

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

細胞および細胞小器官を取り囲む膜に存在する膜タンパク質は、物質輸送・情報交換、エネルギー産生、膜小器官の動態制御など、様々な機能を担っている。それらは細胞質のリボソームで合成され、適切なオルガネラへ局在化し、正確に膜に組み込まれ、はじめて機能構造を形成できる。我々は、膜タンパク質の小胞体、ミトコンドリア、ペルオキシソームへの局在化、並びにタンパク質膜透過チャネルを介した膜タンパク質の膜組み込み機構を研究している。本年度は以下の成果を得た。

①タンパク質がリボソームで合成されてからオルガネラ膜を透過するまでの時間経過を定量的に見積もることが可能な実験系（フォールディングプローブ、CP-EGFP）を駆使して、膜透過関連遺伝子の作用の網羅的かつ定量的な解析を進めてきた。トランスロコン関連遺伝子で、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ものを複数種見出し、相補解析を含めた、各遺伝子産物の作用解析を進めた。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を見出し、リボソーム結合性多機能シャペロン関連タンパク質因子 Zuo1p による標的化抑制作用が新たに見いだされた。また、SSZ1 欠損による標的化効率の向上の分子機構に関する解析を進めた。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、Kar2p の点変異体の発現によって、強いドミナントネガティブ作用があることが見出された。小胞体内腔の分子シャペロンネットワーク系がトランスロコン機能に影響することがさらに明らかになってきた。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、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提唱した。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することで因子は N-末端ミリスチル化酵素であることを確定した。

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

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。ビリルビンを例にとると、ビリルビンの蓄積によって黄疸を引き起こし、重症例では神経核などが障害される。血中のビリルビンは、肝細胞の類洞側細胞膜にある輸送体 (OATP1B1 および OATP1B3) によって取り込まれ、小胞体にある UDP-グルクロン酸転移酵素によってグルクロン酸抱合され、肝細胞の胆管側細胞膜にある輸送体 (ABCC2) によって排出される。これらのタンパク質の機能や局在化を正常に保つことによって、ビリルビンの体内濃度が低く保たれている。

当研究室では、排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターに焦点を当て、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 と OATP1B1 および OATP1B3 は、肝細胞において胆管側ではなく血管側の細胞膜に局在化する。同じ細胞膜であっても、このように極性の異なる局在化様式があるが、極性局在化を制御するしくみに関して全容解明から程遠いのが実状である。そこで、極性局在化の制御を明らかにする研究を進めている。

①ABCC2 の極性局在化を決定するシグナル配列の一つとして見出された、283 番目のセリンから始まる配列 (SQDAL) と結合するタンパク質を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。

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

発表論文 List of Publications

- I-1 阪口雅郎・森川真衣・高原教代・内海俊彦 (山口大学大学院)・阪上春花: 膜タンパク質の小胞体へのデフォルト標的化を抑制するシグナルと認識因子 NMT1 の解析 (ポスター)、第 42 回日本分子生物学会年会 (福岡)、2019

- I-2 松田頌子・山本良・菅公秀・吉久徹・阪口雅郎：出芽酵母トランスロコンを介したタンパク質膜透過における膜貫通型 J-タンパク質 Erj5 p の機能解析（ポスター）、第 42 回日本分子生物学会年会（福岡）、2019
- I-3 藤尾真子・高原教代・木田 祐一郎・阪口 雅郎：正電荷アミノ酸配列に依存した膜タンパク質の膜貫通セグメント形成機構の解析（ポスター）、第 42 回日本分子生物学会年会（福岡）、2019
- I-4 小坂優里菜・菅公秀・吉久徹・阪口雅郎：内腔シャペロンネットワークによる小胞体トランスロコンでの合成共役型タンパク質膜透過の制御（ポスター）、第 19 回日本蛋白質科学会年会（神戸）、2019
- I-5 森川真衣・, 高原教代・内海俊彦・阪口 雅郎：ペルオキシソーム膜タンパク質の小胞体標的化抑制（ETS）に関わる因子ミリスチル転移酵素 NMT1（ポスター）、第 71 回日本細胞生物学会大会（神戸）、2019
- II-1 衣斐義一・阪口雅郎：Cis-acting determinants control apical distribution of family C isoforms of ATP-binding cassette transporters.（ポスター）、第 71 回日本細胞生物学会・第 19 回日本蛋白質科学会年会合同大会（神戸）、2019
- II-2 衣斐義一：ABC 輸送体の極性局在化を決定するシグナル配列 —細胞膜の特定の場所にタンパク質を配達するしくみ（ポスター）、知の交流シンポジウム 2019（神戸）、2019
- II-3 衣斐義一・阪口雅郎：Distinct WXXE motif control apical localization of family C isoforms of ATP-binding cassette transporters with 12-transmembrane arrangement（ポスター）、第 42 回日本分子生物学会年会（福岡）、2019

大学院生命理学研究科

博士前期課程

小坂優里菜

中川知香

森川真衣

藤尾真子

松田頌子

科学研究費補助金等

- 1 兵庫県立大学特別研究助成金（令和元年度） 若手研究者支援

研究課題 小胞体トランスロコンによる膜タンパク質構造形成機構の解明

研究代表者 藤田英伸

I ラマン分光法を用いた金属タンパク質の構造機能解析

Raman spectroscopic analysis of metalloproteins

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・北川禎三

Kubo, M., Yanagisawa, S., Yamada, D., 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密に制御することによって機能している。当講座では、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、金属結合部位やリガンドの構造・電子状態を、ラマン分光を用いて解析している。特にミトコンドリア呼吸系で働くチトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の阻害剤や活性調節因子の作用機序をラマン分光で解析し、金属中心近傍で起こる構造変化を捉えた。また、種々の金属タンパク質のモデル錯体の活性種をラマン分光で解析した。

II 酵素反応の SACLA 時間分解構造解析

Time-resolved structural analysis of enzymatic reactions using SACLA

久保 稔・柳澤幸子・山田大智

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

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、当講座では、X 線自由電子レーザー-SACLA と、光励起により基質を放出するケージド化合物を組み合わせた時間分解 X 線結晶構造解析を世界に先駆けて行なっている。チトクロム P450_{nor}、チトクロム P450、CcO 等のヘム酵素が研究対象である。特にチトクロム P450_{nor} においては、ケージド NO を利用して中間体の構造を高分解能で捉えることに成功した。チトクロム P450 や CcO においては、ケージド O₂ を利用した反応系を構築している。一方、新規ロドプシン類や光駆動型イオンポンプの研究を開始し、微結晶中の反応解析を行なった。

III 酵素反応の時間分解振動分光解析

Time-resolved vibrational analysis of enzymatic reactions

久保 稔・柳澤幸子・山田大智

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

時間分解ラマン・赤外分光を用いて、(時間分解 X 線結晶構造解析の分解能では解析できない) 酵素反応中間体の電子状態や化学状態の変化を精密に解析し、酵素反応機構の物理化学的理解を目指している。チトクロム P450_{nor} を始めとした NO を還元するヘム酵素や Trp を代謝するヘム酵素が主な研究対象であり、ケージド化合物を用いた光誘起時間分解ラマン・赤外分光装置やストップフローラマン分光装置を立ち上げている。ストップフローラマン分光装置が完成したところである。また、青色光を用いて損傷 DNA を修復する酵素 (6-4 フォトリアーゼ、および CraCRY) の研究を新たに開始した。両酵素の発現・精製系を構築し、6-4 フォトリアーゼにおいては、青色光 (1 光子) 吸収後の長寿命中間体を時間分解紫外吸収分光で捉えた。

IV 膜タンパク質の構造機能解析に向けた表面増強

赤外分光装置の開発

Development of the SEIRAS system for functional analysis of membrane proteins

久保 稔・山田大智
Kubo, M., Yamada, D.

膜タンパク質の構造解析と機能解析を同時に行える表面増強赤外分光装置の開発に着手した。この装置では、金表面に膜タンパク質を吸着させて、表面敏感な赤外分光測定を行なう。温度依存性イオンチャネル (TRP チャネル) が研究対象である。金薄膜の調製に成功したところである。

発表論文 List of Publication

- I-1 Kokubo, Y. (愛知工業大), Wasada-Tsutsui, Y. (名古屋工業大), Yomura, S. (名古屋工業大), Yanagisawa, S., Kubo, M., Kugimiya, S. (愛知工業大), Kajita, Y. (愛知工業大), Ozawa, T. (名古屋工業大), Masuda, H. (名古屋工業大): Syntheses, characterizations, and crystal Structures of dinitrogen-divanadium complexes bearing triamidoamine ligands, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2020, 1456-1464 (2020).
- I-2 Kadoya, Y. (同志社大), Fukui, K. (同志社大), Hata, M. (同志社大), Miyano, R. (同志社大), Hitomi, Y. (同志社大), Yanagisawa, S., Kubo, M., Koder, M. (同志社大): Oxidative DNA cleavage, formation of μ -1,1-hydroperoxo species, and cytotoxicity of dicopper(II) complex supported by a p-cresol-derived amide-tether ligand, *Inorg. Chem.*, 58, 14294-14298 (2019).
- I-3 Kotani, H. (筑波大), Shimomura, H. (筑波大), Horimoto, M. (筑波大), Ishizuka, T. (筑波大), Shiota, Y. (九州大), Yoshizawa, K. (九州大), Yanagisawa, S., Kawahara-Nakagawa, Y., Kubo, M., Kojima, T. (筑波大): Fundamental electron-transfer and proton-coupled electron-transfer properties of Ru(IV)-oxo complexes, *Dalton Trans.*, 48, 13154-13161 (2019).
- I-4 Yanagisawa, S.: Visible resonance Raman study on respiratory supercomplex from bovine heart mitochondria, 7th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-7) (Ontario, Canada), May 22, 2019 (招待講演).

- II-1 Wolff, A. M. (UCSF), Kubo, M., Nomura, T., Fraser, J. S. (UCSF), Thompson, M. C. (UCSF) et al.: Comparing serial X-ray crystallography and microcrystal electron diffraction (MicroED) as methods for routine structure determination from small macromolecular crystals, *IUCrJ*, 7, 306-323 (2020).
- II-2 Suga, M. (岡山大), Akita, F. (岡山大), Yamashita, K. (理研), Nakajima, Y. (岡山大), Ueno, G. (理研), Li, H., Yamane, T. (岡山大), Hirata, K. (理研), Umena, Y. (岡山大), Yonekura, S. (岡山大), Yu, L.-J. (岡山大), Murakami, H. (JASRI), Nomura, T., Kimura, T. (神戸大), Kubo, M., Baba, S. (JASRI), Kumasaka, T. (JASRI), Tono, K. (理研), Yabashi, M. (理研), Isobe, H. (岡山大), Yamaguchi, K. (大阪大), Yamamoto, M. (理研), Ago, H. (理研), Shen, J.-R. (岡山大): An oxyl/oxo mechanism for oxygen-oxygen coupling in PSII revealed by an X-ray free electron laser, *Science*, 366, 334-338 (2019).
- II-3 Nango, E.* (京都大), Kubo, M.*, Tono, K. (理研), Iwata, S. (京都大): Pump-probe time-resolved serial femtosecond crystallography at SACLA: Current status and data collection strategies, *Appl. Sci.*, 9, 5505 (2019).
- II-4 當舎武彦 (理研), 久保稔: SACLA を利用した酵素反応の可視化、*生物物理*, 59, 205-207 (2019).
- II-5 久保稔: SACLA を用いたタンパク質の動的構造生物学、光・量子デバイス研究会“医療・バイオ応用を目指したナノ構造・ナノ界面”(姫路)、2020年1月8日(招待講演)。
- II-6 久保稔: XFEL 結晶構造解析と振動分光法を用いたタンパク質の動的精密構造解析、鳥取大学 GSC セミナー (鳥取)、2019年9月27日(招待講演)。
- II-7 久保稔: XFEL と赤外レーザーを用いた酵素反応中間体の時間分解計測。第13回バイオ関連化学シンポジウム“フォーカスドセッション: 先端分光分析・計算科学を活用したバイオ関連化学最前線”(仙台)、2019年9月5日(招待講演)。
- II-8 高坂瞭汰、山本直輝、當舎武彦 (理研)、有安真也 (名古屋大)、荘司長三 (名古屋大)、久保 稔: Caged-O₂ を用いた P450BM3 酸素化型中間体の調製法の検討、CREST「革新的触媒」2019年度全体チーム会議(博多)、2019年10月12日(ポスター)。
- III-1 Kubo, M.: Time-resolved spectroscopic analysis of the enzymatic reaction dynamics of NO reductase, 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15) (Nara, Japan), June 5, 2019 (招待講演)。
- III-2 Kubo, M.: Catalytic reaction dynamics of NO reductase probed by flow-flash vibrational spectroscopy, 7th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-7) (Ontario, Canada), May 23, 2019 (招待講演)。
- III-3 久保稔: Catalytic reaction dynamics of NO reductase probed by time-resolved spectroscopies、第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 シンポジウム“最先端の実験科学と計算科学が明らかにする膜タンパク質の精緻な反応機構”(神戸)、2019年6月26日(招待講演)。
- III-4 久保稔: タンパク質の動的構造と機能、第46回生体分子科学討論会(筑波)、2019年6月22日(招待講演)。
- III-5 Yanagisawa, S., Kayama, K., Hara, M., Sugimoto, H. (理研), Shiro, Y., Ogura, T.: UV Resonance Raman Characterization of a Substrate Bound to Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1, *Biophys. J.*, 117, 706-716 (2019).
- III-6 Yamada, D., Nomura, T., Nakajima, Y., Kubo, M.: Time-resolved spectroscopic study on photoreaction of (6-4) photolyase, The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Miyazaki, Japan) Sep 24, 2019.
- III-7 山田大智: 分光法による光受容タンパク質の分子メカニズム研究、第35回XFEL構造生物ミーティング(SACLA)、2019年7月24日(招待講演)。
- III-8 Yamada, D., Nomura, T., Nakajima, Y., Kubo, M.: 光受容タンパク質における時間分解分光解析、令和元年度 新学術領域研究「高速分子動画」キックオフミーティング・膜タンパク質研究会(淡路)、2019年10月7日。

III-9 山田大智：分光法による DNA 光修復酵素の分子メカニズム研究、兵庫県立大学城研究
室セミナー（研究Ⅱ期棟）、2019年10月21日（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

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（令和 1～5 年度）新学術領域「高速分子動画」課題番号：19H05784
研究課題 時間分解構造解析を補完する精密顕微分光計測
研究代表者 久保 稔
- 2 科学研究費補助金（令和 1～3 年度）基盤研究(B) 課題番号：19H03171
研究課題 新規時間分解計測手法を用いた呼吸系エネルギー変換機構の解明
研究代表者 久保 稔
- 3 理化学研究所 Pioneering Project（平成 28～令和 2 年度）
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 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 CREST「革新的触媒」研究領域（令和 1
～2 年度：5 年プロジェクトの最後の 2 年間に参加）
研究課題 生体触媒の誤作動状態を利用するメタンの直接的メタノール変換
研究代表者 荘司長三（名古屋大学）
研究分担者 久保 稔
- 5 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 CREST「構造生命」研究領域（令和 1 年
度：5 年プロジェクトの最後の 1 年間に参加）
研究課題 新たなる臓器保護剤の開発に向けた ATP 産生制御の構造生命科学
研究代表者 高島成二（大阪大学）
研究分担者 久保 稔
- 6 科学研究費補助金（令和 1～3 年度）基盤研究(C) 課題番号：19K05698
研究課題 ストップフロー共鳴ラマン分光法によるヘム含有 2 原子酸素添加
酵素の反応機構研究
研究代表者 柳澤幸子
- 7 科学研究費補助金（平成 29～令和 1 年度）若手研究(B) 課題番号：17K15103
研究課題 データベース及び実験的手法を用いた光回復酵素/クリプトクロムフ
ァミリーの機能解析
研究代表者 山田大智

- 8 科学研究費補助金（平成 29～令和 1 年度）基盤研究(C) 課題番号: 17K05606
研究課題 ヘモグロビン共同性発現へのタンパク質の大振幅ゆらぎと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
- 9 公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団 教育研究助成（令和 1 年度）
研究課題 時分割紫外可視分光法を用いた(6-4)光回復酵素の反応機構解明
研究代表者 山田大智
- 10 兵庫県立大学 令和元年度特別研究助成金（若手研究者の研究支援）（令和 1 年度）
研究課題 表面増強赤外分光法を用いた不安定な蛋白質への構造変化解析
研究代表者 山田大智

I 微生物の細胞機能を維持するタンパク質群のX線構造化学

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

西川幸志・柴田直樹・樋口芳樹
Nishikawa, K., 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。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。また、 NAD^+ - NADH 変換機能をもつ酵素や膜内電子伝達タンパク質との複合体ヒドロゲナーゼ、さらに、それらの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。一方、ヒドロゲナーゼの基質（水素）をラマン分光法で直接分析することにより酵素活性を測定する新規の活性定量方法を開発している。これは、気体分子を基質とする酵素全般に応用可能である。

ビタミン B_{12} 補酵素（Co原子含有）の関与するジオールデヒドラターゼやエタノールアミンアンモニアラ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。

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のX線構造化学的研究を進めている。

II 高等生物細胞のタンパク質間相互作用のX線構造生物学

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

柴田直樹・西川幸志・樋口芳樹
Shibata, N., 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。

味覚は味覚受容体タンパク質に味物質が結合すると構造変化が起こり、そのシグナルが伝達される。極めて低濃度で甘味受容体を活性化し、ショ糖の代替物としての利用が期待されている甘味タンパク質について構造生物学研究を行っている。

細胞は外界の変化に応答して代謝や増殖を調節するためのシグナル伝達機構をもっている。本研究室ではWntシグナル伝達経路のうち、特に 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 K. Yamanishi, W. Kumano, S. Terawaki, Y. Higuchi, N. Shibata: Head-to-Tail Complex of Dishevelled and Axin-DIX Domains: Expression, Purification, Crystallographic Studies and Packing Analysis, *Protein Pept. Lett.*, **26(10)**, 792-797 (2019)
- I-2 H. Tai, K. Nishikawa, Y. Higuchi, Z. W. Mao, S. Hirota: Cysteine SH and Glutamate COOH Contributions to [NiFe] Hydrogenase Proton Transfer Revealed by Highly Sensitive FTIR Spectroscopy, *Angew Chem Int Ed Engl*, **58(38)**, 13285-13290 (2019)
- I-3 K. Nishikawa, H. Ogata, Y. Higuchi: Structural Basis of the Function of [NiFe]-hydrogenases, *Chemistry Letters*, **49(2)**, 164-173 (2019)
- I-4 Y. K. Nakagawa, K. Nishikawa, S. Nakashima, S. Inoue, T. Ohta, T. Ogura, Y. Shigeta, K. Fukutani, T. Yagi, Y. Higuchi: New Assay Method Based on Raman Spectroscopy for Enzymes Reacting with Gaseous Substrates, *Protein Science*, **28**, 663-670 (2019)
- I-5 Y. Shomura and Y. Higuchi: NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase, *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 1-11 (2019)
- I-6 根来誠司, 武尾正弘, 柴田直樹, 樋口芳樹, 加藤太郎, 重田育照: ナイロン分解酵素 NylB の構造進化, 触媒機構とアミド合成への応用, *月刊バイオインダストリー*, **6** (2019)
- I-7 Y. Higuchi: Role of water network for O₂-stability of [NiFe]-hydrogenases, 12th International Conference on Hydrogenases, 2019/4/1, Universidade Nova de Lisboa (Lisbon, Portugal) 【招待講演】
- I-8 ○T. Tamada, T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, Y. Hirano, Y. Higuchi: Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, 12th International Conference on Hydrogenases, 2019/4/1, Universidade Nova de Lisboa (Lisbon, Portugal) 【ポスター発表】
- I-9 西川幸志: ラマン散乱を利用したヒドロゲナーゼ活性測定法の開発, 新学術領域「ハイドロジェノミクス」第3回若手育成スクール, 2019/5/17, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都, 東京都) 【招待講演】
- I-10 ○玉田太郎, 廣本武史, 西川幸志, 井上誠也, 平野優, 樋口芳樹: *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子回折実験, 第19回日本蛋白質科学会年会第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/24, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- I-11 樋口芳樹: 生物酵素・ヒドロゲナーゼにおける水素合成・活性化触媒反応機構の構造化学, cat-DVD 研究会, 2019/7/19, BIZ SPACE 姫路 (姫路市, 兵庫県) 【招待講演】
- I-12 ○T. Imanishi, H. Matsuura, H. Hasuike, T. Hiromoto, Y. Higuchi: Expression, purification and crystallization of HybA in Hyb-type [NiFe]-hydrogenase, The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, 2019/10/18, 大阪大学 (吹田市, 大阪府) 【ポスター発表】
- I-13 ○T. Hiromoto, K. Nishikawa, H. Matsuura, Y. Hirano, K. Kusaka, M. Cuneo, T. Tamada, Y. Higuchi: Neutron diffraction experiments on [NiFe]-hydrogenase reduced under H₂ atmosphere, The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, 2019/10/19, 大阪大学 (吹田市, 大阪府) 【ポスター発表】
- I-14 ○西川幸志, 井上翔太, 樋口芳樹: 酸化に伴う[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性部位と FeS クラスターの構造変化の関連について, 日本結晶学会 2019 年度年会, 2019/11/19, 金沢市文化ホール (金沢市, 石川県) 【ポスター発表】
- I-15 ○井上翔太, 西川幸志, 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼにおける近位[FeS]クラスターの構造変化について, 日本結晶学会 2019 年度年会, 2019/11/19, 金沢市文化ホール (金沢市, 石川県) 【ポスター発表】
- I-16 ○玉田太郎, 廣本武史, 西川幸志, 井上誠也, 平野優, 樋口芳樹: *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子回折実験, 日本結晶学会 2019 年度年会, 2019/11/20, 金沢市文化ホール (金沢市, 石川県) 【ポスター発表】
- I-17 Y. Higuchi: Structural Studies on [NiFe]-hydrogenases, 3rd International Solar Fuels Conference/International Conference on Artificial Photosynthesis-2019, 2019/11/21, 広島コンベンションホール (広島市, 広島県) 【招待講演】
- I-18 K. Nishikawa, Y. Kawahara, S. Inoue, T. Chuji, S. Nakashima, Y. Shigeta, K. Fukutani, ○Y. Higuchi: New Assay Method for the Enzymes Reacting with Gaseous Substrates by Raman

- Spectroscopy, 1st International Symposium “Hydrogenomics” combines with 14th International Symposium Hydrogen & Energy, 2020/1/6, ホテルモントレーエーデルホフ札幌 (札幌市, 北海道) 【ポスター発表】
- I-19 ○K. Ishikawa, M. Shoji, Y. Hori, T. Hiromoto, Y. Higuchi, Y. Shigeta: Theoretical Analysis on Substrates of Resting Oxidized States of [NiFe]hydrogenase, 1st International Symposium “Hydrogenomics” combines with 14th International Symposium Hydrogen & Energy, 2020/1/6, ホテルモントレーエーデルホフ札幌 (札幌市, 北海道) 【ポスター発表】
- I-20 Y. Higuchi: Structural Studies on [NiFe]-hydrogenases, I²CNER International Workshop, 2020/1/31, 九州大学 (福岡市, 福岡県) 【基調講演】
- II-1 K. Yamanishi, M. Fiedler, S. Terawaki, Y. Higuchi, M. Bienz, N. Shibata: A direct heterotypic interaction between the DIX domains of Dishevelled and Axin mediates signaling to beta-catenin, *Sci. Signal.*, **12(611)**, eaaw5505 (2019)
- II-2 H. Yang, M. Yamanaka, S. Nagao, K. Yasuhara, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Protein surface charge effect on 3D domain swapping in cells for c-type cytochromes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1867(11)**, 140265-140273 (2019)
- II-3 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: Design and Properties of Domain-swapped Myoglobin Dimers with Metal-binding Sites, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/24, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- II-4 ○M. Yamanaka, S. Nagao, C. Ren, M. Zhang, A. Oda, Y. Higuchi, S. Hirota: Construction of Protein Supramolecules Based on Domain Swapping, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/25, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- II-5 ○柴田直樹, 山西勲平, Marc Fiedler, 寺脇慎一, Mariann Bienz, 樋口芳樹: Direct Interaction via the DIX Domains of Dishevelled and Axin Indices Their Colocalization and Down-regulates Wnt/beta-catenin Signaling, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 合同シンポジウム, 2019/6/26, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【招待講演】
- II-6 ○S. Terawaki, K. Wakamatsu, M. Masu, N. Shibata, Y. Higuchi: Structural basis of the molecular interaction of Axin with Coiled-coil DIX1 by heterotypic oligomerization of DIX domain, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/26, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【招待講演】
- II-7 ○M. Yamanaka, S. Nagao, C. Ren, M. Zhang, A. Oda, Y. Higuchi, S. Hirota: Construction of Protein Supramolecules Based on Domain-Swapping Mechanism, The Protein Society 2019, 2019/6/30, The Sheraton Grand Seattle (Washington, USA) 【ポスター発表】
- II-8 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: ドメインスワッピングを利用したミオグロビンへの金属結合部位への導入, 第 13 回バイオ関連化学シンポジウム, 2019/9/4, 東北大学 (仙台市, 宮城県) 【ポスター発表】
- II-9 ○R. Cahyono, 山中優, 長尾聡, 柴田直樹, 廣田俊: Domain Swapping of Azurin from *Alcaligenes xylosoxidans* and Characterization of Its Dimer, 第 13 回バイオ関連化学シンポジウム, 2019/9/6, 東北大学 (仙台市, 宮城県) 【ポスター発表】
- II-10 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: 金属結合部位を導入したドメインスワップミオグロビン 2 量体の構造と性質, 第 9 回 CSJ 化学フェスタ 2019, 2019/10/6, タワーホール船堀 (東京都, 東京都) 【ポスター発表】
- II-11 K. Yamanishi, W. Kumano, S. Terawaki, Y. Higuchi. ○N. Shibata: Structure of the head-to-tail complex of Dishevelled and Axin-DIX domains, The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, 2019/10/18, 大阪大学 (吹田市, 大阪府) 【ポスター発表】
- II-12 ○S. Idomoto, S. Nagao, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Structure and properties of domain-swapped myoglobin dimers with metal binding sites, 43rd Annual Macro Symposium, 2019/10/24, University of Michigan (Michigan, USA) 【ポスター発表】
- II-13 ○長尾聡, 井戸本彩花, 須田綾香, 小林紀, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: タンパク質超分子構築のためのドメインスワッピングにおけるヒンジ領域のアミノ酸配列設計, 日本化学会第 100 春季年会, 2020/3/23, 東京理科大学野田キャンパス (野田市, 千葉県) 【口頭発表】

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

- 松浦滉明： Spectroscopic and crystallographic studies on [NiFe]-hydrogenase
今垣隆浩： Structural and biochemical studies on Hyb-type [NiFe]-hydrogenase

生命科学専攻

博士前期課程

- 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
池田智紀： 中性子結晶解析を目指した還元型ヒドロゲナーゼの大型結晶の調製
大濱 凜： 4量体[NiFe]ヒドロゲナーゼ構成サブユニットの大腸菌発現系の構築
中地隆文： ラマン分光法を用いたヒドロゲナーゼの触媒反応の解析
吉村日向： 細胞の増殖を亢進する DKK-CKAP4 シグナルの構造生物学的研究

科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金（平成 30 年度～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 年度～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. 科学研究費補助金（令和元年度～令和 5 年度）基盤研究(A) 課題番号：19H00984
研究課題：ヒドロゲナーゼの触媒反応機構と高効率プロトン伝達機構の構造基盤解明
研究代表者 樋口芳樹
4. 公益財団法人 ひょうご科学技術協会（平成 31 年度（令和元年度））学術研究助成
研究課題：がん細胞増殖シグナルを活性化するタンパク質複合体の構造生物学
研究代表者 柴田直樹
5. 木下基礎科学研究基金助成金（令和元年度）
研究課題：ヒドロゲナーゼの反応機構解明
研究代表者 西川幸志

I 一酸化窒素還元酵素の構造と機能

Structural and Functional Studies on Nitric Oxide Reductases

城 宜嗣・村本和優・澤井仁美
Shiro, Y., Muramoto, K., Sawai, H.

一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、微生物の嫌気呼吸の一種である脱窒において、中間体として産生される一酸化窒素 NO を亜酸化窒素 N_2O に変換する酵素である。呼吸酵素の分子進化との関係や、地球温暖化・オゾン層破壊などの環境科学との関連、さらには抗菌薬開発などで注目されている酵素である。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* RM495) 由来のチトクロム c 依存型 NOR (*PacNOR*) と NO との反応は μ 秒からミリ秒の時間領域で 3 段階の反応である事を昨年度に提案した。この際に現れる 2 つの短寿命反応中間体について、第一の反応中間体では、NO の伸縮振動が 1683 cm^{-1} に観測され、caged NO の低温光分解とアニーリングを組み合わせた ESR 測定で $g=4$ のシグナルが観測された事から、非ヘム鉄に一分子の NO が結合した構造と決定した。第二の反応中間体ではその NO がヘム鉄に移動した構造であることを決定し、これらの結果を基に、*PacNOR* による NO 還元反応機構を提案した。また、*PacNOR* の電子伝達特性を調べるため、電子供与体 (チトクロム c_{551}) の変異体を作製し、*PacNOR* によるチトクロム c_{551} 酸化反応の速度論的解析を進めた。

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来のキノール依存性 NOR (*NmqNOR*) の単量体亜鉛結合構造を X 線結晶解析により 3.15 \AA 分解能で、2 量体構造を電子顕微鏡単粒子解析により 3.06 \AA 分解能で決定し、論文で報告した。決定された構造に基づき、プロトン輸送機構、亜鉛による活性阻害機構、2 量体化による活性化機構の解析を進めた。*NmqNOR* と阻害剤 (キノールアナログ分子) の結合構造決定に向けて、阻害剤処理した *NmqNOR* の結晶化と X 線回折測定、ならびに電子顕微鏡像測定に取り組んだ。

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ゲナーゼにより触媒される。しかし、ニトロゲナーゼは酸素に対して不安定な為、酸素センサータンパク質 FixL/FixJ が酸素濃度を感知し、ニトロゲナーゼの発現を遺伝子レベルで調節している。FixL は酸素センサードメインとヒスチジンキナーゼドメインを有し、低酸素濃度を酸素センサー部

位が感知した際に、ATP のリン酸基を用いて自己の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、ヘムに配位子が結合していない状態 (2.95 Å 分解能)、酸素ホモログとして機能するイミダゾール結合型 (2.85 Å) とシアンイオン結合型 (2.70 Å) の立体構造解析に成功した。これらの構造を比較することにより、酸素感知は局所的で小さな構造変化によることを明らかにした。また、これらの構造をもとに部位特異的変異体解析を行った結果、ヘム鉄へのリガンドの結合/解離に伴ってヘム周辺のアミノ酸側鎖の向きが変化すると、それに連なる二量体界面の構造変化が誘起され、ヘム結合ドメインの配置を歪ませることにより分子内で情報が伝達されることが示唆された。

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で検討できる「ヒト腸管モデル細胞系」を構築した。この細胞系に、ヒト由来 *Dcytb* の X 線結晶構造から鉄還元反応の促進に重要と推定されたアミノ酸残基の変異体を発現させ、細胞内に取り込まれた鉄イオンを定量することに成功した。さらに、DMT1 による金属輸送メカニズムの原子レベルでの解明を目指して、DMT1 の発現精製法を検討している。

ヒトだけでなく病原菌（溶血性連鎖球菌）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。さらに、各種分光解析により、ヘム結合型は一酸化炭素 (CO) を安定に結合できることを明らかにした。溶血性連鎖球菌が、宿主動物の赤血球を溶血しヘムが放出されると、ヘム分解反応により CO が放出される。その CO は菌体の死滅や休眠を招くため、ヘム結合型は CO による細胞毒性を回避するために機能している可能性があることを提案した。

IV 呼吸鎖末端酵素の構造と機能

Structural and Functional Studies on Respiratory Terminal Enzymes

村本和優
Muramoto, K.

呼吸鎖電子伝達系末端酵素であるヘム・銅酸素還元酵素 (HCOR) スーパーファミリーを対象として効率的なエネルギー変換機構の解明を目指して研究を進めてきた。ウシミトコンドリア由来 A タイプ HCOR について、酵素単量体とリン脂質の 1.85 Å 分解能構造、および 2 量体化による不活性化機構とリン脂質を介した超複合体形成機構を論文で報告した。酸素還元反応中間体のひとつである F 型の構造を 1.8 Å 分解能で決定し、論文で報告した。酸素還元反応中間体のひとつである O 型構造の 1.6 Å 分解能での解析を進めた。酵素 2 量体構造の 1.3 Å 分解能での解析を進めた。

発表論文 List of Publications

- I -1 S. Yanagisawa, K. Kayama, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura: "UV-Raman Characterization of a Substrate Tryptophan Bound to Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1" *Biophys. J.* **117**, 706-716 (2019) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.017>
- I -2 C. Gopalasingam, G. Chiduzu, T. Tosha, M. Yamamoto, Y. Shiro, S. V. Antonyuk, S. Muench, S. S. Hasnain: "Structure of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* by Cryo-electron microscopy" *Sci. Adv.* **5** eaax1803 (2019) DOI: 10.1126/sciadv.aax1803
- I -3 E. Sakakibara, Y. Shisaka, H. Onoda, D. Koga, Ning Xu, T. Ono, Y. Hisaeda, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, Y. Watanabe, O. Shoji: "Highly Malleable Haem-binding Site of the Haemoprotein HasA Permits Stable Accommodation of Bulky Tetraphenylporphycenes" *RSC Advances* **9**, 18697-18702 (2019) DOI: 10.1039/c9ra02872b
- I -4 K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Sugita: "Chemomechanical Coupling in the Transport Cycle of a Type II ABC Transporter" *J. Phys. Chem. B* **123**, 7270-7281 (2019) DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b04356
- I -5 Y. Shisaka, Y. Iwai, S. Yamada, H. Uehara, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, J. K. Stanfield, K. Ogawa, Y. Watanabe, O. Shoji: "Hijacking the haem acquisition system of *Pseudomonas aeruginosa* for antimicrobial delivery" *ACS Chemical Biology* **14**, 1637-1642 (2019) DOI: 10.1021/acscchembio.9b00373
- I -6 K. Yoshitani, E. Ishii, K. Taniguchi, H. Sugimoto, Y. Shiro, 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." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**, 684 (2019)
- I -7 M. A. M. Jamali, C. C. Gopalasingam, R. M. Johnson, T. Tosha, K. Muramoto, S. P. Muench, S. V. Antonyuk, Y. Shiro and S. S. Hasnain. "The active form of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Neisseria meningitidis* is a dimer." *IUCr J* **7**, 404-415 (2020)
<https://doi.org/10.1107/S2052252520003656>.

- I -8 Y. Shiro: "Dynamics of Nitric Oxide in Bacterial Cellular Systems: NO Generation and Decomposition" *Japan-BIOCEV Symposium: Macromolecules; Structure, Function and Beyond*, Prague, Czech, Apr. 23 (2019)
- I -9 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Direct Benzene Hydroxylation Catalyzed by Wild-type Cytochrome P450BM3 with Novel Decoy Molecules", *The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2019)*, Osaka, Japan, May 31- June 1 (2019)
- I -10 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Engineering of Enzymatic Activity Achieved By Employing Newly Screened Peptide-Like Molecules" *15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15)*, Nara, June 2-5 (2019)
- I -11 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, T. Tosha, Y. Shiro, M. Kubo: "NO-binding and Protonation Process in the Catalytic Reaction of Heme/non-heme Iron Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System" *15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15)*, Nara, June 2-5 (2019)
- I -12 K. Omura, Y. Aiba, A. Matsumoto, J. K. Stanfield, H. Onoda, S. Ariyasu, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Oxygen Activation by Self-sufficient Cytochrome P450 Reconstituted with Manganese Porphyrin" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -13 Y. Shisaka, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Specific Photosterilization of *Pseudomonas Aeruginosa* Exploiting Its Heme Acquisition System" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -14 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Screening of N-substituted dipeptides for Activation of Cytochrome P450BM3" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -15 T. Tosha, T. Nomura, H. Takeda, T. Kimura, H. Sugimoto, M. Kubo, Y. Shiro: "Mechanism of P450_{nor}-Catalyzed NO Reduction Proved by Time-Resolved Spectroscopic and Crystallographic Analyses" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -16 城 宜嗣 「分子構造を基盤にしたヘムタンパク質の機能解明～生命金属科学への展開をめざして～」 錯体化学会第69回討論会 貢献賞受賞講演 2019年9月22日、名古屋
- I -17 當舎武彦、山際来佳、倉橋拓也、新井博之、杉本宏、城宜嗣 "Functional Roles of Conserved Residues near the Active Site of Nitric Oxide Reductase Based on the Structural Analysis" 日本生物物理学会第57会年会、2019年9月24日-26日、宮崎
- I -18 武田英恵、木村哲就、野村高志、當舎武彦、城宜嗣、久保稔 "NO-binding and Protonation Process in the Catalytic Reaction of the Bacterial Nitric Oxide Reductase as Established by Time-Resolved Spectroscopy" 日本生物物理学会第57会年会、2019年9月24日-26日、宮崎
- I -19 M. Arif M. Jamali, C.C. Gopalasingam, R.M. Johnson, S.P. Muench, S.V. Antonyuk, S.S. Hasnain, T. Tosha, K. Muramoto, Y. Shiro: "Crystallographic and CryoEM Structures of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductases from *Neisseria meningitidis*" *International Symposium on Diffraction Structure*

- Biology*, Osaka, Japan, Oct. 17-20 (2019)
- I -20 Y. Shiro: “Dynamics of Nitric Oxide in Cellular Systems: NO Generation and Decomposition” *Korean-Taiwan-Japan Bioinorganic Chemistry Symposium 2019 (KTJ-BICS 2019)*, Taichung, Taiwan Nov. 12 -14 (2019)
- I -21 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: “Regulation of the Reaction Site of Cytochrome P450BM3 with Peptide Derivatives” *4th International Symposium on Precisely Designed Catalysts with Customized Scaffolding*, Nara, Dec. 3-5 (2019)
- I -22 M. Arif M. Jamali, C.C. Gopalasingam, R.M. Johnson, S.P. Muench, S.V. Antonyuk, S.S. Hasnain, T. Tosha, K. Muramoto and Y. Shiro. “Crystallographic and cryoEM structures of quinol-dependent nitric oxide reductases from *Neisseria meningitidis*.” 技術・人材マッチング交流会、兵庫県立先端科学技術センター、2019年12月12日
- II -1 H. Sawai, Y. Shiro: “Missing Piece of Two-Component Signal Transduction Systems Unveiled by SEC-SAXS” *SPring-8/SACLA Research Frontiers 2018*, Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI), 15-16, (2019)
- II -2 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 「酸素センサータンパク質FixL のセンサーモジュールの構造解析」 第19 回日本蛋白質科学会年会／第71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会、2019 年6 月24-26 日、神戸
- II -3 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 “Structural Basis for the Intramolecular Signal Transduction of Oxygen Sensor Protein FixL from *Bradyrhizobium japonicum*” 日本生物物理学会第57 会年会、2019 年 9 月24 日-26 日、宮崎
- III-1 澤井仁美 「病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサー蛋白質の多機能性とその構造的機序」 第19 回日本蛋白質科学会年会／第71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 ワークショップ「生命金属とタンパク質による細胞機能の協奏的制御」2019 年6 月24 日、神戸、招待講演
- III-2 西永恵、長井聖奈、村木則文、青野重利、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 「病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサー蛋白質の多機能性とその構造的機序」 第19 回日本蛋白質科学会年会／第71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会、2019年6 月24-26 日、神戸
- III-3 M. Ganasen, X. Yuan, H. Fujishiro, S. Himeno, A. G. Mauk, I. Hamza, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: “Structural Basis for Enhancement of Human Iron Absorption by Duodenal Membrane Proteins with Some Dietary Metal-chelators” *7th International Symposium on Metallomics*, Warsaw, Poland, July 2 (2019)
- III-4 M. Nishinaga, S. Nagai, N. Muraki, S. Nagatoishi, K. Tumoto, S. Aono, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai “Structural Basis for the Transcriptional Regulation of Heme Detoxification Involved in Pathogenic Bacterial Iron Acquisition” *7th International Symposium on Metallomics*, Warsaw, Poland, July 2 (2019)
- III-5 澤井仁美 「原子から細胞レベルの研究による鉄イオンの吸収メカニズムの理解と有効な鉄栄養強化食品成分の探索」 第92 回日本生化学会大会 シンポジウム「生体内における Singularity Elements としての生体金属の利用と制御」 2019 年9 月18 日、横浜
- III-6 澤井仁美、西永恵、長井聖奈、長門石暁、津本浩平、杉本宏、城宜嗣 「病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサータンパク質の構造機能相関の解明」 第43 回日本鉄バイオ

- サイエンス学会学術集会、2019年9月21日、京都
- III-7 城 宜嗣 “Molecular Mechanism of NO Reduction by Nitric Oxide Reductase in Cellular System” 第57回日本生物物理学会年会 シンポジウム「ヘム蛋白質の機能を司る構造・ダイナミクスとエネルギー流：実験と理論」2019年9月26日、宮崎
- III-8 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 “Structural Basis for the Intramolecular Signal Transduction of Oxygen Sensor Protein FixL from *Bradyrhizobium japonicum*” 日本生物物理学会第57回年会、2019年9月24日-26日、宮崎
- III-9 澤井仁美 「溶血性連鎖球菌が宿主の血中から鉄を獲得するシステムで機能するセンサータンパク質の多機能性に関する分子機序」 日本薬学会第140年会 環境・衛生部会若手研究者シンポジウム「生体分子およびタンパク質との相互作用から見た生命金属動態」2020年3月27日、京都、招待講演
- IV-1 A. Shimada, Y. Etoh, R. Kitoh-Fujisawa, A. Sasaki, K. Shinzawa-Ito, T. Hiromoto, E. Yamashita, K. Muramoto, T. Tsukihara, and S. Yoshikawa. X-ray structures of catalytic intermediates of cytochrome *c* oxidase provide insights into its O₂-activation and unidirectional proton-pump mechanisms. *J. Biol. Chem.* **295**, 5818-5833 (2020)
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009596>
- IV-2 Shinzawa-Itoha K, Sugimura T, Misaki T, Tadehara Y, Yamamoto S, Hanada M, Yano N, Nakagawa T, Uene S, Yamada T, Aoyama H, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S, Muramoto K. Monomeric structure of an active form of bovine cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 19945–19951 (2019) doi: 10.1073/pnas.1907183116
- IV-3 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優「ウシ心筋シトクロム酸化酵素の活性型単量体構造」日本生体エネルギー研究会第44回討論会、九州工業大学、2019年12月20日～22日
- IV-4 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優”Monomeric structure of an active form of respiratory oxygen reductase from bovine mitochondria.” 日本生物物理学会第57回年会、シーガイアコンベンションセンター、2019年9月24日～26日
- IV-5 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優「ウシ心筋シトクロム酸化酵素の活性型モノマー構造」第92回日本生化学会大会、パシフィコ横浜、2019年9月18日～20日
- IV-6 島田敦広、村本和優、伊藤・新澤恭子、月原富武、吉川信也「チトクロム酸化酵素反応中間体の構造解析による、酸素還元と共役したプロトンポンプ機構の解明」第19回日本蛋白質科学会年会、神戸国際会議場、2019年6月24日～26日

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

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

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

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 31-令和 4 年度）基盤研究 A
研究課題：時間分解構造解析を活用した一酸化窒素還元酵素の構造ダイナミクス研究
研究代表者：城 宜嗣
- 3 文部科学省科学研究費補助金（平成 31-令和 5 年度）新学術領域研究
研究課題：生命金属動態のタンパク質構造ダイナミクス
研究代表者：城 宜嗣
- 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
- 7 公益財団法人ひょうご科学技術協会学術研究助成（令和元年度）
研究課題：病原菌の鉄源としてのヘムの濃度を感知するタンパク質の分子機構解析
研究代表者：澤井仁美
- 8 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 B
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
研究分担者：澤井仁美

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.

本研究室では、生体高分子結晶の構造解析の簡便化・迅速化・高精度化、さらに解析対象の拡大を包含した「あらゆる結晶の全自動構造解析の実現」を目標とし、SPring-8 構造生物学用ビームラインの高度化研究を進めている。具体的には、1 μ m 集光ビーム（マイクロビーム）の安定運用を世界に先駆けて実現した SPring-8 のマイクロビームビームライン BL32XU を開発研究のプラットフォームとして、「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」の高度化を進めている。ZOO は、結晶試料迅速交換、X 線ビーム位置への結晶センタリング、放射線損傷と測定分解能を考慮した最適測定条件設定と回折イメージ収集、さらに複数結晶からの回折イメージ処理までも統合した自動データ収集システムである。従来、不可能であった数ミクロンの大きさの結晶や結晶クラスターからのデータ収集などを含め、多様な性状の生体高分子結晶のデータ収集を実現している。このシステムを使った大量の 2~3 ミクロンの微小結晶からの全自動データ収集・処理による微小結晶の測定・解析レベルは世界最高水準にあり、X 線結晶構造解析における高難度ターゲットである微結晶しか与えないタンパク質の構造解析を強力に推し進めている。また ZOO を備えたマイクロビームビームライン BL45XU が SPring-8 に新設され高輝度光科学研究センターによって国内外の産学の研究者への共用利用に付されている。

時空間的広がりを持つ分子機能発現過程の多面的構造解析により、機能発現の構造基盤のより深い理解を目指す相関構造解析研究に向けた技術開発の一環として、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、反応中間体の構造解析などへの応用が期待される結晶試料の *in situ* 電子状態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、ZOO を利用したメールイン自動測定やインターネット経由でビームライン機器を操作するリモートアクセス測定など、SPring-8 の遠隔利用の促進に資する効率的なユーザー利用実験環境を構築する研究開発も行なっている。

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

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。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。

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

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

発表論文 List of Publications

- I-1 S. Baba (JASRI) · A. Shimada (岐阜大) · N. Mizuno (JASRI) · J. Baba · H. Ago · M. Yamamoto · T. Kumasaka (JASRI): A temperature-controlled cold-gas humidifier and its application to protein crystals with the humid-air and glue-coating method, *J Appl Crystallogr*, 52, 699-705 (2019)
- I-2 S. Ito · G. Ueno (理研) · M. Yamamoto : DeepCentering: fully automated crystal centering using deep learning for macromolecular crystallography, *J Synchrotron Radiat*, 26, 1361-1366 (2019)
- I-3 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42回日本分子生物学会年会 (福岡市), 2019
- I-4 山本雅貴 · 平田邦生 (理研) · 山下恵太郎 (理研) · 馬場清喜 (JASRI) · 長谷川和也 (JASRI) · 坂井直樹 (理研) · 河野能顕 (理研) · 村上博則 (JASRI) · 熊坂 崇 (JARI): Development of next-generation high-throughput MX beamline at SPring-8, 2019 American Crystallographic Association Annual Meeting (Covington, Kentucky, USA), 2019
- I-5 山本雅貴 · 平田邦生 (理研) · 熊坂 崇 (JASRI): Macromolecular crystallography at SPring-8, 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology: ISDSB2019 (豊中市), 2019

- I-6 上野 剛(理研)・仲村勇樹(JASRI)・奥村英夫(JASRI)・伊藤 翔・水野伸宏(JASRI)・引間孝明(理研)・平田邦生(理研)・河野能顕(理研)・村上博則(JASRI)・馬場清喜(JASRI)・増永拓也(JASRI)・熊坂 崇(JASRI)・山本雅貴：理研構造ゲノムビームライン I&II の現状, 第 33 回日本放射光学会年会 (名古屋市), 2020
- I-7 山本雅貴：Macromolecular Crystallography Pipeline at SPring-8, 3-Way Meeting at ESRF (Grenoble, France), 2020
- II-1 C. C. Gopalasingam(リバプール大)・R. M. Johnson(リード大)・G. N. Chiduzza(リバプール大)・T. Tosha・M. Yamamoto・Y. Shiro・S. V. Antonyuk(リバプール大)・S. P. Muench(リード大)・S. S. Hasnain(リバプール大): Dimeric structures of quinol-dependent nitric oxide reductases (qNORs) revealed by cryo-electron microscopy, *Sci Adv*, 5, eaax1803 (2019)
- II-2 T. P. Halsted(リバプール大)・K. Yamashita(理研)・C. C. Gopalasingam(リバプール大)・R. T. Shenoy(リバプール大)・K. Hirata(理研)・H. Ago・G. Ueno(理研)・M. P. Blakeley(ILL)・R. R. Eady(リバプール大)・S. V. Antonyuk(リバプール大)・M. Yamamoto・S. S. Hasnain(リバプール大): Catalytically important damage-free structures of a copper nitrite reductase obtained by femtosecond X-ray laser and room-temperature neutron crystallography, *IUCrJ*, 6, 761-772 (2019)
- II-3 M. Suga(岡山大)・F. Akita(岡山大)・K. Yamashita(理研)・Y. Nakajima(岡山大)・G. Ueno(理研)・H. Li(岡山大)・T. Yamane(岡山大)・K. Hirata(理研)・Y. Umena(岡山大)・S. Yonekura(岡山大)・L. J. Yu(岡山大)・H. Murakami(JASRI)・T. Nomura(理研)・T. Kimura(神戸大)・M. Kubo(理研)・S. Baba(JASRI)・T. Kumasaka(JASRI)・K. Tono(JASRI)・M. Yabashi(理研)・H. Isobe(岡山大)・K. Yamaguchi(大阪大)・M. Yamamoto・H. Ago・J. R. Shen(岡山大): An oxyl/oxo mechanism for oxygen-oxygen coupling in PSII revealed by an x-ray free-electron laser, *Science*, 366, 334-338 (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

- (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～令和3年度)
研究課題 創薬等ライフサイエンス研究のための関連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
- (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～令和2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)
- 科学研究費補助金 (令和元～5年度) 新学術領域研究 (研究領域提案型) 課題番号: 19H05783
研究領域 高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用

領域代表 岩田 想

研究課題 動的構造解析に資する固定ターゲット微小結晶構造解析法の開発

研究代表者 山本雅貴

I ゴルジ体ストレス応答の解析

The Analysis of the Golgi Stress Response

吉田秀郎・佐々木桂奈江
Yoshida, H., Sasaki, K.

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

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試みている。これまでに、プロテオグリカン経路を制御しているエンハンサー配列として PGSE を同定し、PGSE 配列に結合してプロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF を単離した。現在は、プロテオグリカン経路を制御するセンサー分子を 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・佐々木桂奈江
Yoshida, H., Sasaki, K.

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の合成とフォールディングを司る細胞小器官であるが、細胞内の小胞体の存在量は小胞体ストレス応答と呼ばれる機構によって厳密に制御されている。小胞体ストレス応答も細胞小器官の量的調節機構の一つであり、細胞生物学の根幹に関わる名大の一つであるとともに、神経変性疾患など様々な疾患の発症と強く関連している。これまでにわれわれは、小胞体ストレス応答依存的な転写誘導を制御するエンハンサー配列 ERSE や転写因子 pATF6(N) やセンサー分子 pATF6(P)、活性型転写因子 pXBP1(S) と制御因子 pXBP1(U)、調節因子 UBC9 を同定した。これらの制御因子の機能解析と立体構造解析を並行して行うことによって、小胞体ストレス応答の分子機構をピコバイオロジーのレベルで解明する。現在は、pXBP1(U) に結合する因子 CK2 α の解析を中心に研究を進めている。

発表論文 List of Publications

- I -1 Jamaludin MI, Wakabayashi S, Taniguchi M, Sasaki K, Komori R, Kawamura H, Takase H, Sakamoto M, Yoshida H. MGSE Regulates Crosstalk from the Mucin Pathway to the TFE3 Pathway of the Golgi Stress Response. *Cell Struct Funct.* 2019 31:137-151.
- I -2 Sasaki K, Yoshida H. Golgi stress response and organelle zones. *FEBS Lett.* 2019 593:2330-2340.
- I -3 Sasaki K, Yoshida H. Organelle Zones. *Cell Struct Funct.* 2019 Aug 21;44(2):85-94.
- I -4 Kimura M, Sasaki K, Fukutani Y, Yoshida H, Ohsawa I, Yohda M, Sakurai K. Anticancer saponin OSW-1 is a novel class of selective Golgi stress inducer. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019 15:1732-1736.
- I -5 吉田秀郎 プロテオグリカン型及びムチン型糖鎖修飾を担うオルガネラ・ゾーンの増強機構 第 38 回日本糖質学会年会 (2019)
- I -6 Hiderou Yoshida ER stress response and Golgi stress response. *The Second Symposium on Cellular Response to Organelle Stress.* (2019)
- I -7 Hiderou Yoshida Golgi stress response - a homeostatic mechanism that augments functional zones in the Golgi apparatus. 第 92 回日本生化学会大会 (2019)
- I -8 吉田秀郎 小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答 第 69 回日本薬学会関西支部総会・大会 (2019)
- I -9 佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答によるゴルジ体機能ゾーンの増強機構 第 42 回日本分子生物学会年会 (2019)
- I -10 Jamaludin Mohamad Ikhwan, Hirotsada Kawamura, Hayataka Takase, Kanae Sasaki, Sadao Wakabayashi and Hiderou Yoshida Identification of MGSE as a Novel Enhancer Regulating a Crosstalk between the Mucin and TFE3 pathways in the Mammalian Golgi Stress Response. 第 42 回日本分子生物学会年会 (2019)
- I -11 小森亮太、谷口麻衣、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答 TFE3 経路の活性化機構 第 42 回日本分子生物学会年会 (2019)
- I -12 足立拓弥、渡部雄斗、櫻井香里、養王田正文、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答の新規応答経路であるコレステロール経路の解析 第 42 回日本分子生物学会年会 (2019)

- I-13 田中梓、坂本美憂、田中隆也、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答
プロテオグリカン経路を制御する転写制御配列 PGSE と転写因子 KLF family の同定 第
42 回日本分子生物学会年会 (2019)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

足立 拓弥：ゴルジ体ストレス応答のコレステロール経路による転写誘導機構の解析

田中 梓：ゴルジ体ストレス応答のプロテオグリカン経路を制御する転写因子の同定

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31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 19K06645（平成 31 年度）
研究課題 ゲノムワイド・スクリーニングによるゴルジ体ストレス応答制御因子の網羅的
同定と解析
研究代表者 吉田秀郎
- 3 科学研究費補助金（若手研究B）課題番号19K16131（平成31年度）
研究課題 ゴルジ体ストレス応答の新規応答経路を制御する因子の網羅的同定
研究代表者 佐々木桂奈江
- 4 科学研究費補助金（特別研究員奨励費）課題番号17J00067（平成31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
- 5 兵庫県立大学女性研究者研究活動助成金（平成 31 年度）
研究課題 哺乳類のゴルジ体ストレス応答ムチン経路の分子機構
研究代表者 佐々木桂奈江

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^{UAU} 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^{CAA} 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（モノソーム状態）で翻訳される。こうした mRNA の翻訳制御についても研究を進めている。特に、こうした mRNA の一部では、Puf3 という RNA 結合タンパク質の異常によって、モノソーム状態が亢進することが明らかとなった。

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、ここで用いられている運動タンパク質は微小管、アクチンといった多細胞生物と共通のものである。さまざまな原生動物を用いて、それらの特殊な運動様式の仕組みの解明を行い、それを通じて運動機構の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。

V 植物小胞体の形態形成に関与する分子機械

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

横田悦雄・吉久徹
Yokota, E., Yoshihisa, T.

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

VI その他の共同研究

Other collaborations

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

発表論文 List of Publications

- I-1 Kanai, A. (慶應大) and Yoshihisa, T.: Editorial: Current Advances in the Research of RNA Regulatory Enzymes. *Frontiers in Genetics*, **10**, e00973 (2019)
- I-2 Nagai, A., Mori, M., Shiomi, Y., and Yoshihisa, T.: How to measure absolute quantity of tRNAs. : 第 19 回日本蛋白質学会・第 71 回日本細胞生物学会合同年次大会 2019 年 (神戸国際会議場・神戸市)
- I-3 永井陽久、塩見由麻、森滉平、吉久徹 : 出芽酵母における tRNA 発現解析 : 第 21 回日本 RNA 学会 (東京大学・東京都) (2019 年)
- II-1 Hayashi, M., Mori, S. (名大) , Suzuki, T. (東大) , Suzuki, T. (東大) , and Yoshihisa, T.:

- Impact of intron removal from tRNA genes on *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **47**, 5936–5949 (2019)
- II-2 Hayashi, S., Shichino, Y. (理研), Iwasaki, S. (理研), and Yoshihisa, T.: Intron removal from tRNA^{Leu}_{CAA} genes in *S. cerevisiae*: The 24th RNA Meeting (ICE Kraków Congress Centre, Kraków, Poland) (2019)
- II-3 林紗千子、七野悠一 (理研)、池田彩乃、松井将也、鈴木健夫 (東大)、鈴木勉 (東大)、岩崎信太郎 (理研)、吉久徹: 出芽酵母におけるシステムティックな遺伝子改変をベースにした tRNA 機能の解析: 第 21 回日本 RNA 学会 (東京大学・東京都) (2019 年)
- II-4 Hayashi, S., Shichino, Y. (理研), Iwasaki, S. (理研), and Yoshihisa, T.: Ic-tRNA leads ribosome biogenesis and mitochondrial functions: 第 42 回日本分子生物学会 (福岡国際会議場・福岡市) (2019)
- III-1 岩元夏純、林紗千子、吉久徹: モノソーム集積型 mRNA の翻訳制御機構とミトコンドリアターゲティングに関する解析: 第 42 回日本分子生物学会 (福岡国際会議場・福岡市) (2019)
- III-2 松木泰子 (東北大)、松尾芳隆 (東北大)、岩崎信太郎 (理研)、横尾秀幸 (東北大)、中野裕 (東北大)、宇田川剛 (東北大)、佐伯泰 (東京医学総研)、吉久徹、田中啓二 (東京医学総研)、Nicholas Ingolia (カリフォルニア大)、稲田利文 (東北大): 小胞体ストレス応答におけるリボソームユビキチン化の新規機能: 第 42 回日本分子生物学会 (福岡国際会議場・福岡市) (2019)
- IV-1 濱野美波、松村光一、園部誠司: *Spirostomum ambiguum* の運動における微小管の役割: 日本原生生物学会第 52 回大会 (茨城大学・水戸市) (2019)
- IV-2 和田友里菜、加藤恒星、園部誠司: *Spirostomum ambiguum* の収縮に伴うマイオネームの構造変化: 日本原生生物学会第 52 回大会 (茨城大学・水戸市) (2019)
- IV-3 増田愛葵、園部誠司: *Amoeba proteus* における細胞膜とアクチンの結合: 日本原生生物学会第 52 回大会 (茨城大学・水戸市) (2019)
- V-1 上田晴子、横田悦雄、西村いくこ: 小胞体のゾーンからみる形態形成機構: 第 83 回植物学会 (東北大学・仙台市) (2019)
- VI-1 松田 頌子、山本 良、菅 公秀、吉久 徹、阪口 雅郎: 出芽酵母トランスロコンを介したタンパク質膜透過における膜貫通型 J-タンパク質 Erj5p の機能解析: 第 42 回日本分子生物学会 (福岡国際会議場・福岡市) (2019)
- VI-2 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、横田悦雄、峰雪芳宣: PPB に局在する CDK の研究: PSTAIR 抗体とタマネギ cdc2 抗体の比較: 第 83 回日本植物学会 (東北大学・仙台市) (2019)
- VI-3 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、横田悦雄、峰雪芳宣: 2 種の cdc2 抗体を使ったタマネギ PPB に局在する CDK の解析: 第 31 回日本植物形態学会 (東北大学・仙台市) (2019)
- VI-4 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、横田悦雄、峰雪芳宣: PSTAIR 抗体とタマネギ cdc2 抗体を使ったタマネギ PPB に局在する CDK の解析: 近畿植物学会 (京都大学・京都市) (2019)

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

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

井上 佳菜：Nucleoporin が形成するヒドロゲルを用いた RNA の核膜孔透過の *in vitro* 再構成

増田 愛葵：Amoeba proteus における細胞膜とアクチン繊維の相互作用

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 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
- 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)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、このような遺伝に関わる情報の維持継承の基本となる制御機構の解析として、染色体の複製を“一回のみ”に制御する機構（ライセンス化制御）について解析を進めてきた。現在、1) ライセンス化制御の中心的な因子である Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作用機構、2) 再複製の過程と細胞応答、そして、3) ゲノムの維持と制御に必須な PCNA の機能を正に負に制御する、RFC 複合体ファミリー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に Cdt1 は速やかに分解される。この時に働くのが CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼで、クロマチンにロードされた PCNA に Cdt1 が PIP ボックスを介して結合すると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。我々は、Cdt2 の C 末領域がクロマチンにロードされた PCNA による Cdt1 分解を制御することを明らかにしてきた。今回、クロマチン上の PCNA に Cdt1 および Cdt2 (CRL4 との複合体として)がリクルートされる様子をライブイメージングにて解析を始めた。PCNA-GFP を発現する安定細胞に局所的に紫外線を照射して、照射部位に PCNA が蓄積することを確認した。Cdt1-GFP も蓄積するが徐々に核内の Cdt1-GFP シグナルが低下し、30 分程度で全ての Cdt1 が分解されることを捉えることができた。今後、Cdt2(野生型)-mCherry あるいは Cdt2(C 末側変異体)-mCherry 発現細胞を作成して観察を進める。

2) 再複製の過程の解析

細胞を Cullin ファミリーユビキチンリガーゼの Nedd8 化阻害剤である MLN4924 で処理すると、通常分解されるはずのライセンス化因子 Cdt1 が蓄積し、DNA の過剰な複製が起こる。このときの DNA 合成がどのように行われるのか調べるために、EGFP を融合させた PCNA を安定的に発現する細胞で PCNA を観察した。再複製によるパターンを観察すると通常時より PCNA foci が小さく、数が多く、また、核内全体にわたり偏りなく存在していた。この foci のパターンが再複製誘導後のいつ頃現れるのか調べると、再複製誘導後 24 時間後からこのパターンが観察された。同様の様子を、Cdt2 をノックダウンして再複製を誘導した細胞でも観察した。以上の結果より、再複製誘導時の DNA 複

製は、通常時のS期複製プログラムから外れ、DNA合成が行われていると考えられた。

3) PCNAを制御するRFC複合体ファミリー、および、新規機能因子の解析

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への集合と、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。

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 Panagopoulos A (Patras 大), Taraviras S (Patras 大), Nishitani H, Lygerou Z (Patras 大):
CRL4^{Cdt2}: Coupling Genome Stability to Ubiquitination. Trends Cell Biol. 2020
Apr;30(4):290-302. doi: 10.1016/j.tcb.2020.01.005.
- 2 塩見 泰史、西谷 秀男 ヒト細胞におけるDNAからのPCNA除去機構の解析 第42回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、奈良春日野国際フォーラム、奈良市
- 3 渡邊雄一郎、林 晃世、塩見 泰史、西谷 秀男 DNA再複製誘導によるPCNA fociの核内分布の変化の解析 第42回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、奈良春日野国際フォーラム、奈良市
- 4 塩見 泰史、林 晃世、西谷 秀男 PCNAのクロマチン結合/除去と、それに連係するゲノム維持の解析 第25回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場ほか、福岡市
- 5 渡邊雄一郎、林 晃世、高原教代、塩見 泰史、西谷 秀男 DNA再複製誘導によるPCNA fociの核内パターンの変化の解析 第25回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場ほか、福岡市
- 6 林 晃世、Mazian M、貫名 康平、海老原 溪、末永 尚弘、石井 健士、高原教代、塩見 泰史、西谷 秀男 ゲノム維持に働くCRL4-Cdt2ユビキチンリガーゼのDNA上での作動制御機構の解析 第42回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場ほか、福岡市

大学院生命理学研究科

博士前期課程

渡邊雄一郎：DNA再複製時の核内応答の解析

科学研究費補助金等

- 1 令和元年度公立大学法人兵庫県立大学特別研究助成金
研究課題 PCNA の機能制御のトリガーとなるユビキチン修飾コードの解析
研究代表者：塩見泰史
- 2 令和元年度 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、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ー法を使ったナノマシンの~7 nm レベルでの解析を行っている。今年度は分裂準備帯以外のアクチンシステムの解析にも挑戦した。

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.

種子は乾燥していて休眠状態にあり、吸水するとその中の胚は生命活動を再開して発芽する。その過程に起こる種子中での構造変化を観察する時に、種皮が種子の周りを覆っており、支障となっている。しかし、X線 CT 技術を用いれば、固定や切片作製をしなくても種子内部構造を観察可能

である。SPring-8のBL20XUおよびBL47XUでX線CT撮影を行い、細胞の並びと細胞間隙の関連性を調べた。また、吸水過程の観察方法として吸水後から連続撮影する方法について検討も行った。

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.

ナタマメは漢方薬として利用され、その種子を煎って、お茶（なたまめ茶）として飲まれている。しかしながら、このお茶に含まれる成分に関する研究はほとんど行われていない。そこで、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から電子線トモグラムの作製し、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 大塚礼己・中井朋則・山内大輔・横田悦男・峰雪芳宣: PPB に局在する CDK の研究: PSTAIR 抗体とタマネギ cdc2 抗体の比較、日本植物学会第 83 回大会 (仙台市)、(2019)
- I-2 大塚礼己・中井朋則・山内大輔・横田悦男・峰雪芳宣: PSTAIR 抗体とタマネギ cdc2 抗体を使ったタマネギ PPB に局在する CDK の解析、2019 年度 (第 8 回) 近畿植物学会講演会 (京都市)、(2019)
- III-1 Y. Mineyuki, D. Yamauchi, T. Nakai, D. Tamaoki (富山大), 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), I. Karahara (富山大), In vivo time-lapse imaging of changes in air space distribution during seed imbibition in *Lotus miyakojimae* using X-ray micro-CT. *Microscopy* 68 (Supplement_1) i51. Doi:10.1093/jmicro/dfz078 (2019)
- III-2 T. Kurogane (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), 3D-Modeling of arabidopsis root system architecture by X-ray micro-CT at SPring-8: Observation at different experimental hutches. *Microscopy* 68 (Supplement_1) i51. Doi:10.1093/jmicro/dfz076 (2019)
- III-3 山内大輔・中井朋則・玉置大介 (富山大)・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)・唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣: X線CTを用いた種子吸水過程の観察: 連続CT画像を用いた解析、種子生理生化学研究会 (和歌山市)、(2019)

- III-4 権工民・山内大輔・加藤美有・中井朋則・山内大輔・峰雪芳宣：ミヤコグサ種子胚の細胞間隙形成に関わるペクチンメチルエステラーゼ同定の試み、種子生理生化学研究会（和歌山市）、(2019)
- III-5 峰雪芳宣・山内大輔・中井朋則・玉置大介（富山大）・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）・唐原一郎（富山大）：X線マイクロCTの生体タイムラプスイメージングを使って吸水中のミヤコグサ種子内での空気の移動を捉える、2020年 生体運動合同班会議（京都市）、(2019)
- III-6 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：X線CTを用いたシロイヌナズナ根系形態解析- SPring-8 における実験ハッチの検討、日本顕微鏡学会第75回学術講演会（名古屋市）、(2019)
- III-7 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・唐原一郎（富山大）：SPring-8におけるX線マイクロCTを用いたシロイヌナズナ根系形態解析 - 実験ハッチの検討、日本植物形態学会第31回大会（仙台市）、(2019)
- III-8 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・唐原一郎（富山大）：X線マイクロCTを用いたシロイヌナズナ根系形態解析 - Space Seed宇宙実験試料の解析、日本植物学会第83回大会（仙台市）、(2019)
- III-9 山浦遼平（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・唐原一郎（富山大）：X線マイクロCTによるSpace Seed宇宙実験試料のシロイヌナズナ根系形態解析、日本宇宙生物科学会第33回大会（千葉市）、(2019)
- III-10 唐原一郎（富山大）・澤田綾太、谷畑昂士郎、山浦遼平、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）・峰雪芳宣・高尾泰昌（富山大）・田浦太志（富山大）・黒崎文也（富山大）・Chin Piow WONG（富山大）・森田洋行（富山大）・蒲池浩之（富山大）・久米 篤（九州大）・西内 巧（金沢大）・曾我康一（大阪市大）・吉田久美（名古屋大）・半場祐子（京都工繊大）・藤田知道（北海道大）・神阪盛一郎（富山大）：宇宙における植物の生活環 - シロイヌナズナの生殖器官・根系およびマメ科薬用植物形態への重力影響 -、第34回宇宙環境利用シンポジウム（相模原市）、(2020)

- Ⅲ-11 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・唐原一郎（富山大）：X線マイクロCTを用いたシロイヌナズナ根系形態の3次元モデル化とセグメンテーションの試み、第61回日本植物生理学会年会（大阪市；web）、(2020)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

権工民：ミヤコグサ種子で発現するアクポリン遺伝子の解析

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（令和元年～令和3年度） 基盤研究（C） 課題番号：19K06743
研究課題 細胞分裂面挿入予定域形成の核で進行する素過程の制御機構
研究代表者 峰雪芳宣、研究分担者 中井朋則
- 2 兵庫県立大学特別研究助成金（令和元年度）先導研究 A
研究課題 X線マイクロCTを用いたミヤコグサ種子胚の細胞間隙形成機構の解明
研究代表者 山内大輔
- 3 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
- 4 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：26281042
研究課題 湖沼底層部の低酸素化が誘導するメタロゲニウム粒子生成の分子機構と駆動システム解明
研究分担者 池谷仁里

I 鞭毛軸糸と軸糸ダイニンの構造と運動機構の解明

Molecular structure and mechanism of flagellar axonemes and axonemal dyneins

石橋健太・松田祐佳・佐川美咲・榊原 斉・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。*Chlamydomonas* の鞭毛の軸糸ダイニンを主な対象にして、そ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、軸糸ダイニンの力学的・酵素学的特性を単一分子計測や試験管内再構成実験を使って解析している。軸糸ダイニンには複数の亜種が存在し、それぞれ異なる運動特性を持つ。これらの亜種を混合したときに生じるダイニン間の協働的運動の解析を行うことで、軸糸内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依存した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作業仮説を提唱した。また、ダイニン分子の機能する場である軸糸とダイニン腕については、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ことで、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・岩崎一輝・古田茜・大岩和弘・古田健也
Ibusuki, R., Matsuda, Y., Morishita, T., Iwasaki, K., Furuta, A.,
Oiwa, K. Furuta, 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 F₁-ATPase の回転運動とを同時計測することに成功、F₁-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きた。

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、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。また、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で自己抑制的に運動活性

を低下させるが、外部から力が加わることで抑制状態が解除され、再帰的に運動活性が回復するというダイニン分子の運動活性自己抑制システムのメカニズムを明らかにした。

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新奇のダイニン分子を創出、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・長谷川初範・小嶋寛明

Tanaka, H., Hasegawa, H., Kojima, H.

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指す分子通信技術や、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生体にやさしい材料を用いて、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.

タンパク質モータの機能解析に用いてきた試験管内再構成実験を発展させて、自己駆動粒子の集団運動など自己組織的パターン形成のメカニズムを明らかにする試みを行っている。再構成系において、運動する微小管の表面密度を上げると、微小管同士の衝突頻度が向上する。軸糸ダイニンで駆動される微小管の場合、微小管同士の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、微小管が束化し、さらに蛇行することで渦構造を創出する。直径 400 μm にも及ぶメゾスコピックな渦構造が、実験槽のガラス表面に array 状に形成されるのである。数値計算によるシミュレーションから、微小管が示すわずかな運動軌跡のバイアスが、ネマティック相互作用を介して集団として共有されていく過程が明らかになった。この実験系は、個々の素過程(微小管同士の衝突)を正確に記述することが可能であり、かつ集団的挙動も観測できるため、複雑系物理学の理論と実験を結ぶ橋渡しの研究と捉えられて注目されている。また、微小管を架橋する能力のあるキネシン-5を微小管と混合すると、微小管がノードでつながったネットワークが形成される。この微小管ネットワークはキネシンの濃度依存的にその構造をダイナミックに変化させることを明らかにした。これらの研究は、集団運動やアクティブマターと呼ばれる物理学の新分野の研究に、生物学の視点から関わることのできる実験系を構築したものである。

発表論文 List of Publications

- I-1. K. Ishibashi (Osaka Univ), H. Sakakibara (NICT), K. Oiwa : Force-generating mechanism of axonemal dynein in solo and ensemble. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2843 (2020)
- I-2. M. Shiraga, J. Kirima, N. Kanatani, Y. Shimizu (NICT), H. Sakakibara (NICT), K. Oiwa : *In Handbook of Dynein*, 2nd Edition (ed. K. Hirose), Pan Stanford Publishing, Chapter 9, (2019)
- I-3. K. Oiwa, H. Iwamoto (JASRI), H. Sakakibara (NICT) : Changes in the helical symmetry of the axoneme of *Chlamydomonas* flagella coupled with Ca²⁺ concentrations. The American Society for Cell Biology/European Molecular Biology Organization 2019 Meeting, (Washington DC, USA) , 2019
- I-4. K. Oiwa, K. Shiba (Tsukuba Univ), K. Inaba (Tsukuba Univ), H. Iwamoto (JASRI), H. Sakakibara (NICT) : Change in the helical symmetry of *Chlamydomonas* and *Ciona* flagellar axonemes coupled with the change in Ca²⁺ concentrations revealed by X-ray fiber diffraction. 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (San Diego, USA), 2020
- I-5. K. Oiwa, K. Shiba (Tsukuba Univ), K. Inaba (Tsukuba Univ), H. Iwamoto (JASRI), H. Sakakibara (NICT) : Structural changes of *Chlamydomonas* and *Ciona* flagellar axonemes coupled with the change in [Ca²⁺] studied with X-ray fiber diffraction. 日本生物物理学会第 57 回年会 (宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- I-6. 榊原 斉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大岩 和弘 : The flagellar waveforms of *mbol* “a mutant moving backward only” in the presence/absence of Ca²⁺. 日本生物物理学会第 57 回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、 2019
- I-7. 榊原 斉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大岩 和弘 : Ca²⁺ 存在下/非存在下における *mbol* (後退運動変異株) の鞭毛波形. 第 13 回 クラミドモナス研究会(東京工業大学すずかけ台キャンパス)、2019
- II-1. R. Ibusuki, M. Shiraga, A. Furuta (NICT), M. Yoshio (NICT), H. Kojima (NICT), K. Oiwa, K. Furuta(NICT) : Collective motility of dynein linear arrays built on DNA nanotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 523, 1014-1019 (2020)
- II-2. S.R. Nasrin, T. Afrin, A.M.R. Kabir, D. Inoue, T. Torisawa, K. Oiwa, K. Sada, A. Kakugo : Regulation of biomolecular-motor-driven cargo transport by microtubules under mechanical stress. *ACS Applied Bio Materials* 3 (4), 1875-1883 (2020)
- II-3. T. Kaneko (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ) : Different motilities of microtubules driven by kinesin-1 and kinesin-14 motors patterned on nanopillars. *Science Advances* 6 (4), eaax7413 (2020)
- II-4. T. Kaneko (Kyoto Univ), S. Ando (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ) : Transport of microtubules according to the number and spacing of kinesin motors on gold nano-pillars. *Nanoscale* 11 (20), 9879-9887 (2019)
- II-5. T. Kaneko (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ) : Molecular nano-patterning reveals different coordination of kinesin-1 and kinesin-14 motors. 64th Annual Meeting of the Biophysical Society, (San Diego, USA), 2020
- II-6. 熊谷 優佑(長岡技科大)・柴田 桂太朗(NICT)・古田 健也(NICT)・本多 元(長岡技科大・生物機能)・小嶋 寛明(NICT) : Cytoplasmic dynein stepping on crowded microtubules

resolved using dark-field imaging with high spatio-temporal resolution. 日本生物物理学会第57回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019

- II-7. 森下 達矢(NICT)・指宿 良太(NICT)・古田 茜(NICT)・大岩 和弘(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・古田 健也(NICT) : Systematic studies on the relation between binding kinetics and speed of movement using engineered DNA-based dynein motor. 日本生物物理学会第57回年会 (宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- II-8. 指宿 良太(NICT)・森下 達矢(NICT)・古田 茜(NICT)・大岩 和弘(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・古田 健也(NICT) : Creating artificial transport systems by using engineered dynein that moves along DNA nanofilament. 日本生物物理学会第57回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- II-9. 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2回領域会議(九州大学 筑紫キャンパス 筑紫ホール), 2019
- III-1. K. Jindai (Kansai Univ), K. Nakade (Kansai Univ), K. Masuda (Kansai Univ), T. Sagawa (NICT), H. Kojima (NICT), T. Shimizu (Kansai Univ), S. Shingubara (Kansai Univ), T. Ito (Kansai Univ) : Adhesion and bactericidal properties of nanostructured surfaces dependent on bacterial motility. RSC Adv., 10, 5673-5680 (2020)
- III-2. 田中 裕人: 微生物を活用した化学物質識別法開発と化学的影響評価の可能性. 月刊クリンテクノロジー 6月号 (2019)
- III-3. 神代啓輔(関西大院シス理工)・増田恭介(関西大院シス理工)・富成 征弘(NICT)・田中 秀吉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・清水智弘(関西大院シス理工)・新宮原正三(関西大院シス理工)・伊藤健(関西大院シス理工) : ナノ構造が発現する抗菌作用のリアルタイム観察の試み. 応用物理学会秋季学術講演会 (北海道大学札幌キャンパス)、2019
- III-4. 神代啓輔(関西大・システム理工)・増田恭介(関西大・システム理工)・小嶋 寛明(NICT)・佐川貴志(NICT)・清水智弘(関西大・システム理工)・新宮原正三(関西大・システム理工)・伊藤健(関西大・システム理工) : ナノ構造表面の濡れ性が抗菌作用に及ぼす影響. 第46回年次大会 防菌防黴学会(千里ライフサイエンスセンター)、2019
- III-5. 田中 裕人(NICT)・数田 恭章(NICT)・小嶋 寛明(NICT) : Quantitative analysis of *E. coli* chemotaxis adaptation process that changes depending on temperature conditions. 日本生物物理学会第57回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- III-6. 小嶋 寛明(NICT) : 細胞は動くマイクロ機械～つまむ技・動きを観る技～ けいはんな情報通信フェア 2019(けいはんなプラザ)、2019
- III-7. 小嶋 寛明(NICT) : 細胞は動くマイクロ機械・動きを観る技・つまむ技. けいはんな情報通信フェア 2019(けいはんなプラザ)、2019
- VI-1. S. Tanida (Tokyo Univ), K. Furuta (NICT), K. Nishikawa (Tokyo Univ), T. Hiraiwa (Tokyo Univ), H. Kojima (NICT), K. Oiwa, M. Sano (Tokyo Univ) : Gliding filament system giving both global orientational order and clusters in collective motion. Physical Review E 101 (3), 032607 (2020)

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

(大阪大学大学院生命機能研究科)

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

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

学部 4 年生

岩崎 一輝：DNA nanotube 上を運動する新規分子モーターを創る

長谷川 初範：英語リスニング時の脳波応答の速さと母語の語彙力との関係

科学研究費補助金等

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

研究課題名 軸糸ダイニンの構造ダイナミクスと協働性

研究代表者 大岩和弘（兵庫県立大学、情報通信研究機構）

I ゲノム編集法による分化後神経細胞における 神経細胞内の蛋白質のラベリング

In vivo gene labeling within post-mitotic neurons through
genome editing

生沼泉
Oinuma, I.

遺伝子治療への技術応用のためには、組み換え効率を高め、生体内において分化後神経細胞での相同組み換えを可能とする必要がある。我々は、電気パルス法を用いた相同組み換えと蛋白質標識の至適化の検討を行うことで、マウス成体の中枢神経組織である大脳皮質において、分化後神経細胞における相同組み換えに成功した。大脳皮質脳神経ネットワークの破綻は様々な疾患に繋がる。大脳皮質内の神経細胞に対する直接的な遺伝子治療技術の開発は、各種難治性疾病の治療基盤の確立となる。以上から、我々はまず、大脳皮質神経細胞を直接操作し、相同組み換えを行うことを試みた。我々は、哺乳類モデル動物としてマウスを用い、妊娠 14.5 日齢の子宮内に居るマウスに対して、大脳皮質内に対する直接的遺伝子導入を行った。条件検討の結果、電気パルスを用いた「電気細孔法」を用いた遺伝子導入により、母体から出産された各仔において大脳皮質特異的に神経細胞での遺伝子導入を確認し、体細胞への直接的遺伝子導入を確認した。また、この遺伝子導入操作を施した仔は、通常通り哺乳され正常な発生過程を辿った。

この技法を用い、実際に分化後神経細胞における相同組み換えに挑戦した。学習や記憶に関係する遺伝子である *PSD-95* に着目し、マウス *PSD-95* 遺伝子座をターゲットとした相同組み換えによる蛋白質標識を目的とし、ノックインコンストラクトを構築した。このコンストラクトおよび遺伝子導入細胞を確認するための発現ベクターコンストラクトを妊娠 14.5 日齢の母体マウス子宮内に居るマウス 1 匹 1 匹に対して、電気細孔法を用い同時に導入し、生後 2 ヶ月まで通常通り母親の下で哺乳・保育した後に、仔を組織化学および Western Blot 法により解析することにより、狙った遺伝子領域での相同組み換えを検証した。検討の結果、一部の神経細胞で相同組み換えが起こったことで発せられる緑色蛍光を確認でき、さらにこの緑色蛍光タンパク質が内在性の *PSD-95* タンパク質に意図した通りに融合されていることを、Western Blot 法で確認した。以上の成果から、マウス生体において、電気パルス法を用いて遺伝子置換を引き起こすことに成功した。また、同様の技法は大脳皮質組織のみならず、網膜組織においても適応されることが明らかになり、確立した系の普遍性の裏付けも得られた。今後、網膜および大脳皮質神経細胞の遺伝性変性疾患への治療応用が期待される。

さらに、初代培養神経細胞においても、電気パルス法を用いた遺伝子置換の条件検討を行った。遺伝子治療の汎用性の向上のためには、各タンパク質をコードする遺伝子の

C末側のみならず、N末側への遺伝子置換操作を可能とある必要があり、われわれは、N末側へのノックイン技術の確立を目的として、神経伸長に促進的に働くアクチン制御因子の lamellipodin (Lpd) に着目し、ラット *Lpd* 遺伝子座の N末側への緑色蛍光タンパク質(EGFP) のノックインのための条件を検討した。プロモーター領域を含まれる可能性を極力排除し、相同組み換えが起こらない限り緑色蛍光タンパク質が発現しないようにした。設計したコンストラクトをラット大脳皮質神経細胞に導入し、試験管内で培養した。神経細胞内で相同組み換えが起こり、*Lpd* 遺伝子の N末側に EGFP が融合されているかどうかを、細胞から抽出したゲノム DNA サンプルに対する RT-PCR 法を用いて確認した。PCR 法による検討の結果、相同組み換えが起こり、神経細胞内在性の *Lpd* 遺伝子座のゲノム配列に EGFP が融合されていることが確認できた。この結果から、従来から実施されている C末側のみでなく、homology arm の長さを工夫することで、targeting vector からの意図しない発現を起こすことなく、意図した相同組み換え下での遺伝子融合産物の発現を可能とすることができることがわかった。この技法は、様々な神経伸長因子をターゲットとすることで、今後、神経損傷モデル系での神経再生への利用応用が期待される。

II 核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析

Interaction between nuclear lamina and heterochromatin

廣瀬富美子
Hirose, F.

核膜の裏側に存在する核ラミナは A-type lamin (lamin A/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きた。その結果、ヘテロクロマチン結合たんぱく質である HP1 が免疫沈降実験で lamin A と共沈降し、さらに細胞内での共局在することを見出した。

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。そこで、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に lamin A-HP1 間相互作用が関与しているかどうかを調べるために、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た。現在、生細胞での lamin A と HP1 との相互作用を解析するために、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を行っている。

発表論文等 List of Publications

- I-1 Takahiko Matsuda, and Izumi Oinuma: Imaging endogenous synaptic proteins in primary neurons at single-cell resolution using CRISPR/Cas9. *Mol. Biol. Cell* 30(22) 2838-2855. doi: 10.1091/mbc.E19-04-0223. (2019)
- I-2 Takahiko Matsuda, and Izumi Oinuma: Optimized CRISPR/Cas9-mediated in Vivo Genome Engineering Applicable to Monitoring Dynamics of Endogenous Proteins in the Mouse Neural Tissues. *Sci. Rep.* Aug 5;9(1):11309. doi: 10.1038/s41598-019-47721-4. (2019)
- II-1 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 42 回分子生物学会年会 (令和元年 12 月、福岡国際会議場)

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-令和 1 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 31-令和 2 年度)
研究課題 アクチン足場の選択的スプライシングの時空間ダイナミクスが担う軸索誘導の新概念
研究代表者 生沼 泉
3. 研究助成金 公益財団法人カシオ科学振興財団研究助成金 (平成 31-令和 1 年度)
研究課題 損傷神経細胞の体内修復利用を可能とする電気パルスを用いた遺伝子導入法を用いた遺伝子工学技術の開発
研究代表者 生沼 泉
4. 科学研究費助成事業 (基盤 C) (平成 30-令和 2 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

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.

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では、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ことができる。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、アルコールを含む溶液中でコロイド状に分散した高分子化合物やエマルジョン溶液など、様々な液体試料の観察においても有効であ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局在解析

Molecular localization 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、足場タンパク質である rapsyn や筋特異的受容体チロシンキナーゼ (MuSK) とともに集積してクラスターを形成することにより効率の良い情報伝達が行われている。nAChR のクラスター形成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、クラスター形成途中および形成後の分散が始まった段階での、nAChR、rapsyn、MuSK の詳細な局在を調べたところ、クラスター形成途中と分散が始まった段階で、クラスター内における MuSK の分布が異なることが示唆された。

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、生きている細胞にX線を照射して、細胞膜に発現しているnAChRの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計測し、計測後の細胞の生存状態を蛍光顕微鏡を用いて評価した。

IV 光合成初期過程と電子伝達超複合体の構造と機能の研究

Structure and function of super complexes of photosynthetic electron transport systems

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

光合成における光エネルギーの化学的エネルギーへの変換を担う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 I 複合体の構造を解明した。南極のある種の緑藻が、南極の自然環境下で発現する赤外光を利用するための光捕集色素タンパク質の特性を解析した。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 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*, 68, 94-99 (2019)
- I-2 櫻林靖哲 (トヨタ自動車)・前川諒介 (トヨタ自動車)・宮澤淳夫・西野有里・伊藤喜子・安永卓生 (九工大) : Cryo-TEMを用いた溶液中のアイオノマー凝集状態解析、第75回日本顕微鏡学会学術講演会 (名古屋)、2019
- I-3 T. Kamigaki (雪印メグミルク), Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Analysis of Structure Formation Mechanism in Whipped Cream by Cryo-transmission Electron Microscopy, *Food Science and Technology Research*, 25, 727-733 (2019)
- I-4 J. Omi (同志社大), M. Watanabe-Takahashi (同志社大), K. Igai (長崎大), E. Shimizu (同志社大), C.-Yi Tseng (同志社大), T. Miyasaka (同志社大), Tsuyoshi Waku (同志社大), S. Hama (同志社大), R. Nakanishi (同志社大), Y. Goto (同志社大), Y. Nishino, A. Miyazawa, Y. Natori (岩手医大), M. Yamashita (東大), K. Nishikawa (同志社大), The inducible amphisome isolates viral hemagglutinin and defends against influenza A virus infection, *Nature Communications*, 11, 162 (2020)
- II-1 西野有里・野間有加里・村松諒太・宮澤淳夫 : アセチルコリン受容体クラスター構成タンパク質の分子動態解析、第75回日本顕微鏡学会学術講演会 (名古屋)、2019
- II-2 Y. Nishino, Y. Noma, A. Miyazawa, Dynamic localization of acetylcholine receptor and related proteins studied by CLEM, 日本顕微鏡学会 生体解析分科会研究会 "Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen Preparation Techniques", Bristol, 2019
- IV -1 Ryo Nagao (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) (神戸大), Jian-Ren Shen (岡山大), Naoyuki Miyazaki (阪大) & Fusamichi Akita (岡山大) (2019) Structural basis for energy harvesting and dissipation in a diatom PSII-FCPII supercomplex, *Nature Plants* 5: 890-901.
- IV -2 Takaaki Suzuki (茨城大), Akito Nishizawa (茨城大), Masashi Kikuchi (茨城大), Chihiro Nonaka (茨城大), Mariko Komuro (茨城大), Miki Nakayama (茨城大), Yasuhiro Kashino, Masao Fukuda (長岡技科大) and Shigenobu Kimura (茨城大) (2019) Biphenyl degradation by recombinant photosynthetic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in an oligotrophic environment using unphysiological electron transfer, *Biochem J* 476 (23): 3615-3630 (<https://doi.org/10.1042/BCJ20190731>)
- IV -3 Makiko Kosugi (中央大), Shin-ichiro Ozawa (岡大), Yuichiro Takahashi (岡大), Yasuhiro Kamei (総研大、基生研), Shigeru Itoh (名大), Sakae Kudoh (極地研), Yasuhiro Kashino, Hiroyuki Koike (中央大) (2019) Red-shifted chlorophyll a bands allow uphill energy transfer to photosystem II reaction centers in an aerial green alga, *Prasiola crispa*, harvested in Antarctica, *Biochim Biophys Acta* 1861 (2): 148139 (<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148139>)
- IV -4 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), Kashino Y, Naoshi Dohmae (理研), Seiji Akimoto (神戸大), Naoyuki Miyazaki (阪大) & Jian-Ren Shen (岡山大) "Cryo-EM structure of the diatom PSII-PCPII: Insights into the evolutionary development of light-harvesting complexes" 3rd International

Solar Fuels Conference (ISF-3) International Conference on Artificial
Photosynthesis-2019 (ICARP2019), Hiroshima, 2019/11/20-24

- IV -5 Yasuhiro Kashino, Kyoko Shinzawa-Itoh, Ko Maeda, Natsuko Inoue-Kashino, Eiki Yamashita (阪大), Kentaro Ifuku (京大), Keisuke Kawakami (大阪市大), Tasuku Hamaguchi (理研), Koji Yonekura (理研) "Photosystem II complex of a cyanobacterium, *Acaryochloris marina*" 3rd International Solar Fuels Conference (ISF-3) International Conference on Artificial Photosynthesis-2019 (ICARP2019), Hiroshima, 2019/11/22
- IV -6 長尾遼 (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), 沈建仁 (岡山大), 宮崎直幸 (阪大), 秋田総理 (岡山大) 「珪藻PSI-FCPI複合体のクライオ電顕構造解析」 第61回 日本植物生理学会年会、大阪大学、2020/3/19
- V -1 Kazuhiro Itoh, Yasuhiro Kashino, Kentaro Ifuku (京大), Maeda Kouji, Takuji Yamamoto, Shogo Taguchi (2019) Dispersed air flotation of microalgae using venturi tube type microbubble generator. *Biomass Bioenergy* 130: 105379
- V -2 Kazuhiro Itoh, Tomoki Nakasuji, Yasuhiro Kashino, Kentaro Ifuku (京大), Kouji Maeda, Takuji Yamamoto, Shogo Taguchi (2019) Influence of air flow rate on flotation of marine diatoms using venturi tube type microbubble generator, *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*: 73, 354 - 355.
- V -3 菓子野康浩 「珪藻の光環境変化応答の多様性」 光合成研究、Vol 30 (1); 46-54 (2020)
- V -4 Yasuhiro Kashino、Different acclimation strategies to the light environment among marine diatoms、RIIS International Symposium "Photosynthesis Research for the Future" Okayama、2019/11/19-20
- V -5 熊沢穰 (京大), 西出浩世 (基生研), 内山郁夫 (基生研), 井上 (菓子野) 名津子, 菓子野康浩, 中野雄司 (京大), 伊福健太郎 (京大) 「ツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* のゲノム解析とゲノム編集」 第61回 日本植物生理学会年会、大阪大学、2020/3/20
- V -6 菓子野康浩 「珪藻の光環境変化応答の多様性」、第10回日本光合成学会のシンポジウム 2 「藻類と環境との対話」 京都、2019/5/26
- V -7 伊福健太郎 (京大)、菓子野康浩 「実用珪藻ツノケイソウ の応用利用に向けた基盤技術の開発」 日本農芸化学会 2020年度大会 シンポジウム 「バイオエコノミー時代を切り拓く、遺伝子組換え微生物の新しい利用形態 「カルタヘナ第一種使用」 の可能性を探る」 福岡、2020/3/26
- V -8 特許
登録番号：特許第6 5 7 3 4 0 0 号
登録日：2019年8月23日
発明の名称：珪藻の新規形質転換ベクターおよびその含有する新規プロモーター配列
発明者：伊福健太郎 (京大)、菓子野康浩、福澤秀哉 (京大)、梶川昌孝 (京大)、小川順 (京大)
特許権者：兵庫県立大学
- V -9 特許出願
出願番号：特願2019-073016
出願日：2019年4月5日
発明の名称：微細藻培養方法および微細藻培養装置
発明者：中嶋祐二 (三菱重工)、上野大司 (三菱重工機械システム)、坪武夫 (三菱重工機械システム)、菓子野康浩・伊福健太郎 (京大)

発明者所属：三菱重工機械システム・兵庫県立大学・京都大学
出願人：三菱重工機械システム・兵庫県立大学・京都大学

大学院生命科学研究科

博士後期過程

大石 鴻一郎：生細胞を用いたアセチルコリン受容体の分子内運動解析

博士前期過程

杉本菜月：in vitro神経筋接合部モデルの作製

水谷 歩：光化学系II複合体の構築過程の解明

永森 繭：ポストシナプスタンパク質局在解析のための金粒子標識法の研究

井上祐大：大量培養技術開発を通じた珪藻の光合成機能の解析

科学研究費補助金等

- 1 文部科学省科学研究費補助金（基盤C） 平成31～令和3年度
研究課題 培養シナプスモデルを用いた神経筋接合部の機能構造に関わる分子動態の相関顕微鏡解析
研究代表者 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～令和3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 共同研究 トヨタ自動車(株) 令和元年度
研究課題 燃料電池触媒溶液中のアイオノマ吸着、凝集状態に関する研究
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里、伊藤喜子
- 4 共同研究 日産自動車(株) 令和元年度
研究課題 リチウムイオン電池の電極スラリーおよび電解液の可視化
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 5 共同研究 日産自動車(株) 令和元年度
研究課題 全固体電池電極スラリーの可視化に関する共同研究
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 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～令和元年度

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31～令和3年度

研究課題 極域の光合成生物の生理応答機構の解析

研究代表者 菓子野康浩

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30～令和元年度

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

9 独立行政法人 科学技術振興機構(JST)先端的低炭素化技術開発(ALCA) 令和元年度～

研究課題 亜リン酸を用いたロバスト且つ封じ込めを可能とする微細藻類の培養技術開発

研究代表者 廣田隆一（広島大学）、分担研究者 菓子野康浩

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

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

八田公平・二階堂昌孝
Hatta K, Nikaido M

ゼブラフィッシュは胚が透明で発生が早く、遺伝学的手法に優れた、ヒトを含む脊椎動物のモデルである。私たちは、魚類後脳に存在し、逃避行動の制御に関わるマウスナー細胞におけるグリシンや GABA 作動性の抑制メカニズムについて、組織化学的、分子遺伝学、および、イメージング技術を用いた解析を行ってきた。Cre 組み替え技術を用いて、マウスナー細胞に投射する複数の GABA 作動性のシナプス末端を、生きた個体の中で区別して可視化することにより解析を進めている。

ゼブラフィッシュは第2の脳とも呼ばれる腸神経系の機能や発生の解析にも優れたモデルとなりうると考えられる。私達は、腸の蠕動運動に伴う平滑筋、腸神経細胞、ペースメーカー細胞での GCaMP3 を用いたカルシウム動態の可視化に成功し、蠕動反射と徐波関連運動の2種類の収縮波をカルシウム動態によって区別できることを発見した。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、感覚神経系から運動神経系までの神経回路を持って中枢から半ば独立して活動できることから、腸神経系は第2の脳とも呼ばれる。この腸神経系を構成する各種神経細胞や、腸神経系の運動機能に重要なペースメーカー細胞の分化や機能に関わる遺伝子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、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単離した *tachykinin3a* は、腸神経細胞に発現することが確認できた。また、ペースメーカー細胞の分類に

重要なマーカーとして *pdgrfa* 遺伝子を単離し、腸に発現することを確認した。一方、腸神経細胞の再生を解析する実験系を用い、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、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ため、学術雑誌に投稿した。

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 における放射光イメージングの 動物学・神経生物学への応用：

A. 古代魚等における第2、第3の顎の形態・機能と進化の解析、 B. マイクロナノ CT による個体内の神経細胞の相関顕微鏡観察

Synchrotron microCT and live imaging analysis of the second and third jaws in ancient fish by using SPring-8; micro-nanoCT and correlative microscopic analysis of identified neurons or cells in an intact animal

八田公平・二階堂昌孝
Hatta K, Nikaido M

A: 多くの魚は口にある顎（口顎：第1の顎）のほかに、咽頭顎（第2の顎）をもっている。私達は、その形態・機能の進化過程を調べるため、SPring-8 におけるマイクロ CT と高速 X 線動画撮影によって、様々な硬骨魚類の咽頭歯の形態と摂食時における運動の解析を行なっている。これまでに、スポットドガー、ポリプテルス、ハイギョなどの「古代魚」、シルバーアロワナやバタフライフィッシュなど、舌にも歯をもっている（3つの顎をもつ）もの、ベニイロカエルアンコウなど特徴的な形態を持つもの、また、その比較対照となる陸上脊椎動物（コーンスネイク）、脊椎動物の祖先である棘皮動物（ウニ、ニセクロナマコ）などについて、解析を行った。今年度はそれに加えて、咽頭顎進化の鍵と考えられるアミアカルヴァ／アミメウナギをはじめとする計4種のポリプテルス、

陸上爬虫類（ヒョウモントカゲモドキ）の口顎の動き、鳥類（ニワトリの雛）の摂食時における特徴的な舌の動き、また、ミナミトビハゼが水から上がった状態で魚を補食する様子の立体ライブイメージングに成功した。

B: SPring-8 における高解像度マイクロ CT と共焦点顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡の技法を用いて、ナノマイクロ位相 CT 法を用いて、個体内にあるゼブラフィッシュの脳や腸の細胞ひとつひとつ（CEMAPOC、マウスナー細胞、中腸と後腸の粘膜にある内外分泌細胞）を同定し高解像度観察することに成功した。

発表論文 List of Publications

- I-1 ○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（ポスター発表）第 42 回日本神経科学大会（2019 年 7 月 27 日, 新潟）
- I-2 Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, Koichi Kawakami（遺伝研）, Shin-ichi Okamoto, ○Kohei Hatta : Ca²⁺ imaging and optogenetic analysis of tissues in the zebrafish gut（国際学会, 口頭発表）International Zebrafish Conference（2019 年 6 月 15 日 Suzhou, China）
- I-3 ○高御堂大慈、西田さやか、児島卓也、二階堂昌孝、川上浩一、岡本晋一、八田公平 ゼブラフィッシュ幼生の腸組織のカルシウムイメージングと光遺伝学的解析（ポスター発表）第 42 回日本神経科学大会（2019 年 7 月 27 日, 新潟）
- I-4 ○高御堂大慈、西田さやか、児島卓也、佐藤史織、神保歩、和田里紗、岡本晋一、川上浩一、二階堂昌孝、八田公平 ゼブラフィッシュ幼生の腸運動のカルシウムイメージングと光遺伝学的手法による機能解析（ポスター発表）第 42 回日本分子生物学会（2019 年 12 月 5 日, 福岡）
- II-1 Mai Kuwata, Masataka Nikaido, & 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. *Dev. Dyn.* vol. 248(6). p437-448. 2019.
- 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細胞除去後の再生機構の解明（口頭発表）第 52 回日本発生生物学会大会（2019 年 5 月 14-17 日, 大阪）
- II-3 ○二階堂 昌孝、白井 彩香、水巻 裕美子、上野 直人（基生研）、重信 秀治（基生研）、八田 公平 ゼブラフィッシュ腸神経系を構成する外・中胚葉組織の分化マーカーの単離（ポスター発表）第 42 回日本分子生物学会（2019 年 12 月 3-6 日, 福岡）
- III-1 ○村田 大夢、堀江 健生（筑波大）、中川 将司 ホヤ幼生のマウスナー様神経は、逃避行動を引き起こさない（口頭発表）第 90 回日本動物学会（2019 年 9 月 14 日, 大阪）
- IV-1 ○岡田 央人、古森 大樹、塩本 咲希、桑原 健太、上杉 健太郎（JASRI）、星野 真人（JASRI）、八田 公平 水棲および陸上脊椎動物が獲物を丸呑みにする仕組みの多様性と共通性：放射光 X 線イメージングを用いた解析（口頭発表）第 90 回日本動物学会（2019 年 9 月 14 日, 大阪）
- IV-2 ○八田公平 放射光イメージングの動物学への応用：魚が隠し持つ第 2・第 3 の顎の謎を SPring-8 で解き明かす（口頭発表）第 90 回日本動物学会 SPring-8 先端利用技術ワークショップ シンクロトロン放射光 X 線は動物学にどう役立つか？（2019 年 9 月 12 日, 大阪）

- IV-3 ○青木 滂、馬場 俊平、井上 智裕、東 毅、角本 貴進、岡田 岸他華 上杉 健太朗 (JASRI)、竹内晃久 (JASRI)、池永 隆徳、二階堂 昌孝、八田 公平 ゼブラフィッシュ幼魚におけるマウスナー細胞上の GABA 作動性ニューロンのシナプス終末解析 (ポスター発表) 第 42 回日本分子生物学会 (2019 年 12 月 5 日, 福岡)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 青木 滂：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
岡田 央人：水棲および陸上脊椎動物が獲物を丸呑みにする顎・舌・咽頭の仕組みの進化
村田 大夢：ホヤ幼生の行動を制御する神経回路の光遺伝学的解析

科学研究費補助金等

住友財団 基礎科学研究助成 (平成 30 年 11 月～令和 2 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・森山・浅田：再生過程における ATP 産生を考える．第2回再生学異分野融合研究会（岡崎）、2019
- I-2 浅田・森山・梅園：プラナリア乳酸脱水素酵素遺伝子の発現解析．第2回再生学異分野融合研究会（岡崎）、2019
- III-1 山本・梅園・織井：カズメウズムシ眼点の再生からプラナリア再生のルールを探る．日本動物学会第90回大会(大阪)、2019
- III-2 西谷(大阪府立箕面東高)・織井：核型および DNA バーコーディングに基づく淡水棲プラナリアの再検討－国内に生息する *Seidlia* 属および *Polycelis* 属の4種について－．日本動物学会第90回大会(大阪)、2019
- IV-1 Okumura A, Hayashi T (理研), Ebisawa M (理研), Yoshimura M (理研), Sasagawa Y (理研), Nikaido I (理研), Umesono Y, Mochii M.: Cell type-specific transcriptome analysis unveils secreted signaling molecule genes expressed in apical epithelial cap during appendage regeneration. *Dev Growth Differ.* 61(9):447-456.(2019)
- IV-2 菊本・奥村・梅園・餅井：アフリカツメガエル幼生の尾部再生時に傷表皮で発現

する分泌性シグナル因子の解析. 日本動物学会第90回大会(大阪)、2019

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

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

菊本 葵: アフリカツメガエル幼生の尾部再生における*tgfb1*の役割

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(B)
研究課題 再生現象に伴う新規ATP産生制御機構の探索
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.

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）を奪い取ることで補給している。鉄は様々なタンパク質の活性中心に結合して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ことから、鉄の輸送に関与するタンパク質分子は新たな抗生物質やワクチン開発のターゲットとして注目されてきた。本研究室では病原菌の内膜で発現している 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に取り組んでいる。輸送基質であるヘムが結合した状態や ATP 結合型の構造決定を行うことで、タンパク質の大規模なコンフォメーションの変化のメカニズムを原子レベルで解明することを目的としている。構造解析試料の調整の際に両親媒性分子の存在で分子が安定化することを見出していることから、高分解能での構造決定によってヘム輸送サイクルの分子メカニズムの詳細を明らかになると期待される。

II 金属タンパク質の構造機能解析

Structural and Functional Studies of Metalloproteins

當舎武彦・杉本 宏
Tosha, T., Sugimoto, H.

金属タンパク質は、温和な条件下で高選択的かつ高効率的に触媒反応を行うことができる。この仕組みを理解するためには、触媒反応中に過渡的に形成される反応中間体の構造情報を得ることが重要となる。本研究室では、大型放射光施設 SPring-8 や X 線自由電子レーザー施設 SACLA を利用し、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、脂肪酸酸化酵素（チトクロム P450BM3）、ヘム含有ペルオキシダーゼの反応中間体、銅結合型亜硝酸還元酵素の休止酸化状態・基質結合型・生成物結合型の無損傷構造解析を行った。また、SACLA での時間分解計測に向けて、チップを利用した基盤技術開発に取り組んだ。他の金属タンパク質の触媒反応の鍵となる反応中間体の構造解析についても 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. M. Horitani, K. Kusubayashi, K. Oshima, A. Yato, H. Sugimoto, K. Watanabe: X-ray crystallography and electron paramagnetic resonance spectroscopy reveal active site rearrangement of cold-adapted inorganic pyrophosphatase. *Sci. Rep.* **10**, 4368 (2020)
- I-2. R. H. Pek, X. Yuan, N. Rietzschel, J. Zhang, L. Jackson, E. Nishibori, A. Ribeiro, W. Simmons, J. Jagadeesh, H. Sugimoto, M. Z. Alam, L. Garrett, M. Haldar, M. Ralle, J. D. Phillips, D. M. Bodine, I. Hamza: Hemozoin produced by mammals confers heme tolerance. *eLIFE* **8**, e49503 (2019)
- I-3. S. Yanagisawa, K. Kayama, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura: UV resonance Raman characterization of a substrate bound to human indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Biophys. J.* **117**, 706 (2019)
- I-4. K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Sugita: Chemo-mechanical coupling in the transport cycle of a heme ABC transporter. *J. Phys. Chem. B* **123**, 7270 (2019)
- I-5. Y. Shisaka, Y. Iwai, S. Yamada, H. Uehara, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, J. K. Stanfield, K. Ogawa, Y. Watanabe, O. Shoji: Hijacking the heme acquisition system of *Pseudomonas aeruginosa* for the delivery of phthalocyanine as an antimicrobial. *ACS Chem. Biol.* **14**, 1637 (2019)
- I-6. E. Sakakibara, Y. Shisaka, H. Onoda, D. Koga, N. Xu, T. Ono, Y. Hisaeda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: Highly malleable haem-binding site of the haemoprotein HasA permits stable accommodation of bulky tetraphenylporphycenes. *RSC Adv.* **9**, 18697 (2019)
- I-7. K. Yoshitani, E. Ishii, K. Taniguchi, H. Sugimoto, Y. Shiro, 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. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**, 684 (2019)
- I-8. H. Sugimoto, M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, T. Tosha, A.G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai: Structural basis of iron reduction by human duodenal cytochrome *b* (Dcytb) involved in intestinal iron absorption. 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken), August 11-16, 2019 (口頭発表)
- I-9. K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: Direct Benzene Hydroxylation Catalyzed by Wild-type Cytochrome P450BM3 with Novel Decoy Molecules. The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (Osaka), May 31- June 1, 2019 (口頭発表)
- I-10. 四坂勇磨, 杉本宏, 莊司長三: 合成ポルフィリンを内包させたヘム蛋白質の超高分解能 X 線結晶構造解析 日本結晶学会令和元年度年会 (金沢)、2019年11月19-20日 (口頭発表)
- I-11. H. Sugimoto, M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, T. Tosha, A.G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai: Structural basis of ascorbate-dependent iron reduction by human Dcytb involved in intestinal iron absorption, 32nd European Crystallographic Meeting (Vienna), Aug 18-23, 2019 (ポスター発表)
- I-12. K. Omura, Y. Aiba, A. Matsumoto, J. K. Stanfield, H. Onoda, S. Ariyasu, H. Sugimoto, Y.

- Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: Oxygen Activation by Self-sufficient Cytochrome P450 Reconstituted with Manganese Porphyrin 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken) August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-13. E. Sakakibara, Y. Shisaka, D. Koga, X. Xu, T. Ono, Y. Hisaeda, H. Sugimoto, Y. Watanabe, O. Shoji: Construction of Hemoprotein HasA Incorporating Bulky Metal Complexes 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken), August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-14. Y. Shisaka, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: Specific Photosterilization of *Pseudomonas Aeruginosa* Exploiting Its Heme Acquisition System 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken), August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-15. K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: Screening of N-substituted dipeptides for Activation of Cytochrome P450BM3, 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken), August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-16. K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: Regulation of the Reaction Site of Cytochrome P450BM3 with Peptide Derivatives, 4th International Symposium on Precisely Designed Catalysts with Customized Scaffolding (Nara), December 3-5, 2019 (ポスター発表)
- I-17. K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: *Engineering of Enzymatic Activity Achieved By Employing Newly Screened Peptide-Like Molecules*, 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15), June 2-5, 2019 (Nara), December 3-5, 2019 (ポスター発表)
- I-18. 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美: 酸素センサータンパク質 FixL のセンサーモジュールの構造解析、第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-19. 浅田拓也、鏝木基成、城宜嗣、杉本宏、木村哲就: ナノディスク再構成型ヘム ABC トランスポーターを用いた基質輸送機構の分光学的解析、第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-20. 米村開、有安真也、Joshua K. Stanfield、小野田浩宜、杉本宏、城宜嗣、渡辺芳人、 荘司長三: シトクロム P450BM3 の酵素活性改変を誘起するペプチド様小分子のスクリーニング、第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-21. 四坂勇磨、岩井佑介、山田志歩、當舎武彦、杉本宏、城宜嗣、 渡辺芳人、 荘司長三: 緑膿菌のヘム獲得機構を標的とする薬剤輸送システムの開発、第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-22. 西永恵、長井 聖奈、村木則文、青野重利、杉本宏、城宜嗣、澤井 仁美: 病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサー蛋白質の多機能性とその構造的機序、第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-23. 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美: Structural basis for

- the intramolecular signal transduction of oxygen sensor protein FixL from *Bradyrhizobium japonicum*、第 57 回日本生物物理学会年会 (宮崎)、2019 年 9 月 24 -26 日 (ポスター発表)
- I-24. 西永恵, 長井聖奈, 村木則文, 青野重利, 杉本宏, 城宜嗣, 澤井仁美「ヘムセンサータンパク質における転写調節の分子機構」第 92 回日本生化学会大会 (横浜) 2019 年 9 月 18 日-20 日 (ポスター発表)
- II-1 M. Suga, A. Shimada, F. Akita, J.R. Shen, T. Tosha, H. Sugimoto: Time-resolved studies of metalloproteins using X-ray free electron laser radiation at SACLA, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 1864, 129466 (2020)
- II-2 T. Moreno-Chicano, A. Ebrahim, D. Axford, M. V. Appleby, J. H. Beale, A. K. Chaplin, H. M. E. Duyvesteyn, R. A. Ghiladi, S. Owada, D. A. Sherrell, R. W. Strange, H. Sugimoto, K. Tono, J. A. R. Worrall, R. L. Owen, M. A. Hough: High-throughput structures of protein-ligand complexes at room temperature using serial femtosecond crystallography. *IUCrJ* **6**, 1074 (2019)
- II-3 A. Ebrahim, T. Moreno-Chicano, M. V. Appleby, A. K. Chaplin, J. H. Beale, D. A. Sherrell, H. M. E. Duyvesteyn, S. Owada, K. Tono, H. Sugimoto, R. W. Strange, J. A. R. Worrall, D. Axford, R. L. Owen, M. A. Hough: Dose-resolved serial synchrotron and XFEL structures of radiation-sensitive metalloproteins. *IUCrJ* **6**, 543 (2019)
- II-4 C. Gopalasingam, G. Chidusa, T. Tosha, M. Yamamoto, Y. Shiro, S. V. Antonyuk, S. Muench, S. S. Hasnain: Dimeric structures of quinol-dependent Nitric Oxide Reductase (qNOR) revealed by cryo-Electron Microscopy, *Science Advances*, **5**, no 8, eaax1803 (2019)
- II-5 當舎武彦、久保稔 : SACLA を利用した酵素反応の可視化 (Visualization of enzymatic reactions using SACLA)、生物物理 (SEIBUTSU BUTSURI)、**59**、205-207 (2019)
- II-6 T. Tosha, M. Kubo: Observation of enzymatic reactions by time-resolved X-ray crystallography using photosensitive caged substrate, *SPRING-8/SACLA Research Frontiers 2018*, 28-29 (2019)
- II-7 M. Kato, Y. Masuda, S. Nakagawa, T. Tosha, I. Yagi: Mechanistic Insights into Enzymatic Nitric Oxide Reduction Revealed by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy, 235th The Electrochemical Society Meeting (Dallas), May 26-30, 2019 (ポスター発表)
- II-8 M. Kato, Y. Masuda, S. Nakagawa, T. Tosha, I. Yagi: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase Immobilized on Gold Electrodes, 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (Nara), Jun. 2-5, 2019 (口頭発表)
- II-9 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, T. Tosha, Y. Shiro, M. Kubo: NO-binding and Protonation Process in the Catalytic Reaction of Heme/non-heme Iron Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System, 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (Nara), Jun. 2-5, 2019 (ポスター発表)
- II-10 T. Tosha, T. Nomura, H. Takeda, T. Kimura, H. Sugimoto, M. Kubo, Y. Shiro: Mechanism of P450nor-Catalyzed NO Reduction Proved by Time-Resolved Spectroscopic and

Crystallographic Analyses, 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken), Aug. 11-16, 2019 (口頭発表)

II-11 T. Tosha: Elucidation of NO reduction mechanism in soluble NO reductase by time-resolved crystallography with photosensitive caged compound, 32nd European Crystallographic Meeting (Vienna), Aug. 18-23, 2019 (招待講演)

II-12 當舎武彦、山際来佳、倉橋拓也、新井博之、杉本宏、城宜嗣: Functional roles of conserved residues near the active site of nitric oxide reductase based on the structural analysis、第 57 回日本生物物理学会年会 (宮崎)、2019 年 9 月 24 -26 日 (ポスター発表)

II-13 武田英恵、木村哲就、野村高志、當舎武彦、城宜嗣、久保稔: NO-binding and protonation process in the catalytic reaction of the bacterial Nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopy、第 57 回日本生物物理学会年会 (宮崎)、2019 年 9 月 24 -26 日 (ポスター発表)

II-14 當舎武彦: 放射光および X 線自由電子レーザーを用いた構造生物学: 金属含有酵素の触媒反応機構に関する研究、医療・バイオ研究に有効なインターフェースと量子ビーム応用に関する技術調査専門委員会第二回委員会 (大阪)、2019 年 9 月 26 日 (依頼講演)

科学研究費補助金等

博士前期課程

阿部綾萌: 低温電子顕微鏡によるヘムトランスポーターの構造解析

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金 (平成 31~令和 2 年度) 挑戦的研究 (萌芽) 課題番号 19K22403
研究課題 XFEL とマイクロ流体技術の融合によるモノオキシゲナーゼの新しい構造解析
研究代表者 杉本 宏
- 2 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
- 3 科学研究費補助金 (平成 31~令和 2 年度) 挑戦的研究 (萌芽) 課題番号 19K22208
研究課題 一酸化窒素から酸素分子を合成する金属酵素の同定
研究代表者 當舎武彦
- 4 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

I 地球内部の物理探査技術の開発

Development of Geophysical Exploration Technology

後藤忠徳
Goto, T.N.

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

II 数値シミュレーションを通じた地球内部の可視化

Visualization of Earth's Interior based on Numerical Simulations

後藤忠徳
Goto, T.N.

物理探査データから3次元的な地下物性分布を求めるためには、数値計算が必要である。例えば、仮想的な地下構造上での観測データを予測する技術や、観測データを地下物性分布へ焼き付ける逆写像技術の研究が不可欠である。これに加えて、地表浅部情報や物性の不連続境界、複雑な地形などを取り込むことで、活断層地域などでの地下構造解析の高度化を実施している。また得られた地下物性分布に基づいて、断層運動や地殻変動のシミュレーションを行っている。

III 地下構造の統合解析に関する研究

Joint Analysis of Geological/Geophysical structure

後藤忠徳
Goto, T.N.

物理探査情報や岩石試料の物質・物性測定情報に基づいて、3次元的な地質構造・地下水分布を求めることは、地下の科学的理解と社会利用において欠かせない。これまでに例えば、海底熱水地域での岩石試料・物理探査データ・熱水対流数値シミュレーションを用いた統合解析を行った。その結果、海底金属資源の新たな生成モデル提案を行うことに成功した。このようなマルチスケール情報の融合を実施することで、定性的ではなく定量的な地下構造解釈を目指している。

IV SR を用いた微小領域回折法による鉱物の 結晶学的評価

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

萩谷健治
Hagiya, K.

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

V 相平衡岩石学 Phase Petrology

後藤 篤
Goto, A.

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

発表論文 List of Publications

- [1] 石須慶一, Chatchai Vachirastienchai, Weerachai Siripunvaraporn, 後藤忠徳, 笠谷貴史, & 岩本久則 : 物理探査, 72, 122-138 (2019).
- [2] Ishizu, K., Goto, T., Ohta, Y., Kasaya, T., Iwamoto, H., Vachirastienchai, C., Siripunvaraporn, W., Tsuji, T., Kumagai H., & Koike, K. : Geophysical Research Letters, 46(20), 11025-11034 (2019).
- [3] 岡本拓, 後藤忠徳, 笠谷貴史, 寺西陽祐, 石須慶一, 稲盛隆穂, 阿部進, & 高井克己 : 石油技術協会誌, 85(1), 54-61, (2020).
- [4] 山下 凧・後藤忠徳・山口 覚,令和元年度 Conductivity Anomaly 研究会, 東京大学地震研究所 (2020).

科学研究費補助金等

1. 国際科学技術共同研究推進事業 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム
(平成 27-令和元年度)
研究課題 インドネシアにおける地熱発電の大幅促進を目指した
蒸気スポット検出と持続的資源利用の技術開発
研究代表者 小池克明
2. 科学研究費補助金 (平成 30-33 年度) 基盤研究(A) 課題場号 : 18H03894
研究課題 大規模フラクチャーの強度・透水性を非破壊技術で把握できるか?
研究代表者 後藤忠徳
3. 科学研究費補助金 (平成 30-33 年度) 基盤研究(A) 課題番号 : 18H03733
研究課題 海溝近傍での海洋プレート変形に伴う水・熱の流動過程と
その沈み込み帯への影響の解明
研究代表者 山野 誠
4. 科学技術振興機構イノベーションハブ構築支援事業 (平成 30-令和元年度)
研究課題 超広帯域電磁波計測による地下電気物性分布の可視化
研究代表者 後藤忠徳

I ユビキチン-プロテアソーム経路反応機構の解明

X-ray structural analysis of the ubiquitin proteasome pathway

水島恒裕・西尾和也

Mizushima, T., Nishio, K.

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

II 病原菌エフェクタータンパク質の構造解析による 感染機構の解明

Structural analysis of bacterial effector proteins to reveal the pathogenic mechanism

水島恒裕・西尾和也

Mizushima, T., Nishio, K.

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

発表論文 List of Publications

- I-1 Structural and biochemical characterization of mitochondrial citrate synthase 4 from *Arabidopsis thaliana*. Nishio, K., Mizushima, T. *Acta Cryst F* **76**, 109-115. (2020)

- I-2 Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NFκB activation and apoptosis in an AAA+ domain-dependent manner. Takeda, M., Tezuka, T., Kim, M., Choi, J., Oichi, Y., Kobayashi, H., Harada, K., Mizushima, T., Taketani, S., Koizumi, A., Youssefian, S. *Biochem Biophys Res Commun.*, **525**, 668-674. (2020)
- II-1 平木慶人・高木賢治・西出旭・Kim Minsoo・水島恒裕：赤痢菌エフェクター IpaH1.4/2.5 基質認識ドメインの X 線結晶構造解析、第 19 回日本日本蛋白質科学会年会 第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会(兵庫)、2019
- II-2 瀧祐太・高木賢治・Kim Minsoo・水島恒裕：赤痢菌タンパク質 OSPI による宿主免疫反応阻害機構の解明、技術・人材マッチング交流会(兵庫)、2019

大学院生命理学研究科

博士前期過程

瀧 祐太：エフェクタータンパク質による宿主ユビキチンリガーゼ阻害機構の解析

平木慶人：赤痢菌エフェクターによる宿主炎症応答阻害機構の解析

科学研究費補助金等

- 1 令和元年度公立大学法人兵庫県立大学特別研究助成金 基礎研究支援(2019)
研究課題 病原菌エフェクターによる宿主防御応答阻害機構の解析
研究代表者 水島恒裕
- 2 公益財団法人アステラス病態代謝研究会 2019 年度研究助成金
研究課題 病原菌エフェクターによる宿主防御応答阻害機構の解明
研究代表者 水島恒裕