

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ンネルを介した膜タンパク質の膜組み込み機構を研究している。本年度は以下の成果を得た。

①タンパク質がリボソームで合成されてからオルガネラ膜を透過するまでの時間経過を定量的に見積もることが可能な実験系（フォールディングプローブ、CP-EGFP）を駆使して、膜透過関連遺伝子の作用の網羅的かつ定量的な解析を進めてきた。トランスロコン関連遺伝子で、その破壊によって小胞体標的化機構の変換が起きるもの、疎水性配列の透過に影響するもの、正電荷配列の透過に影響の出るものを複数種見出し、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、小胞体内腔 Hsp70 である Kar2p の存在量によって疎水性セグメントのトランスロコンにおける膜透過動きが向上すること、Kar2p の点変異体の発現によって、強いドミナントネガティブ作用があることを見出した。さらに、Kar2p の、ATP 結合、リン酸加水分解、基質結合領域、J-タンパク質結合領域、ドメイン間ヒンジ領域など、各機能ドメインの点変異を構築した。小胞体内腔の分子シャペロンネットワーク系のトランスロコン機能への影響を p 詳細に解析している。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てきた。単純な 1 回膜貫通型の膜貫通セグメントとは異なり、疎水性度が極端に低くとも膜貫通トポロジーを形成できるメカニズムの存在を提唱した。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。ミリスチル化酵素の、基質結合部位、ミリスチル CoA 結合部位、転移反応活性中心のそれぞれに必須と考えられるアミノ酸の点変異体の作成を進め、活性確認を行っている。

II 低分子有機化合物に対する生体防御系の機能制御

Regulation of Antiorganochemical Detoxification System

衣斐義一・阪口雅郎
Emi, Y., Sakaguchi, M.

我々のからだには、ホルモンなどの体内で合成される生理活性物質のほか、食物などから摂取した多種多様な有機化合物を、適切に処理して無害化して排出する仕組みが備わっている。肝臓で行われている異物代謝経路は、初めに酸素添加などにより官能基を導入し、続いてグルクロン酸などの水溶性原子団を抱合し、最後に代謝物を細胞外へ排出するという三つのステップに分けられる。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。

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

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

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

大学院生命理学研究科

博士後期課程

Md Shajedul Haque

博士前期課程

藤尾真子

松田頌子

大裏夏也

大原正明

城尾優実

水野花菜

科学研究費補助金等

- 1 学術研究助成基金助成金（令和2年度～令和4年度） 基盤研究C（一般）
課題番号 20K06510
研究課題 膜タンパク質の構造構築過程に関わるトランスロコン因子群の機能解明
研究代表者 阪口雅郎
- 2 （公財）武田科学振興財団（令和2年度～令和4年度）
研究課題 小胞体・ゴルジ体ストレス応答を軸とした新規創薬戦略の基盤構築
研究分担者 阪口雅郎
- 3 公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団（令和2年度教育研究助成）
研究課題 上皮細胞において ABCC2 を頂端部細胞膜に局在化させる機構の解明
研究代表者 衣斐義一

I 金属タンパク質のラマン分光解析

Raman spectroscopic analysis of metalloproteins

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・北川禎三
Kubo, M., Yanagisawa, S., Kitagawa, T.

当講座では、共鳴ラマン分光法を用いて金属タンパク質の機能メカニズムを研究している。特にミトコンドリアで好気呼吸酵素として働いているチトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の機構解明に力を入れている。CcO は、ヘム Fe と Cu を含む活性中心で O₂ を H₂O にまで還元するとともに、それと共役してプロトンをポンプする膜タンパク質である。本年度は、CcO の分子表面に結合し、アロステリックに作用する小分子 (阻害剤) の作用機序を解明した。さらに、CcO の活性をアロステリックに上昇させる 2 つのタンパク質 (Higd1a, CHCHD2) の作用機序解明を進めている。また、共同利用機器センターの共同研究として実施した金属タンパク質やモデル錯体のラマン分光解析 2 件を論文発表した (*J. Am. Chem. Soc.* 及び *Angew. Chem. Int. Ed.*掲載)。

II タンパク質の SACLA 時間分解構造解析

Time-resolved structural analysis of proteins using SACLA

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・長尾 聡
Kubo, M., Yanagisawa, S., Yamada, D., Nagao S.

SACLA を用いた時間分解結晶構造解析は、タンパク質の動きを原子レベルで可視化する新しい手法であり、当講座は世界に先駆けてこの手法を活用してきた。特にケージド基質を用いた計測手法を開拓し、ヘム酵素 (NO 還元酵素、チトクロム P450、CcO) に応用している。ケージド NO を用いた NO 還元酵素の中間体構造解析は構造精密化を終え、後述の時間分解分光解析とあわせて論文投稿中である。一方、チトクロム P450 と CcO の系は、引き続きケージド O₂ を用いた中間体微結晶の生成方法を検討している。その他、新規ロドプシン類の時間分解結晶構造解析を進めているが、本年度は光遺伝学ツールであるチャネルロドプシンの構造変化観測に成功し、機能メカニズムを論文にまとめた (*eLife* 掲載)。

III 酵素反応の時間分解分光解析

Time-resolved vibrational analysis of enzymatic reactions

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・長尾 聡

当講座では、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トフローラマン分光装置を立ち上げ、さまざまな酵素の反応機構を研究している。特にヘム酵素 (Trp 代謝酵素、CcO、NO 還元酵素) とフラビン酵素 (DNA 光修復酵素) の反応解析に力を入れている。本年度はケージド NO を用いた 2 つの NO 還元酵素 (カビと緑膿菌の酵素) の反応機構研究を論文にまとめた (*PNAS* 改訂中および *Bull. Chem. Soc. Japan* 掲載)。特にカビの NO 還元酵素の研究では、微結晶試料を扱える顕微時間分解 FTIR 装置を新たに開発し、SACLA 時間分解構造解析と時間分解赤外分光をあわせて、中間体の構造および電子状態を決定した。まさに“ダイナミックピコバイオロジー”を推進した。また、DNA 光修復酵素 (6-4 フォトリアーゼ) の研究において大きな進展が見られた。鍵となる中間体を時間分解紫外吸収分光で捉えたことは前年度に報告したが、本年度は時間分解赤外分光で捉えることに成功した。今後さらなる解析を通して中間体の化学構造を解明し、反応機構の決定を目指す。

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を開発している。この装置では、His タグを付加した膜タンパク質を Ni-NTA を化学修飾した金表面に固定化し、表面敏感な赤外分光測定を実現する。前年度は金薄膜の形成に成功したが、本年度は金表面への Ni-NTA の化学修飾に成功した。今後生体試料 (温度依存性 TRP チャネル) の測定を進める。

発表論文 List of Publication

- I-1 Xue, S.-S. (Ewha Womans Univ.), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Kim, S. H. * (Ewha Womans Univ.), Fukuzumi, S. (Ewha Womans Univ.)*, Nam, W.* (Ewha Womans Univ.) et al.: Enhanced redox reactivity of a nonheme iron(V)-oxo complex binding protons, *J. Am. Chem. Soc.* 142, 15305-15319 (2020).
- I-2 Fujieda, N. (大阪府大) *, Umakoshi, K. (阪大), Ochi, Y. (大阪府大), Nishikawa, Y. (阪大), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Kurisu, G. (阪大), Itoh, S. (阪大) *: Copper-oxygen dynamics in tyrosinase mechanism, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 13385-13390 (2020).
- I-3 柳澤幸子: 第 1 編 第 2 章 第 16 節 ピコバイオロジー: 振動分光法. 膜タンパク質工学ハンドブック (津本浩平、浜窪隆雄監修), NTS, 122-129 (2020).

- II-1 Oda, K. (東大), Nomura, T., Nakane, T. (東大), Yamashita, K. (東大), **Kubo, M.***, Nishizawa, T. (東大)*, Nureki, O. (東大)* et al.: Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin, *eLife* 10, e62389 (2021).
- II-2 久保稔: SACLA 時分割結晶構造解析による動的構造生物学研究～酵素反応の可視化に向けた分子動画～, *放射光* 33, 266-270 (2020).
- II-3 溝端栄一, 久保稔: 第1編 第1章 X線自由電子レーザーによる膜タンパク質の構造解析, 膜タンパク質工学ハンドブック (津本浩平、浜窪隆雄監修), NTS, 11-15 (2020).
- III-1 Takeda, H., Kimura, T. (神戸大), Nomura, T., Horitani, M. (佐賀大), Yokota, A., Matsubayashi, A., Ishii, S., Shiro, Y., **Kubo, M.***, Toshi, T.*: Timing of NO binding and protonation in the catalytic reaction of bacterial nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopy, *Bull. Chem. Soc. Japan* 93, 825-833 (2020) (Selected paper).
- III-2 Yamada, D.: The molecular mechanism of photoreceptor proteins by infrared spectroscopy, The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (online) Sep 17, 2020.
- III-3 山田大智: 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、兵庫県立大学 知の交流シンポジウム 2020 (ウェブ開催)、2020年10月~12月.
- III-4 山田大智、柳澤幸子、久保稔: 顕微分光装置開発の現状と今後、令和二年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム (淡路)、2020年10月19日.

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 河村味奈: Stopped-flow ラマン・吸収同時測定によるインドールアミン 2,3 ジオキシングナーゼの反応機構の解明
- 松村和香: チトクロム *c*酸化酵素と活性増強因子 Higd1a のラマン相互作用解析

科学研究費補助金等

- 科学研究費補助金(令和1~5年度) 新学術領域「高速分子動画」 課題番号:19H05784
研究課題 時間分解構造解析を補完する精密顕微分光計測
研究代表者 久保 稔
- 科学研究費補助金(令和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
- 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
- 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
- 6 兵庫県立大学 令和 2 年度特別研究助成金（若手研究者支援）（令和 2 年度）
研究課題 時間分解分光計測を用いた(6-4)光修復酵素の DNA 修復機構の解明
研究代表者 山田大智
- 7 科学研究費補助金（令和 1～3 年度） 国際共同研究強化(A) 課題番号: 18KK0397
研究課題 固体高分解能 NMR を用いた不完全な配列を有するナノ構造体の構造
解析
研究代表者 長尾 聡
- 8 科学研究費補助金（令和 1～3 年度） 基盤研究(C) 課題番号: 19K05695
研究課題 ドメインスワッピングの熱力学的制御による選択的かつ安定なタンパ
ク質分子複合体構築
研究代表者 長尾 聡

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., Hiromoto, T., Shibata, N., Higuchi, Y.

微生物の細胞内では、酵素や電子伝達タンパク質など多くの生体高分子が重要な化学反応の制御に関与している。膜内外のプロトン濃度の調節や還元力の維持などはある種の微生物にとっては必須の生体内システムである。硫酸還元菌では[NiFe]ヒドロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ成熟化因子、シトクロム類、硫酸塩・亜硫酸塩還元系酵素、フラビンタンパク質などの分子が水素代謝に関与している。我々はこれらの生体高分子のX線結晶構造解析を行い、その生化学的機能・分子間相互作用・電子伝達機構などの解明を目指している。特にヒドロゲナーゼについては、その水素活性化の分子機構の解明に近づいており、中性子結晶解析法による研究も進めている。また、一般的にヒドロゲナーゼは、酸素によりその機能を失う。我々は、酸素耐性をもつヒドロゲナーゼの構造を解明し、酸素耐性の構造基盤を明らかにしてきた。さらに、水素の還元力を利用してNAD⁺-NADH変換機能をもつ酵素や翻訳システムの制御に関わる酵素の構造生物学も進めている。

ビタミンB₁₂補酵素 (Co原子含有) の関与するジオールデヒドラターゼやエタノールアミンアンモニアリアーゼの構造解析を行い、酵素の触媒するラジカル反応機構を提唱している。他にナイロンオリゴマー分解酵素やデカルボキシラーゼ、フェレドキシニン-NADP還元酵素、マルチ銅酸化酵素、抗生物質の生産など医薬品合成に応用できるアミノ酸2量体合成酵素などについても高精度な構造化学的研究を展開している。

外部からの様々な刺激・ストレス・外敵に应答してそれに対応、あるいは制御するためのシステムは生物が生命を維持するためには重要である。酸化ストレス、金属イオンの細胞外排出に関わるマルチ銅酵素や、気体分子に反応してDNAの転写制御に関わるタンパク質群のX線構造化学的研究を進めている。

II 高等生物細胞のタンパク質間相互作用のX線構造生物学

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

柴田直樹・西川幸志・樋口芳樹

Shibata, N., Hiromoto, T., Nishikawa, K., Higuchi, Y.

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

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

発表論文 List of Publications

- I-1 K. Nishikawa, H. Ogata and Y. Higuchi: Structural Basis of the Function of [NiFe]-hydrogenases, *Chemistry Letters*, **49(2)** 164-173 (2020)
- I-2 T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, H. Matsuura, Y. Hirano, K. Kurihara, K. Kusaka, M. Cuneo, L. Coates, T. Tamada and Y. Higuchi: Towards cryogenic neutron crystallography on the reduced form of [NiFe]-hydrogenase, *Acta Crystallogr. D*, **76** 946-953 (2020)
- I-3 T. Hiromoto, K. Nishikawa, T. Tamada, Y. Higuchi: The Challenge of Visualizing the Bridging Hydride at the Active Site and Proton Network of [NiFe]-Hydrogenase by Neutron Crystallography, *Topics in Catalysis*, (2021)
- I-4 S. Negoro, D. Kato, T. Ohki, K. Yasuhira, Y. Kawashima, K. Nagai, M. Takeo, N. Shibata, K. Kamiya, Y. Shigeta: Structural and functional characterization of nylon hydrolases, *Methods in Enzymology*, **648** 357-389 (2021)
- I-5 緒方英明, 樋口芳樹: 水素酸化還元酵素ヒドロゲナーゼ, 生命金属ダイナミクス (2021)
- I-6 柴田直樹, 末吉由依, 樋口芳樹, 虎谷哲夫: X線結晶構造に基づく B₁₂ 補酵素がラジカル酵素反応を制御する仕組みの解明, 放射光, **33(1)** 33-42 (2020)
- I-7 樋口芳樹: 生物のエネルギー代謝酵素の分子進化, 実験医学増刊 イメージング時代の構造生命科学, **38(5)** 56-59 (2020)
- I-8 ○T. Tamada, T. Hiromoto, K. Nishikawa, Y. Hirano, K. Kusaka, L. Coates, Y. Higuchi: Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, 第20回日本蛋白質科学会年会, 2020/6/18 オンライン開催 (札幌市, 北海道) 【口頭発表】
- I-9 ○今西隆浩, 熊坂崇, 奥村英夫, 仲村勇樹, 松浦滉明, 樋口芳樹: プレートスキャン法を用いた [NiFe] ヒドロゲナーゼの常温構造解析, 日本結晶学会 2020 年度年会, 2020/11/28 オンライン開催 (つくば市, 茨城県) 【口頭発表】
- I-10 ○樋口芳樹: 生物酵素による水素の合成と分解～水素触媒の新たな展開になるか～, 若狭湾エネルギー研究所・先端技術セミナー, 2020/12/18 オンライン開催 (敦賀市, 福井県) 【招待講演】
- II-1 R.N. Cahyono, M. Yamanaka, S. Nagao, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: 3D domain swapping of azurin from *Alcaligenes xylosoxidans*, *Metallomics*, **12(3)** 337-345 (2020)
- II-2 S. Nagao, A. Suda, H. Kobayashi, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Thermodynamic Control of Domain Swapping by Modulating Helical Propensity in the Hinge Region of Myoglobin, *Chemistry-An Asian Journal*, **15** 1743-1749 (2020)
- II-3 S. Nagao, A. Idomoto, S. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Rational Design of Metal-binding Sites in Domain-swapped Myoglobin Dimers, *J. Inorg. Biochem.*, **217** (2021)

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

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

生命科学専攻

博士前期課程

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～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 (令和元年度～令和 5 年度) 基盤研究(A) (一般) 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
3. 科学研究費補助金 (令和 2 年度～令和 4 年度) 基盤研究(C) (一般) 課題番号: 20K06511
研究課題: [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸化に伴う鉄硫黄クラスターの構造変化に関する研究
研究代表者 西川幸志

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 N₂O 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、これまでは時間分解の可視・赤外分光法を用いてそれらの電子状態を解析してきた。その解析をさらに進め Fe-NO 配位構造を決定するために、本年度から時間分解 X 線結晶構造解析を開始した。cNOR の結晶を還元状態に保つ方法として、酸素透過性が非常に低い酸素バリア性フィルムで還元型 cNOR の結晶を包み、酸素分子による cNOR の酸化が起きないようにして X 線回折実験を行うことを考え、その準備実験を開始した。

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来のキノール依存性 NOR (*NmqNOR*) は、*PacNOR* が単量体で機能するのに対して、二量体で高活性である。二量体 *NmqNOR* の高分解能構造を得るために、界面活性剤で可溶化した試料とナノディスクと複合体を形成した試料の低温電子顕微鏡構造解析 (CryoEM) を行ない、2.9 Å 分解能で構造を得ることに成功した。高活性の二量体 *NmqNOR* との構造比較を目的に単量体 *NmqNOR* の構造解析も開始した。さらに、CryoEM により *NmqNOR* と非競合阻害剤 (HQNO: 2-heptyl-4-quinolinol 1-oxide) の複合体の構造を決定した。その結果、3.1 Å 分解能の電顕像が得られ、ヘム *b* 付近の膜貫通ヘリックス表面に結合した HQNO 分子が観測された。HQNO の結合には Tyr312 残基と Asp728 残基の水素結合、および膜貫通ヘリックスとの疎水性相互作用が関与することが示唆される。

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。FixJ は FixL 及び DNA と相互作用する 2 つのドメインを持ち、結晶構造解析においてはそれぞれが様々な配向を取ることが明らかになっている。本年度は、NMR 分光法を用いて FixJ の溶液構造解析を目指した。FixJ の NMR 構造解析では、常磁性ラベルを用いた PCS/PRE 測定を計画しており、FixJ のラベル用変異体 C51S/S118C、C51S/S129C、C51S/S191C を作製した。このうち 129、191 の変異体については野生型と同等のリン酸基転移活性を示した。C51S/S129C について、DO3MA-Tb³⁺ タグを導入して HSQC スペクトルの測定を行ったところピークのシフトが見られ、PCS を観測できたと結論付けた。

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。このモデル細胞系を用いて、さまざまな食物由来の添加物を加えた際の鉄取り込みを解析した結果、フルクトースの添加で最も効率よく鉄イオンが取り込まれることが明らかになった。現在、フルクトースの作用を分子レベルで調べるために、鉄イオンとフルクトースが結合した Dcytb の構造解析に向けて結晶を作製している。

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、メタノール資化性酵母あるいはチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO 細胞) を宿主として DMT1 の発現精製法を検討した。

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 J. K. Stanfield, K. Omura, A. Matsumoto, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Crystals in Minutes: Instant On-site Microcrystallisation of Various Flavours of the CYP102A1 (P450BM3) Haem Domain." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 59, 2-10 (2020) <https://doi.org/10.1002/anie.201913407>
- I -2 M. A. M. Jamali, C. C. Gopalasingam, R. M. Johnson, T. Tosha, K. Muramoto, S. P. Muench, S. V. Antonyuk, Y. Shiro, S. S. Hasnain: "Active Form of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductases (qNOR) from *Neisseria meningitidis* is a Dimer" *IUCr J.* 7, 404-415 (2020) <https://doi.org/10.1107/S2052252520003656>
- I -3 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, A. Yokota, A. Matsubayashi, S. Ishii, Y. Shiro, M. Kubo, T. Tosha: "Timing of NO binding and Protonation in Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System" *Bull. Chem. Soc. Japan* 93, 825-833 (2020) doi:10.1246/bcsj.20200038 **Selected Paper**
- I -4 M. Kato, Y. Masuda, N. Yoshida, T. Tosha, Y. Shiro, and I. Yagi "Bilayer Lipid Membranes on SAM-modified Gold Electrode" *Electrochim. Acta*, 373, 137888-1378xx (2021) doi: 10.1016/j.electacta.2021.137888
- I -5 T. Nomura, T. Kimura, Y. Kanematsu, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, T. Hisano, R. Yamagiwa, H. Takeda, C. Gopalasingam, Y. Kino, R. Kousaka, S. Yanagisawa, O. Shoji, T. Kumasaka, Y. Takano, H. Ago, M. Yamamoto, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo, Y. Shiro: "Coordination and Electronic Structures of Short-Lived Intermediate in NO Reduction by Cytochrome P450 NO Reductase as Characterized by Time-Resolved IR Spectroscopy and XFEL Crystallography" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2101481118 (2021) doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2101481118>
- I -6 H. Kwon, J. Basran, C. Pathak, M. Hussain, S. Freeman, A. Fielding, A. Bailey, N. Stefanou, H. Sparkes, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, H. Murakami, G. Ueno, H. Ago, K. Tono, M. Yamamoto, H. Sawai, Y. Shiro, H. Sugimoto, E. Raven, P. Moody: "XFEL

- Crystal Structures of Peroxidase Compound II” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60**, 14578-14585 (2021)
doi: <https://doi.org/10.1002/anie.202103010>
- I -7 城 宜嗣：「分子構造を基盤にしたヘムタンパク質・ヘム酵素の機能解明」 *BJSCC* **75**, 51-56 (2020) **Award Accounts**
- I -8 T. Tosha, R. Yamagiwa, H. Sawai, Y. Shiro: “NO Dynamics in Bacterial Denitrification System” *Chem. Lett.* **50**, 280-288 (2021) <https://doi.org/10.1246/cl.200629> **Vol. 50 Commemorative Highlight Review & The Chemical Society of Japan Award for 2020 Award Highlight Review**
- I -9 城 宜嗣：「『生命金属科学』のめざすところ」コラボレーション企画 CSJ化学フェスタ 2020年10月20日 [オンライン開催]
- I -10 城 宜嗣 「分子構造を基盤にした鉄結合タンパク質の機能解明：Functional Studies of Iron-Related Proteins on Molecular Basis」第73回日本化学会賞 受賞講演、日本化学会第101春季年会、2021年3月22日 [オンライン開催]
- I -11 C.C. Gopalasingam: “Transformation of the Structural Biology Landscape with Cryogenic Electron Microscopy” Japan Advancement on CryoEM and SACLA: Leading Techniques in Structural Characterization (Universiti Teknologi MARA (UiTM), Selangor, Malaysia) September 15th, 2020
- I -12 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: “Cryo-EM, Crystallographic and kinetic study of quinol-dependent nitric oxide reductases from *Neisseria Meningitidis*.” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- I -13 當舎武彦、武田英恵、木村哲就、堀谷正樹、久保稔、城宜嗣 「マイクロ秒時間領域で形成される一酸化窒素還元酵素反応中間体の分光解析」 第58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日 [オンライン開催]
- III-1 H. Sawai, K. Ishimori: “Integrated Bio-metal Science: New Frontiers of Bio-metal Science Opened with Cutting-edge Techniques” *Biophysics and Physicobiology*, **17**, 94-97 (2020) doi: 10.2142/biophysico.BSJ-2020017
- III-2 M. Nishinaga, S. Nagai, N. Muraki, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, S. Aono, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, H. Sawai: “Heme Controls the Structural Rearrangement of Its Sensor Protein Mediating the Hemolytic Bacterial Survival” *Commun. Biol.* **4**:467 (2021) doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01987>
- III-3 城 宜嗣、澤井仁美、當舎武彦 「第4章 維持 一分子— 第2節 ヒト、病原菌における鉄の動態 ～分子から細胞へ～」生命金属ダイナミクス：生体内における金属の挙動と制御 城宜嗣、津本浩平 監修 (エヌ・ティー・エス出版) 2021年
- III-4 澤井仁美 Hyogo EYE 科学研究の第一線を訪ねて「病原菌が菌体内のヘム濃度を感知するメカニズムを原子レベルで解明」ひょうごサイエンス (公益財団法人ひょうご科学技術協会発行)、38号、pp. 9-10
- III-5 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 [発表証明発行]
- III-6 H. Sawai 「Structural Basis for the Survival of Hemolytic Bacteria by a Heme-responsive Sensor Protein (ヘム応答性センサータンパク質による溶血性細菌の生存の構造的機序)」 第94回日本細菌学会総会 シンポジウム「生命金属の新潮流」、2021年3月23日 [オンライン開催]
- III-7 澤井仁美 「ヒトにおける鉄イオンの吸収に関わる膜タンパク質の構造機能相関と腸管細胞モデルでの機能評価系を用いた鉄イオン吸収を向上させる新たな化合物スクリーニング」 日本薬学会第141年会 環境・衛生部会若手研究者シンポジウム～金属研究の新たな切り口：分子からヒトを対象とした研究最前線～、2021年3月28日 [オンライン開催]
- III-8 M. Takahara, H. Fujishiro, T. Kambe, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai: “Functional Analysis of Membrane Proteins Involved in Iron Absorption Using Human Intestinal Model Cell System” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- III-9 Y. Nishitani, M. Nishinaga, S. Naga, H. Sugimoto, T. Tosha, Y. Shiro, H. Sawai: “Dual Function of the Heme Ligation in a Heme-responsive Sensor Protein, PefR” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- III-10 A. Abe, H. Shigematsu, M. Yamamoto, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Reconstitution of Full-Complex of Bacterial Heme Transporter into the Platforms Suitable for Structural Analysis.” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- III-11 西谷雄大、西永恵、長井聖奈、杉本宏、當舎武彦、城宜嗣、澤井仁美 「Structural and Kinetic Analysis of CO Binding to Bacterial Heme-responsive Sensor Protein」 第93回日本生化学会大会 2020年9月15日 [オンライン開催]
- III-12 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58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日 [オンライン開催]
- III-13 木村哲就、林沙英、池本夕佳、城宜嗣、杉本宏 「Time-resolved Spectroscopic Measurements on the Transport Dynamics of ABC Transporter」 第58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日 [オンライン開催]

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Muhamad Arif Mohanmad Jamali :

Cryo-Electron Microscope, X-ray Crystallography and Kinetics Study of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from *Neisseria meningitidis*

博士後期課程

寺田隆一郎 : Theoretical Analysis of Functional Mechanism of Biological Macromolecular Systems Employing *ab initio* Quantum (QM) and Classical (MM) Molecular Dynamic (MD) Simulation

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 Crystallographic snapshots of EF-hand protein MCFD2 complexed with intracellular lectin ERGIC-53 involved in glycoprotein transport. Satoh, T., Nishio, M., Suzuki, K., Yagi-Utsumi, M., Kamiya, Y., Mizushima, T., Kato, K., *Acta Cryst F* 76, 216-221. (2020)

- I-2 p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and antioxidative stress response. Kageyama, S., Gudmundsson, S., Sou, Y., Ichimura, Y., Tamura, N., Kazuno, S., Ueno, T., Miura, Y., Noshiro, D., Abe, M., Mizushima, T., Miura, N., Okuda, S., Motohashi, H., Lee, J., Sakimura, K., Ohe, T., Noda, N., Waguri, S., Eskelinen, E., and Komatsu, M. *Nat Commun.* 12, Article number: 16. (2021)
- I-3 Neonatal-onset autoinflammation and immunodeficiency caused by heterozygous missense mutation of the proteasome subunit β -type 9. Kanazawa, N., Hemmi, H., Kinjo, N., Ohnishi, H., Hamazaki, J., Mishima, H., Kinoshita, A., Mizushima, T., Hamada, S., Hamada, K., Kawamoto, N., Kadowaki, S., Honda, Y., Izawa, K., Nishikomori, R., Tsumura, M., Yamashita, Y., Tamura, S., Orimo, T., Ozasa, T., Kato, T., Sasaki, I., Fukuda-Ohta, Y., Wakaki-Nishiyama, N., Inaba, Y., Kunimoto, K., Okada, S., Taketani, T., Nakanishi, K., Murata, S., Yoshiura, K., Kaisho, T. *medRxiv* (2021)
- II-1 平木慶人・西出旭・高木賢治・Kim Minsoo・水島恒裕：X線結晶構造解析による赤痢菌エフェクターIpaH1.4及び2.5の基質認識機構の解析、日本結晶会 令和2年度年会 オンライン開催、2020

大学院生命理学研究科

博士後期過程

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 科学研究費助成事業（令和2～5年度）基盤研究（B） 課題番号：20H03198
研究課題 病原細菌エフェクターによるNF- κ B経路を標的とした感染機構の解析
研究代表者 水島恒裕
- 2 科学研究費助成事業（令和2～4年度）基盤研究（B） 課題番号：20H03790
研究課題 もやもや病や脳梗塞の遺伝性リスク因子の機能解析
研究代表者 手塚徹
研究分担 水島恒裕
- 3 科学研究費助成事業（令和2～5年度）基盤研究（B） 課題番号：20H02878
研究課題 病原因子の分解を誘導する分子標的型新規抗菌剤の開発基盤の構築
研究代表者 Kim Minsoo
研究分担 水島恒裕
- 4 公益財団法人武田科学振興財団 2020年特定研究助成
研究課題 小胞体・ゴルジ体ストレス応答を軸とした新規創薬戦略の基盤構築
研究代表者 吉田秀郎
研究分担 水島恒裕

I SPring-8 蛋白質結晶構造解析ビームラインの高度化と応用

Research and Development for SPring-8 Structural Biology Beamlines

山本雅貴
Yamamoto, M.

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。これまでに開発した「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」の実装により SPring-8 マイクロビームビームライン BL32XU では結晶試料を収めた試料ホルダー UniPuck を結晶交換ロボットに装填して以降人手を介する事なく数分単位での結晶試料の X 線回折強度データの連続収集が可能になっている。ビームラインの自動化に次いで現在結晶試料の凍結と UniPuck への収納の自動化、X 線回折強度データからの構造解析の自動化に関する研究開発を進めている。また連続自動測定で得られる大量の構造データを効率よく研究に活用するため構造解析結果の効果的なブラウジングシステムの開発を進めている。これらの自動化研究の推進で研究開発の目的の 1 つに掲げる迅速化が進み多数の構造データの取り扱いが可能になる事で、平均構造を解析する X 線結晶構造解析では無視されてきた結晶内での存在頻度の低い準安定構造を含めた結晶構成分子の構造多様性の議論が可能になる。技術開発に加え開発した技術を用いた構造解析も外部機関と協力し進めている。

II X線結晶構造解析関連応用技術開発

Development of applied technology relating to X-ray protein crystallography

山本雅貴
Yamamoto, M.

前述した X 線結晶構造解析技術の基礎研究に加え X 線結晶構造解析の応用技術に関する研究も行っている。X 線結晶構造解析を応用した創薬手法に、多種類のリガンドと目的タンパク質の複合体構造解析を実施し得られた情報でリード化合物の構造最適化を支援する手法がある。ここでは構造解析の数を左右する迅速性は手法の有効性を左右する大きな要素である。現在自動化を進めていることが示すように結晶試料凍結の工程は律速段階である。凍結工程の自動化と異なる発想として、タンパク質リガンド複合体結晶の調製と非凍結での X 線回折強度測定を同じマイクロ流路内で実施するための研究を進めている。これとは別に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）の開発も進めている。さらに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などの開発も進めている。また構造研究を進める上で試料の質は極めて重要であることからタンパク質の生産精製の高度化に関する研究も行っている。

Ⅲ 放射線損傷を低減した新規解析手法の開発

Development of methods focused on radiation damage reduction

山本雅貴・吾郷日出夫
Yamamoto, M., Ago, H.

タンパク質結晶構造解析の発展に大きく貢献した超高輝度放射光の利用では試料の放射線損傷の速やかな発生への対処が不可欠である。これまで SPring-8 のビームラインでは 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、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 SACLA では特に X 線感受性の高いタンパク質の無損傷結晶構造が決定できる超高輝度極短パルス X 線を活用した Serial Femtosecond ROTation Crystallography (SF-ROX) を開発した。これら放射線損傷を低減した新規構造解析手法をポンプ - プロブ法やクライオトラップ法と組み合わせて使用する酵素反応の中間体構造解析なども他機関と共同で実施している。

Ⅳ タンパク質構造解析の新規手法開発

Research and Development for Protein Structure Analysis Methods

山本雅貴・吾郷日出夫
Yamamoto, M., Ago, H.

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

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

発表論文 List of Publications

- I-1 K. Ihara (理研)・M. Hato (理研)・T. Nakane (東大)・K. Yamashita (東大)・T. Kimura-Someya (理研)・T. Hosaka (理研)・Y. Ishizuka-Katsura (理研)・R. Tanaka (理研)・T. Tanaka (理研)・M. Sugahara (理研)・K. Hirata (理研)・M. Yamamoto・O. Nureki (東大)・K. Tono (JASRI)・E. Nango (理研)・S. Iwata (京大)・M. Shirouzu (理研) : Isoprenoid-chained lipid EROCO17+4: a new matrix for membrane protein crystallization and a crystal delivery medium in serial femtosecond crystallography., *Sci Rep*, 10, 19305 (2020)
- I-2 S. Ito・A. Senoo (東大)・A. Nagatoishi (東大)・M. Ohue (東工大)・M. Yamamoto・K. Tsumoto (東大)・N. Wakui (長岡高専) : Structural basis for the binding mechanism of human serum albumin complexed with cyclic peptide Dalbavancin., *J Med Chem*, 63, 14045-14053 (2020)
- I-3 山本雅貴 : 生命機能に迫るSPring-8/SACLAの構造生命科学研究所、マイクロ固体フォトリニクス研究会 第10回 「ユビキタス・パワーレーザー」 専門委員会(岡崎)、2020
- I-4 平田邦生 (理研)・小林 周 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (理研)・山本雅貴 : SPring-8におけるタンパク質結晶自動凍結装置の開発、日本結晶学会年 (オンライン)、2020
- I-5 山本雅貴 : 創薬を目指したSPring-8/SACLAの構造生物学研究、大阪大学ナノ理工学人材育成産学コンソーシアム令和2年度第2回ナノ理工学情報交流会 (豊中市)、2020
- I-6 平田邦生 (理研)・小林 周 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (理研)・山本雅貴 : 協働ロボットを利用した高速結晶凍結システムの開発、日本放射光学会年会 (オンライン)、2021
- I-7 上野 剛 (理研)・奥村英夫 (JASRI)・伊藤 翔・仲村勇樹 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・引間孝明 (理研)・増永拓也 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・熊坂 崇 (JASRI)・山本雅貴 : 理研構造ゲノムビームラインI&IIの現状、日本放射光学会年会 (オンライン)、2021
- I-8 山本雅貴 : コロナの時代の放射光構造生物学、第38回コロイド・界面技術シンポジウム (オンライン)、2021
- I-9 山本雅貴 : 創薬を目指したSPring-8/SACLAの構造生物学研究、第68回応用物理学会春季学術講演会 (オンライン)、2021
- II-1 Y. Nakamura (JASRI)・S. Baba (JASRI)・N. Mizuno (JASRI)・T. Irie (JASRI)・G. Ueno (理研)・K. Hirata (理研)・S. Ito・K. Hasegawa (JASRI)・M. Yamamoto・T. Kumasaka (JASRI) : Computer-controlled liquid-nitrogen drizzling device for removing frost from cryopreserved crystals., *Acta Cryst*, F76, 616-622 (2020)
- II-2 M. Maeki (北大)・S. Ito・R. Takeda (北大)・G. Ueno (理研)・A. Ishida (北大)・H. Tani (北大)・M. Yamamoto・M. Tokeshi (北大) : Room-temperature crystallography using a microfluidic protein crystal array device and its application to protein-ligand complex structure analysis., *Chem Sci*, 11, 9072-9087 (2020)
- II-3 K. Yoshimi (東大)・K. Takeshita (理研)・S. Yamayoshi (東大)・S. Shibumura (C4U)・Y. Yamauchi (東大)・M. Yamamoto・H. Yotsuyanagi (東大)・Y. Kawaoka (東大)・T. Mashimo (東大) : Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3., *medRxiv*, DOI: 10.1101/2020.06.02.20119875 (2020)
- II-4 坂井直樹 (理研)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴 : SPring-8におけるリガンドスクリーニングパイプラインの開発、日本結晶学会年会 (オンライン)、2020
- III-1 K. Hasegawa (JASRI)・S. Baba (JASRI)・T. Kawamura (JASRI)・M. Yamamoto・T.

- Kumasaka (JASRI) : Evaluation of the data-collection strategy for room-temperature micro-crystallography studied by serial synchrotron rotation crystallography combined with the humid air and glue-coating method., *Acta Cryst*, D77, 300-312 (2021)
- III-2 S.L. Rose (リバプール大)・S.V. Antonyuk (リバプール大)・D. Sasaki (リバプール大)・K. Yamashita (東大)・K. Hirata (理研)・G. Ueno (理研)・H. Ago・R.R. Eady (リバプール大)・T. Toshiya・M. Yamamoto・S.S. Hasnain (リバプール大) : An unprecedented insight into the catalytic mechanism of copper nitrite reductase from atomic-resolution and damage-free structures, *Sci Adv*, 7, eabd8523 (2021)
- IV-1 S. Tojo (住友大日本製薬)・Z. Zhang (東大)・H. Matsui (住友大日本製薬)・M. Tahara (住友大日本製薬)・M. Ikeguchi (横市大)・M. Kochi (住友大日本製薬)・M. Kamada (住友大日本製薬)・H. Shigematsu (理研)・A. Tsutsumi (東大)・N. Adachi (KEK)・T. Shibata (東大)・M. Yamamoto・M. Kikkawa (東大)・T. Senda (KEK)・Y. Isobe (住友大日本製薬)・U. Ohto (東大)・T. Shimizu (東大) : Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism., *Nat Commun*, 11, 5204 (2020)
- IV-2 S. Nojima (京大)・Y. Fujita (京大)・K.T. Kimura (京大)・N. Nomura (京大)・R. Suno (京大)・K. Morimoto (京大)・M. Yamamoto・T. Noda (京大)・S. Iwata (京大)・H. Shigematsu (理研)・T. Kobayashi (京大) : Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein., *Structure*, 29, 252-260 (2020)
- IV-3 山本雅貴 : CryoEM/bioSAXS/XFEL、第59回Spring-8 先端利用技術ワークショップ/大阪大学蛋白質研究所セミナー (オンライン)、2021

生命科学専攻

博士後期過程

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

科学研究費補助金等

- 1 (国研) 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (平成29~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相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化
研究代表者 山本雅貴
- 2 (国研) 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 (平成30~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)
- 3 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 KLF2 と KLF4 を単離した。興味深いことに、KLF2 と KLF4 の発現は、プロテオグリカン経路によって誘導されることがわかった。また、プロテオグリカン経路の制御因子として、PITPNB と PI4KA、PI4KB、CDIPT を単離した。

II 小胞体ストレス応答の解析

The Analysis of the ER Stress Response

吉田秀郎・佐々木桂奈江
Yoshida, H., Sasaki, K.

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

発表論文 List of Publications

- I-1 Hiderou Yoshida ER stress response and Golgi stress response. KSMCB (2020)
- I-2 Kanae Sasaki and Hiderou Yoshida The regulatory mechanism of the mammalian Golgi stress response. Cold Spring Harbor Meeting (2020)
- I-3 小森亮太、岩崎洗介、岡本明日香、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 72 回日本細胞生物学会大会 (2020)
- I-4 田中梓、坂本美憂、田中隆也、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 72 回日本細胞生物学会大会 (2020)
- I-4 坂本美憂、田中梓、三宅衣織奈、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF2 と KLF4 の発現制御機構と活性化機構 第 72 回日本細胞生物学会大会 (2020)
- I-5 佐々木 桂奈江、吉田 秀郎 細胞の需要に応じてゴルジ体機能を調節するゴルジ体ストレス応答の制御機構 第 43 回日本分子生物学会年会 (2020)
- I-6 足立拓弥、渡部雄斗、森下史、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コレステロール経路の分子機構 第 43 回日本分子生物学会年会 (2020)
- I-7 田中梓、坂本美憂、三宅衣織奈、小森亮太、若林貞夫、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写因子の探索 第 43 回日本分子生物学会年会 (2020)
- I-8 坂本美憂、田中梓、三宅衣織奈、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プロテオグリカン経路を制御する転写因子 KLF2 の発現制御機構 第 43 回日本分子生物学会年会 (2020)

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
- 岩崎 洗介：ゴルジ体ストレス応答 TFE3 経路の制御因子の同定

坂本 美憂：ゴルジ体ストレス応答プロテオグリカン経路の転写因子候補の活性制御機構の解析
博士後期課程

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

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（令和2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（令和2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（令和2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 武田科学振興財団（特定研究助成）（令和2年度）
研究課題 小胞体・ゴルジ体ストレス応答を軸とした新規創薬戦略の基盤構築
研究代表者 吉田秀郎

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。この中で、定常期における tRNA レパートリー形成への自食作用の影響についても研究を進めている。

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、特に ribosome タンパク質の翻訳に影響が出ていることを見出した。現在、tRNA intron と ribosome の機能化の関係について研究を進めている。

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

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

吉久徹
Yoshihisa, T.

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

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

IV 原生動物の運動に関与する分子機械

Studies on biomolecules responsible for motility of protozoa

園部誠司・吉久徹
Sonobe, S., Yoshihisa, T.

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

V 植物小胞体の形態形成に関与する分子機械

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

横田悦雄・吉久徹
Yokota, E., Yoshihisa, T.

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

VI その他の共同研究

Other collaborations

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

発表論文 List of Publications

- I-1 Nagai, A., Mori, K., Shiomi, Y., and Yoshihisa, T.: OTTER, a new method for quantifying absolute amounts of tRNAs. *RNA* **27**, 628-640 (2021)
- II-1 Kato, H. Yoshihisa, T., and Hayashi, S. : tRNA-Leu_{CAA} keeps up ribosome biogenesis and

functions. : 第 43 会日本分子生物学会年会 (オンライン) (2020)

- III-1 Matsuki, Y. (東北大), Matsuo, Y., Nakano, Y., Iwasaki, S. (理研, Yoko, H. (東北大), Udagawa Tsuyoshi (東北大), Li Sihan (東北大), Saeki Y. (東北大), Yoshihisa T., Tanaka K. (東京都医学総合研), Ingolia, N. T. (Univ. California, Berkeley), Inada Toshifumi (東北大) : Ribosomal protein S7 ubiquitination during ER stress in yeast is associated with selective mRNA translation and stress outcome. *Scientific Reports*, **10**,19669 (2020)

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

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

谷脇 萌佳 : イントロン配列等の多様性を利用した tRNA 遺伝子の個別発現制御の解析

科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会科学研究費補助金 (令和 2~4 年度) 基盤研究(C) (一般) 課題番号 20KT06490
研究課題 tRNA レパートリー形成のための tRNA 遺伝子の発現制御機構の解明
研究代表者 吉久徹
- 2 日本学術振興会科学研究費補助金 (令和 2~3 年度) 新学術領域研究(研究領域提案型)・公募研究
課題番号 20H05338
研究課題 tRNautophagy を介した tRNA レパートリーの調節機構の解析
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て倍加したのち、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) 再複製の誘導過程の解析、そして、3) ゲノムの維持と制御に必須な PCNA の機能を正に負に制御する反応機構について研究を展開している。

1) CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの制御機構の解析

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 末領域に存在する PIP ボックス、DNA 結合領域が Cdt1 の分解を制御することを明らかにしてきた。昨年度からライブイメージング法にて解析を始め、PCNA-GFP あるいは Cdt1-GFP を発現する細胞に局所的に紫外線を照射すると、照射部位に PCNA が蓄積すること、Cdt1-GFP も蓄積するが分解されることを観察できた。そこで、Cdt2(野生型)-mCherry あるいは Cdt2(PIP ボックス変異体)-mCherry 発現細胞を作成して観察を進めた。Cdt2(野生型)は、紫外線照射部位に PCNA とほぼ同じタイミングで蓄積した。一方、Cdt2(PIP ボックス変異体)は、蓄積の低下が観測された。Cdt2(野生型)は、基質 Cdt1 が存在する G1 期および存在しない S 期においても損傷部位に同程度で集積したことから、基質の有無にかかわらず PIP ボックスにより PCNA に結合することで損傷部位に集積すると考えられた。

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ている。Cdt1 は、MLN4924 投与 3 時間後ごろから蓄積するのが観察された。DNA 量は、2C から 4C までは通常時と同じ速度で増加した。コントロール細胞では、9 時間-12 時間に M 期を経て G1 期に移行するのに対して、投与群では一度、4C 量で留まっ

た後、細胞周期再開後 9 時間で 4N 以上の細胞が現れた。この過程での、クロマチン上に結合した PCNA や MCM4 の量を調べた。コントロールでは S 期の進行・終了に伴い、クロマチン上の MCM4 は減少したのに対して、MLN4924 処理細胞では、時間とともに MCM4 量の増加が見られた。MLN4924 は MCM2-7 の unloading を阻害することを考えると、MCM2-7 が S 期において新規にクロマチンにロードされたと考えられた。一方、クロマチン上の PCNA は、通常は G2 期までに減少するのに対して、MLN4924 投与した細胞では、クロマチンからの減少は見られなかったため、再ライセンス化された複製起点から再複製が起こっていると予想された。

3) PCNA の機能を制御する反応機構の解析

ゲノム維持の過程では、複製をはじめとした修復や組換えの反応に DNA 結合した PCNA が必須であり、ゲノム維持機構で反応する因子の DNA への集合と、その反応制御に機能する。PCNA の DNA 結合と除去を行うのが RFC 複合体ファミリーで、RFC1-RFC と Ctf18-RFC が PCNA の DNA 結合を担っている。もう一つの RFC 複合体である Elg1-RFC については、PCNA の DNA からの除去を特異的に行っていることが私たちの解析から示された。ヒト細胞内の Elg1 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。

一方、Elg1-KD 細胞でも複製が終了した G2 から M 期にかけて PCNA が DNA から除去されることが示され、M 期への進行過程で機能する新規 PCNA 除去機構の存在が示唆された。これについて解析を進めると、ユビキチンリガーゼの TRAIP が PCNA 除去に寄与することがわかってきた。TRAIP 発現抑制細胞の DNA 画分では、対照細胞と比較して複製期中の PCNA 量に差はないが、M 期では PCNA が DNA から除去されなかったことから、TRAIP は M 期進行時に Elg1-RFC とは独立したタイミングで機能する因子であることがわかった。そこで現在は、TRAIP による PCNA 除去の反応機構と、それに連係したゲノム維持について解析を進めている。

発表論文 List of Publications

- 1 渡邊 雄一郎、林 晃世、高原 教代、塩見 泰史、西谷 秀男 DNA 再複製誘導による過剰な複製の開始タイミングの解析第 43 回日本分子生物学会年会 2020 年 12 月 2 日～4 日 オンライン開催
- 2 海老原 溪、日下部 将之（神戸大学）、林 晃世、塩見 泰史、菅澤 薫（神戸大学）、西谷 秀男 DNA 損傷修復において機能する CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構の解析第 38 回染色体ワークショップ・第 19 回核ダイナミクス研究会、2021 年 1 月 16 日～21 日、オンライン開催
- 3 西谷 秀男、吉田 秀郎 特別基礎講座 生命理学に学ぶがんゲノム、第 35 回日本がん看護学会 学術集会 ポストゲノム時代のケアを先導する 2021 年 2 月 27 日～28 日

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

海老原 溪：CRL4Cdt2 ユビキチンリガーゼ活性を制御する Cdt2 のモチーフの解析

宮崎 健心：PCNA を阻害する PIP デグロンペプチドの探索

科学研究費補助金等

- 1 令和 2 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
- 2 令和 2 年度 女性研究者研究活動助成金
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活性制御機構の解析
研究代表者：林晃世
- 3 令和 2 年度 学術研究助成基金助成金 基盤研究（C）
研究課題 DNA 複製により起動する選択的タンパク質分解によるゲノム維持機構
研究代表者：西谷秀男

I 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、タマネギの RNA-seq データを基に分裂準備帯における微小管と核周期との関連する分子についての解析を行った。

II 植物の細胞分裂と細胞質分裂に関与するナノマシンの解析

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

峰雪芳宣・山内大輔・中井朋則

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

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

III 種子内部構造の X 線 CT による解析

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

山内大輔・中井朋則・峰雪芳宣

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

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

である。SPring-8 の BL20B2 を利用して種子の吸水過程を連続撮影する方法について検討も行った。また、富山大学などとの共同研究で植物の X 線 C T の画像解析法についても検討を行った。

IV なたまため茶成分の解析

Analysis of peptides in a tea from roast sword bean seeds

山内大輔
Yamauchi, D.

なたまためは漢方薬として利用され、その種子を煎って、お茶（なたまため茶）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た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。

発表論文 List of Publications

- III-1 I. Karahara (富山大), R. Yamaura (富山大), 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), Y. Mineyuki, S. Kamisaka (富山大), Analysis of Arabidopsis root system developed in space by X-ray micro-CT at SPring-8. 43rd Scientific Assembly of the Committee on Space Research (COSPAR), (Sydney, web), 2020
- III-2 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 μ CTを用いたSpace Seed宇宙実験におけるシロイヌナズナ根系の三次元形態解析、日本顕微鏡学会第63回シンポジウム (札幌市, web)、2020
- III-3 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): 屈折コントラスト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、日本顕微鏡学会第76回学術講演会 (大阪市, web)、2020
- III-4 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を用いたSpace Seed宇宙実験におけるシロイヌナズナ根系の形態解析、日本植物学会第84回大会 (名古屋市, web)、2020
- III-5 唐原一郎 (富山大)・山浦遼平 (富山大)・黒金智文 (富山大)・山内大輔・峰雪芳宣・蒲池浩之 (富山大)・橋本博文 (宇宙科学研究所/宇宙航空研究開発機構)・星野真人 (高輝度光科学研究センター)・上杉健太郎 (高輝度光科学研究センター)・中井勇介 (農研機構)・中野明正 (千葉大)・谷畑昂士郎 (富山大)・玉置大介 (富山大)・西内巧 (金沢大)・高尾泰昌 (富山大)・田浦太志 (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)・鎌田源司 (AES)・鈴木智美 (宇宙航空研究開発機構)・小野田雄介 (京大)・久米篤 (九大)・半場祐子 (京都工繊大)・藤田知道 (北大)・神阪盛一郎 (富山大): 宇宙における植物の生活環ー根系の三次元形態の評価を通じた低重力植物栽培条件の最適化を目指してー、第35回宇宙環境利用シンポジウム (相模原市, web)、2021

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 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
- 3 科学研究費補助金（平成30～令和2年度） 萌芽的研究（萌芽） 課題番号：18K19365
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（令和2年度～令和4年度） 挑戦的研究（萌芽） 課題番号：20K21451
研究課題 ホシミドロ目藻類の受容体キナーゼとリガンドから迫る、植物の陸上進出背景
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・佐川美咲・榊原 斉・小嶋寛明・大岩和弘
Ishibashi, K., 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、軸糸内でのダイニン亜種の協働性に関する知見を積み上げている。

これまで、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ている。

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・山脇一輝・古田 茜・大岩和弘・古田健也
Ibusuki, R., Yamawaki, 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 F_1 -ATPase の回転運動とを同時計測することに成功、 F_1 -ATPase の運動機構の一端を明らかにしてきた。また、光ピンセット法を用いた単一分子レベルの力学測定によって、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 に特定の数に結合させることで、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、細胞質ダイニンは、2 つのモータ領域が密接に結合した状態を取ることによって自己抑制的に運動活性を低下させる。しかし、外部から力が加わることでこの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や DNA 結合タンパク質と置換することで、アクチンフィラメントや DNA チューブを滑走させることができる新奇のダイニン分子を創出、アクチンフィラメントや DNA チューブの運動方向も簡易に操作することができることを示した。この結果は、タンパク質モーター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・岩崎正紘・小嶋寛明

Tanaka, H., Iwasaki, M., 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与することが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. I. Guido (MaxPlanck Inst), A. Vilfan(MaxPlanck Inst), K. Ishibashi (Osaka Univ), H. Sakakibara(NICT), M. Shigara, E. Bodenschatz(MaxPlanck Inst), R.Golestanian (MaxPlanck Inst), K. Oiwa, Active beating of a reconstituted synthetic minimal axoneme. arXiv preprint arXiv:2102.12849, 2021
- I-2. K. Ishibashi(Osaka Univ), H Iwamoto(JASRI, SPring8), H Sakakibara(NICT), K Oiwa, X-Ray Fiber Diffraction and Numerical Simulation Studies on the Change in the Helical Symmetry of *Chlamydomonas* Flagellar Axonemes Coupled with the Change in Ca^{2+} Concentrations. Biophysical Journal 120 (3), 165a-166a, 2021
- I-3. 榑原 斉(NICT)・石橋健太(Osaka Univ)・岩本裕之(JASRI, SPring8)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘 : The Helical Arrangement of Axonemal Structures Depends on the Region of the Flagellum, 日本生物物理学会 第 58 回年会 (Online), 2020
- I-4. K. Oiwa, K. Ishibashi (Osaka Univ), K. Shiba (Tsukuba Univ), K. Inaba (Tsukuba Univ), H. Iwamoto(JASRI, SPring8), H. Sakakibara(NICT), $[Ca^{2+}]$ -dependent changes in the helical symmetry of *Chlamydomonas* and *Ciona* flagellar axonemes revealed by X-ray fiber diffraction. 日本生物物理学会 第 58 回年会 (Online), 2020
- I-5. K. Ishibashi (Osaka Univ), K. Oiwa, A mathematical model for mechanism of flagella waveform change. 日本生物物理学会 第 58 回年会 (Online), 2020
- I-6. 榑原 斉(NICT)・石橋健太(Osaka Univ)・岩本裕之(JASRI, SPring8)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘 : The Helical Arrangement of Axonemal Structures Depends on the Region of the Flagellum, 第 14 回 クラミドモナス研究会 (Online), 2020
- I-7. K Ishibashi(Osaka Univ), H. Iwamoto (JASRI, SPring8), H. Sakakibara(NICT), K. Oiwa, X-ray fiber diffraction and numerical simulation studies on the change in the helical symmetry of *Chlamydomonas* flagellar axonemes coupled with the change in Ca^{2+} concentrations. Biophysical Society Meeting 2021 (Online), 2021
- II-1. H. Linke (Lund Univ), B. Höcker, K. Furuta (NICT), N. R. Forde, P. M. G. Curmi, Synthetic biology approaches to dissecting linear motor protein function: towards the design and synthesis of artificial autonomous protein walkers. Biophysical Reviews 12, 2020. DOI: 10.1007/s12551-020-00717-1
- II-2. 指宿良太・古田 茜(NICT)・古田健也(NICT) : タンパク質でできた分子モーターを創る・観る・使う. Creating,, Measuring,, and Using Molecular Motors Made of Proteins, 情報通信研究機構研究報告 Vol.66 No.1, 2020
- III-1. 小嶋寛明(NICT) : 自然知に学ぶバイオ ICT 特集 緒言 自然の知に学ぶ未来の ICT. 情報通信研究機構研究報告 Vol.66 No.1, 2020

大学院生命理学研究科

博士課程後期

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)

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

岩崎正紘 : 脳波による主観的恐怖の客観的評価法の検討

山脇一輝 : 対戦型ゲームにおけるタスク成功の推定のための脳情報に関する研究

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（令和2年度～令和5年度）挑戦的研究（開拓） 課題番号 20K20583
研究課題名 クシクラゲ楯板の分子構造の解明と運動性フォトニック結晶開発に向けた基盤研究
研究代表者 稲葉一男（筑波大学）
研究分担者 大岩和弘
- 2 科学研究費補助金（令和3年度～令和6年度）基盤研究(B) 課題番号 21H02455
研究課題名 昆虫精子鞭毛の運動解析から明らかにする鞭毛波形成・伝播の普遍的メカニズム
研究代表者 大岩和弘（兵庫県立大学、情報通信研究機構）

I R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質 TC21 の神経細胞樹状突起形態制御およびシナプス形成における役割の解析

Role of TC21 of R-Ras subfamily small GTPases in neuronal dendritic maturation and synapse formation

生沼泉
Oinuma, I.

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

R-Ras サブファミリーは、R-Ras (R-Ras1)、TC21 (R-Ras2)、および M-Ras (R-Ras3) の 3 つの構成因子から成る低分子量 G 蛋白質サブグループである。われわれのこれまでの研究で、R-Ras は神経軸索の決定やその後の伸長や分枝の過程に関与していること (Oinuma *et al.*, 2007; Iwasawa *et al.*, 2012)、また、M-Ras が樹状突起の伸長と分枝を伴った成熟の過程に関与している (Saito and Oinuma *et al.*, 2009; Tasaka *et al.*, 2012) ことが明らかになっている。一方で、TC21 の中枢神経系における具体的な機能の解析はなされていない。そこで、われわれは、まず、TC21 の脳における発現部位および時期を解析し、神経細胞の発達過程でどのような生理的機能があるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

はじめに、胎生期から成体までのマウス脳を回収し、RT-PCR 法を用いた発現のタイミング解析を行った。その結果、TC21 の mRNA は神経細胞が発達する間、持続して発現していることがわかった。次に、*in situ hybridization* 法を用いて成体脳組織における発現部位の空間的解析を行った。その結果、大脳皮質の皮質層や海馬のアンモン角など、神経細胞が密度高く存在している部位に特に強いシグナルが認められた。また、胎生期から成体までのラット脳や海馬初代培養神経細胞での TC21 タンパク質の発現量の変化を解析したところ、樹状突起の成熟やスパインの形成が起こる時期に非常に強い発現が認められた。

上記結果を踏まえ、まず、樹状突起が成熟する時期のラット初代培養神経細胞に常時

活性型変異体 TC21 (TC21-QL) を過剰発現させ、その表現型を解析した。その結果、常時活性型変異体 TC21 を過剰発現させることにより、樹状突起から伸びる短い突起構造物であるフィロポディアの数の増加が観察された。次に、TC21 に対して特異的にノックダウン効果を発揮する shRNA ベクターを作成し、内在性の TC21 に RNA 干渉を用いたノックダウンを行った。その結果、樹状突起のフィロポディアの数が減少した。また、このノックダウンによる効果は shRNA 耐性ミュータントである res-TC21 を共発現させることによって阻止された。また、スパイン形成期のラット海馬初代培養神経細胞においては、野生型 TC21 (TC21-WT) を過剰発現させることで、スパインの増加が見られ、内在性の TC21 を RNA 干渉を用いてノックダウンすることで、スパインの減少が見られた。

以上の結果より、神経細胞において TC21 は神経細胞樹状突起において、将来スパインになるようなフィロポディアの形成や維持への関与、さらにはスパインへの成熟への関与が示唆された。現在、TC21 がどのようなエフェクターを介して上記機能を発揮するかの分子メカニズムについて、引き続き研究を進めている。

II 核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析

Interaction between nuclear lamina and heterochromatin

廣瀬富美子
Hirose, F.

核膜の裏側に存在する核ラミナは A-type lamin (lamin A/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。生細胞での lamin A と HP1 との相互作用は、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) 解析システムを利用した。

BiFC 法により HP1 ファミリータンパク質のひとつである HP1 β と lamin A の相互作用は分裂期の終期の染色体の周りで始まり、G1 期初期の約 5 時間の中に相互作用の場は核内部から核周縁部に移動することを見つけた。このことは、ヘテロクロマチン結合タンパク質と核ラミナ構成タンパク質の直接的な相互作用が重要な役割を担っていることを示唆する。

発表論文等 List of Publications

- I-1 松田孝彦、生沼泉：ゲノム編集技術を用いたマウス中枢神経系における内在性蛋白質の蛍光標識と発現動態の解析．ポスター発表 第 93 回日本生化学会大会（令和 2 年 9 月、Web 開催）
- II-1 廣瀬富美子：RepoMan/PP1 γ 複合体は分裂期終期の lamin A を脱リン酸化する
ポスター発表 第 42 回分子生物学会年会（令和 2 年 12 月、Web 開催）

科学研究費補助金等

1. 科学研究費助成事業（基盤 B）（令和 2 年度-令和 4 年度）
研究課題 ガイダンスシグナルのハブ分子としての低分子量 G 蛋白質 R-Ras の機能解析
研究代表者 生沼 泉
2. 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. 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 低温電子顕微鏡法を用いた液体試料観察法の検討

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.

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を、非晶質に凍結して凍結状態のまま電子顕微鏡で観察することにより、脱水による変形のない、含水状態のままの微細構造を解析することができる。様々な含水・液体試料について、低温透過型電子顕微鏡法および低温走査型電子顕微鏡法による観察の可能性を検討した結果、含水試料だけでなく、有機溶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、低温電子顕微鏡法が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 の分子局在を走査型電子顕微鏡を用いて調べたところ、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 nAChR の分布が異なることが示された。

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ンネル開閉機構を明らかにすることはシナプスにおける情報伝達機構を解明する上で重要な課題である。また、nAChRの活性は生体中では脂質や足場タンパク質、細胞膜に対する機械刺激等周囲の環境によって調節されていることが報告されている。そこで、nAChRを本来発現しているNMJポストシナプスモデルの細胞に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確認した。

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、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および構造を解析した。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、分子育種の基盤とするため、ゲノム解析を進めた。そして、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。組換え藻類の第一種利用に向けた共同研究を進めた。

発表論文 List of Publications

- I-1 西野有里・田村佳穂・宮澤淳夫・伊藤喜子（ライカマイクロシステムズ）：クライオSEMの特徴を活かした生物試料の観察、日本顕微鏡学会第76回学術講演会・シンポジウム「Next generation of cryo-SEM」（誌上開催）、2020年5月25 - 27日
- I-2 高橋真一（日産自動車）・大間敦史（日産自動車）・伊藤喜子（ライカマイクロシステムズ）・西野有里・宮澤淳夫：Cryo-SEMを活用した自動車用電池開発、日本顕微鏡学会第76回学術講演会・シンポジウム「Next generation of cryo-SEM」（誌上開催）、2020年5月25 - 27日
- I-3 高橋真一（日産自動車）・渡邊学（日産自動車）・大間敦史（日産自動車）・伊藤喜子（ライカマイクロシステムズ）・西野有里・宮澤淳夫：クライオ電子顕微鏡によるリチウムイオン電池電解液のマクロ構造可視化、第61回電池討論会・電池、燃料電池の反応と材料（オンライン討論会）、2020年11月18 - 20日
- II-1 永森繭・西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫：電子顕微鏡を用いた分子局在解析のためのF(ab')₂結合金コロイド粒子の作製、日本顕微鏡学会第76回学術講演会、誌上開催、2020年5月25 - 27日
- III-1 大石鴻一郎・西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫・関口博史（JASRI）・佐々木裕次（東京大学）：Ligand-dependent intramolecular motion of nAChR in living cells detected by DXT、第58回日本生物物理学会年会（オンライン開催）、2020年9月16 - 18日
- IV-1 Ryo Nagao（岡山大）、Koji Kato（岡山大）、Kentaro Ifuku（京大）、Takehiro Suzuki（理研）、Minoru Kumazawa（京大）、Ikuo Uchiyama（基生研）、Yasuhiro Kashino, Naoshi Dohmae（理研）、Seiji Akimoto（神戸大）、Jian-Ren Shen（岡山大）、Naoyuki Miyazaki（阪大） & Fusamichi Akita（岡山大）（2020）Structural basis for assembly and function of a diatom photosystem I-light-harvesting supercomplex. *Nat Commun* 11:2481 (<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16324-3>)
- IV-2 Kousuke Kawahara（名大）、Natsuko Inoue-Kahino, Keisuke Namie（東北大）、Yuki Kato（名大）、Tatsuya Tomo（東京理科大）、Yutaka Shibata（東北大）、Yasuhiro Kashino & Takumi Noguchi（名大）（2020）A gold nanoparticle conjugate with photosystem I and photosystem II for development of a biohybrid water-splitting photocatalyst. *Biomed Spectrosc Imaging* 9: 73–81 (<https://doi.org/10.3233/BSI-200200>)
- IV-3 Makiko Kosugi（アストロバイオロジーセンター）、Fumino Maruo（中央大）、Norio Kurosawa（中央大）、Akinori Kawamata（中央大）、Yasuhiro Kamei（総研大、基生研）、Yasuhiro Kashino, Hiroyuki Koike（中央大）、Sakae Kudoh（極地研） and Satoshi Imura（極地研）、Adaptation strategy of aerial green alga, *Prasiola crispa* growing in Antarctica, The 11th Symposium of Polar Science, Tokyo, 2020年11月16日 - 12月18日
- V-1 井上祐大、井上（菓子野）名津子、伊福健太郎、北方恵美、大平猛、菓子野康浩「珪藻 *Chaetoceros gracilis* の油脂蓄積に対するナノバブルの有効性の検討」、近畿植物学会、奈良（オンライン）、2020年11月21日
- V-2 菓子野康浩、井上（菓子野）名津子、伊福健太郎 「第Ⅲ編 第5章 珪藻の産業応用に向けた基盤技術開発」、『脱石油に向けたCO₂資源化技術—化学的・生物学的利用法を中心に—』（湯川英明 監修） 株式会社シーエムシー出版、2020

- V-3 熊沢穰、西出浩世、長尾遼、井上（菓子野）名津子、内山郁夫、菓子野康浩、沈建仁、中野雄司、伊福健太郎「ツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* のゲノム解析と集光性色素タンパク質 fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein (FCP) の分子系統解析」、第62回日本植物生理学会年会、島根、2021年3月14 - 16日

大学院生命理学研究科

博士後期過程

大石 鴻一郎：アセチルコリン受容体の分子内運動解析

博士前期過程

永森 繭：電子顕微鏡を用いた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

佐藤史織：電子顕微鏡を用いたアセチルコリン受容体の構造解析

田村佳穂：皮膚角質の微細形態学的研究

藤田葉明：生物学的封じ込め微細藻類の社会実装に向けた大量培養技術開発

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jing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2年度
研究課題 他成分系高分子のナノ構造観察に関する研究
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 4 共同研究 日産自動車(株) 令和2年度
研究課題 電解液の構造観察に関する共同研究
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 5 共同研究 阪本薬品工業(株) 令和2年度
研究課題 ホイップクリームの構造に及ぼすポリグリセリン脂肪酸エステル添加効果
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里

- 6 国立極地研究所共同研究 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
- 7 独立行政法人 科学技術振興機構(JST)先端的低炭素化技術開発(ALCA) 令和元年度～
研究課題 亜リン酸を用いたロバスト且つ封じ込めを可能とする微細藻類の培養技術開発
研究代表者 廣田隆一（広島大学）、分担研究者 菓子野康浩
- 8 文部科学省科学研究費補助金（基盤B） 令和2年度～令和4年度
研究課題 実用モデル珪藻の光環境応答・適応機構の最適化
研究代表者 伊福健太郎（京都大学）、分担研究者 菓子野康浩

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

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

八田公平・二階堂昌孝
Hatta K, Nikaido M

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

一方、ゼブラフィッシュは第2の脳とも呼ばれる腸神経系の機能や発生の解析にも優れたモデルとなりうると考えられる。私達は、腸の蠕動運動に伴う平滑筋、腸神経細胞、ペースメーカー細胞での 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の発生・分化の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development of the enteric neural crest 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得られた興奮性神経伝達物質遺伝子 *tachykinin3a* は、腸神経細胞に発現することが確認できた。現在 Tachykinin3a 作動性神経細胞の分布や形態、機能を知る目的で遺伝子導入魚や遺伝子ノックアウトを作成中である。また、ペースメーカー細胞の1種に発現する *pdgrfa* 遺伝子も単離し、腸に発現することを確認した。こちらも、腸の運動時の働き方を解析する目的でカルシウム インジケータの GCaMPなどを導入した遺伝子導入魚の作成を行っている。一方、腸神経細胞の再生を解析する実験系を確立し、神経細胞除去部に未分化神経堤由来細胞が出現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、受理された。

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

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

八田公平・二階堂昌孝
Hatta K, Nikaido M

A: 多くの魚は口にある顎 (口顎: 第1の顎) のほかに、咽頭顎 (第2の顎) をもっている。私達は、その形態・機能の進化過程を調べるため、SPring-8 におけるマイクロ CT と高速 X 線動画撮影によって、様々な硬骨魚類の咽頭歯の形態と摂食時における運動の解析を行なっている。これまでに、スポッテドガー、ポリプテルス、ハイギョなどの「古代魚」、シルバーアロワナやバタフライフ

イッシュなど、舌にも歯をもっている（3つの顎をもつ）もの、ベニイロカエルアンコウなど特徴的な形態を持つもの、また、その比較対照となる陸上脊椎動物（コーンスネイク）、脊椎動物の祖先である棘皮動物（ウニ、ニセクロナマコ）などについて、解析を行った。また、咽頭顎進化の鍵と考えられるアミアカルヴァ／アミメウナギをはじめとする計4種のポリプテルス、陸上爬虫類（ヒョウモントカゲモドキ）の口顎の動き、鳥類（ニワトリの雛）の摂食時における特徴的な舌の動き、また、ミナミトビハゼが水から上がった状態で魚を補食する様子の立体ライブイメージングに成功している。本年度は、さらにカラシン目2種、シマドジョウが砂と餌を吸い込み、砂を鰓蓋から排出する様子のほか、クランウェルツノガエルが眼と舌を使って餌を飲み込む様子、ハエトリソウがヨロピアンイエコオロギを捕まえる様子を撮影することに成功した。

B: SPring-8における高解像度マイクロCTと共焦点顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡の技法を用いて、マイクロ・ナノ・マルチスケール位相CT法を用いて、個体内にあるゼブラフィッシュの脳や腸の細胞ひとつひとつ（CEMAPOC、マウスナー細胞、中腸と後腸の粘膜にある内外分泌細胞）を同定し高解像度観察することに成功している。本年度はさらに、幼生時に片方のCEMAPOCを赤外レーザーで破壊したのち育てた成魚の脳のマイクロCT解析を行った。

発表論文 List of Publications

- I-1 Daiji Takamido, Shin-ichi Okamoto, Shiori Satoh, Yumiko Mizumaki, Risa Wada, Ayumi Jimpo, Koichi Kawakami (遺伝研), Masataka Nikaido, Kohei Hatta. Functional Imaging and Optogenetic Analysis of Cells Derived from Three Germ Layers in the Larval Zebrafish Gut (口頭発表; Web開催) 11th European Zebrafish Meeting (2020年10月26-27日, Prague, Czech)
- II-1 Maria Ohno, Masataka Nikaido, Natsumi Horiuchi, Koichi Kawakami (遺伝研) & Kohei Hatta: The enteric nervous system in zebrafish larvae can regenerate via migration into the ablated area and proliferation of neural crest-derived cells. *Development*. vol. 148. dev195339. 2021.
- II-2 〇二階堂昌孝、白井彩香、水巻裕美子、川上浩一(遺伝研)、上野直人(基生研)、重信秀治(基生研)、八田公平 ゼブラフィッシュ消化管の初期発生過程において、腸神経細胞の分化や多様性の創出に関わる新規遺伝子の探索 (abstract WEB公開のみ) 第53回日本発生生物学会 (2020年5月19-22日, 熊本)
- IV-1 〇八田公平 放射光イメージングの動物学への応用: 魚類が持つ第2・第3の顎の機能の多様性と進化 (口頭発表; Web開催) The 14th NIBB Bioimaging Forum (2020年11月6日, 岡崎)
- IV-2 〇Kohei Hatta, Tomoya Shimamura, Hiroto Okada, Kentaro Uesugi (JASRI), Akihisa Takeuchi (JASRI), Masataka Nikaido, Daiji Takamido, Mio Aoki Zooming in from a whole animal to identified neurons or cells by micro-nano multi-scale synchrotron X-ray computer tomography. *Technologies for brain structure/function analysis* (口頭発表; Web開催) 第43回神経科学大会 (2020年7月29日-8月1日, 神戸)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

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 プラナリア摂食行動に関する研究

Molecular Analysis of Planarian Feeding Behavior

梅園良彦・餅井真・織井秀文
Umesono, Y., Mochii, M., Orii, H.

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

III プラナリアの体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体細胞へと分化する。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生殖細胞(卵や精子)へと分化し有性生殖を行うようになる。この生殖細胞は有性生殖体が切断される

と一旦全て消失し新たに形成される。体細胞と生殖細胞を生み出すこれら2種類の幹細胞の性質の相違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 浅田・織井・梅園：プラナリア乳酸脱水素酵素遺伝子 (*Djldh*) の発現解析. 日本動物学会第 91 回大会(オンライン)、2020
- I-2 神村・Auwal・梅園：酸化的リン酸化に着目したプラナリア頭部再生に関する解析. 日本動物学会第 91 回大会(オンライン)、2020
- I-3 Auwal MA, Kashima M (京大), Nishimura O (京大), Hosoda H, Motoishi M, Kamimura A, Okumura A, Agata K (京大), Umesono Y.: Identification and characterization of a *fibroblast growth factor* gene in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ.* 62: 527-539.(2020)
- II-1 澤本・服部・梅園：プラナリアにおける摂食調節に関わる神経細胞種の同定. 日本動物学会第 91 回大会(オンライン)、2020
- II-2 Miyamoto M, Hattori M, Hosoda K, Sawamoto M, Motoishi M, Hayashi T (理研), Inoue T (学習院大), Umesono Y. : The pharyngeal nervous system orchestrates feeding behavior in planarians. *Sci Adv.* 6, eaaz0882.(2020).

大学院生命理学研究科

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

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

浅田 楓 : 解糖系によるプラナリア幹細胞の機能制御に関する研究

神村 彬文 : 酸化的リン酸化によるプラナリア幹細胞の機能制御に関する研究

澤本 美香 : 咽頭を介したプラナリアの摂食行動の解析

科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会 科学研究費補助金 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.

私たちが食べ物から体内に吸収した鉄分は、各細胞へ運ばれて様々なタンパク質と結合して生理反応を触媒する。その一方で、病原菌が増殖に必要な鉄を補給する際には、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。そのため、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ヘムトランスポーターが安定化することを見出しており、低温電子顕微鏡による画像データの取得を進めた。今後引き続き試料調製とデータ収集を進めて 3 次元マップへの再構成解析へと進め、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する計画である。

II 金属タンパク質の構造機能解析

Structural and Functional Studies of Metalloproteins

當舎武彦・杉本 宏
Tosha, T., Sugimoto, H.

タンパク質の活性部位に補因子として金属イオンを結合している金属タンパク質は、温和な条件下で高選択的かつ高効率に触媒反応を行うことができる。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んでおり、得られた構造情報を基盤に分光計測や生化学的解析を組み合わせることで、金属タンパク質の反応機構の解明を目指している。本年度は、SACLA を用いて、脂肪酸酸化酵素（チトクロム P450BM3）、ペルオキシダーゼ、銅結合型亜硝酸還元酵素の反応中間体の無損傷構造解析を行った。また、他の金属タンパク質の触媒反応のメカニズムの解析においても、反応過程の解析で鍵となる中間体の時間分解計測のための基盤技術開発を行った。

発表論文 List of publications

- I-1. 杉本宏 「病原菌のヘム獲得のメカニズム」第15回トランスポーター研究会年会 2020年10月12-16日、オンライン開催（招待講演）
- I-2. Ayaho Abe, Hideki Shigematsu, Masaki Yamamoto, Yoshitugu Shiro, Hiroshi Sugimoto: Reconstitution of full-complex of bacterial heme transporter into the platforms suitable for structural analysis. 日本蛋白質科学会年会 2020年7月6-9日札幌（ポスター要旨発表）
- I-3. 浅田拓也, 鏑木基成, 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58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日）オンライン開催（ポスター発表）
- I-4. 木村哲就, 林沙英, 池本夕佳, 城宜嗣, 杉本宏: Time-resolved spectroscopic measurements on the transport dynamics of ABC transporter. 第58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日、オンライン開催（ポスター発表）
- II-1 Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, K. Suzuki, H. Onoda, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Aiba, Y. Watanabe, O. Shoji: Systematic Evolution of Decoy Molecules for the Highly Efficient Hydroxylation of Benzene and Small Alkanes Catalyzed by Wild-Type Cytochrome P450BM3, *ACS Catal.* 10, 9136-9144 (2020)
- II-2 K. Stanfield, K. Omura, A. Matsumoto, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: Crystals in minutes: instant on-site microcrystallisation of various flavours of the CYP102A1 (P450BM3) haem domain, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 7611-7618 (2020)
- II-3 A. Jamali, C. Gopalasingam, R. Johnson, T. Tosha, K. Muramoto, S. Muench, S. Antonyuk, Y. Shiro, S. Hasnain: The active form of quinol-dependent nitric oxide reductases from *Neisseria meningitidis* is a dimer, *IUCrJ* 7, 404-415 (2020)
- II-4 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, M. Horitani, A. Yokota, A. Matsubayashi, S. Ishii, Y. Shiro, M. Kubo, T. Tosha: Timing of NO Binding and Protonation in the Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase as Established by Time-Resolved Spectroscopy, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 93, 825-833 (2020)
- II-5 M. Lucic, D. A. Svistunenko, M. Wilson, A. Chaplin, B. Davy, A. Ebrahim, D. Axford, T. Tosha, H. Sugimoto, S. Owada, F. Dworkowski, I. Tews, R. Owen, M. Hough, J. A. R. Worrall: Serial femtosecond zero dose crystallography captures a water-free distal heme site in a dye-decolourising peroxidase to reveal a catalytic role for an arginine in FeIV=O formation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 21656-21662 (2020)
- II-6 S. Rose, S. Antonyuk, D. Sasaki, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Ago, R. Eady, T. Tosha, M. Yamamoto, S. Hasnain: An unprecedented insight into the catalytic mechanism of copper nitrite reductase from atomic resolution and damage-free structures, *Sci. Adv.*, 7, eabd8523 (2021)

- II-7 M. Kato, Y. Masuda, N. Yoshida, T. Tosha, Y. Shiro, I. Yagi: Impact of membrane protein-lipid interactions on formation of bilayer lipid membranes on SAM-modified gold electrode, *Electrochim. Acta*, 373, 13788 (2021)
- II-8 T. Tosha, R. Yamagiwa, H. Sawai, Y. Shiro: NO Dynamics in Microbial Denitrification System, *Chem. Lett.*, 50, 280-288 (2021)
- II-9 堀谷正樹, 杉本宏, 渡邊啓一, X-ray Crystallography and EPR Spectroscopy Reveal Active Site Rearrangement of Cold-Adapted Inorganic Pyrophosphatase, 第 58 回日本生物物理学会年会 2020 年 9 月 16-18 日、オンライン開催 (口頭発表)
- II-10 I. Yagi, Y. Masuda, N. Yoshida, S. Nakagawa, T. Tosha, M. Kato: Electrochemical Surface-enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase Immobilized on Gold Electrodes, 71st Annual Meeting of ISE (Belgrade Online), Aug. 2, 2020 (招待講演)
- II-11 當舎武彦、武田英恵、木村哲就、堀谷正樹、久保稔、城宜嗣: マイクロ秒時間領域で形成される一酸化窒素還元酵素反応中間体の分光解析、第 58 回日本生物物理学会年会(オンライン開催)、2020 年 9 月 16-18 日 (ポスター発表)
- II-12 當舎武彦: 時間分解結晶構造解析および分光解析が明らかにする金属酵素による一酸化窒素分解機構、第 2 回量子線科学セミナー ~生体分子の構造と作動原理を分子・原子・電子レベルで理解する~ Zoom を使った Web 講演会 (茨城大学)、2020 年 9 月 25 日 (招待講演)
- II-13 M. Kato, N. Yoshida, Y. Masuda, S. Nakagawa, T. Tosha, I. Yagi: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under Electrocatalytic Conditions, International Online Conference on Bio-Hybrid Approaches to Solar Energy Conversion (Biohybrid), Oct. 27-29, 2020 (口頭発表)
- II-14 當舎武彦: 構造生物学における XFEL と放射光の相補的利用~金属酵素の反応機構解明を目指して~、放射光ユーザーのための SACLA の利活用に関するワークショップ (SP8/SACLA オンライン)、2021 年 3 月 9 日 (招待講演)
- II-15 當舎武彦: 光解離性ケージド基質を利用した時間分解構造解析による酵素反応の可視化、日本薬学会第 141 回年会 (広島 オンライン)、2021 年 3 月 26-29 日 (招待講演)

生命理学専攻

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

- 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
- 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（令和 2～3 年度）新学術領域（研究領域提案型） 課題番号 20H05452
- 研究課題 ヘム酵素が生成する酸化活性種の精密構造析
- 研究代表者 杉本 宏
- 4 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
- 5 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
- 6 科学研究費補助金（令和 2～3 年度）新学術領域（研究領域提案型） 課題番号 20H05451
- 研究課題 高速分子動画でみる金属酵素活性中心における NO 還元反応
- 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] de Sa, V. R., Koike, K., Goto, T., Nozaki, T., Takaya, Y. & Yamasaki, T. : Natural Resources Research, 1-13 (2020)
- [2] Sato, S., Goto, T., & Koike, K. : Earth, Planets and Space, 72(1), 1-19 (2020)
- [3] Tomita, S. A., Koike, K., Goto, T., & Suzuki, K. : Geophysical Research Letters, 47(20), e2020GL088681 (2020)
- [4] Chang, P.-Y., Goto, T., Hu, X., & Um, E. : Terr. Atmos. Ocean. Sci., 31, 487-495 (2020)
- [5] Sato, S., Goto, T., Kasaya, T., & Ichihara, H. : Geophysics, 86(1), E21-E35 (2021)
- [6] Asaue, H., Koike, K., Yoshinaga, T., Goto, T., & Yoshida, H. : Natural Resources Research, 1-18 (2021)

科学研究費補助金等

- 1. 科学研究費補助金（平成 30-令和 3 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
- 2. 科学研究費補助金（平成 30-令和 3 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
- 3. 科学研究費補助金（令和 2-4 年度） 基盤研究(B) 課題番号：20H01974
研究課題 琵琶湖深部湖底湧水の地下構造との関係解明および湖底環境への
影響評価
研究代表者 小泉尚嗣
- 4. 科学技術振興機構持続可能開発目標達成支援事業（令和 2-3 年度）
研究課題 地熱生産井掘削地点特定用の蒸気スポット検出技術の高精度化
とボーリングによる実証
研究代表者 小池克明