 数の量子ビームを用いたヒドロゲナーゼの立体構造解析, 量子生命科学会第 1 回大会, 2019/5/23, 東京大学・弥生講堂一条ホール (文京区, 東京都) 【ポスター発表】
- II-1 A. Oda, S. Nagao, M. Yamanaka, I. Ueda, N. Shibata, Y. Higuchi and S. Hirota: Construction of a Triangle-Shaped Trimer and a Tetrahedral Structure Using an  $\alpha$ -Helix-Inserted Circular Permutant of Cytochrome c555, *Chem. Asian J.*, 13, 964-967 (2018)
- II-2 S. Negoro, N. Shibata, Y.-H. Lee, I. Takehara, R. Kinugasa, K. Nagai, Y. Tanaka, D. Kato, M. Takeo, Y. Goto and Y. Higuchi: Structural Basis of Correct Subunit Assembly, Aggregation, and Intracellular Degradation of Nylon Hydrolase, *Scientific Reports*, 8, 9725 (2018)
- II-3 K. Yamanishi, Y. Sin, S. Terawaki, Y. Higuchi and N. Shibata: High-resolution Structure of Dishevelled2-DIX Domain Y27W Mutant, *Acta Crystallogr.*, F75, 116-122 (2018)
- II-4 ○Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi: Domain Swapping-Based Assemblies of c-Type Cytochromes, ICPP-10 (International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines), 2018/7/6, The Westin Grand Munich (ミュンヘン, ドイツ) 【口頭発表】
- II-5 ○廣田俊, 太虎林, 樋口芳樹, 柳澤幸子, 小倉尚志: Picobiology of metalloproteins: Vibrational spectroscopic studies of cytochrome c and hydrogenase, 日本生物物理学会第 56 回年会, 2018/9/16, 岡山大学 (岡山市, 岡山県) 【招待講演】
- II-6 ○Kumpei Yamanishi, Naoki Shibata, Marc Fiedler, Mariann Bienz, Yoshiki Higuchi: Heterotypic interaction of Dishevelled-DIX and Axin-DIX triggers their colocalization and activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, 第 91 回日本生化学会大会, 2018/9/25, 国立京都国際会館 (京都市, 京都府) 【ポスター発表】
- II-7 ○Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota: Design of stable domain-swapped myoglobin oligomers, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【口頭発表】
- II-8 ○Cheng Xie, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota: Construction of a Two-Dimensional Protein Array Utilizing a Cytochrome c555-Based Protein, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【口頭発表】
- II-9 ○Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota: Design and properties of domain-swapped myoglobin dimers with metal-binding abilities, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【口頭発表】
- II-10 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: 金属結合を有するドメインスワッピングしたミオグロビン 2 量体のデザインと性質, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【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]-hydrogenase

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

井上翔太： ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化の構造化学

清水 要： [NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶構造化学

谷垣暁章： 転写因子 Sox9-HMG ドメインの構造解析

### 科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金（平成 30～令和 4 年度） 新学術領域研究 課題番号：18H05516  
研究課題：水素－電子カップリング機能の創出と機構解明  
研究分担者 樋口芳樹
2. 科学研究費補助金（平成 30～令和 1 年度）国際共同研究加速基金 課題番号：16K21748  
研究課題：水素生成[FeFe]ヒドロゲナーゼの反応機構  
研究分担者 樋口芳樹
3. ひょうご科学技術協会 学術研究助成（平成 30-31 年度）  
研究課題：中性子により [NiFe]ヒドロゲナーゼのプロトン輸送経路を可視化する  
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<sub>2</sub>O に変換する酵素である。呼吸酵素の分子進化との関係や、地球温暖化・オゾン層破壊などの環境科学との関連、さらには抗菌薬開発などで注目されている酵素である。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) を宿主としたチトクロム c 依存型 NOR (cNOR) 発現系を用いて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構造解析に成功した。cNOR と NO との反応を高速分光測定で解析し、 $\mu$  秒からミリ秒の時間領域で 3 段階の反応である事、さらに第 3 段階の反応でプロトンが消費される事を見出した。これらの結果を基に、cNOR による NO 還元反応機構を提案した。さらに、cNOR と電子供与タンパク質 Cytochrome c<sub>551</sub> および Azurin との反応について、電子受容体 (NO と O<sub>2</sub>) 依存性、イオン強度依存性、アミノ酸変異効果の速度論的解析を進めた。

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、構造解析に取り組み、単量体酵素の構造を X 線結晶解析によって 3.0 Å 分解能で決定した。また、2 量体酵素の構造を電子顕微鏡単粒子解析によって 9 Å 分解能で決定した。髄膜炎菌 qNOR による NO 消費活性について、キノールアナログ分子 (ユビキノール、メナジオール) を基質として速度論的解析を進めた。キノールアナログ分子であるベンゾキノンと HQNO が、それぞれ競合阻害効果と非競合阻害効果を示すことを見出した。キノール結合部位と推定されるアミノ酸残基の変異効果を調べた。

## 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.

マメ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グナーゼにより触媒される。しかし、ニトログ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、ニトログ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ヒスチジンをリン酸化し、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。本年度は、FixLの酸素感知に伴う自己リン酸化からFixJへのリン酸基転移までの一連の分子機構の解明を目的に、各タンパク質のX線結晶構造解析ならびNMR分光法を用いた立体構造解析を行った。X線結晶構造解析では、FixLの酸素センサードメインを含む二量体化領域についてリガンド結合型の立体構造解析に成功し、分子内情報伝達に重要なアミノ酸残基を特定した。

### 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、二価金属トランスポーターDMT1を介して細胞内に取り込まれる。本年度からは、これまでに我々が決定したヒト由来 *Dcytb* のX線結晶構造を基盤に、構造情報から得られた知見を生きた細胞（鉄還元酵素欠損酵母、腸管モデル細胞）に展開する、あるいは細胞を用いた機能評価により見出した性質を立体構造から説明づけることで、ヒトの鉄イオン吸収機構を分子論的に理解することを目的に研究を進めた。その結果、十二指腸の環境に類似する条件下では、有機酸が存在すると、鉄イオンだけの時に比べて鉄還元活性が5~6倍向上することを明らかにした。これは、ヒト由来 *Dcytb* のX線結晶構造中にみられた基質ポケットに鉄イオンが有機酸と共に結合することを示唆する結果であり、ヒトの鉄イオンの吸収にクエン酸などの摂取が有効であるという栄養学的な知見を分子論的に説明づけることができた。

ヒトだけでなく病原菌（溶連菌）の鉄獲得機構で、ヘ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ヘム結合型/非結合型ならびにDNA結合型の立体構造を決定することにより、ヘム鉄の感知に伴う構造変化を明らかにした。

### IV 呼吸鎖末端酵素の構造と機能

#### Structural and Functional Studies on Respiratory Terminal Enzymes

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。ウシミトコンドリア由来 A タイプ HCOR について、以下の構造を X 線結晶解析によって決定した。電子伝達経路近傍の分子表面へのカルシウムイオンの結合構造を 1.7 Å 分解能で決定した。酸素還元反応中間体のうちのひとつ (高酸化型) の構造を 1.8 Å 分解能で決定した。従来構造が知られていた 2 量体酵素に加えて単量体酵素の構造を 1.85 Å 分解能で決定し、2 量体構造と単量体構造での機能部位の構造の違いを明らかにするとともに、酵素に結合したリン脂質分子を同定した。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 N. Gonska, D. R. Young, R. Yuki, T. Okamoto, T. Hisano, S. V. 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.” *Sci. Rep.* **8**, 3637 (2018)
- I-2 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)
- I-3 R. Makino, Y. Obata, M. Tsubaki, T. Iizuka, Y. Hamajima, Y. Kato-Yamada, K. Mashima, Y. Shiro: “Mechanistic Insights into the Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Carbon Monoxide: A Multi-Step Mechanism Proposed for the BAY 41-2272-Induced Formation of 5-Coordinate CO-Heme” *Biochemistry* **57**, 1620–1631 (2018)
- I-4 K. Omura, Y. Aiba, H. Onoda, J. Stanfield, S. Ariyasu, H. Sugimoto, Y. Shiro, O. Shoji, Y. Watanabe: “Reconstitution of Full-Length P450BM3 with an Artificial Metal Complex by Utilising the Transpeptidase Sortase A” *Chem. Commun.* **54**, 7892-7895 (2018)
- I-5 M. Kato, S. Nakagawa, T. Tosha, Y. Shiro, Y. Masuda, K. Nakata, I. Yagi: “Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under Electrochemical Control Using Vibrational Probe of Carbon Monoxide” *J. Phys. Chem. Lett.* **9**, 5196-5200 (2018)
- I-6 Y. Furukawa, C. T. Lim, T. Tosha, S. Akiyama, S. Watanabe, K. Nakagome, Y. Shiro: “Identification of a Novel Zinc-binding Protein, C1orf123, as an Interactor with a Heavy Metal-associated Domain” *PLOS ONE* **13**, e020435 (2018)
- I-7 C. Gopalasingam, R. Yamagiwa, G. Chiduzza, T. Tosha, S. Muench, Y. Shiro, M. Yamamoto, S. S. Hasnain and S. Antonyuk : “Characterizing a Bacterial Nitric Oxide Detoxification Complex via X-ray Crystallography and Cryo Electron Microscopy” 50 years of Synchrotron Radiation in the UK and its global impact (UKSR50), Liverpool, UK, 2018 年 6 月 26 日 (火) -29 日 (金)



- I-8 武田英恵、木村哲就、野村高志、石井頌子、松林亜希子、横田あずさ、當舎武彦、城 宜嗣、久保 稔：“時間分解可視・赤外吸収分光法を用いた一酸化窒素還元酵素の触媒反応過程の直接観測” 第45回生体分子科学討論会 大阪府立大学田中記念館 2018年6月22日(金)-23日(土)
- I-9 武田英恵、木村哲就、野村高志、石井頌子、松林亜希子、横田あずさ、當舎武彦、久保 稔、城 宜嗣：“時間分解可視・赤外吸収分光法を用いた一酸化窒素還元酵素における NO 還元反応過程の直接観測” 日本蛋白質科学会 第 18 回年会 於 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター 新潟 2018年6月27日
- I-10 Shiro, Y.: “Coordination and Electronic Structures of Short-Lived Intermediate in Heme-Containing NO Reductases” *“Chemistry and Biology of Tetrapyrroles” Gordon Research Conference, Newport, USA, July 15-20 (2018) invited talk*
- I-11 T. Tosha, H. Takeda, T. Nomura, T. Kimura, M. Kubo and Y. Shiro “Elucidation of Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction” 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC), Sendai, Japan 2018年7月30日-8月4日
- I-12 野村高志、當舎武彦、杉本 宏、久野玉雄、山際来佳, Chai Gopalasingam, 山下恵太郎、平田邦生、山本雅貴、城 宜嗣、久保 稔：“時間分解赤外分光法および凍結トラップX線結晶構造解析によるP450nor反応中間体の解析” 第12回分子科学討論会、福岡、2018年9月10-13日
- I-13 武田英恵、木村哲就、野村高志、石井頌子、松林亜希子、横田あずさ、當舎武彦、城 宜嗣、久保 稔：“マイクロフロー・フラッシュ赤外分光法を用いた膜内在性NO還元酵素の触媒反応の直接観測” 日本生物物理学会第56回年会 岡山大学津島キャンパス 2018年9月15 -17日
- I-14 倉橋拓也、山際来佳、新井博之、澤井仁美、當舎武彦、城 宜嗣：“一酸化窒素還元酵素の触媒反応におけるAsp198の役割” 第91回日本生化学会大会 京都国際会議場 2018年9月24 -26日
- I-15 武田英恵、城 宜嗣：“緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の触媒反応機構の解明～時間分解分光法を用いた酵素反応の追跡～” 兵庫県立大学 知の交流シンポジウム2018 姫路商工会議所 2018年9月26日
- I-16 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, T. Tosha, Y. Shiro and M. Kubo : “Direct Observation of the Catalytic Reaction of Nitric Oxide Reductase Using Time-resolved Vis/IR Spectroscopy” RIKEN Summer School 2018, つくば国際会議場, 2018年9月27 -28日
- I-17 野村高志、當舎武彦、杉本 宏、久野玉雄、山際来佳, Chai Gopalasingam, 山下恵太郎、平田邦生、山本雅貴、城 宜嗣、久保 稔：“時間分解赤外分光法およびX線結晶構造解析によるP450nor の反応中間体の解析” 平成30年度 内外環境応答・代謝酵素研究会、鳥取、2018年11月23-24日
- I-18 Takeda, H., Nomura T., Tosha, T., Sugimoto, H., Kubo, M., Shiro, Y.: “Characterization of Short-Lived Reaction Intermediates of Nitric Oxide Reductases by Time-Resolved Techniques” *9<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC-9)*, Natl. Univ. Singapore, Dec. 9-14, (2018) **invited talk**
- I-19 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, T. Tosha, Y. Shiro and M. Kubo “Direct Observation of Catalytic Reaction of Nitric Oxide Reductase Using Time-resolved Vis/IR Spectroscopy” *9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC9)*, Singapore, Dec. 9 - 13, 2018

- I-20 Jamali MMA, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y. “Steady state kinetics of quinol oxidation by nitric oxide reductase from *Neisseria meningitidis*.” 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Singapore, December 9 - 14, (2018).
- II-1 G. S. A. Wright, A. Saeki, T. Hikima, Y. Nishizono, T. Hisano, M. Kamaya, K. Nukina, H. Nishitani, H. Nakamura, M. Yamamoto, S. V. Antonyuk, S. S. Hasnain, Y. Shiro, H. Sawai: “Architecture of the Complete Oxygen-Sensing FixL-FixJ Two-Component Signal Transduction System” *Sci. Signal.* 11, aaq0825 (2018)
- II-2 K. Yoshitani, E. Ishii, K. Taniguchi, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Mori, Y. Akiyama, A. Kato, R. Utsumi, Y. Eguchi: “Identification of an Internal Cavity in the PhoQ Sensor Domain for PhoQ Activity and SafA-mediated Control” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 83, 684–694 (2018)
- II-3 M. Kamaya, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai: “Investigation of the intra-molecular signal transduction mechanism in the oxygen sensor protein FixL” 第18回日本蛋白質科学会年会、朱鷺メッセ、2018年6月26-28日
- II-4 澤井仁美: “SEC-SAXS法を用いることで解明できた酸素センサータンパク質システム FixL/FixJの全体像とシグナル伝達機構” 大阪大学蛋白質研究所セミナー／SPRING-8先端利用技術ワークショップ「第2回SPRING-8における蛋白質構造生物学研究の現状と将来」、大阪大学、2018年8月10日
- II-5 鎌屋美咲、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美: “ダイズ根粒菌由来酸素センサータンパク質FixLのタンデムPASドメインにおけるシグナル伝達機構” 第91回日本生化学会年会、京都国際会館、2018年9月26日
- II-6 佐伯茜子、澤井仁美: “酸素を感知するFixL-FixJ二成分シグナル伝達系の全体像” サイエンスシグナリングに載った日本人研究者 (Japanese Scientists in Science Signaling) pp. 12-13 (2019)
- II-7 H. Sawai and Y. Shiro: “Missing piece of two-component signal transduction systems unveiled by SEC-SAXS” SPRING-8/SACLA Research Frontiers 2018, pp. 15-16 (2019)
- III-1 M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, H. Asakura, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, Y. Nariai, T. Urano, X. Yuan, I. Hamza, G. A. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: “Structural Basis for Promotion of Duodenal Iron Absorption by Enteric Ferric Reductase with Ascorbate” *Commun. Biol.* 1: 120 (2018)
- III-2 澤井仁美: “ヒトの鉄吸収機構を原子・分子⇔細胞・組織の階層で相互に理解する” 物質階層原理研究」& 「ヘテロ界面研究」合同集会、かんぼの宿熱海、2018年5月12日
- III-3 澤井仁美: “ヒトの鉄吸収に関わる膜貫通型鉄還元酵素の立体構造に基づく生きた細胞での機能解析” 第18回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「金属イオンとタンパク質: その密接な関係が破綻するとき」、朱鷺メッセ、2018年6月28日
- III-4 M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: “Structural insight into the dietary non-heme iron absorption in human duodenum” 第18回日本蛋白質科学会年会、朱鷺メッセ、2018年6月26-28日
- III-5 M. Nishinaga, H. Sugimoto, N. Muraki, S. Aono, Y. Shiro, H. Sawai: “Molecular mechanism of transcriptional regulation of a heme sensor protein PefR” 第18回日本蛋白質科学会年会、朱鷺メッセ、2018年6月26-28日

- III-6 M. Ganasen, H. Fujishiro, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, S. Himeno, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai : “Structure-guided functional analysis of human ferric reductase using living cells” *Gordon Research Conference: 2018 Chemistry and Biology of Tetrapyrroles*, United States (Salve Regina University in Newport, RI), July 15-20 (2018)
- III-7 澤井仁美：“ヒトの鉄イオン吸収に関わる膜タンパク質の立体構造を基盤とした機能と構造の相互解析” 第42回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、金沢医科大学、2018年9月1日
- III-8 K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, and Y. Sugita, “Computational Modeling of the Outward-facing Form and the Occluded Intermediate of a Heme Importer with Bound Nucleotides”, 256th American Chemical Society National Meeting, (August 19-23, 2018) Boston
- III-9 中村寛夫、久野玉雄、白水美香子、Md. M. Rahman、城 宜嗣：“へムを解毒する病原菌由来ABC排出ポンプの機能と構造” 第30回微生物シンポジウム、城西国際大学、東京、2018年8月28日
- III-10 田村康一，杉本宏，城宜嗣，杉田有治「分子シミュレーションによるへムインポーターの化学・力学共役機構の解明」第56回日本生物物理学会年会、岡山大学、2018年9月17日
- III-11 澤井仁美：“ヒトの鉄吸収機構を「膜タンパク質」と「生きた細胞」の研究により相互に理解する” 第91回日本生化学会年会 ワークショップ「生体金属のMagical Power とその研究最前線」、京都国際会館、2018年9月26日
- III-12 M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, T. Urano, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai : “Understanding the mechanism of dietary iron absorption at the atomic level” 第91回日本生化学会、京都国際会館、2018年9月26日
- III-13 西永恵、長井聖奈、村木則文、青野重利、城宜嗣、杉本宏、澤井仁美：“へムセンサータンパク質のへムの結合に伴う構造変化” 第91回日本生化学会、京都国際会館、2018年9月26日
- III-14 M. Ganasen, 藤代瞳、X. Yuan, I. Hamza, 姫野誠一郎、A. G. Mauk, 杉本宏、城宜嗣、澤井仁美：“ヒトの鉄イオン吸収に関わる膜タンパク質の立体構造に基づく生きた細胞での機能解析” メタルバイオサイエンス研究会 2018、仙台市戦災復興記念館、2018年11月17日
- III-15 杉本宏, Menega Ganasen 富樫ひろ美, 武田英恵, 朝倉帆南, 山下恵太郎, 平田邦生, A. Grant Mauk, 城宜嗣, 澤井仁美：“小腸上皮細胞膜で機能する鉄還元酵素Dcytbの結晶構造” 平成30年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 鳥取大学 2018年11月23-24日
- III-16 H. Sawai: “Structural basis for promotion of human iron absorption by duodenal ferric reductase with ascorbate and some dietary metal-chelators” Cold Spring Harbor Asia Meeting: Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease, Dushu Lake Conference Hotel, Suzhou (China), Nov. 27 (2018)
- III-17 H. Sugimoto, M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, H. Asakura, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai : “Structural basis of ascorbate-dependent iron reduction by human duodenal cytochrome *b* (Dcytb) involved in intestinal iron absorption” Asian Crystallographic Association Conference (AsCA 2018), Auckland, Dec. 2-5, 2018
- III-18 中村寛夫、久野玉雄、白水美香子、Md. M. Rahman、城 宜嗣：“へムを解毒する病原菌由来ABC排出ポンプのへム・ATP結合にリンクした膜ドメインの構造変換 “日本生体エネルギー研

研究会第44回討論会 千葉大学、2018年12月7日

- III-19 H. Sawai: “Structural basis for enhancement of human iron absorption by duodenal ferric reductase with ascorbate” 9<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC-9), University of Singapore (Singapore), Dec. 12 (2018)
- III-20 M. Nishinaga, S. Nagai, S. Nagatoishi, N. Muraki, S. Aono, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai; “Structural Basis for Transcriptional Regulation of a Novel Heme Sensor Protein in Pathogenic Bacteria” 9<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC-9), University of Singapore (Singapore), Dec. 12 (2018)
- III-21 M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: “Structural insight into ferric reduction in human duodenal enterocyte” Leading program evaluation conference, CAST, Dec. 12-13 (2018)
- III-22 澤井仁美: “「鉄」のバイオサイエンス” 第29回STクラブ、じばさんびる、2019年1月28日
- IV-1 Shimada A, Hatano K, Tadehara H, Yano N, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Muramoto K, Tsukihara T, Yoshikawa S. “X-ray structural analyses of azide-bound cytochrome *c* oxidases reveal that the H-pathway is critically important for the proton-pumping activity.” *J. Biol. Chem.* **293**, 14868-14879 (2018)
- IV-2 村本和優、伊藤・新澤恭子 Calcium ion-binding structure of respiratory A-type oxygen reductase. 日本生物物理学会第56回年会 岡山大学 2018年9月15日～9月17日
- IV-3 村本和優、伊藤・新澤恭子 “ウシ心筋ミトコンドリア由来シトクロム*c*酸化酵素のカルシウムイオン結合構造” 日本生体エネルギー研究会第43回討論会 千葉大学 2018年12月6日～12月8日
- IV-4 村本和優 “呼吸鎖電子伝達系末端酵素の構造と機能” 2018年度べん毛研究交流会 蒲郡 2019年3月12日～3月14日

## 大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Md. Mahfuzur Rahman: 病原菌のヘム輸送体の構造機能解析

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

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

鎌屋美咲: 酸素センサータンパク質 FixL の構造解析解析

西永恵: 病原菌のヘムセンサータンパク質のX線結晶構造解析

## 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 30～令和 2 年度）基盤研究 C  
研究課題：プロトンポンプ機構解明に向けた呼吸鎖末端酵素の構造機能解析  
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 26-30 年度）  
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 文部科学省科学研究費補助金（平成 30-令和 2 年度）基盤研究 C  
研究課題：ヒトの鉄吸収に関わる膜タンパク質の立体構造を基盤とした生細胞での構造機能  
    相関解析  
研究代表者：澤井仁美
- 5 共同研究費（理化学研究所）（平成 29-令和 4 年度）  
研究課題：物質階層原理研究  
研究代表者：城 宜嗣
- 6 共同研究費（理化学研究所）（平成 30-令和 5 年度）  
研究課題：ヘテロ界面研究  
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、解析対象の拡大と簡便かつ迅速化な構造決定を目指したビームラインの高度化研究を進めている。具体的には、1 $\mu$ m 集光ビームの安定運用を世界に先駆けて実現した BL32XU を中心に、結晶の大きさや単結晶か単結晶の集合体であるかといった結晶の性状に関係無く、あらゆる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試料自動交換迅速化、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による自動回折イメージ収集、さらに複数結晶からの回折イメージ自動処理システムまでも統合した「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、主に、微小タンパク質結晶の高精度構造解析に不可欠な、大量の 2~3 ミクロンの微小結晶からの全自動データ収集・処理法の研究開発を進めている。この研究開発により、ミクロンオーダーの微小結晶の測定・解析のレベル向上に努めると同時に、微結晶しか与えない X 線結晶構造解析における高難度ターゲットタンパク質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関連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-リガンド複合体結晶の高効率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、幅広い温度範囲で結晶内環境を制御する温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 蛋白質構造解析での新規解析手法の開発

Research and Development for Protein Structure Analysis Methods

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)、特に大量の微小結晶を凍結固定した大型の結晶ループを回転しながら走査する Serial Synchrotron ROTation Crystallography (SS-ROX)の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 では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、機能性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。一方、非晶質の試料について、X線小角散乱による溶液場でのタンパク質の機能解析やX線コヒーレント回折イメージング (Coherent X-ray Diffraction Imaging : CXDI) による生体試料からの単粒子解析の技術開発なども進めている。

## 発表論文 List of Publications

- I -1 K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), G. Ueno (理研), Y. Kawano (理研), K. Hasegawa (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), M. Yamamoto : ZOO: an automatic data-collection system for high-throughput structure analysis in protein microcrystallography, *Acta Cryst. SecD* 75, 138-150 (2019).
- I -2 K. Morimoto (京都大), R. Suno (京都大), Y. Hotta (京都大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto, S. Narumiya (京都大), S. Iwata (京都大), T. Kobayashi (京都大) : Crystal structure of the endogenous agonist-bound prostanoid receptor EP3, *Nat Chem Biol*. 15, 8-10 (2019).
- I -3 R. Suno (京都大), S. Lee (Beckman Res. Inst. of the City of Hope), S. Maeda (Stanford 大), S. Yasuda (千葉大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), S. Horita (京都大), M. S. Tawaramoto (京都大), H. Tsujimoto (京都大), T. Murata (千葉大), M. Kinoshita (京都大), M. Yamamoto, B. K. Kobilka (Stanford 大), N. Vaidehi (Beckman Res. Inst. of the City of Hope), S. Iwata (京都大), T. Kobayashi (京都大) : Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor, *Nat Chem Biol*. 14,1150-1158 (2018).
- I -4 K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto: KAMO: towards automated data processing for microcrystals, *Acta Cryst. SecD* 74, 441-449 (2018).
- I -5 T. Murakawa (大阪医科大), S. Baba (JASRI), Y. Kawano (理研), H. Hayashi (大阪医科大), T. Yano (大阪医科大), T. Kumasaka (JASRI), M. Yamamoto, K. Tanizawa (大阪大), T. Okajima (大阪大) : In crystallo thermodynamic analysis of conformational change of the topaquinone cofactor in bacterial copper amine oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 135-140 (2019).
- I -6 S. Basu (PSI), V. Olieric (PSI), F. Leonarski (PSI), N. Matsugaki (KEK/PF), Y. Kawano (理研), T. Tomizaki (PSI), C. Y. Huang (PSI), Y. Yamada (KEK/PF), L. Vera (PSI), N.

- Olieric(PSI), J. Basquin (MPI), J. Wojdyla (PSI), O. Bunk (PSI), K. Diederichs (Konstanz 大), M. Yamamoto, M. Wang (PSI) : Long-wavelength native-SAD phasing: opportunities and challenges, *IUCrJ*. 6, 373-386 (2019).
- I -7 M. Yamamoto, K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), K. Hasegawa (JASRI), T. Kumasaka (JASRI): “Challenges to high-throughput protein micro-crystallography at SPring-8”, Synchrotron Radiation Instrumentation 2018. Taipei Taiwan, June (2018).
- I -8 M. Yamamoto: “Development of beamlines for protein microcrystallography at SPring-8” 50 years of Synchrotron Radiation in the UK and its global impact (UKSR50), Liverpool UK, June (2018).
- I -9 山本雅貴 : “小宇宙・生命の働きに迫る超高分解能顕微鏡 SPring-8”、日本天文学会市民公開講座、姫路、9月 (2018).
- I -10 山本雅貴、平田邦生 (理研) : “放射光ビームラインにおける自動データ収集の現在と将来”、Photon Factory シンポジウム、つくば、9月 (2018).
- I -11 平田邦生 (理研)、河野能顕 (理研)、上野剛 (理研)、山下恵太郎 (理研)、村上博則 (JASRI)、熊坂崇 (JASRI)、山本雅貴 : “LCP結晶から効率よくデータ収集を行う手法開発”、日本放射光学会、福岡、1月 (2019).
- II -1 A. Kobayashi (理研), Y. Takayama, K. Okajima (慶應大), M. Oide (慶應大), T. Yamamoto (慶應大), Y. Sekiguchi (慶應大), T. Oroguchi (慶應大), M. Nakasako (慶應大), Y. Kohmura (理研), M. Yamamoto, T. Hoshi (理学相原精機), Y. Torizuka (理学相原精機) : Diffraction apparatus and procedure in tomography X-ray diffraction imaging for biological cells at cryogenic temperature using synchrotron X-ray radiation, *J. Synchrotron Rad.* 25, 1803-1818 (2018).
- II -2 G. S. A. Wright (Liverpool 大), A. Saeki, T. Hikima (理研), Y. Nishizono, T. Hisano (理研), M. Kamaya, K. Nukina, H. Nishitani, H. Nakamura (理研), M. Yamamoto, S. V. Antonyuk (Liverpool 大), S. S. Hasnain (Liverpool 大), Y. Shiro, H. Sawai : Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system, *Sci. Signal.* 11, eaaq0825 (2018).
- II -3 M. Yamamoto, K. Hasegawa (JASRI), K. Yamashita (理研), S. Baba (JASRI), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), H. Ago, T. Kumasaka (JASRI) : “Serial crystallography at SPring-8 and SACLA” , ACA meeting, Toronto Canada, July (2018).
- II -4 G. Ueno (理研), A. Shimada (岐阜大), E. Yamashita (大阪大), K. Hasegawa (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, M. Yamamoto : “Low-dose X-ray structure of Cytochrome c Oxidase utilizing high-energy X-ray” , 10th International Workshop on Radiation Damage to Biological Samples, Brookhaven USA, (2018).
- II -5 T. Kumasaka (JASRI), K. Hasegawa (JASRI), S. Baba (JASRI), T. Kawamura (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto: “Development of fixed-target serial synchrotron crystallography at room temperature in SPring-8”, AsCA 2018, Auckland New Zealand, December (2018).
- II -6 山本雅貴 : “生命機能に迫る相関構造解析の最前線”、量子生命科学研究会第2回学術集会、東京、5月 (2018).



- II-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”、第56回日本生物物理学会年会、岡山、9月（2018）.
- II-8 山本雅貴：“生命機能に迫る放射光構造生命科学研究”，産総研中国センター・国際シンポジウム「SDGsの推進に資する化学技術と材料／タンパク質構造解析が切り拓く低環境負荷社会」、広島、2月（2019）.

## 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 (国研)日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業（平成30～32年度）  
研究課題 最新の構造解析技術を活用したGPCR創薬のための技術基盤の構築  
研究代表者 小林拓也（研究分担 山本雅貴）

## 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・佐々木桂奈江

Yoshida, H., Wakabayashi, S., Sasaki, K.

ゴルジ体は分泌タンパク質や膜タンパク質の糖鎖修飾や選別輸送を行う細胞小器官であるが、細胞内のゴルジ体の存在量はゴルジ体ストレス応答と呼ばれる機構によって厳密に制御されている。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。また、HRG が敗血症の有力な治療薬となるとの報告を受け、有効活性ドメインの検索準備を進めている。

### 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 Sasaki K, Komori R, Taniguchi M, Shimaoka A, Midori S, Yamamoto M, Okuda C, Tanaka R, Sakamoto M, Wakabayashi S, Yoshida H. PGSE Is a Novel Enhancer Regulating the Proteoglycan Pathway of the Mammalian Golgi Stress Response. *Cell Struct Funct.* (2019) 44:1-19.
- I -2 Hiderou Yoshida. Organelle Zone: Autoregulation of the proteoglycan glycosylation zone by the Golgi stress response. (第 70 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀、東京都)
- I -3 Jamaludin Mohamad Ikhwan, Kanae Sasaki, Mai Taniguchi, Hirotada Kawamura, Sadao Wakabayashi, Hiderou Yoshida. Promoter analysis of GALNT18 and GALNT5 regulated by Golgi stress response of mucin pathway. (第 70 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀、東京都)
- I -4 Mai Taniguchi, Ryota Komori, Chiho Okuda, Ryuya Tanaka, Kanae Sasaki, Sadao Wakabayashi, Hiderou Yoshida. Analysis of the proteoglycan pathway of the mammalian Golgi stress response that regulates the transcription of glycosylation enzymes for proteoglycans. (第 70 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀、東京都)

- I-5 Hiderou Yoshida. The Proteoglycan pathway – a novel pathway of the Golgi stress response. (The 2018 FEBS Golgi meeting, Sorrento, Italy)
- I-6 佐々木桂奈江、小森亮太、谷口麻衣、島岡晶恵、緑佐智子、山本真由、奥田知穂、田中隆也、若林貞夫、吉田秀郎 O型糖鎖修飾能を強化するゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する新規エンハンサー配列の同定 (第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、東京都)
- I-7 田中隆也、山本真由、緑佐智子、佐々木桂奈江、若林貞夫、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る NDST2 遺伝子の転写誘導メカニズム (第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、東京都)
- I-8 斉藤美知子、井上ちひろ、曾我部将至、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答と抗体産生細胞分化 (第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、東京都)
- II-9 若林貞夫、河村優忠、吉川和宏、佐々木桂奈江、谷口麻衣、吉田秀郎 ムチン糖鎖付加阻害によるゴルジ体ストレスでTFE3の発現が活性化される (第91回日本生化学会大会、国立京都国際会館、京都)

## 大学院生命科学研究科

### 博士前期課程

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

### 博士後期課程

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

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

## 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30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30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30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30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17J00067 (平成30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、転写後に様々な修飾を受けて成熟化し、最終的には細胞質で働く。一部の tRNA は intron を含んだ前駆体として転写されるが、ほとんどの intron は anticodon 近傍に挿入されており、その splicing は tRNA の機能化に必須である。tRNA の splicing は、mRNA とは異なり、タンパク質のみから成る酵素群が司るが、我々は出芽酵母の splicing 酵素群が、細胞質、特にミトコンドリア表面で働くこと、さらには、成熟体 tRNA が細胞質と核とを行き来しながらその一生を過ごすことを見出している。現在、この過程を司る分子機構の全貌を明らかにするため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を進めている。さらに近年、tRNA のレパートリーが、生理的環境や生物の発生段階、組織形成に応じて変化するという証拠が得られつつある。我々は、tRNA 量の新規絶対定量法である OTTER 法を開発し、また、積極的な tRNA 量の改変系を構築することで、tRNA レパートリーの生理的環境に応じた動態の詳細や、それを可能にする機構、さらには、そうしたレパートリー変化が翻訳をはじめとする生理機能へ及ぼす影響を解析している。

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

Studies on physiological functions of tRNA introns in budding yeast

吉久徹  
Yoshihisa, T.

前駆体 tRNA 中の intron は除かれることが tRNA の機能化に必須だが、逆に言えば tRNA 遺伝子に intron は必要なのだろうか？我々は、染色体上の遺伝子組換えが容易な出芽酵母の特性を生かし、tRNA の種類毎に、intron を持つ遺伝子全てを intron 欠失型に置き換えるプロジェクトを進め、全ての isoacceptor tRNA にとって intron は必ずしも必要でないことを明らかにしている。intron 欠失株の表現型解析を進めるなかで、tRNA-Ile<sup>UAU</sup> の intron が必要なアンチコドン修飾に必須であるだけで無く、不必要な修飾を防ぐ役割を持つこと、intron 欠失株の一部では、rRNA の成熟化や核小体の形態に異常が見られることを明らかにした。現在、tRNA-Leu<sup>CAA</sup> の intron 欠失

株において、intron 欠失の mRNA レポートリーや翻訳への影響を網羅的な解析で検討している。

### 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 型の細胞質プライシングを受けるめずらしい mRNA から翻訳される。しかし、前駆体 *HAC1* mRNA は、(1) 翻訳停止状態にあること、(2) 見かけ上、未成熟終止コドンと認識されうる読み枠構造をもつこと等から、mRNA の品質管理機構によって分解されるべき特性を持つにもかかわらず、非ストレス下で安定な休眠状態にある。他の mRNA でも、その 2 次構造や rare codon を用いた一時的翻訳停止を用いて、タンパク質のドメイン毎の折りたたみを可能にする例があるが、こうした mRNA の翻訳停止機構がある程度理解されているに対し、その翻訳再開機構はよくわかっていない。当然、こうした mRNA もこれらも見かけ上、RNA の品質管理に抵触している。そこで、*HAC1* mRNA をはじめとする一時的翻訳停止を伴う mRNA の品質管理回避や、翻訳再開の機構について研究を進めている。特に、*HAC1* mRNA の翻訳制御にも関わり、この mRNA の細胞質プライシング因子でもある Rlg1 に着目した解析を進めている。この中で、小胞体ストレス応答不全となる *rlg1* 変異の中には非ストレス下の *HAC1* mRNA が不安定になる変異があること、また、小胞体ストレス下では酵母 Ski 複合体が *HAC1* の翻訳制御に関わることを明らかにした。一方、複数のリボソームが同じ mRNA 分子上に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 Herrmann, J. M., Carvalho, P., Hayer-Hartl, M., and Yoshihisa, T.: Life of proteins: from nascent chain to degradation. *Nature Structural and Molecular Biology*, **25**, 996-999 (2018)
- I-2 吉久徹 : tRNA の成熟化と核-細胞質間ダイナミクス. *Plant Morphology*, **30**, 37-58 (2018)
- I-3 Nagai, A., Mori, K., Shiomi, Y., and Yoshihisa, T.: OTTER, a new method for measuring absolute quantity of tRNAs. The 23rd Annual Meeting of the RNA Society (University of California at Berkeley, Berkeley, USA)(2018)
- I-4 Nagai, A., Mori, K., Shiomi, Y., and Yoshihisa, T.: Measurement and alteration of tRNA repertoires in *Saccharomyces cerevisiae*. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (Enryakuji-Kaikan, Shiga, Japan)(2018)
- I-5 Nagai, A., Mori, K., Shiomi, Y., and Yoshihisa, T.: How to measure absolute quantity of tRNAs.: 第 70 回日本細胞生物学会・第 51 回日本発生生物学会合同大会 (タワーホール船堀・東京都) (2018)
- I-6 永井陽久、塩見由麻、森滉平、池田彩乃、佐藤友衣子、河野龍之進、荒井麻里、粕谷日向子、吉久徹 : 出芽酵母における tRNA レポートリーの解析と改変 : 第 20 回日本 RNA 学会年会 (大阪市ホテルコスモスクエア国際交流センター・大阪市) (2018)
- I-7 永井陽久、塩見由麻、森滉平、吉久徹 : 出芽酵母における tRNA トランスクリプトーム解析 : 第 20 回日本 RNA 学会年会 (大阪市ホテルコスモスクエア国際交流センター・大阪市) (2018)
- I-8 永井陽久、塩見由麻、森滉平、吉久徹 : 出芽酵母における tRNA トランスクリプトーム解析 : 第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜市) (2018)
- II-1 Hayashi, S. and Yoshihisa, T.: Intron removal from tRNA genes in *S. cerevisiae*. The 27th tRNA Conference (Strasbourg Convention + Exhibition Centre, Strasbourg, France)(2018)
- II-2 Hayashi, S. and Yoshihisa, T.: Intron removal from tRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (Enryakuji-Kaikan, Shiga, Japan)(2018)
- II-3 林 紗千子、七野 悠一 (理研)、岩崎 信太郎 (理研)、吉久 徹 : tRNA-Leu<sub>CAA</sub> 遺伝子からのイントロン削除が与える影響について : 第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜・横浜市) (2018)
- III-1 吉見理子、山本智加、吉久徹 : 酵母 *HAC1* mRNA の安定化に関する tRNA ligase、Rlg1 の遺伝的解析 : 第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜・横浜市) (2018)
- III-2 林 紗千子、岩元夏純、吉久 徹 : モノソーム偏在 mRNA として同定された核コードミトコンドリア mRNA の翻訳制御に関する解析 : 第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜・横浜市) (2018)
- IV-1 園部誠司、山岡望海 : イカダケイソウの滑走運動機構. *生物工学*, **96**, 257-260 (2018)
- V-1 Arima, K., Tamaoki, D., Mineyuki, Y., Yasuhara, H., Nakai, T., Shimmen, T., Yoshihisa, T., and Sonobe, T.: 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)
- VII-1 横田悦雄、新免輝男、高木慎吾 (大阪大学) : PIP2 を介してリポゾームに結合したピリンは、F-アクチンと相互作用することができる : 第 82 回日本植物学会年会 (広島国際会議場・広島市) (2018)



- VII-2 Takamatsu, H.(大阪大学), Yokota, E., Morii, M.(大阪大学), Takagi S.(大阪大学) : Roles of spinach villin-like proteins in chloroplast anchoring.: International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018 (倉敷国際ホテルおよび倉敷市民会館・倉敷市) (2018)
- VII-3 小島 崇裕 (大阪大学)、甲斐 卓 (大阪大学)、石田 泰浩 (大阪大学)、横田 悦雄、高木 慎吾 (大阪大学) : シロイヌナズナの向背軸変異体における葉緑体暗黒定位の制御 : 第 60 回日本植物生理学会年会 (名古屋大学・名古屋市) (2019)
- VII-4 菅 公秀、吉久 徹、阪口 雅郎 : 出芽酵母小胞体におけるフォールディングプローブを用いた新生鎖膜透過動態解析 : 第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜・横浜市) (2018)

## 大学院生命理学研究科

### 博士後期課程

永井 陽久 : isodecoder tRNA 毎の絶対定量法の確立と、生理学的変化に伴う tRNA レパートリー変化の解析

### 博士前期課程

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

岩元 夏純 : monosome にトラップされている mRNA の翻訳一時停止機構の解析

## 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 レパートリー  
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。現在、1) ライセンス化制御の中心的な因子である Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作用機構、2) Cdt1 の M 期染色体分配における新規機能、そして、3) 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制御機構の解析

DNA 複製のライセンス化因子 Cdt1 は、DNA ヘリカーゼである MCM2-7 のクロマチンローディングを担う因子である。一方、S 期が開始すると、染色体の再複製を抑制するため Cdt1 はポリユビキチン化を受け速やかに分解される。クロマチンにロードされた PCNA に Cdt1 が PIP ボックスを介して結合すると、E3 ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 が認識してポリユビキチン化する。また、紫外線などによる DNA 損傷によっても同様の機構で Cdt1 の分解が誘導される。しかし、S 期 DNA 複製あるいは DNA 損傷修復が行われる場合のみに、かつ迅速に分解される機構はよく分かっていない。我々は、Cdt2 の C 末側の解析により、この領域が DNA 結合活性を持ち、さらに C 末端に PIP ボックスが存在し、これらが迅速な Cdt1 分解に必要であることを発表した。Cdt2C 末端の PIP ボックスに変異を導入すると、PCNA 局在部位への CRL4-Cdt2 の集積が遅れ Cdt1 の分解の遅延が見られた。また、CRL4-Cdt2 は PIP ボックスを介して直接 DNA にロードされた PCNA に結合することを示した。一方、C 末端の 460-580 アミノ酸領域が DNA 結合能を持ち、この領域を欠失した Cdt2 を発現した細部では、Cdt1 の分解が低下することを見出した。これらの結果より、CRL4-Cdt2 は、DNA 上で直接 PCNA と結合して待機し、リクルートされた Cdt1 を捉えて迅速にユビキチン化すると考えられる。この時、Cdt2 の DNA 結合領域が安定な PCNA-基質(Cdt1)-E3(CRL4-Cdt2)複合体の形成、あるいはユビキチン化活性を亢進することにより、DNA 上に PCNA がロードされた時のみ機能するように制御されていると考えられる。その分子機構の詳細は、今後の解析が必要である。

## 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。そこで、酵母2ハイブリッドスクリーニングでCdt1との結合性が予測されたTACC3との関連を調べた。TACC3は、M期の前-中期において微小管の束化を促進し紡錘体の形成に関わる。高発現した場合、TACC3とCdt1の共沈が見られた。続いて、PLA(proximity ligation assay)によりTACC3とCdt1の結合を調べると、両者の結合を示すドット上のシグナルが見られた。その数はM期前/中期において増加し、紡錘体上に局在するものが多く観察された。Cdt1がTACC3を通してM期進行に寄与する可能性が示唆された。

### 3) PCNAを制御する、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、RFC1-RFCとCtf18-RFCがPCNAのDNA結合を担っており、DNA上で反応する因子のPCNAへの集束と、その機能を制御する事が明らかになっている。一方、もう一つのRFC複合体であるElg1-RFCについては、PCNAのDNAからの除去を特異的に行っていることが私たちの解析から示された。ヒト細胞内のElg1をノックダウン(KD)すると、複製期のDNAに過剰に結合したPCNAや細胞周期進行の遅延、核内クロマチン構造や染色体構造の異常が見られた。以上のことから、PCNAのDNA結合だけでなく、積極的なPCNA除去もゲノム維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

そこで、さらに詳細なElg1-RFCによるPCNA除去を明らかにするため、Elg1-RFCに特異的な結合因子の探索を質量分析で行い解析を進めている。また、これまでに、Elg1-KD細胞でも複製が終了したG2からM期にかけてはPCNAがDNAから除去されることが分かった。これは、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、未知のPCNA除去機構を探索し、新規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 Wright GSA (Liverpool 大), Saeki A, Hikima T (理研), Nishizono Y, Hisano T (理研), Kamaya M, Nukina K, Nishitani H, Nakamura H (理研), Yamamoto M (理研), Antonyuk SV (Liverpool 大), Hasnain SS, Shiro Y, Sawai H. : Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system. *Sci Signal*. 2018 Apr 10;11(525). pii: eaaq0825. doi: 10.1126/scisignal.aaq0825.
- 2 Hayashi A, Giakoumakis NN (Patras 大), Heidebrecht T (Netherlands Cancer Institute), Ishii T, Panagopoulos A (Patras 大), Caillat C (Netherlands Cancer Institute), Takahara M, Hibbert RG (Netherlands Cancer Institute), Suenaga N, Stadnik-Spiewak M (Netherlands Cancer Institute), Takahashi T (九州大), Shiomi Y, Taraviras S (Patras 大), von Castelmur E, Lygerou Z (Patras 大), Perrakis A (Netherlands Cancer Institute), Nishitani H.: Direct binding of Cdt2 to PCNA is important for targeting the CRL4<sup>Cdt2</sup> E3 ligase activity to Cdt1. *Life Sci Alliance*. 2018 Dec 31;1(6):e201800238. doi: 10.26508/lsa.201800238.
- 3 Mazian M, Suenaga N, Ishii T, Hayashi A, Shiomi Y, Nishitani H.: A DNA-binding domain in the C-terminal region of Cdt2 enhances the DNA synthesis-coupled CRL4<sup>Cdt2</sup> ubiquitin ligase activity for Cdt1. *J Biochem*. 2019 Jan 12. doi: 10.1093/jb/mvz001.

- 4 松井作仁（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 GTF2H2の機能解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 5 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：クロマチンからの PCNA除去と、それに連係した細胞内機能の解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 6 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41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 7 林晃世、遠藤浩太郎、塩見泰史、西谷秀男：DNA再複製に伴う細胞応答の解析（DNA再複製と中心体複製の連係について）第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 8 Mazian MA, Takahara M, Hayashi A, Shiomi Y, Nishitani H : Control of Cdt1 proteolysis by ubiquitinligase CRL4Cdt2; role of C-terminus of Cdt2 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 9 Mazian M, Nukina K, Suenaga N, Ishii T, Hayashi A, Shiomi Y, Nishitani H: The C-terminal region of Cdt2 regulates the PCNA-dependent CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase activity. The 11<sup>th</sup> 3R & 3C Symposium November 12-16, 2018, Kanazawa city, Japan
- 10 西谷秀男、林晃世、遠藤浩太郎、渡邊雄一郎、塩見泰史：DNA の再複製に伴うサイズの増加と細胞応答 サイズ生物学 ワークショップ 2019平成31年3月19日—20日 海峡メッセ（山口県）

## 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

5年一貫制博士課程

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30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
- 2 平成30年度 熊本大学発生医学研究所共同研究  
研究課題 PCNA ユビキチン化酵素Rad6-Rad18 とCRL4-Cdt2 のクロストークによるゲノム維持機構  
研究代表者：西谷秀男、研究分担者：林晃世
- 3 平成30年度 神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究 共同研究（若手）  
研究課題 ゲノム維持に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作動メカニズムの解明  
研究代表者：林晃

- 4 平成30年度 兵庫県立大学特別研究助成金 若手研究者支援  
研究課題 DNA 再複製に伴う細胞内応答の解析  
研究代表者：林晃世

## 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、当研究室で開発した GLIM システムを使って、細胞板の端をメモリー領域に導くアクチン繊維の挙動について報告した。また、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引き続き行った。

## 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。今年度は学術雑誌 Microcopy に植物の特集号を編集し出版した。

## III 種子内部構造の X 線 CT による解析

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

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

種子は乾燥して休眠状態にあり、吸水するとその中の胚は生命活動を再開して発芽する。その過程に起こる種子中での構造変化を観察する時に、種皮が種子の周りを覆っており、支障となっている。しかし、X線CT技術を用いれば、固定や切片作製をしなくても種子内部構造を観察可能である。SPring-8の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. Sinmmen, 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 doi:10.1007/s10265-018-1047-4 (2018)
- I-2 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に関する核からのシグナル因子、日本植物学会第82回大会（広島市）、(2018)
- I-3 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細胞の前期核による細胞骨格再構成への関与、日本植物形態学会第30回総会・大会（広島市）、(2018)
- I-4 Y. Otsuka, T. Nakai, D. Yamauchi, Y. Mineyuki : Preprophase band formation and establishment of actin-depleted zone in onion root tip cells under conditions inhibiting nuclear cycle progression, 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会（東京都江東区）、(2018)
- II-1 Y. Mineyuki, MS. Otegui (ウィスコンシン大) , For Microscopy special issue on ‘Plant Science’. *Microscopy* 68, 3 doi:10.1093/jmicro/dfz006 (2019)
- II-2 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 D. Yamauchi, A. Fukuda, T. Nakai, I. Karahara (富山大), M. Takeuchi (東京大), D. Tamaoki (富山大), T. Tsuda (大阪大), K. Tsunashima (和歌山工専), S. Kuwabata (大阪大), M. Hoshino (高輝度光科学研究センター), K. Uesugi (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, Use of ionic liquid for X-ray micro-CT specimen preparation of imbibed seeds. *Microscopy* 68 92-97 doi:10.1093/jmicro/dfy130 (2019)
- III-2 K. Sasaki (富山大), M. Muramoto (富山大), D. Tamaoki (富山大), S. Yano (宇宙航空研究開発機構), F. Tanagaki (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), D. Yamauchi, K. Uesugi (高輝度光科学研究センター), M. Hoshino (高輝度光科学研究センター), S. Kamisaka (富山大), Y. Mineyuki, I. Karahara (富山大), Three-dimensional morphological analysis of supporting tissues in the dried peduncle of arabidopsis by X-ray micro-CT. *Microscopy* 67 (suppl\_2):i34-i34 (2018)
- III-3 山内大輔・中井朋則・金子康子 (埼玉大)・佐藤繭子 (理研・CSRS)・豊岡公德 (理研・CSRS)・上杉健太朗 (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)・玉置大介 (富山大)・唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣 : ミヤコグサ子葉における細胞間隙出現機構の解析、日本植物学会第82回大会 (広島市)、(2018)
- III-4 山内大輔・中井朋則・金子康子 (埼玉大)・佐藤繭子 (理研・CSRS)・豊岡公德 (理研・CSRS)・上杉健太朗 (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)・玉置大介 (富山大)・唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣 : X線マイクロCT, SEM及び免疫蛍光抗体法を使ったミヤコグサ種子発芽時の子葉内細胞間隙出現機構の解析、日本植物形態学会第30回総会・大会 (広島市)、(2018)
- III-5 山内大輔・中井朋則・金子康子 (埼玉大)・上杉健太朗 (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)・玉置大介 (富山大)・唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣 : ミヤコグサ種子吸水過程における子葉内細胞間隙出現機構の解析、近畿植物学会 (京都市)、(2018)
- III-6 藤田尚子 (横浜市大)・赤司裕子 (横浜市大)・佐藤萌子 (横浜市大)・山内大輔・玉置大介 (富山大)・唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣・上杉健太朗 (高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)・辻寛之 (横浜市大) : イネの花成初期メリステムをライブイメージングでみる (2)、日本植物形態学会第30回総会・大会 (広島市)、(2018)
- III-7 T. Kurogane (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. Shimizu (宇宙航空研究開発機構), H. Kasahara (有人宇宙システム), D. Yamauchi, K. Uesugi (高輝度光科学研究センター), M. Hoshino (高輝度光科学研究センター), S. Kamisaka (富山大), Y. Mineyuki, I. Kasahara : Observation of arabidopsis roots using X-ray micro computed tomography, 日本顕微鏡学会第61回シンポジウム (富山市)、(2018)
- III-8 唐原一郎 (富山大)・黒金智文 (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）・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）・神阪盛一郎（富山大）・峰雪芳宣：シロイヌナズナ根系形態のX線マイクロCTを用いた三次元解析の試み、日本顕微鏡学会第74回学術講演会（久留米）、(2018)

III-9 黒金智文（富山大）・唐原一郎（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）・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）・神阪盛一郎（富山大）・峰雪芳宣：X線マイクロCTによるシロイヌナズナ根系形態の可視化、日本宇宙生物科学会第32回大会（仙台市）、(2017)

III-10 唐原一郎（富山大）・黒金智文（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）・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）・神阪盛一郎（富山大）・峰雪芳宣：SPring-8を用いたX線マイクロCTによるシロイヌナズナ根系形態の可視化、日本植物学会第82回大会（広島市）、(2018)

## 大学院生命理学研究科

博士後期課程

大塚礼己：核由来の分裂準備帯形成制御因子の解析

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成 29～令和元年度） 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
- 2 科学研究費補助金（平成 30～令和元年度） 萌芽的研究（萌芽） 課題番号：18K19865  
研究課題 ホシミドロ目藻類から迫る、陸上植物への進化メカニズム  
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

石橋健太・松田祐佳・佐川美咲・榊原 齊・小嶋寛明・大岩和弘  
Ishibashi, K., Matsuda, Y., Sagawa, M., 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・松田祐佳・森下達矢・古田健也・古田茜・小嶋寛明・大岩和弘  
Ibusuki, R., Matsuda, Y., Morishita, T., 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・坪本理沙・木場有希・小嶋寛明・大岩和弘

Tanaka, H., Tsubomoto, R., Kiba, Y., Kojima, H., Oiwa, K.

生体における情報処理を情報通信技術に活かす取り組み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る。生体構成要素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分子通信技術や、脳波など微弱な生体信号を精度よく効率的に収集する装置の開発などがこの研究に含まれる。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、生体信号や生体情報伝達のメカニズムを明らかにするとともに、生体-マシン間コミュニケーション技術として、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

石橋健太・大岩和弘

Ishibashi, K., 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発展させて、自己駆動粒子の集団運動など自己組織的パターン形成のメカニズムを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  $\mu\text{m}$  にも及ぶメソ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的研究と捉えられ、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。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Shiraga, M. Kirima, J., Shimizu, Y., Sakakibara, H. (NICT). and Oiwa, K.: Motility of axonemal dyneins. *In: Handbook of Dynein*, 2nd edition (eds. Hirose, K. and Amos, L), Pan Stanford Publishing, London, Chapter 10 (2019)
- I-2 Oiwa, K., Sakakibara, H. (NICT), Furuta, K. (NICT) : Electron microscopy of isolated dynein complexes and the power stroke mechanism, *In Dyneins: Dynein Mechanics, Dysfunction, and Disease*, 3, 2nd edition (ed. King, S), Academic Press, Boston, Chapter 12 (2018)
- I-3 Zhu, X., Poghosyan, E., Rezakbova, L., Mehall, B., Sakakibara, H. (NICT), Hirono, M. (Hosei Univ), Kamiya, R., Ishikawa, T., Yang, P.: The roles of a flagellar HSP40 ensuring rhythmic beating. *Molecular Biology of the Cell*, 30, 228-241 (2019)
- I-4 Oiwa, K. Iwamoto, H., (JASRI, SPring-8): Ca<sup>2+</sup> dependent changes in helical symmetry of axonemal components of *Chlamydomonas* flagella studied by X-ray fiber diffraction. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- I-5 Ishibashi, K. (Osaka Univ), Oiwa, K.: High-speed atomic force microscopic observations on demembrated *Chlamydomonas* axonemes and dynein arms. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- I-6 Sagawa, M., Shiraga, M., Sakakibara, H. (NICT), Oiwa, K.: Repetitive buckling of microtubules driven by axonemal dynein arrays reconstituted on a microtubule. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- I-7 Sakakibara, H., Kojima H. (NICT): The String-like structure on the tip of dynein-c tail. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-1 Kaneko, T. (Kyoto Univ.), Ando, S. (Kyoto Univ.), Furuta, K. (NICT), **Oiwa, K.**, Shintaku, H. (Kyoto Univ.), Kotera, H. (Kyoto Univ.), Yokokawa, R. (Kyoto Univ.) : Transport of microtubules according to the number and spacing of kinesin motors on gold nano-pillars. *Nanoscale* **11**, 9879-9887, doi:10.1039/c9nr01324e (2019).
- II-2 Yano, T. (Osaka Univ.), Torisawa, T. (NICT, CREST), **Oiwa, K.** Tsukita, S. (Osaka Univ.): AMPK-dependent phosphorylation of cingulin reversibly regulates its binding to actin filaments and microtubules. *Sci Rep* **8**, 10, doi:10.1038/s41598-018-33418-7 (2018).
- II-3 古田 健也 (NICT) : 生物分子マシンをつくって理解する, 現代化学 **567**, 30-35 (2018)
- II-4 Oiwa, K., Ibusuki, R., Furuta, A. (NICT), Furuta, K. (NICT): Creation of protein-based molecular motors moving on DNA nanostructure. 16<sup>th</sup> International Alpbach Workshop on Molecular Motors (Alpbach, Austria), 2019 (Invited)
- II-5 Oiwa, K., Ibusuki, R., Furuta, K. (NICT) Creation of protein-based molecular motors moving on DNA nanostructure. *International Conference on processing and manufacturing of advanced materials, THERMEC2018* (Paris, France), 2018 (Invited)
- II-6 Oiwa, K. : Learning from the complexity of dynein. "Mechanisms of Muscle Contraction and Motility" Symposium commemorating Prof. Bernhard Brenner (Hannover Medical School, Germany) 2018 (Invited)
- II-7 Kojima H. (NICT): Micro-Force measurement method with optical feedback. "Mechanisms of Muscle Contraction and Motility" Symposium commemorating Prof. Bernhard Brenner (Hannover Medical School, Germany) 2018 (Invited)
- II-8 Ibusuki, R., Furuta, A., Oiwa, K., Kojima, H. (NICT), Furuta, K. (NICT): Re-design of linear molecular motors. 63th Biophysical Society Annual Meeting (Baltimore, MD,

- USA) 2019 (Invited)
- II-9 Oiwa, K., Ibusuki, R., Furuta, K.(NICT): Creation of novel molecular motors on the basis of dynein function, Seminar Series in Crick Institute (London, UK), 2018
- II-10 Oiwa, K.: Creation of novel molecular motors on the basis of dynein function. Seminar Series, Max Planck Institute Goettingen, University of Goettingen (Goettingen, Germany) 2018
- II-11 古田健也(NICT) : 生物分子モーターを再設計する, 第 15 回 原子・分子・光科学 (AMO) 討論会 (東北大学 仙台) 2018
- II-12 Oiwa, K., Torisawa, T.(NICT, CREST): TPPP3 promotes microtubule bundling and networking via weak interactions which enable the microtubule network to adapt the external stress changes. American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Diego, CA, USA) 2018
- II-13 Oiwa, K., Torisawa, T.(NICT, CREST), Ishihara, S. (Tokyo Univ): Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (TPPP3) facilitates microtubule bundling and network formation via its weak interaction with microtubules. 63th Biophysical Society Annual Meeting, (Baltimore, MD, USA) 2019
- II-14 Ibusuki, R., Furuta, A.(NICT), Oiwa, K., Kojima, H.(NICT), Furuta, K.(NICT): Re-design of biomolecular motors. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-15 Matsuda, Y., Furuta, A.(NICT), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K., Furuta, K.(NICT): DNA-templated assembly of axonemal outer arm dynein complexes in vitro, 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-16 Kaneko, T.(Kyoto Univ), Oba, S.(Kyoto Univ), Furuta, K.(NICT), Oiwa, K., Shintaku, H.(Kyoto Univ), Kotera, H.(Kyoto Univ), Yokokawa, R.(Kyoto Univ.): Investigating coordination of kinesin-1 and Ncd using their selective immobilization on gold nano-pillars, 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-17 Ibusuki, R., Furuta, A.(NICT), Oiwa, K., Kojima, H.(NICT), Furuta, K.(NICT): Re-design of biomolecular motors, 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-18 Ibusuki, R., Furuta, A.(NICT), Morishita, T., Oiwa, K., Kojima, H.(NICT), Furuta, K.(NICT): Engineering motor proteins to move along DNA nanotubes. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-19 古田健也(NICT): Re-design of biomolecular motors. 第 79 回 岡崎コンファレンス Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines, (分子研・岡崎) 2018
- II-20 古田健也(NICT) : Re-design of linear molecular motors. 仙台ワークショップ "An Update on Molecular Motors: Open Challenges and New Perspectives", (東北大学) 2018
- II-21 古田健也(NICT) : 生体発動分子の創成 : 自然界の生体分子の改造とゼロからの設計, 発動分子科学 第一回領域会議、(東京工業大学、東京) 2018
- II-22 古田健也(NICT): 天然のタンパク質機械を基に新しい分子モーターをデザインする, 第 1 回 岡崎発動分子セミナー, (分子科学研究所, 岡崎) 2018
- II-23 古田健也(NICT): タンパク質ブロックを組み合わせて新しい生物分子モーターをデザインする, 第 4 回発動分子科学セミナー, (東京工業大学, 東京) 2018
- II-24 柴田桂太朗(NICT): 渋滞微小管中のダイニンの運動活性. 第 8 回分子モーター討論会, 東京大学本郷キャンパス

- II-25 柴田桂太朗(NICT),古田 健也(NICT),小嶋 寛明(NICT),豊島 陽子(東京大学): 渋滞微小管上のダイニン 1 分子運動解析, 2019 年 生体運動研究合同班会議 (福岡大学, 福岡) 2019
- III-1 中出一輝(関西大), 神代啓輔(関西大), 佐川貴志(NICT), 小嶋寛明(NICT), 清水智弘(関西大), 新宮原正三(関西大), 伊藤 健(関西大): Adhesion and Bactericidal Properties of a Wettability-Controlled Artificial Nanostructure, ACS Applied Nano Materials,1 (10), pp 5736-5741, (2018)
- III-2 田中裕人(NICT), 數田恭章(NICT), 坪本梨沙, 小嶋寛明(NICT): 微生物を用いた化学物質識別デバイスの開発と味判定の可能性. 美味技術学会誌, 17(2), 74-76 (2018)
- III-3 田中裕人(NICT): 微生物を用いた化学物質識別デバイスの開発と味判定の可能性, 2018FOOMA 美味技術学会シンポジウム (東京ビッグサイト, 東京) 2018
- III-4 田中裕人(NICT), 數田恭章(NICT), 富成征弘(NICT), 成瀬康(NICT), 岡田真人, 坪本梨沙, 梅原広明(NICT), 曾和義幸(Hosei Univ), 川岸郁朗(Hosei Univ), 田中秀吉(NICT), 小嶋寛明(NICT): 微生物を使った化学物質評価法の開発, 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会 (名古屋国際会議場, 名古屋) 2018
- III-5 中出一輝(関西大), 神代啓輔(関西大), 佐川貴志(NICT), 小嶋寛明(NICT), 清水智弘(関西大), 新宮原正三(関西大), 伊藤 健(関西大): ナノ構造が発現する抗菌作用に付着力が及ぼす影響, 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会 (名古屋国際会議場, 名古屋) 2018
- III-6 Tanaka, H.(NICT), Kazuta, Y.(NICT), Tsubomoto, R., Oiwa, K., Kojima, H.(NICT): Parameters describing CW bias time traces of adaptation of chemotaxis of cells of *E. coli* correlate to OD 600 value at cell culture stop. 第 56 回生物物理学学会年会 (岡山大学), 2018
- VI-1 Tanida,S. (Tokyou Univ), Furuta,K.(NICT), Nishikawa,K. (Tokyou Univ), Hiraiwa, T. (Tokyou Univ), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K., Sano, M. (Tokyou Univ): Gliding filament system giving both orientational order and clusters in collective motion. arXiv preprint arXiv:1806.01049 (2018)
- VI-2 Oiwa, K.: Biological soft matters containing nanometer-scale protein motors and micrometer-scale protein filaments spontaneously generate various types of large-scale active networks. Physical Department Colloquim Series in Oregon State University (Oregon, USA) 2019
- VI-3 Oiwa, K.: Cytoskeletal proteins : an excellent toolbox to study active matter physics. International Workshop:Advances in Physics on Emergent Order of Active Matter(石川四高記念文化交流館, 金沢), 2018 (Invited)
- VI-4 Torisawa, T. (NICT), Ishihara, S.(Tokyou Univ), Oiwa, K.: Cell-like movement of self-organized microtubule aster, 第 56 回生物物理学学会年会 (岡山大学), 2018
- VI-5 Tanida,S. (Tokyou Univ), Furuta, K.(NICT), Nishikawa, K. (Tokyou Univ), Hiraiwa, T. (Tokyou Univ), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K., Sano, M. (Tokyou Univ): The role of steric interaction in collective motion of microtubules driven by kinesins. 第 56 回生物物理学学会年会 (岡山大学), 2018

## 大学院生命理学研究科

### 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

石橋健太: 軸糸ダイニンの協働性創発メカニズムの解明

### 博士課程前期

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

- 森下 達矢：構成論的手法による新奇分子モーターの創製  
学部4年生
- 木場 有希：ヒトの認知機能に対する飲料の効果の評価法
- 坪本 梨沙：バクテリア化学走性を利用した化学物質センサー：  
ヒトの味覚の評価への応用
- 佐川 美咲：真核生物鞭毛の屈曲形成・伝播メカニズムの理解のための再構築実験系開発

## 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）
- 3 平成29年度 公益財団法人ひょうご科学技術協会 研究助成  
研究課題名 高輝度X線マイクロビームを用いた真核生物鞭毛軸糸の構造ダイナミクスの  
解析  
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。

平成 30 年度の研究では、「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・神経回路形成が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きた。まず、各アイソフォームを分別できるペプチド抗体を作成し、マウス脳内での発現パターンの差異を詳細に検証し、領野・層普遍的に発現している L 体に対し、S 体は皮質 2/3 層の、特に、体性感覚野で強い発現が観察された (*Brain Res.*, 2018)。さらに、大脳皮質 2/3 層の軸索発達過程において *in vivo* で afadin のスプライシングパターンが変化していることを bichromatic-splicing reporter (*Gene.*, 2019) を用いた実験で証明した。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こと、また、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ることから、S 体の発現の量やタイミング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示した。さらに分子メカニズムの検証を進めた結果、L 体が脳梁軸索の束化に必須であり semaphorin の共受容体 Neuropilin-1(Nrp1) と結合することで束化を担っていることが明らかになった。大脳皮質発達過程において S 体の発現が低い脳梁通過時には L 体、その後急峻な S 体の発現亢進が起こる脳梁通過後には S 体へと Nrp1 の結合相手がダイナミックに変化することで、L 体による軸索束化を S 体が拮抗的に阻害していた。

以上から、アクチン足場分子の選択的スプライシングが脳梁通過までに必要な軸索束化、その後の対側で軸索が上行し皮質内投射するのに必要な脱束化のタイミングを制御することで、脳梁軸索のガイダンスが規定されることが明らかになった。我々は、従来から広く提唱されている、長距離・短距離作動性のガイダンス因子による脳梁軸索の投射制御機構とは全く異なる、個々の軸索内でのアクチン足場蛋白質のバリエーションの発現の時空間制御という、神経細胞内因性のセントラルドグマのレベルでの脳梁軸索ガイダンスの新奇システムを提唱するに至った。

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。そこで、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 修飾が起こらなくなる 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。平成 30 年度は、分裂期の終わりから G1 期にかけて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ために、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。また、核ラミナの構成因子であるラミン A をノックダウンし、ヘテロクロマチンの核膜直下への配置に対する影響を調べた結果、ラミン A は分裂期終期から G1 期における核内でのヘテロクロマチンの正しい配置に必要であることが証明し判明した。今後は、生細胞での lamin A とヘテロクロマチンの相互作用を解析する予定である。このために、蛍光たんぱく質を利用した細胞内のたんぱく質因子間相互作用を検出できる Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析システムの構築に取りかかった。

### 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、長いバリエント (*l-afadin*) と短いバリエント (*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30年度の研究では、大脳皮質神経細胞の初代分散培養系をモデルとし、神経損傷後の修復過程における *l-/s-afadin* の発現パターンを解析した。その結果、*l-/s-afadin* の発現はともに、神経損傷に伴う軸索切断が起こると一旦発現がリセットされ、その後の修復過程で、正常な神経発達過程とは異なる時期特異的な発現パターン（発現量・タイミング）を示した。これは、中枢神経系における神経損傷後の神経回路が部分的にしか修復できないことの要因の一つである可能性が考えられ、完全修復のためには、軸索形態を制御する *l-/s-afadin* の発現バランス・タイミングを制御する必要があることを示唆している。さらに、神経細胞間の細胞間接着を物理的に亢進させると *s-afadin* の発現が早期に誘導されたことから、細胞間接着という神経修復のための新たなメカニズムが提唱された。最後に、*s-afadin* の選択的スプライシング制御因子を探索するために、RNA結合タンパク質に焦点を当て、*in silico* スクリーニングと RT-PCR の詳細な解析から候補遺伝子を10個に絞り込むことができた。今後は、これらの発現ベクターを 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し、培養神経細胞を用いて神経発達・修復過程における機能を解明していく。さらに生体マウスを用いて、*in vivo* 大脳皮質神経回路構築における候補遺伝子の役割についても調べていく。

## 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ント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ント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ントの発現差異の解析．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. 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)
- II-5 河合淳史、廣瀬富美子 : Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. ポスター発表 第 41 回分子生物学会年会 (平成 30 年 11 月、パシフィコ横浜)

## 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術の確立

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 G.L Snider

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
10. 科学研究費助成事業（基盤 C）（平成 30-32 年度）  
研究課題 G1 期における核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析  
研究代表者 廣瀬 富美子
11. 研究助成金 公益財団法人 日本科学協会 笹川科学研究助成（平成 30 年度）  
研究課題 哺乳類中枢神経回路の配線原理に基づいた損傷脳領域の機能的回復への挑戦  
研究代表者 北川 宏信
12. 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 30 年度）  
研究課題 損傷脳機能の革新的な治療戦略につながる神経回路配線の時空間制御メカニズムの解明  
研究代表者 北川 宏信
13. 研究助成金 公益財団法人兵庫県立大学科学技術公園財団 教育研究助成（平成 30 年度）  
研究課題 中枢神経回路の配線構築における時空間制御メカニズムに基づいた損傷脳機能の画期的回復法の開発  
研究代表者 北川 宏信

## 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 cryo-electron microscopy for hydrated samples

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

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

細胞やタンパク質をはじめとした含水試料の微細構造を脱水による変形のない状態で観察するためには、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。様々な含水・液体試料について、低温透過型電子顕微鏡法および低温走査型電子顕微鏡法による観察の可能性を検討した結果、含水試料だけでなく、有機溶媒中のカーボン粒子や油脂結晶など、様々な液体試料についても観察できることが明らかになった。

## II 神経筋接合部におけるニコチン性アセチルコリン受容体と筋特異的受容体チロシンキナーゼの分子動態解析

Molecular dynamics of nicotinic acetylcholine receptor and muscle specific kinase at the neuromuscular junction

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

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

神経筋接合部 (NMJ) のポストシナプス膜では、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) が集積して存在することにより効率の良い情報伝達が行われている。nAChR の集積機構を明らかにするために、NMJ ポストシナプスの培養細胞モデルを用いて、nAChR および nAChR の集積に関わることが知られている筋特異的受容体チロシンキナーゼ (MuSK) の蛍光タイムラプス観察を行った後、細胞内に取り込まれた nAChR と MuSK の分子局在を電子顕微鏡を用いて解析した。

## III リガンド依存的なニコチン性アセチルコリン受容体の分子内運動解析

Ligand-dependent intramolecular dynamics of nicotinic acetylcholine receptor



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

nAChR は、NMJ 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。また、nAChR の活性は生体中では周囲の環境によって調節されていることが示されている。そこで、nAChR が生きている細胞に存在した状態で、リガンド依存的な分子内運動を X 線 1 分子追跡法を用いて解析し、リガンド依存的な回転運動を捉えることができた。

## IV 光合成初期過程と電子伝達超複合体の構造と機能の研究

Structure and function of super complexes of photosynthetic electron transport systems

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

光合成における光エネルギーの化学的エネルギーへの変換を担う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。クロロフィル *d* を主要色素とするシアノバクテリアの光化学系複合体の構造解明に向けた解析を進めた。珪藻の光化学系 II 複合体の構造を解明した。また、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。

## V 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。そのような珪藻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た。その一環として、野外の解放系で汚水を使った培養技術開発を進めるとともに、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 神垣隆道（雪印メグミルク）・塩田誠（雪印メグミルク）・泉井亮太（雪印メグミルク）・伊藤喜子、西野有里、宮澤淳夫、クライオ透過型電子顕微鏡を用いた W/O エマルションの油脂結晶観察、第 74 回日本顕微鏡学会学術講演会（久留米）、2018
- I-2 島貫 純一（日産アーク）・高橋 真一（日産自動車）・大間 敦史（日産自動車）・今井 英人（日産アーク）・伊藤 喜子、西野 有里、宮澤 淳夫、Cryo-SEM 法を用いた燃料電池触媒インク塗膜の乾燥過程における 微細構造解析、第 74 回日本顕微鏡学会学術講演会（久留米）、2018
- I-3 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-4 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*, 67, 829-837 (2018)
- I-5 M. Watanabe-Takahashi（同志社大）, S. Yamasaki（大阪府立大）, M. Murata（東京大）, F. Kano（東京工業大）, J. Motoyama（同志社大）, J. Yamate（大阪府立大）, J. Omi（同志社大）, W. Sato（同志社大）, H. Ukai（同志社大）, K. Shimasaki（同志社大）, M. Ikegawa（同志社大）, M. Tamura-Nakano（国立国際医療研究所センター）, R. Yanoshita（帝京平成大）, Y. Nishino, A. Miyazawa, Y. Natori（岩手医療大）, N. Toyama-Sorimachi（国立国際医療研究所センター）, K. Nishikawa（同志社大）, Exosome-associated Shiga toxin 2 is released from cells and causes severe toxicity in mice, *Scientific reports*, 8, 10776 (2018)
- I-6 T. Kamigaki（雪印メグミルク）, T. Hanazawa（雪印メグミルク）, Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Immunoelectron microscopic observation of b-lactoglobulin in paneer cheese using the Tokuyasu method, *Milk Science*, In press
- II-1 大石鴻一郎・西野有里・宮澤淳夫：大腸菌に対する金結晶標識法に向けた金処置の影響についての検討、第 74 回日本顕微鏡学会学術講演会（久留米）、2018
- II-2 Y. Nishino, M. Kaise, A. Miyazawa, Molecular distribution analysis of nicotinic acetylcholine receptor and MuSK on the cell surface by correlative fluorescent microscopy and cryo-SEM, 19th International microscopy congress, Sydney, 2018
- II-3 Y. Noma, Y. Nishino, A. Miyazawa, Internalized molecular localization of nAChR and MuSK by CLEM, 19th International microscopy congress, Sydney, 2018
- III-1 大石鴻一郎・西野有里・宮澤淳夫：大腸菌に対する金結晶標識法に向けた金処置の影響についての検討、第 74 回日本顕微鏡学会学術講演会（久留米）、2018
- IV -1 菓子野康浩「近赤外光利用型天然光化学系 II の構造と機能」アグリバイオ、3 (3); 259-262 (2019)
- IV -2 Ryo Nagao（岡山大）, Fusamichi Akita（岡山大）, Koji Kato（岡山大）, Takehiro Suzuki（理研）, Kentaro Ifuku（京大）, Ikuo Uchiyama（基生研）, Yasuhiro Kashino, Naoshi Dohmae（理研）, Seiji Akimoto（神戸大）, Naoyuki Miyazaki（阪大）, Jian-Ren Shen（岡山大）, Cryo-EM structures of diatom PSII-FCPII

supercomplexes, International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018, P1, 倉敷市民会館, Japan, 2018-11-7-10

- IV -3 Ryo Nagao (岡山大), Fusamichi Akita (岡山大), Koji Kato (岡山大), Takehiro Suzuki (理研), Kentaro Ifuku (京大), Ikuo Uchiyama (基生研), Yasuhiro Kashino, Naoshi Dohmae (理研), Seiji Akimoto (神戸大), Naoyuki Miyazaki (阪大), Jian-Ren Shen (岡山大), Cryo-EM structures of PSII-FCPII complexes in the diatom *Chaetocers gracilis*, 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis, S3-7, Beijing Friendship Hotel, China, 2018-8-19-23
- IV -4 長尾 遼 (岡山大)、秋田 総理 (岡山大)、加藤公児 (岡山大)、鈴木健裕 (理研)、伊福健太郎 (京大)、内山郁夫 (基生研)、菓子野康浩、堂前直 (理研)、秋本誠志 (神戸大)、宮崎直幸 (阪大)、沈建仁 (岡山大)、珪藻 PSII-FCPII 複合体のクライオ電顕構造解析、2pE06、第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年 3 月 13-15 日
- IV -5 長尾 遼 (岡山大)、秋田 総理 (岡山大)、加藤公児 (岡山大)、鈴木健裕 (理研)、伊福健太郎 (京大)、内山郁夫 (基生研)、菓子野康浩、堂前直 (理研)、秋本誠志 (神戸大)、宮崎直幸 (阪大)、沈建仁 (岡山大)、クライオ電子顕微鏡による珪藻 PSII-FCPII 複合体の構造解析、第 26 回「光合成セミナー2018: 反応中心と色素系の多様性、O-9、神戸大学百年記念会館、2018 年 7 月 21-22 日
- IV -6 長尾 遼 (岡山大)、秋田 総理 (岡山大)、加藤公児 (岡山大)、鈴木健裕 (理研)、伊福健太郎 (京大)、内山郁夫 (基生研)、菓子野康浩、堂前直 (理研)、秋本誠志 (神戸大)、宮崎直幸 (阪大)、沈建仁 (岡山大)、珪藻の C2S2M2 型 PSII-FCPII 複合体のクライオ電顕構造解析、新学術領域研究「革新的光物質変換」第 2 回公開シンポジウム、P-55、岡山大学創立 50 周年記念会館、2019 年 1 月 13-14 日
- IV -7 前田皐臣、井上 (菓子野) 名津子、小谷弘哉、新澤 (伊藤) 恭子、山下栄樹、伊福健太郎、菓子野康浩「シアノバクテリア *Acaryochloris marina* の光化学系 II」、光合成分子機構の学理解明と時空間制御による革新的光 — 物質変換系の創製「第 2 回公開シンポジウム」、岡山、2019/01/13-14
- IV -8 長尾 遼 (岡山大)、秋田 総理 (岡山大)、加藤公児 (岡山大)、鈴木健裕 (理研)、伊福健太郎 (京大)、内山郁夫 (基生研)、菓子野康浩、堂前直 (理研)、秋本誠志 (神戸大)、宮崎直幸 (阪大)、沈建仁 (岡山大)、珪藻光化学系 II 膜タンパク質複合体の構造解析、日本光合成学会年会およびシンポジウム、P16、東北大学、2018 年 5 月 26-27 日
- IV -9 Makiko Kosugi (中央大), Shin-ichiro Ozawa (岡大), Rika Okamoto (中央大), Yurie Kubo (中央大), Mitsuo Iwadate (中央大), Yasuhiro Kamei (総研大、基生研), Sakae Kudoh (極地研), Yasuhiro Kashino, Yuichiro Takahashi (岡大), Shigeru Itoh (名大), Kojiro Hara (秋田県立大) and Hiroyuki Koike (中央大), Characterization and identification of the red-shifted chlorophyll binding protein of a terrestrial green alga, *Prasiola crispaharvested in Antarctica*, *International Conference on Microbial Photosynthesis*, 8 月 9-12, 2018, Vancouver
- IV -10 Makiko Kosugi (中央大), Shin-ichiro Ozawa (岡大), Rika Okamoto (中央大), Yurie Kubo (中央大), Mitsuo Iwadate (中央大), Yasuhiro Kamei (総研大、基生研), Sakae Kudoh (極地研), Yasuhiro Kashino, Yuichiro Takahashi (岡大), Shigeru Itoh (名大), Kojiro Hara (秋田県立大) and Hiroyuki Koike (中央大), An Antarctic terrestrial green alga, *Prasiola crista*, has an unique red-shifted chlorophyll binding protein which permits large uphill energy transfer, *The Ninth Symposium on Polar Science*, 12 月 4-7, 2018, 東京 (極地研)

- V -1 菓子野康浩、伊福健太郎（京大）、「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」のためのパイロットプラント完成、クリーンエネルギー、vol. 27, No. 9, pp 29-35, 2018.
- V -2 菓子野康浩 “Direct and rapid extraction/concentration technique of useful materials from large-scale micro-algal cultivation” JST「日中大学フェア&フォーラム in CHINA 208」（中国広東省広州市）2018/5/12
- V -3 Kazuhiro Itoh, Haruka Tanaka, Yasuhiro Kashino, Kentaro Ifuku（京大）, Kouji Maeda and Takuji Yamamoto, "Triacylglycerol Condensation from Microalga using Venturi Tube Type Microbubble Generator" The 24th International Joint Seminar between Dong-A University and University of Hyogo October 24 – 27, 2018 Himeji, Japan
- V 4 菓子野 康浩「低コストで珪藻を大量培養するための実証実験」特定非営利活動法人 21世紀水倶楽部、研究集会「下水由来のCO<sub>2</sub>等資源活用の研究」、東京、2019/1/25
- V -5 菓子野 康浩「低炭素化に向けた実用珪藻 *Chaetoceros* 属組み換え体の大量培養プラットフォーム構築に向けた取り組み」、2018 生態工学会オーガナイズドセッション、大阪府立大学、2018/6/23
- V -6 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」、「ハババイオテクノロジー」ALCA 公開シンポジウム、JST 東京本部別館、2018 年 12 月 26 日
- V -7 中筋智樹、伊藤和宏、菓子野康浩、伊福健太郎（京大）、前田光治、山本拓司「珪藻細胞のマイクロバブル濃縮に対する気泡径の寄与」第 21 回化学工学会学生発表会、京都、2019/3/2
- V -8 菓子野康浩「微細藻類のための低コスト大規模培養システム」（査読あり）JST イノベーションジャパン 2018、東京ビッグサイト、2018/8/30、31
- V -9 梶川 昌孝（京大）、本庄 智也（京大）、伊福 健太郎（京大）、小川 順（京大）、菓子野 康浩、福澤 秀哉（京大）「実用珪藻における有用不飽和脂肪酸リシノール酸の生産」第 36 回日本植物細胞分子生物学会（金沢商工会議所会館）2018 年 8 月 26-28 日

## 大学院生命理学研究科

博士前期過程

- 前田皐臣 : シアノバクテリア *Acaryochloris marina* の光化学系  
 宮崎加奈子 : クライオ電子顕微鏡法によるスキンケア研究へのアプローチ  
 野間有加里 : ニコチン性アセチルコリン受容体クラスターの分子動態解析

## 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 トヨタ自動車(株) 平成 30 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
  
- 5 共同研究 日産自動車(株) 平成 30 年度  
研究課題 全固体電池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
  
- 6 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
  
- 7 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
  
- 8 文部科学省科学研究費補助金(新学術領域研究・公募) 平成 29～30 年度  
研究課題 近赤外光利用型天然光化学系 II の構造と機能  
研究代表者 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。Cre 組み替え技術を用いて、マウスナー細胞に投射する複数の GABA 作動性のシナプス末端を、生きた個体の中で区別して可視化することにより解析を進めている。

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、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細胞前駆体である神経堤細胞の個々の移動や、分裂後の運命を可視化・解析するため、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。これによって、(1) 腸原基に入った後の神経堤細胞は様々な方向に移動していること、(2) 分裂後、両娘細胞ともに神経分化するものや、一方だけが神経分化し他方はさらに分裂するものがあるように、細胞ごとにパターンが異なることがわかった。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。特に、自発的に採餌を開始する受精後5日ごろの興奮性神経伝達物質として、今回初めて *tachykinin3a* の発現が確認できた。一方、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、(1) 神経細胞除去部に未分化神経堤由来細胞が進入し神経分化することや、(2) 神経細胞除去に応じて、神経幹細胞のマーカー (Sox10) 陽性の細胞が増殖することが示唆される結果を得た。

### III ホヤ幼生神経系の機能解析

#### Functional analysis of ascidian larval nervous system

中川将司・八田公平  
Nakagawa M, Hatta K

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。幼生の神経系における神経細胞数は、僅か 177 個であることが明らかにされた。しかし、その神経系の機能解析は、殆どなされていない。我々は、単一細胞光刺激装置を作製し、光遺伝学的手法を用いてホヤ幼生の神経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

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

八田公平・二階堂昌孝  
Hatta K, Nikaido M

A: 多くの魚は口にある顎（口顎：第 1 の顎）のほかに、咽頭顎（第 2 の顎）をもっている。私達は、その機能進化過程を調べるため、スポットドガー、ポリプテルス、ハイギョなどの「古代魚」、シルバーアロワナやバタフライフィッシュなど、舌にも歯をもっている（3つの顎をもつ）もの、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、SPring-8におけるマイクロ CT や高速 X 線撮影によって、様々な硬骨魚類の咽頭歯の形態と摂食時における運動の解析を行なってきた。今年度はそれに加えて、脊椎動物の祖先である棘皮動物（ウニ）や、咽頭歯なしでも獲物を丸呑みできる陸上爬虫類（コーンスネーク）の摂食時におけるアリストテレスのランタンや、左右が分離した特殊な口顎の動きの立体ライブイメージングに成功した。B: 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を行なっている。

また、ナノマイクロ位相CT法を用いて、ゼブラフィッシュの脳や腸の細胞ひとつひとつの高解像度観察に成功した。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, ○ Kohei Hatta  
Identification of neuronal and non-neuronal cells associated with either peristalsis or slow waves in the zebrafish intestine（国際学会，口頭発表）13th International Zebrafish Conference (2018年6月20-24日, Madison, USA)
- I-2 Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, Shin-ichi Okamoto, ○ Kohei Hatta  
Imaging and optogenetic analysis of the second brain to control gut motility in zebrafish larvae（国際学会，ポスター発表）CSH Asia meeting on Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits (2018年9月6-7日, Awaji Japan)
- I-3 ○高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、川上 浩一、岡本 晋一、八田 公平  
Ca<sup>2+</sup> imaging and optogenetic analysis of cells derived from ectodermal, mesodermal and endodermal germ layers in the zebrafish gut.（ポスター発表）第41回日本分子生物学会（2018年11月28-30日, 横浜, 神奈川県）
- I-4 ○青木 滯、馬場 俊平、井上 智裕、東 毅、角本 貴進、池永 隆徳、二階堂 昌孝、八田 公平  
ゼブラフィッシュ幼生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（口頭発表）第41回日本神経科学大会（2018年7月26-29日, 神戸）
- I-5 ○八田 公平、兒島 卓也、高御堂 大慈、西田 さやか、二階堂 昌孝、岡本 晋一  
ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸における徐波と蠕動運動に関連して活動する細胞群の光遺伝学による機能解析（口頭発表）第41回日本神経科学大会（2018年7月26-29日, 神戸）
- I-6 ○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における蠕動運動と徐波に関連して活動する神経および非神経細胞群の同定（口頭発表）第41回日本神経科学大会（2018年7月26-29日, 神戸）
- I-7 ○青木 滯、○高御堂 大慈  
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～（ポスター発表）第一回 技術・人材マッチング交流会（2019年2月12日, 光都, 兵庫県）
- II-1 Mai Kuwata, ○Masataka Nikaido, Koichi Kawakami (NIG) & Kohei Hatta : A heat-shock mediated multi-color labeling of the enteric neural crest cells for analyzing the patterns of their migration, division and differentiation in zebrafish gut.（口頭・ポスター発表）第51回 日本発生生物学会（2018年6月6-8日, 船堀, 東京都）



- II-2 ○大野 真理愛、堀内 奈津美、川上 浩一（遺伝研）、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再生機構の解明（ポスター発表）第41回 日本神経科学大会（2018年7月26-29日、神戸、兵庫県）
- II-3 ○大野 真理愛、堀内 奈津美、川上 浩一（遺伝研）、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神経再生機構の解明（ポスター発表）第41回日本分子生物学会（2018年11月28-30日、横浜、神奈川県）
- IV-1 ○八田 公平、○岡田 央人 ウツボ・ヘビは、どうやってエサを丸のみするの？ 魚のもつ2つの「あご」の秘密を SPring-8 でときあかす！（招待講演）西栗栖ふれあいフェスティバル（2018年11月18日、西栗栖コミュニティセンター、たつの、兵庫県）

## 大学院生命理学研究科

### 博士前期課程

大野 真理愛：腸神経系の再生機構の研究

青木 滯：マウスナー神経細胞を制御する GABA 作動性回路の探索

高御堂大慈：腸の運動を制御する神経・非神経細胞の  $Ca^{2+}$  イメージングと光遺伝学解析

## 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 住友財団 基礎科学研究助成（平成 30 年 11 月～令和元年 10 月）  
 研究課題 多様な腸神経細胞の形成・特異化に関わる転写因子コードの解明  
 研究代表者 二階堂昌孝

## 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、自切・再生を繰り返し無性的に増殖する。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、ある環境下でプラナリアを飼育すると体細胞系幹細胞の一部が生殖系幹細胞へ変化し卵や精子を生じ有性生殖を行うようになる。この2種類の幹細胞の性質の違い、および、体細胞系幹細胞から生殖系幹細胞への転換機構を解明する。

## 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種のほか、数十の個眼をもつ多眼種プラナリ

アがいる。このプラナリアの個眼は1つの視神経と1つの色素細胞から構成されているため、眼の形成・消失を細胞レベルで生きたまま継続的に観察することができる。この多眼種プラナリアの眼をモデルとしてプラナリアの再生における細胞分化のルールを明らかにする。

## 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 梅園：プラナリアの前後軸再生機構の解明。再生学異分野融合研究会（岡崎）、2018
- I-2 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89回大会（札幌）、2018
- I-3 梅園：プラナリア再生における前後軸パターンのサイズ調節機構。サイズ生物学ワークショップ2019（下関）、2019
  
- II-1 加納・関井(弘前大)・小林(弘前大)・梅園・織井：プラナリア生殖腺発達におけるFGFシグナルの機能解析。日本動物学会第89回大会（札幌）、2018
  
- IV-1 塚原・奥村・梅園・餅井：アフリカツメガエル幼生尾部再生時の傷表皮/AECにおける神経の役割。日本動物学会第89回大会（札幌）、2018

#### 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

服部 美希：摂食器官の付加再生制御機構に関する研究

加納 沙也佳：プラナリア生殖腺発達における FGF シグナルの機能解析

塚原 由希菜：傷表皮/AEC に投射する神経の尾部再生における役割

## 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

### 2 日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 (C)

研究課題 再生を制御する傷表皮シグナルの解明

研究代表者 餅井真

## 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。そのため、病原菌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。病原菌が持っている ABC 型ヘムトランスポーターについて、低温電子顕微鏡による高分解能立体構造解析を行うための試料調整方法の確立に取り組んだ。3 つのタンパク質サブユニットが複合体を形成し、輸送基質が結合した状態での構造決定を目指しており、測定のための安定な試料を調製できる精製条件の検討を行った。また、共同研究で分子動力学計算を行い、ATP がヌクレオチド結合サブユニットへ結合することによって引き起こされる膜貫通領域のコンフォメーション変化の経路を予測した。

## 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、金属タンパク質の結晶構造解析や時間分解構造解析に取り組み、得られた構造情報を基盤に分光計測や生化学的解析を組み合わせることで、金属タンパク質の反応機構の解明を目指している。本年度は、SACLA 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>）の触媒反応の鍵となる反応中間体の構造解析を行った。現在、構造に基づいた理論計算により、反応中間体の電子状態についての詳細を検討中である。他の金属酵素についても SACLA での時間分解計測にむけて準備を進めている。

### 発表論文 List of publications

- I-1. H. Onoda, O. Shoji, K. Suzuki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe:  $\alpha$ -Oxidative decarboxylation of fatty acids catalysed by cytochrome P450 peroxygenases yielding

- shorter-alkyl-chain fatty acids, *Catal. Sci. Technol.* 8, 434 (2018)
- I-2. M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, H. Asakura, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, Y. Nariai, T. Urano, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: Structural basis for promotion of duodenal iron absorption by enteric ferric reductase with ascorbate, *Commun. Biol.* 1, 120 (2018)
- I-3. K. Omura, Y. Aiba, H. Onoda, J. K. Stanfield, S. Ariyasu, H. Sugimoto, Y. Shiro, O. Shoji, Y. Watanabe: Reconstitution of full-length P450BM3 with an artificial metal complex by utilising the transpeptidase Sortase A, *Chem. Commun.* 54, 7892 (2018)
- I-4. M. Ganasen、富樫ひろ美、山下恵太郎、平田邦生、A. G. Mauk、城 宜嗣、澤井仁美、杉本宏: ヒト小腸の細胞膜で Dcytb が鉄分吸収を促進するメカニズム, 平成 30 年度結晶学会年会、(東京)、2018 年 11 月 10-11 日 (口頭発表)
- I-5. 野村高志、當舎武彦、杉本宏、久野玉雄、山際来佳、Chai Gopalasingam、山下恵太郎、平田邦生、山本雅貴、城宜嗣、久保稔: 時間分解赤外分光法および凍結トラップ X 線結晶構造解析による P450nor 反応中間体の解析, 第 12 回分子科学討論会 (福岡)、2018 年 9 月 10-13 日 (口頭発表)
- I-6. M. Ganasen, 藤代瞳、X. Yuan, I. Hamza, 姫野誠一郎、A. G. Mauk, 杉本宏、城宜嗣、澤井仁美: ヒトの鉄イオン吸収に関わる膜タンパク質の立体構造に基づく生きた細胞での機能解析, メタルバイオサイエンス研究会 (仙台)、2018 年 11 月 16-17 日 (口頭発表)
- I-7. M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto and H. Sawai: Structural Insight into the Dietary Non-heme Iron Absorption in Human Duodenum, 第 18 回日本蛋白質科学会年会 (新潟)、2018 年 6 月 27 日 (ポスター発表)
- I-8. 鎌谷美咲、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美: 酸素センサータンパク質 FixL における分子内シグナル伝達機構の解析, 第 18 回日本蛋白質科学会年会 (新潟)、2018 年 6 月 27 日 (ポスター発表))
- I-9. 西永恵、杉本宏、村木則文、青野重利、城宜嗣、澤井仁美: ヘムセンサータンパク質 PefR における転写調節の分子メカニズム, 第 18 回日本蛋白質科学会年会 (新潟)、2018 年 6 月 27 日 (ポスター発表)
- I-10. M. Ganasen, H. Fujishiro, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, S. Himeno, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai: Structure-guided Functional Analysis of Human Ferric Reductase Using Living Cells, Gordon Research Conference: 2018 Chemistry and Biology of Tetrapyrroles (Newport), Jul. 15-20, 2018 (ポスター発表)
- I-11. K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, and Y. Sugita: Computational Modeling of the Outward-facing Form and the Occluded Intermediate of a Heme Importer with Bound Nucleotides, 256th American Chemical Society National Meeting (Boston), Aug. 19-23, 2018 (ポスター発表)
- I-12. 田村康一、杉本宏、城宜嗣、杉田有治: 分子シミュレーションによるヘムインポーターの化学-力学共役機構の解明、第 56 回日本生物物理学会年会 (岡山)、2018 年 9 月 17 日 (ポスター発表)
- I-13. M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, T. Urano, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: Understanding the Mechanism of Dietary Iron Absorption at the Atomic level, 第 91 回日本生化学会年会 (京都)、2018 年 9 月 26 日 (ポスター発表)

- I-14. 鎌屋 美咲, 杉本 宏, 城 宜嗣, 澤井 仁美: ダイズ根粒菌由来酸素センサータンパク質 FixL のタンデム PAS ドメインにおけるシグナル伝達機構、第 91 回日本生化学会年会 (京都)、2018 年 9 月 26 日 (ポスター発表)
- I-15. 西永恵、長井聖奈、村木則文、青野重利、城宜嗣、杉本宏、澤井仁美: ヘムセンサータンパク質のヘムの結合に伴う構造変化、第 91 回日本生化学会年会 (京都)、2018 年 9 月 26 日 (ポスター発表)
- I-16. 杉本宏, Menega Ganasen, 富樫ひろ美, 武田英恵, 朝倉帆南, 山下恵太郎, 平田邦生, A. Grant Mauk, 城宜嗣, 澤井仁美: 小腸上皮細胞膜で機能する鉄還元酵素 Dcytb の結晶構造、平成 30 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 (鳥取)、2018 年 11 月 23-24 日 (ポスター発表)
- I-17. H. Sugimoto, M. Ganesen, H. Togashi, H. Takeda, H. Asakura, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai: Structural basis of ascorbate-dependent iron reduction by human duodenal cytochrome b (Dcytb) involved in intestinal iron absorption, Asian Crystallographic Association Conference (Auckland), Dec. 2-5, 2018 (ポスター発表)
- I-18. M. Nishinaga, S. Nagai, S. Nagatoishi, N. Muraki, S. Aono, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto, and H. Sawai: Structural Basis for Transcriptional Regulation of a Novel Heme Sensor Protein in Pathogenic Bacteria, 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC9) (Singapore), Dec. 9 – 13, 2018 (ポスター発表)
- II-1 R. Yamaguchi, H. Furutachi, S. Shiotsuki, X. Zhang, T. Ishikawa, S. Akine, T. Tosha, S. Fujinami, M. Suzuki and T. Kitagawa, Synthesis and Crystal Structure of the Bis( $\square$ -hydroxo)diiron(II) Complex with Tridentate Ligands Having a Sterically Bulky Imidazolyl Group, *X-ray Structure Analysis Online* 35, 27-29 (2019)
- II-2 Y. Furukawa, C. T. Lim, T. Tosha, K. Yoshida, T. Hagai, S. Akiyama, S. Watanabe, K. Nakagome and Y. Shiro: Identification of a novel zinc-binding protein, Clorf123, as an interactor with a heavy metal-associated domain, *PLoS One*, 13, e0204355 (2018)
- II-3 M. Kato, S. Nakagawa, T. Tosha, Y. Shiro, Y. Masuda, K. Nakata and I. Yagi: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under Electrochemical Control Using a Vibrational Probe of Carbon Monoxide, *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 5196-5200 (2018)
- II-4 T. Tosha and Y. Shiro: Structure and Function of Membrane-bound Bacterial Nitric Oxide Reductases, in *Dioxygen-dependent Heme Enzymes* (Royal Society of Chemistry Metallobiology Series No. 13), M. Ikeda-Saito and E. Raven Ed., p334-350 (2019)
- II-5 H. Sugimoto: Structure analysis of radiation-sensitive NO-bound state of cytochrome P450nor using XFEL at SACLA, 10th International workshop on X-ray radiation damage to biological samples (Upton, USA), Sep. 13-14, 2018 (招待講演)
- II-6 T. Tosha, E. Terasaka, K. Yamada, P.-H. Wang, H. Arai, H. Sugimoto, Y. Sugita and Y. Shiro: Nitric Oxide Dynamics Controlled by Formation of Protein Complex in Denitrification, 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC9), Singapore, Dec. 9-13, 2018 (招待講演)

- II-7 T. Tosha: Regulation of nitric oxide dynamics in microbial denitrification, The International Symposium on Bioinorganic Chemistry 2018, Okazaki, Japan, Nov. 30-Dec. 1, 2018 (招待講演)
- II-8 T. Tosha, H. Takeda, T. Nomura, T. Kimura, M. Kubo and Y. Shiro: Elucidation of Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction, 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC), Sendai, Japan, Jul. 30-Aug. 4, 2018 (口頭発表)
- II-9 T. Tosha: Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction Proved by Time-resolved Spectroscopic Analyses, International Conference on Porphyrin and Pthalocyanines (ICPP)-10, Munich, Germany, Jul. 1-6, 2018 (招待講演)
- II-10 當舎武彦: 亜硝酸還元酵素と一酸化窒素還元酵素の複合体形成による迅速な NO 分解機構, 平成 30 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 (鳥取) 2018 年 11 月 23-24 日 (ポスター)
- II-11 野村高志, 當舎武彦, 杉本 宏, 久野玉雄, 山際来佳, Chai Gopalasingam, 山下恵太郎, 平田邦生, 山本雅貴, 城 宜嗣, 久保 稔: 時間分解赤外分光法および X 線結晶構造解析による P450<sub>nor</sub> の反応中間体の解析, 平成 30 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 (鳥取)、2018 年 11 月 23-24 日 (口頭発表)
- II-12 當舎武彦: 脱窒にみられる金属タンパク質複合体による効率的な連続化学反応, 第 56 回日本生物物理学会年会 (岡山) 2018 年 9 月 15-17 日 (招待講演)
- II-13 當舎武彦: Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction, 平成 30 年度化学系学協会東北大会 (秋田) 2018 年 9 月 15-16 日 (招待講演)
- II-14 當舎武彦 “生体システムがもつ効率的な一酸化窒素分解機構” 秋田大学工学部生命科学コース特別講演会 (秋田) 2018 年 9 月 14 日 (招待講演)
- II-15 當舎武彦 “SACLA を利用した時間分解構造解析による酵素反応の観測” 新学術領域「中分子戦略」「分子夾雑化学」ジョイントシンポジウム第 21 回生命化学研究会 (豊中) 2018 年 9 月 8 日 (招待講演)
- II-16 當舎武彦 “光解離性基質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追跡” 第 18 回日本蛋白質科学会年会 (新潟) 2018 年 6 月 26-28 日 (招待講演)

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金 (平成 29~令和 2 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
- 3 科学研究費補助金 (平成 30~令和 2 年度) 基盤研究 (B) 課題番号 18H02396  
 研究課題 生体金属イオンの輸送システムで機能する膜タンパク質の構造解析  
 研究代表者 杉本 宏



## 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。特にマンタ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タ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。

### 特許取得 Patent Application

- III-1 佐藤博樹・興梶敬典（株式会社Nextremer）：  
地震予測装置、地震予測マップ作成  
特許6397972号  
登録日 平成30年9月7日