

生命科学專攻

Department of Life Science

I 膜タンパク質の細胞内局在化とトポロジー形成機構

Molecular Mechanism for Topogenesis and Targeting
of Membrane Proteins in the Cell

阪口雅郎・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として、小胞体内腔 Hsp70 である Kar2p の存在量に依存して、疎水性セグメントのトランスロコンにおける膜透過動きが向上すること、Kar2p の点変異体の追加発現によって強いドミナントネガティブ作用が見られることを見出した。さらに、Kar2p の、ATP 結合、リン酸加水分解、基質結合領域、J-タンパク質結合領域、ドメイン間ヒンジ領域など、各機能ドメインの点変異を構築し、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詳細に解析している。②合成共役型タンパク質膜透過の駆動作用の作用点の解析：合成後に進行するポリペプチド鎖の膜透過においては、Kar2p は Hsp70 のシャペロン作用サイクルを介してラチェット機能を発揮して駆動すると信じられている。一方、合成後型膜透過では、ポリペプチド鎖の伸長自体が駆動力として有効であり、ラチェット作用の貢献する余地がないと考えられているため、合成共役型膜透過における Kar2p の作用ドメインの解析が必要であった。そこで、Kar2p のドミナントネガティブ作用を示す点変異体について、そのネガティブ効果を消失する第 2 の変異、すなわち分子内抑圧変異の探索を進めている。これにより、合成共役型の膜透過における複数の Kar2p の作用点が明らかになるものと期待される。③膜タンパク質のトポロジーを規定する正電荷配列の作用機構の解析：これまでポリペプチド鎖上の正電荷残基がトランスロコンにおける膜透過を抑制することによって複雑な膜タンパク質の分子配向や膜貫通トポロジーが規定されることを明らかにしてきた。ここでは、正電荷残基を識別するトランスロコン側の要因を解明するために、トランスロコン本体分子 Sec61p および第 2 のトランスロコンチャンネルである Ssh1p について、系統的変異を導入し、正電荷配列部分の合成共役型膜透過状況を調べている。多数の変異について、正電荷配列の透過効率変動が観察されており、詳細を解析中である。

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、生合成されたタンパク質の局在や機能を制御するしくみを解き明かし、化学物質に対する生体防御系の制御機構を明らかにすることを目標にして研究を進めてきた。ABCC2 はグルクロン酸抱合体などを肝細胞から胆管へ排出する輸送体であり、肝細胞において血管側ではなく胆管側の細胞膜に極性をもって局在化する。ABCC2 と同じファミリー C に分類される ABCC1 と OATP1B1 および OATP1B3 は、肝細胞において胆管側ではなく血管側の細胞膜に局在化する。同じ細胞膜であっても、このように極性の異なる局在化様式があるが、極性局在化を制御するしくみに関して全容解明から程遠いのが実状である。そこで、極性局在化の制御を明らかにする研究を進めている。

① ABCC2 の極性局在化を決定するシグナル配列の一つとして見出された、283 番目のセリンから始まる配列 (SQDAL) と結合するタンパク質を、酵母ツーハイブリッド法により見出しており、生合成された ABCC2 を細胞膜に標的化させる機構を明らかにする研究を進めている。

② 酵母ツーハイブリッド法によって ABCC2 のカルボキシ末端部に結合するタンパク質をスクリーニングし、その一つとしてクラスリン被覆小胞に付随するタンパク質として知られている NECAP1 を見出した。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた ABCC2 を細胞膜に再循環させる過程において、NECAP1 がはたらいていることを証明すべく研究を進めている。

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

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

発表論文 List of Publications

II-1 衣斐 義一「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～細胞膜の特定の場所にタンパク質を配達するしくみを探る～」知の交流シンポジウム 2021 (2021 年、兵庫)

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

大裏夏也

大原正明

城尾優実

水野花菜

松本侑子

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

Spectroscopy

生体物質構造学 II

I 金属タンパク質のラマン分光解析

Raman spectroscopic analysis of metalloproteins

柳澤幸子・佐藤航・長尾聡・山田大智・北川禎三・久保稔
Yanagisawa, S., Sato, W., Nagao, S., Yamada, D., Kitagawa, T.,
Kubo, M.

当講座では共同利用機器センターの振動分光装置群を維持管理するとともに、それらを用いて金属タンパク質の構造機能相関を研究している。2021年度は、チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の活性増強機構の解明を大きく進めた。CcO はミトコンドリア内膜の呼吸鎖末端で働く酵素であり、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、膜を介して H⁺ をポンプしている。近年、低酸素下で CcO の活性をアロステリックに増強する膜タンパク質 (Hypoxia-inducible gene domain 1; HIGD1) が同定されているが、われわれは共鳴ラマン分光法を用いて、HIGD1 が CcO の H⁺ ポンプ経路に構造変化を引き起こすことを見出した。リポソームを用いたアッセイ系を構築し、HIGD1 結合時の H⁺ ポンプ活性の上昇も捉えつつあり、さらなる機構解明を進めている。また、学外との共同研究を 8 件実施し、金属酵素モデル錯体のラマン分光解析を 2 報論文発表した (*Inorg. Chem., Chem. Eur. J.*)。

II タンパク質の SACLA 時間分解構造解析

Time-resolved structural analysis of proteins using SACLA

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

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時間軸上で観測できる動的構造解析手法であり、当講座は世界に先駆けてこの手法を活用してきた。2021年度は、チトクロム P450 の O₂ 結合型中間体の構造解析を進め、ヘム Fe への O₂ 結合が基質の配向を最適化する動きを捉えることに成功した。本発見で講座配属生 (M1 桑野わ子) が第 59 回日本生物物理学会年会で学生発表賞を受賞した。その他、学外との共同研究で種々のタンパク質の時間分解結晶構造解析を進めている。2021年度は塩化物イオンポンプロドプシンと光化学系 II の動的構造解析を論文発表した (*PNAS, IUCrJ*)。

Ⅲ 酵素反応の時間分解分光解析

Time-resolved vibrational analysis of enzymatic reactions

山田大智・柳澤幸子・久保稔

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

ケージド基質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、ヘムやフラビンなどの補因子を有する酵素の触媒反応機構を研究している。2021年度は、NO還元酵素（チトクロム P450_{nor}）の中間体の化学構造を顕微時間分解 FTIR で決定し、時間分解結晶構造解析の結果と併せて論文発表した（*PNAS*）。2つの先端手法を統合することで、本酵素のラジカル反応機構を解明した。また、Trp代謝酵素（インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ）の中間体を Stopped-flow ラマン分光法で解析し、基質 Trp のヘムポケットへの結合ステップを解明した。さらに本年度は、損傷 DNA を光依存的に修復するフラビン酵素（6-4 フォトリアーゼ）の研究にも大きな進展が見られた。時間分解紫外可視・赤外分光測定により、本酵素においては DNA の完全修復に光吸収が 2 回必要であることを解明した。本発見で講座配属生（M1 楞野亜衣）が第 47 回生体分子科学討論会優秀ポスター賞を受賞した。

Ⅳ 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

SEIRAS system development for *operando* analysis of protein structure and function

山田大智・久保稔

Yamada, D., Kubo, M.

タンパク質の構造解析と機能解析を同時に行なえる表面増強赤外分光装置を開発している。この装置では、Ni-NTA を化学修飾した金表面に His タグを付加したタンパク質を固定化し、表面敏感な赤外分光測定によりタンパク質の構造と機能をオペランド計測する。前年度までに赤外分光測定で用いる Si プリズムへの金薄膜形成と Ni-NTA の化学修飾に成功している。2021年度は His タグを付加したタンパク質（フォトリアーゼ）の金表面への固定化を試みた。しかし、His タグを介さず金表面に直接吸着したタンパク質が多数見られ、タンパク質の固定化法に課題が残された。

V 二機能性クリプトクロムの天然変性領域の構造解析

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

長尾聡・山田大智・久保稔

Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

クラミドモナス由来の動物型クリプトクロム (CraCRY) は、DNA 光修復酵素／クリプトクロムスーパーファミリーに属するフラボタンパク質であるが、(i) クリプトクロムとしての概日時計制御機能に加えて、(ii) DNA 光修復酵素としての酵素機能も保持した二機能性タンパク質である。CraCRY は C 末端に約 100 残基の天然変性領域を有するが、光に依存した C 末端領域のダイナミクスが二機能性制御の鍵を握る。2021 年度は、C 末端領域を含む全長 CraCRY の発現・精製法を確立し、まずは空気酸化した酸化状態の X 線小角散乱 (SAXS) 実験を行なった。現在、SAXS データを解析し、C 末端領域の構造状態を解析するとともに、NMR による構造解析を試みている。

VI 協同性を有するミオグロビン人工二量体の分子設計

Molecular design of artificial myoglobin dimer as cooperative O₂ carrier

長尾聡・山田大智・久保稔

Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

ミオグロビンは特定のループに変異を加えることで、互いの部分構造をスワップさせた二量体を形成する。本研究では変異導入を工夫することで、酸素結合に協同性をもったミオグロビン二量体を分子設計する。2021 年度は、三箇所変異を加えたミオグロビン二量体を調製し、CO (O₂ アナログ) 結合に対して協同性を示唆する結果を得た。今後、酸素解離曲線の測定によるヒル係数の決定、O₂ 結合時の構造変化解析へと研究を進める計画である。

発表論文 List of Publication

- I-1 Mikata, Y.* (奈良女子大), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Kodera, M. (同志社大) et al.: A synthetic model for the possible Fe^{IV}₂(μ-O)₂ core of methane monooxygenase intermediate Q derived from a structurally characterized Fe^{III}Fe^{IV}(μ-O)₂ complex, *Inorg. Chem.* 61, 786-790 (2022).
- I-2 Shinke, T. (大阪大), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Itoh S.* (大阪大) et al.: Revisiting alkane hydroxylation with *m*-CPBA (*m*-chloroperbenzoic acid) catalyzed by nickel(II) complexes, *Chem. Eur. J.* 27, 14730-14737 (2021).
- I-3 Hagiwara, S. (筑波大), Momotake, A. (筑波大), **Ogura, T.**, **Yanagisawa, S.**, Suzuki, A. (長岡工業高専), Neya, S. (千葉大), Yamamoto, Y.* (筑波大): Effects of Heme Electronic Structure and Local Heme Environment on Catalytic Activity of a Peroxidase-Mimicking Heme-DNAzyme, *Inorg. Chem.* 60, 11206-11213 (2021).

- I-4 Nagatomo, S.* (筑波大), **Kitagawa, T.***, Nagai, M. (法政大) : Roles of Fe-Histidine bonds in stability of hemoglobin: Recognition of protein flexibility by Q Sepharose, *Biophys. J.* 120, 2734-2745 (2021).
- I-5 **Matsumura, W., Yanagisawa, S.**, Shinzawa-Itoh, K. (兵県大), Nishida, Y. (国循), Nagao, T. (国循), Shintani, Y. (国循), **Kubo, M.** : Spectroscopic study on the action mechanism of Higd1a for activating cytochrome *c* oxidase, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- II-1 Hosaka, T. (理研), **Nomura, T., Kubo, M.**, Nango, E.* (東北大), Shirouzu, M.* (理研) et al.: Conformational alterations in unidirectional ion transport of a light-driven chloride pump revealed using X-ray free electron lasers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 119, e2117433119 (2022).
- II-2 Li, H. (兵県大), Nakajima, Y. (岡山大), **Nomura, T., Kubo, M.**, Iwata, S. (京都大), Shen, J.-R.* (岡山大), Suga, M.* (岡山大) et al.: Capturing structural changes of the S1 to S2 transition of photosystem II using time-resolved serial femtosecond crystallography, *IUCrJ* 8, 431-443 (2021).
- II-3 **久保稔** : SACLA により明らかにされるタンパク質の動的構造と機能、第 39 回 ST クラブ (姫路)、2021 年 7 月 26 日 (Invited) .
- II-4 **Kuwano, W., Nagao, S.**, Tosha, T. (理研), Stanfield, J. K. (名古屋大), Kasai, C. (名古屋大), Ariyasu, S. (名古屋大), Shoji, O. (名古屋大), Sugimoto, H. (理研), **Kubo, M.** : Structure of a heme-oxy intermediate of cytochrome P450BM3 catalyzing a non-natural substrate, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日 (学生発表賞) .
- III-1 **Nomura, T., Yamada, D.**, Tosha, T.* (理研), **Kubo, M.***, Shiro, Y.* (兵県大) et al.: Short-lived intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2101481118 (2021).
- III-2 **山田大智** : 時間分解顕微分光法による構造ダイナミクス研究、第 35 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (online)、2022 年 1 月 8 日 (招待講演) .
- III-3 **Kubo, M.** : Time-resolved infrared and XFEL analyses of P450nor reaction intermediates using caged-substrate, Pacificchem2021 (Online) Dec 20, 2021 (Invited) .
- III-4 **Kubo, M.** : Combining time-resolved XFEL crystallography with IR spectroscopy for capturing P450nor reaction intermediates, Pacificchem2021 (Online) Dec 17, 2021 (Invited) .
- III-5 **Yanagisawa, S.** : Ultraviolet resonance Raman characterization of a substrate bound to human indoleamine 2,3-dioxygenase 1, Pacificchem2021 (Online) Dec 21, 2021 (Invited) .
- III-6 **Kawamura, M., Nasada, K., Yanagisawa, S., Kubo, M.** : Investigation of reaction intermediates of indoleamine 2,3-dioxygenase by using a stopped-flow Raman/absorption spectrometer, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- III-7 **Kadono, A., Yamada, D.**, Yamamoto, J. (大阪大), **Kubo, M.** : Time-resolved IR spectroscopic detection of a photorepair intermediate in (6-4) photolyase, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- III-8 **Maeno, T., Yamada, D.**, Yamamoto, J. (大阪大), **Kubo, M.** : Microflow-flash Time-resolved UV-vis spectroscopic analysis of DNA photorepair reaction catalyzed by cryptochrome CraCRY, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- III-9 **山田大智、楞野亜衣、久保稔** : 顕微分光装置開発の現状と DNA 光修復酵素の時分割分光解析、令和三年度 新学術領域研究「高速分子動画」 シンポジウム (淡路)、2021 年 11 月 1 日.

- III-10 山田大智、楞野亜衣、山元淳平（大阪大）、久保稔：時間分解分光法を用いた(6-4)光回復酵素の逐次的 2 光子反応モデルの検証、第 15 回分子科学討論会（online）、2021 年 9 月 20 日。
- III-11 河村味奈、柳澤幸子、久保稔：Stopped-flow ラマン・吸収同時測定装置の開発とそれを用いた IDO 酵素反応追跡の試み、第 47 回生体分子科学討論会(ポスター、online)、2021 年 6 月 4 日。
- III-12 楞野亜衣、山田大智、山元淳平（大阪大）、久保稔：時間分解赤外分光法を用いた(6-4)光修復酵素の光修復中間体の追跡、第 47 回生体分子科学討論会（ポスター、online）、2021 年 6 月 4 日（優秀ポスター賞）。

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 河村味奈（M2）：Stopped-flow 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中間体の解析
- 松村和香（M2）：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
- 楞野亜衣（M1）：時間分解赤外分光法を用いた DNA 光修復酵素の触媒機構解析
- 北山実咲（M1）：膜タンパク質オペランド解析に向けた表面増強赤外分光装置の開発
- 桑野わ子（M1）：SACLA を用いたチトクロム P450 酸素化型中間体の無損傷構造解析
- 名定加峰（M1）：Stopped-flow 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基質阻害機構の解析
- 前野達海（M1）：クリプトクロムの DNA 光修復機能の分光学的解析

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 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
- 4 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
- 5 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
- 6 公益財団法人木下記念事業団 木下基礎科学研究基金助成（令和 3 年度）

- 研究課題 表面増強赤外分光法を用いた温度感受性チャネルの反応機構解明
研究代表者 山田大智
- 7 兵庫県立大学 令和3年度特別研究助成金（若手研究者支援）
研究課題 アロステリック調節因子によるチトクロム酸化酵素活性化の作用機序
をダイナミックピコバイオロジーに基づいて理解する
研究代表者 柳澤幸子
- 8 兵庫県立大学 令和3年度女性研究者研究活動助成金
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

Protein Crystallography

生体物質構造学 I

I 微生物の細胞機能を維持するタンパク質群のX線構造化学

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

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に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、フェレドキシン-NADP還元酵素、マルチ銅酸化酵素、抗生物質の生産など医薬品合成に応用できるアミノ酸2量体合成酵素などについても高精度な構造化学的研究を展開している。

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

II 高等生物細胞のタンパク質間相互作用のX線構造生物学

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

柴田直樹・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。

細胞は外界の変化に反応して代謝や増殖を調節するためのシグナル伝達機構をもっている。本研究室ではWntシグナル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 T. Imanishi, K. Nishikawa, M. Taketa, K. Higuchi, H. Tai, S. Hirota, H. Hojo, T. Kawakami, K. Hataguchi, K. Matsumoto, H. Ogata, Y. Higuchi, Structural and spectroscopic characterization of CO inhibition of [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77. *Acta Cryst. F78*, 66-74 (2022)
- I-2 T. Toraya, T. Tobimatsu, K. Mori, M. Yamanishi, N. Shibata, Coenzyme B₁₂-dependent eliminases: Diol and glycerol dehydratases and ethanolamine ammonia-lyase. *Methods in enzymology*, **668**, 181-242 (2022)
- I-3 T. Toraya, T. Tobimatsu, N. Shibata, K. Mori, Reactivating chaperones for coenzyme B₁₂-dependent diol and glycerol dehydratases and ethanolamine ammonia-lyase. *Methods in enzymology*, **668**, 243-284 (2022)
- I-4 樋口芳樹: ヒドロゲナーゼによる水素合成・分解についての構造化学, ポリマーフロンティア 21 2021/6/7 オンライン開催【口頭発表】
- I-5 玉田太郎, 廣本武史, 西川幸志, 平野優, 日下勝弘, Leighton Coates, 樋口芳樹: *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子結晶構造解析, 日本蛋白質科学会年会 2021/6/16 オンライン開催【口頭発表】
- I-6 柴田直樹, 樋口芳樹, 虎谷哲夫: ラジカル B₁₂ 酵素ジオールデヒドラターゼ-アデノシルメチルコバラミン複合体の立体構造, 第 463 回ビタミン B 研究協議会 2021/7/3 オンライン開催【口頭発表】
- I-7 樋口芳樹: 水素合成・分解酵素の構造生物学, 令和 3 年度兵庫県高等学校教育研究会生物部会 講演会 2021/7/8 姫路市立総合教育センター クレアホール【口頭発表】
- I-8 柴田直樹, 樋口芳樹, 虎谷哲夫: ラジカル B₁₂ 酵素エタノールアミンアンモニアリアーゼ-アデノシルメチルコバラミン複合体の立体構造, 第 464 回ビタミン B 研究協議会 2021/8/27 オンライン開催【口頭発表】
- I-9 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼの構造化学, 水素エネルギー共同研究センター研究発表会 2021/8/31 オンライン開催【口頭発表】
- I-10 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼの分子機能の構造基盤, CBI 学会 2021 年大会 (第 2 回量子構造生命科学研究シンポジウム) 2021/10/27 オンライン開催【口頭発表】
- I-11 樋口芳樹: 水素社会の実現を目指して, バイオインダストリー協会・発酵と代謝研究会 2021/11/22 オンライン開催【口頭発表】
- I-12 K. Nishikawa, Y. Nakagawa, S. Inoue, T. Chuji, S. Nakashima, Y. Shigeta, K. Fukutani and Y. Higuchi: New assay method for the enzymatic reaction with gaseous substrates by Raman spectroscopy, Materials Research Meeting 2021 2021/12/13 PACIFICO Yokohama, Yokohama【口頭発表】
- II-1 C. Xie, H. Shimoyama, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, N. Shibata, Y. Higuchi, Y. Shigeta, S. Hirota, Experimental and theoretical study on converting myoglobin into a stable domain-swapped dimer by utilizing a tight hydrogen bond network at the hinge region, *RSC Adv.*, **11**, 37604-37611 (2021)
- II-2 柴田直樹: がん細胞増殖シグナルを活性化する Cytoskeleton-associated protein 4 細胞外領域の構造解析, 第 3 回ピコバイオロジー研究会 2022/3/14 オンライン開催【ポスター】
- II-3 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: ミオグロビンにおける安定性向上および金属結合性付与ドメインスワップ二量体の分子設計, 第 15 回バイオ関連化学シンポジウム 2021/9/8-10 オンライン開催【口頭発表】
- II-4 C. Xie, H. Shimoyama, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, N. Shibata, Y. Higuchi, Y. Shigeta, S. Hirota: Experimental and theoretical study on converting myoglobin into a stable domain-swapped dimer by utilizing a tight hydrogen bond network at the hinge region, 日本化学会春期年会 2022/03/25, オンライン開催【口頭発表】

科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金 (令和 3 年度~令和 5 年度) 基盤研究(B) (一般) 課題番号: 21H02420
研究課題: Wnt シグナル因子が関わる新規癌細胞増殖シグナル活性化と阻害抗体の構造基盤

- 研究代表者 柴田直樹
2. 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
 3. 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
 4. 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

Cellular Regulation

細胞制御学Ⅱ

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
Shiro, Y., Muramoto, K.

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 (*Pac*NOR) 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、時間分解 X 線結晶構造解析を開始した。cNOR による NO 還元反応は、還元型 cNOR と NO が反応することで開始されるので、酸素分子 (O₂) により還元型 NOR が自動酸化されるのを防ぐことが必須となる。本年度は、O₂ の透過性が非常に低い O₂ バリアフィルムであるエチレン・ビニルアルコール共重合体からなるフィルムを用いると、還元型 cNOR を一週間以上維持することができ、この状態での結晶化、結晶構造解析も可能であることを確認した。さらに、酸化型 cNOR とケージド NO を O₂ バリアフィルムで挟み共結晶化し、光照射した後に結晶構造解析を行った。亜硝酸 (NO₂) 結合型 NOR の構造が得られ、ケージド NO の光解離をトリガーとした反応系も利用できることを示した。

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来のキノール依存性 NOR (*Nmq*NOR) は、機能単位は単量体であるが二量体で高活性である。低温電子顕微鏡を用いた解析により、野生型 *Nmq*NOR 二量体の構造を 2.85 Å 分解能で決定した。野生型 *Nmq*NOR 単量体の構造を 3.05 Å 分解能で決定し、二量体の安定化と二量体化による活性化に関与するアミノ酸残基を特定した。さらに、*Nmq*NOR と阻害剤 (HQNO: 2-heptyl-4-quinolinol 1-oxide) の複合体の構造解析を進め、2.97 Å 分解能構造を決定した。野生型 *Nmq*NOR 構造、および *Nmq*NOR と類縁の大腸菌キノール酸化酵素との比較からキノール結合部位を特定し、アミノ酸変異体の酵素反応速度解析による検証を行った。

II 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。これらの膜タンパク質の機能不全は、鉄代謝異常の起因となるため、機能制御メカニズムを詳細に解明することは医学的にも大変重要である。本研究では、ヒトの腸管における鉄イオン吸収をプラスチックプレート内で再現できる「ヒト腸管モデル細胞システム」を構築し、それを用いて *Dcytb*-*DMT1* による鉄イオン吸収の機能評価を行うことを目的としている。

昨年度までに、ヒト結腸がん由来 *Caco-2* 細胞が分化した特殊な細胞 *Caco-2-kh* 細胞にヒト由来 *dcytb* 遺伝子を導入し、*Dcytb* を一過性発現させた細胞を用いて、定性的かつ定量的に鉄イオン吸収評価が行えるシステムを構築してきた。本年度は、すべての *Caco-2-kh* 細胞が恒常的に *Dcytb* を過剰発現した状態を保つことができる安定発現株を作製した。野生型 *Dcytb* の安定発現株の作製は完了し、それを用いて鉄イオン吸収評価を行った。安定発現株の場合、恒常的に *Dcytb* を過剰発現しているため、*dcytb* 遺伝子を導入していない *Caco-2-kh* 細胞（コントロール細胞）よりも培養液中の鉄イオンを多く取り込んでいた。この安定株を用いて、鉄イオン吸収に対する糖や有機酸の効果を検討した結果、フルクトースおよびリンゴ酸の添加により、細胞内 Fe^{2+} 量が劇的に向上することが明らかになった。フルクトースならびにリンゴ酸が Fe^{3+} をキレートして *Dcytb* の基質結合ポケットに結合することで、 Fe^{3+} 還元反応が促進されて鉄イオン吸収が向上し、結果的に細胞内 Fe^{2+} 量を増加させている可能性があると考えた。フルクトース結合型 *Dcytb* のX線結晶構造解析をめざして、本年度は *in situ* 結晶化用プレート *DiffraX™* を用いて LCP 結晶を作製し、AOMUSHI システムを用いてX線回折データ収集をおこなった。決定した *Dcytb* の全体構造は、先行研究で明らかになっている「基質フリー型」および「亜鉛アスコルビン酸結合型」とほぼ同じだったが、一部のデータでは基質ポケットに残余電子密度が観測された。しかし、電子密度が不明瞭であるため、何が結合しているかは未だ同定できていない。

ヒト二価金属トランスポーター *DMT1* は、分子レベルでの研究が報告されておらず、未だ不明な点が多い。本研究では精製 *DMT1* を用いた分子レベルでの機能・構造解析を行うことで鉄取り込みの分子機構解明を試みる。メタノール資化性酵母を用いてヒト *DMT1* の発現、精製を行なしたが、細胞内における *DMT1* の分解が認められ、全長タンパク質を得ることができなかった。哺乳類由来の *CHO* 細胞を用いて *DMT1*-GFP 融合タンパク質の発現系を共同研究者の築取いずみ助教（名古屋大学医学研究科）に構築していただいた。本年度はこの *CHO* 細胞を大量培養し、細胞膜画分からの可溶化及び野生型 *DMT1* の単離精製の条件検討を行なった。培養 dish で継代した細胞を回収し、超音波破砕及び高速遠心分離によって得られた細胞膜画分に非イオン性界面活性剤 *DDM* 及びコレステロール誘導体 *CHS* を加えて可溶化した。得られた可溶化上清を *Ni* アフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。精製標品を用いて *SDS*-*PAGE* 及びゲルの *CBB* 染色を行った結果、100 kDa 付近に鮮明なバンドが確認できた。このバンドを用いて *N* 末端アミノ酸分析を行った結果、ヒト *DMT1* のアミノ酸と一致し、全長タンパク質の精製を確認できた。Blue-

Native PAGE (BN-PAGE)を行いウエスタンブロッティング(WB)を行った結果、およそ 240 kDa にバンドが見られ、溶液状態で精製 DMT1 は二量体を形成していると考えられた。しかしながら、精製標品に不純物の混在が認められたため、形質膜のみをベシクル化させ分離する手法を用いて膜面分を回収した。この膜面分からの精製では、SDS-PAGE で不純物由来のバンドが消失しており、ベシクル化を利用することで精製純度が向上することが示された。今後はベシクル化を応用しながら大量培養及び精製を行う。

DMT1 の働きにより、細胞内に取り込まれた Fe^{2+} は、酵素の活性中心として利用される・フェリチンに貯蔵される・毛細血管側に放出されて血清タンパク質に結合し血流によって全身を巡る等の運命をたどる。 Fe^{2+} は水溶性が高く、生体が利用しやすい状態ではあるが、遊離の Fe^{2+} は反応性に富むため、最も強力な活性酸素ヒドロキシラジカルの産生源でもある。近年、細胞内に取り込まれた Fe^{2+} を安全に輸送する役割を担うタンパク質（鉄シャペロン）として、水溶性タンパク質である PCBP (poly r(-C) binding protein) が報告されている。本研究では、PCBP の鉄シャペロンとしての詳細な性質や鉄輸送の分子メカニズムは解明することを目的としている。組換え PCBP を大腸菌 BL21(DE3)に発現させ、そこから高純度の精製標品を調製する方法を確立した。PCBP 標品には Fe^{3+} ではなく Fe^{2+} が結合でき、二量体あたり 2 つの Fe^{2+} が結合するという結果を得た。PCBP の鉄シャペロン機能を解明するためには、DMT1、*Dcytb* ならびに鉄貯蔵タンパク質フェリチン複合体形成を検討する必要がある。*Dcytb* と PCBP の複合体化については、*Dcytb* とアポ型 PCBP1 を混合してゲルろ過クロマトグラフィーと Blue-Native PAGE を行った結果、*Dcytb* 二量体に対して PCBP 二量体が 2 分子結合して複合体化している可能性が示唆された。今後、X線小角散乱法やクライオ電子顕微鏡による単粒子解析により明らかにする。

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、鉄の輸送や鉄濃度感知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。病原菌の内臓で発現している ABC 型ヘムインポーターについて、低温電子顕微鏡による立体構造解析に取り組んでいる。構造解析試料の調整の際に両親媒性分子の存在でヘムインポーターが安定化することを見出しており、ヘム結合タンパク質との複合体や ATP アナログ結合型の状態での電子顕微鏡による画像データの取得を進め、低分解能の 3 次元再構成マップを得た。今後も引き続きデータ収集を進めて、高分解能構造決定を行う計画である。また、神戸大学の木村グループを中心に、二重スピンラベル ESR 分光法を用いたヘムインポーターの構造ダイナミクスの解析を行っており、これらを統合してヘム輸送サイクルにおけるインポーター分子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指す。また、B 群レンサ球菌のアガラクチア菌 *Streptococcus agalactiae* が宿主の血中から鉄源としてヘムを奪取する際にヘムによる細胞毒性を軽減するために用いるヘム応答センサータンパク質 PefR の立体構造を解明した。PefR が機能しなくなると、アガラクチア菌はヘムの毒性で死滅することから PefR に特異的な阻害剤を探索できれば、アガラクチア菌に特異的な抗菌薬を開発できると考えた。そこで、アガラクチア菌の *pefR* オペロン上に存在する遺伝子 (*gbs1400*, *1401*, *1402*) のノックアウト株を作製し、スクリーニング実験を行うことで、抗菌薬候補となる化合物の探索を試みている。現在、ノックアウト株の増殖を検討した結果、野生型とほぼ同じ速度で増殖できるクローンを幾つか取得できた。今後、化合物ライブラリーを用いて培地に様々な化合物を添加し、野生株とノックアウト株の増殖を比較することで、PefR に特異的な抗菌薬候補化合物を探索する。

Ⅲ 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 であるシトクロム酸化酵素 (Cytochrome *c* oxidase: CcO) について、2 量体 CcO の 1.3 Å 分解能構造を決定し、2 量体化に関わるアミノ酸と脂質の構造、および翻訳後修飾による構造を論文で報告した。酸素還元反応中間体のひとつである O 型の構造を 1.84 Å 分解能で決定し、論文で報告した。CcO と電子供与体 (シトクロム *c*) の複合体の 2.55 Å 分解能での構造解析を進めた。活性阻害効果を示す界面活性剤を含まないコール酸フリー CcO を調製し、構造決定へ向けた取り組みを開始した。

発表論文 List of Publications

- I -1 T. Nomura, T. Kimura, Y. Kanematsu, D. Yamada, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, T. Hisano, R. Yamagiwa, H. Takeda, C. Gopalasingam, R. Kousaka, S. Yanagisawa, O. Shoji, T. Kumasaka, M. Yamamoto, Y. Takano, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo, and Y. Shiro "Short-lived intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2021, **118**, e2101481118, doi: 10.1073/pnas.2101481118.
- I -2 Mukai, K., Sugimoto, H., Kamiya, K., Suzuki, R., Matsuura, T., Hishiki, T., Shimada, H., Shiro, Y., Suematsu, M., Kagawa, N. "Spatially restricted substrate-binding site of cortisol-synthesizing CYP11B1 limits multiple hydroxylations and hinders aldosterone synthesis". *Curr. Res. Struct. Biol.* **3**, 192-205 (2021)
- I -3 Kwon, H., Basran, J., Pathak, C., Hussain, M., Freeman, S. L., Fielding, A. J., Bailey, A. J., Stefanou, N., Sparkes, H. A., Tosha, T., Yamashita, K., Hirata, K., Murakami, H., Ueno, G., Ago, H., Tono, K., Yamamoto, M., Sawai, H., Shiro, Y., Sugimoto, H., Raven, E., Moody, P. C. E. "XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II". *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 14578-14585 (2021)
- I -4 Chai C. Gopalasingam "Exploring native structures of nitric oxide reductase using cryoEM" Integrated Bio-metal Science (IBmS) Summer Camp 2021, Hokkaido, Sep 4-6th 2021
- I -5 Chai C. Gopalasingam "Harnessing the power of electrons to unravel atomic level structures of macromolecules" RIKEN Pioneering Projects (Material Hierarchical Principles and Heterogenous Interfaces Research Group), Wako, Dec 5th, 2021 (online)
- I -6 福本幸起, Chai C. Gopalasingam, 當舎武彦, 村本和優, 城宜嗣 「髄膜炎菌の感染増殖に必須の酵素：一酸化窒素還元酵素～構造、機能とその阻害～」 兵庫県立大学「知の交流

- シンポジウム 2021」 2021年9月28日 [オンライン開催]
- I-7 Gopalasingam C, Yamaoka H, Shibata A, Fukumoto K, Shigematsu H, Tosha T, Muramoto K, Shiro Y “Probing functional and structural differences of quinol dependent Nitric Oxide Reductases” (qNOR) within a lipidic nanodisc environment” 第21回日本蛋白質科学会年会 第21回日本蛋白質科学会年会 2021年6月16-18日 [オンライン開催]
- I-8 榛葉幹治、松浦滉明、平田邦生、山本雅貴、城宜嗣、當舎武彦 「酸素バリア性フィルムを用いた嫌気条件下での一酸化窒素還元酵素反応中間体の構造解析への挑戦」 第47回生体分子科学討論会、オンライン、2021年6月4日 (金)
- I-9 Takehiko Tosha, Hanae Takeda, Yoshitsugu Shiro and Minoru Kubo, “Time-resolved techniques provide mechanism for nitric oxide reduction by nitric oxide reductase” Pacificchem 2021 (Novel Heme Proteins and Model Systems), online, 2021年12月20日 (月)
- I-10 プレスリリース「温室効果・オゾン層破壊の原因である亜酸化窒素の生物的発生機構の解明」 2021年5月17日
- II-1 Hitomi Sawai “Structural insights into the multifunctionality of the heme-responsive sensor protein for detoxification in hemolytic bacteria” The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacificchem 2021), December 20, 2021 (オンライン発表)
- II-2 Hitomi Sawai “Structural basis for the multifunctionality of the heme-responsive sensor protein for heme detoxification in hemolytic bacteria” 11th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-11), June 28, 2021 (オンライン発表)
- II-3 澤井仁美 “鉄イオンの吸収に関わる膜タンパク質の構造と腸管モデル細胞を用いた機能解析” 第1回トランスポーター研究会関西部会、2021年10月30日 (オンライン発表)
- II-4 澤井仁美 “膜タンパク質の立体構造を基盤とする腸管モデル細胞を用いた鉄イオン吸収メカニズムの解析” 生理学研究所研究会「上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出」、自然科学研究機構生理学研究所、2021年9月10日 (オンライン発表)
- II-5 澤井仁美 “生体内「鉄」動態の統合的研究：食物中の鉄分を吸収し利用する仕組みを分子⇔細胞レベルで精密に理解すること” 兵庫県立健康科学研究所合同研究発表会、2022年2月8日 (オンライン発表)
- II-6 澤井仁美 “生命金属科学の統合的研究による創薬を目指して” 生命金属科学 夏の合宿、2021年9月5日、北海道
- II-7 浦敦人、阪口智哉 “ヒト小腸での鉄吸収の構造・細胞生物学”第3回技術・人材マッチング交流会、2021年12月9日 (オンライン発表)
- II-8 高原教代、杉本宏、神戸大朋、城宜嗣、澤井仁美 “ヒト腸管細胞モデル系を用いた鉄イオンの吸収を向上させる食品成分の探索とそれらの成分が鉄輸送関連タンパク質に作用する分子機構” 第94回日本生化学会大会、2021年11月3-5日 (オンライン発表)
- II-9 澤井仁美 2022年1月4日 ラジオ関西「PUSH！」出演 “生きるために必要な金属「鉄」～からだの中で鉄分がはたらく仕組みを精密に理解しよう！～”
- II-10 澤井仁美 2021年4月発刊 『ひょうごサイエンス38号』 (9-10ページで人物と研究内容の

- 紹介) “Hyogo EYE科学研究の第一線をたずねて ～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～”
- II-11 2021年4月13日 日本経済新聞オンライン版 “東大・兵庫県立大・理研など、ヘム濃度センサータンパク質の立体構造を決定し作動機序を原子レベルで解明”
https://www.nikkei.com/article/DGXLRS608500_T10C21A4000000/
- II-12 2021年4月13日 プレスリリース “ヘム濃度センサータンパク質の作動機序を原子レベルが解明～病原菌が毒を回避する生存戦略～”
- II-13 木村哲就, 浅田拓也, 仲絢香, 林沙, 城宜嗣, 杉本宏 「ヘム ABC トランスポーターの基質輸送機構に関する分光学的解析」 第 47 回生体分子科学討論会、2021 年 6 月 4-5 日、オンライン (姫路)
- II-14 木村哲就, 浅田拓也, 林沙英, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏 「ナノディスク再構成型 BhuUV-T による段階的な基質輸送の分光学的観察」 第 21 回蛋白質科学会年会、2021 年 6 月 16-18 日、オンライン (富山)
- II-15 木村哲就, 浅田拓也, 林沙英, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏 「ナノディスク再構成型 BhuUV-T による段階的な基質輸送の分光学的観察」 第 21 回日本蛋白質科学会年会、2021 年 6 月 16-18 日、オンライン (富山)
- II-16 仲絢香, 小堀康博, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏, 木村哲就 “Structural analyses of ABC transporters in nucleotide bound states investigated by CW-ESR spectroscopy” 第 59 回日本生物物理学会年会、2021 年 11 月 25-27 日、オンライン (仙台)
- II-17 木村哲就, 浅田拓也, 林沙英, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏 「ナノディスク再構成型 BhuUV-T による段階的な基質輸送の分光学的観察」 第 21 回日本蛋白質科学会年会、2021 年 6 月 16-18 日、オンライン (富山)
- II-18 仲絢香, 小堀康博, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏, 木村哲就 「二重スピンラベル ESR 分光法を用いたヘムインポーターBhuUV-T の構造ダイナミクスの解析」 第 21 回日本蛋白質科学会年会、2021 年 6 月 16-18 日、オンライン (富山)
- II-19 仲絢香, 小堀康博, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏, 木村哲就 “Double spin-label ESR spectroscopic analysis of structural changes in heme ABC transporter induced by nucleotide-binding” 第 94 回日本生化学会大会、2021 年 11 月 3-5 日、オンライン (つくば)
- III-1 伊藤 (新澤) 恭子, 村本和優 「構造情報に基づくミトコンドリア呼吸鎖複合体の反応機構及び活性制御メカニズム」 ミトコンドリアダイナミクス～機能研究から疾患・老化まで～ (株)エヌ・ティー・エス (2021) ISBN: 978-4-86043-746-6 C3045
- III-2 Shimada A, Hara F, Shinzawa-Itoh K, Kanehisa N, Yamashita E, Muramoto K, Tsukihara T, Yoshikawa S. Critical roles of Cu_B site in efficient proton pumping as revealed by crystal structures of mammalian cytochrome *c* oxidase catalytic intermediates. *J. Biol. Chem.* 297, 100967 (2021) DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100967
- III-3 Shinzawa-Itoh K, Muramoto K. Biochemical and crystallographic studies of monomeric and dimeric bovine cytochrome *c* oxidase. *Biophysics and Physicobiology* 18, 186-195 (2021) DOI: 10.2142/biophysico.bppb-v18.020
- III-4 Shinzawa-Itoh K, Hatanaka M, Fujita K, Yano N, Ogasawara Y, Iwata J, Yamashita E,

- Tsukihara T, Yoshikawa S, Muramoto K. The 1.3-Å resolution structure of bovine cytochrome *c* oxidase suggests a dimerization mechanism. *BBA Advances* 1, 100009 (2021) DOI: 10.1016/j.bbadv.2021.100009IV-3
- III-5 伊藤(新澤)恭子, 村本和優 「ウシ心筋シトクロム酸化酵素の活性化型単量体構造」 生物物理 60, 276-279 (2020) DOI: 10.2142/biophys.60.276IV-5
- III-6 伊藤(新澤)恭子, 青江新平, 島田悟, 馬場淳平, 藤本光輝, 島田敦広, 山下栄樹, 吉川信也, 月原富武, 村本和優 「ウシ心筋シトクロム酸化酵素の第二のシトクロム *c* 結合構造」 日本生体エネルギー研究会第 47 回討論会 2021 年 12 月 16-17 日 [オンライン開催]
- III-7 伊藤(新澤)恭子, 青江新平, 島田悟, 馬場淳平, 藤本光輝, 島田敦広, 山下栄樹, 吉川信也, 月原富武, 村本和優 「ウシ心筋シトクロム酸化酵素の第二のシトクロム *c* 結合構造」 第 59 回日本生物物理学会年会 2021 年 11 月 25-27 日 [オンライン開催]
- III-8 伊藤・新澤恭子, 畑中美紀, 藤田和也, 矢野直峰, 小笠原由美, 岩田淳, 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 1.3 Å 分解能構造が示唆する二量体化機構」 日本生体エネルギー研究会第 46 回討論会 2020 年 12 月 9-11 日 [金沢市長土堀青少年交流センター (オンライン開催)]
- III-9 伊藤・新澤恭子, 畑中美紀, 藤田和也, 矢野直峰, 小笠原由美, 岩田淳, 山下栄樹, 月原富武, 吉川信也, 村本和優 「ウシミトコンドリア呼吸鎖酸素還元酵素の 1.3Å 分解能構造が示唆する二量体化機構」 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-10 島田敦広, 伊藤・新澤恭子, 山下栄樹, 村本和優, 月原富武, 吉川信也 “O₂-activation and unidirectional proton-pump mechanisms of cytochrome *c* oxidase elucidated by X-ray structures of its catalytic intermediates.” 第 20 回日本蛋白質科学会年会 2020 年 7 月 28 日 [オンライン開催]

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 榛葉幹治： 緑膿菌由来の一酸化窒素還元酵素の短寿命反応中間体の構造解析
- 福本幸起： 髄膜炎菌由来の一酸化窒素還元酵素の構造機能解析
- 柴田晃利： ヒト十二指腸由来の二価金属膜輸送体の構造機能解析

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 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
- 2 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

- 3 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
- 4 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
- 5 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

Macromolecular Dynamics and X-ray Crystallography

生体高分子動的構造解析学

I SPring-8 蛋白質結晶構造解析ビームラインの高度化と応用

Research and Development for SPring-8 Structural Biology Beamlines

山本雅貴

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「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」による人手を介さないビームライン自動運転と高輝度光源並びに高速検出器の相乗効果により、データ爆発とも言える X 線回折強度データの大量自動取得を実現した。X 線回折強度データ取得の一層の効率向上に向けた研究開発を継続している。具体的には X 線光軸上への微結晶の精密導入、大量の構造解析結果の閲覧性向上に関わる開発等が進行中である。大量の X 線回折強度データの利用法の開拓として、X 線回折強度データの同型性に基づく結晶弁別による同型結晶間に存在する生体高分子の構造の違いを分別した構造解析の実現と構造生命科学への応用方法の検討を進めている。

全自動構造解析の実現とは方向性の異なる技術開発として、高輝度光源と高速検出機の相乗効果により可能となった微結晶の高速回折像測定技術を拡張した放射光での常温時分割構造解析の手法開発も進めている。XFEL の時間分解能構造解析を補完し、動的な観点での生体高分子が働く仕組みの解明への貢献が期待される。

ここまで述べた技術開発の基盤の一つである高輝度放射光の利用で避けて通れない課題が X 線による試料の損傷の管理である。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。また XFEL 施設である SACLA でも無損傷結晶構造が決定できる超高輝度極短パルス X 線を活用した Serial Femtosecond ROtation Crystallography (SF-ROX) の開発と利用支援をおこなっている。

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.

ビームラインの高度化研究に併せて、ビームラインの効果的な運用に資する周辺技術の開発として「結晶化した試料をビームラインで測定できる凍結結晶試料にする準備の効率化」に関わる技術開発を行なっている。放射線損傷の抑制の観点で凍結結晶の利用は高輝度放射光を用いる現代的な X 線結晶構造解析の基本である。しかし、結晶の抗凍結剤処理と凍結処理、凍結結晶試料の UniPuck への装填、回折実験結果を踏まえた抗凍結条件の最適化など人手が必要な工程からなる結晶凍結作業は、X 線結晶構造解析において人手がかかる過程の代表格である。これらの工程に含まれる結晶の凍結作業と UniPuck への装填作業の省力化に資する技術開発を行なっている。

結晶凍結作業の省力化とは発想を異にする試料準備の効率化方法として、常温測定を前提とした試料準備法の開発も進めている。具体的には、溶液交換可能なマイクロ流路に多数の結晶を固定し測定試料とする方法、結晶化で用いた SBS 規格の結晶化プレートそのままを使用する方法などである。結晶周辺の溶媒交換の容易さに優れる前者は、多種類の低分子化合物との複合体構造解析で得られた情報から薬剤候補化合物の構造最適化をすすめる創薬手法の効率的運用への貢献が期待できる。現在、実験効率向上のためマイクロ流路の集積化を進めている。後者は、化合物の浸漬など事後の結晶修飾ができないが、一切手を加えないことを生かした X 線回折データ収集、例えば、結晶化後の環境変化に敏感な結晶の X 線回折強度測定、初期結晶化条件探索段階での視認できない微結晶の検出や X 線回折データ収集で活用が期待される。これまでに SBS 規格の結晶化プレートを回折計に設置する装置を作成し、実利用に向けた検討を進めている。

これらとは別に、温度や水素イオン濃度といった試料環境を制御する装置や使用法 (HAG 法) の開発も進めている。外部トリガーによる構造変化を追跡する時分割構造解析を含めた生体高分子構造の環境応答を調べる実験での活用が進んでいる。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 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 H. Kwon (Bristol 大) · J. Basran (Leicester 大) · C. Pathak (Leicester 大) · M. Hussain (Leicester 大) · S. L. Freeman (Bristol 大) · A. J. Fielding (Liverpool John Moores 大) · A. J. Bailey (Bristol 大) · N. Stefanou (Bristol 大) · H. A. Sparkes (Bristol 大) · T. Tosha (理研) · K. Yamashita (MRC) · K. Hirata (理研) · H. Murakami (JASRI) · G. Ueno (理研) · H. Ago · K. Tono (JASRI) · M. Yamamoto · H. Sawai · Y. Shiro · H. Sugimoto (理研) · E. L. Raven (Bristol 大) · P. C. E. Moody (Leicester 大) : XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II, *Angew Chem Int Ed Engl*, 60, 14578-14585 (2021)
- I-2 T. Nomura · T. Kimura (神戸大) · Y. Kanematsu (広島市大) · D. Yamada · K. Yamashita (理研) · K. Hirata (理研) · G. Ueno (理研) · H. Murakami (JASRI) · T. Hisano (理研) · R. Yamagiwa · H. Takeda · C. Gopalasingam · R. Kousaka · S. Yanagisawa · O. Shoji (名古屋大) · T. Kumasaka (JASRI) · M. Yamamoto · Y. Takano (広島市大) · H. Sugimoto (理研) · T. Tosha (理研) · M. Kubo · Y. Shiro : Short-lived intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118, (2021)
- I-3 S. Baba (JASRI) · H. Matsuura (理研) · T. Kawamura (JASRI) · N. Sakai (理研) · Y. Nakamura (JASRI) · Y. Kawano (理研) · N. Mizuno (JASRI) · T. Kumasaka (JASRI) · M. Yamamoto · K. Hirata (理研) : Guidelines for de novo phasing using multiple small-wedge data collection, *J Synchrotron Radiat*, 28, 1284-1295 (2021)
- I-4 Y. Saijo-Hamano (神戸大) · A. A. Sherif (大阪大) · A. Pradipta (大阪大) · M. Sasai (大阪大) · N. Sakai (理研) · Y. Sakihama (神戸大) · M. Yamamoto · D. M. Standley (大阪大) · R. Nitta (神戸大) : Structural basis of membrane recognition of *Toxoplasma gondii* vacuole by Irgb6, *Life Sci Alliance*, 5, (2022)
- I-5 R. Kutsukawa (東北大) · R. Imaizumi (金沢大) · M. Suenaga-Hiromori (東北大) · K. Takeshita (理研) · N. Sakai (理研) · S. Misawa (金沢大) · M. Yamamoto · H. Yamaguchi (住友ゴム) · Y. Miyagi-Inoue (住友ゴム) · T. Waki (東北大) · K. Kataoka (金沢大) · T. Nakayama (東北大) · S. Yamashita (金沢大) · S. Takahashi (東北大) : Structure-based engineering of a short-chain cis-prenyltransferase to biosynthesize nonnatural all-cis-polyisoprenoids : molecular mechanisms for primer substrate recognition and ultimate product chain-length determination, *FEBS J*, (2022)
- I-6 Y. Kamitsukasa (東大) · K. Nakano (東大) · K. Murakami (東大) · K. Hirata (理研) · M. Yamamoto · T. Shimizu (東大) · U. Ohto (東大) : The structure of NLRP9 reveals a unique C-terminal region with putative regulatory function, *FEBS Lett*, 596, 876-885 (2022)
- I-7 K. Yoshimi (東京大) · K. Takeshita (理研) · S. Yamayoshi (東京大) · S. Shibumura (C4U) · Y. Yamauchi (東京大) · M. Yamamoto · H. Yotsuyanagi (東京大) · Y. Kawaoka (Wisconsin-Madison 大) · T. Mashimo (東京大) : CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus, *iScience*, 25, 103830 (2022)
- I-8 山本雅貴 · 平田邦生 (理研) · 長谷川和也 (JASRI) : SPring-8 のタンパク質結晶構造解析、日本結晶学会誌、64、2-9 (2022)
- I-9 平田邦生 (理研) · 松浦滉明 (理研) · 坂井直樹 (JASRI) · 河野能顕 (理研) · 馬場清喜

- (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・熊坂 崇 (JASRI)・山本雅貴 :
SPring-8 ビームラインにおけるタンパク質結晶からの自動データ収集の現状、第 21 回日本
蛋白質科学会年会 (online)、2021
- I-10 松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・河野能顕 (理研)・山本雅貴 :
階層的クラスタリングを用いた回折データの分類と構造多型の解析、第 21 回日本蛋白質科学
会年会 (Online)、2021
- I-11 長谷川和也 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増
永拓也 (JASRI)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : 時分割構造解析に向けた SPring-8
BL41UX の高度化構想、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- I-12 馬場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・奥
村英夫 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・坂井直
樹 (JASRI)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) :
SPring-8 BL45XU で実現する高効率・高精度自動測定、日本結晶学会令和 3 年度年会
(Online)、2021
- I-13 平田邦生 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・竹下浩平 (理研)・當舎武彦 (理
研)・榛葉幹治・山本雅貴 : SPring-8 ZOO システム 次の一手、日本結晶学会令和 3 年度年
会 (Online)、2021
- I-14 松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・山本雅貴 :
構造多型解析に向けた回折データ分類の検討、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- I-15 H. Ago : Time resolved x-ray crystal structure analysis of photolysis of CO bound
cytochrome *c* oxidase, Pacificchem 2021 (Online), 2021
- I-16 上野 剛 (理研)・小西真晶(リガク)・吾郷日出夫・奥村英夫 (JASRI)・河村高志 (JASRI)
・坂井直樹 (理研)・竹下浩平 (理研)・引間孝明 (理研)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理
研)・松浦滉明 (理研)・仲村勇樹 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・馬
場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (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 II の現状、第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同
シンポジウム (Online)、2022
- I-17 馬場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・奥
村英夫 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・坂井直
樹 (JASRI)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : 共用
タンパク質結晶回折ビームライン BL45XU における自動測定の現状、第 35 回日本放射光学
会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- I-18 平田邦生 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・竹下浩平 (理研)・當舎武彦 (理
研)・榛葉幹治・山本雅貴 : SPring-8 ZOO システム 次の一手、第 35 回日本放射光学会年
会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- I-19 長谷川和也 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増永
拓也 (JASRI)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : 動的構造解析に向けた SPring-8 BL41XU
の高度化構想、第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- I-20 水野伸宏 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・上野 剛 (理研)・山本雅
貴・熊坂 崇 (JASRI) : SPring-8 タンパク質結晶回折ビームライン新遠隔測定システム、
第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022

- II-1 Y. Kawano (理研)・M. Hikita (KEK)・N. Matsugaki (KEK)・M. Yamamoto・T. Senda (KEK) : A crystal-processing machine using a deep-ultraviolet laser : application to long-wavelength native SAD experiments, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 78, 88-95 (2022)
- II-2 坂井直樹 (JASRI)・竹下浩平 (理研)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴 : 理研 SPring-8 におけるハイスループットリガンドスクリーニングパイプラインの開発、第 21 回日本蛋白質科学会年会 (online)、2021
- II-3 五代乃々花・竹下浩平 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・上野 剛 (理研)・伊藤 翔 (リガク)・吾郷日出夫・山本雅貴 : ヒスタミンメチルトランスフェラーゼの SAM 結合に依存する構造変化を伴う活性化メカニズムへの構造的洞察、第 21 回日本蛋白質科学会年会 (online)、2021
- II-4 上野 剛 (理研)・真栄城正寿 (北海道大)・竹田怜央 (北海道大)・伊藤 翔 (リガク)・山本雅貴 : 化合物スクリーニングに向けたマイクロ流路デバイス開発、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- II-5 奥村英夫 (JASRI)・坂井直樹 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・上野 剛 (理研)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : SPring-8 PX-BL における結晶化プレート in situ 回折測定と化合物スクリーニングシステムの開発、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- II-6 奥村英夫 (JASRI)・坂井直樹 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・上野 剛 (理研)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・山本 雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : SPring-8 PX-BL における結晶化プレート in situ 回折測定と化合物スクリーニングシステムの開発、第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- III-1 松浦滉明 (理研)・小林 周 (理研)・鈴木明大 (北海道大)・平田邦生 (理研)・上野 剛 (理研)・吾郷日出夫・山本雅貴 : サブミクロン結晶からの構造決定を目指した微小結晶解析基盤の開発、令和三年度新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム (淡路市)、2021

生命科学専攻

博士前期過程

尾松美音 : クリスピーキャス 3 の機能メカニズムの解明を目指した構造生物学研究

五代乃々花 : ヒスタミンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の開発を目指したハイスループット複合体構造解析スクリーニング手法の構築

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 科学研究費補助金(令和元～5年度) 新学術領域研究(研究領域提案型) 課題番号:19H05783
- 研究領域 高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用
- 領域代表 岩田 想
- 研究課題 動的構造解析に資する固定ターゲット微小結晶構造解析法の開発
- 研究代表者 山本雅貴

Molecular Biochemistry II

生体物質化学 II

I ゴルジ体ストレス応答の解析

The Analysis of the Golgi Stress Response

吉田秀郎・佐々木桂奈江

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。TFE3 を脱リン酸化する脱リン酸化酵素や TFE3 経路のセンサー分子を Genome-wide siRNA library screening によって検索した結果、いくつかの制御因子候補を単離することが出来た（東京大学薬学研究所一条秀憲博士・名黒功博士との共同研究）。

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。現在は、GeCKO スクリーニングによってセンサー分子を検索しようとしている。また、GeCKO スクリーニングによってコレステロール経路の制御因子を探索したところ、PITPNB と PI4KA、PI4KB、CDIPT を単離した。ムチン経路に関しては、エンハンサー配列 MGSE と転写因子の候補を封数単離している。

II 小胞体ストレス応答の解析

The Analysis of the ER Stress Response

吉田秀郎・佐々木桂奈江
Yoshida, H., Sasaki, K.

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

発表論文 List of Publications

- I-1 吉田秀郎：哺乳類ノックアウト細胞ライブラリーを用いた薬剤の作用機序の解析 — ゴルジ体ストレス応答での応用例 — 日本ケミカルバイオロジー学会産学連携委員会 (2021)
- I-2 吉田秀郎：新規技術によるゴルジ体ストレス応答の制御因子の同定 第44回日本分子生物学会年会 (2021)
- I-3 吉田 秀郎：小胞体・ゴルジ体ストレス応答と神経変性疾患との関連 第67回日本生化学会近畿支部例会 (2021)
- I-4 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を制御する転写因子 KLF2 の発現制御機構 第73回日本細胞生物学会大会 (2021年)
- I-5 三宅衣織奈、坂本美憂、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を制御する転写因子 KLF4 の発現制御機構 第73回日本細胞生物学会大会 (2021)
- I-6 佐々木桂奈江、森下史、足立拓弥、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、吉田秀郎：抗がん剤 OSW-1 によるゴルジ体ストレス応答における PtdIns transfer protein beta(PITPNB)の機能解析 第73回日本細胞生物学会大会 (2021)

大学院理学研究科

博士前期課程

- 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
- 岡本明日香：ゴルジ体ストレス応答の TFE3 経路の包括的解析
- 三宅衣織奈：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 KLF4 の解析

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3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3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3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3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 出芽酵母を用いた空間的・量的 tRNA 動態の解析

Analyses of tRNA kinesis, dynamics of abundance and localization of tRNAs, in budding yeast

吉久徹

Yoshihisa, T.

真核生物の tRNA は、転写後に様々な修飾を受けて成熟化し、最終的には細胞質で働く。一部の tRNA は intron を含んだ前駆体として転写されるが、ほとんどの intron は anticodon 近傍に挿入されており、その splicing は tRNA の機能化に必須である。tRNA の splicing は、mRNA とは異なり、タンパク質のみから成る酵素群が司るが、我々は出芽酵母の splicing 酵素群が、細胞質、特にミトコンドリア表面で働くこと、さらには、成熟体 tRNA が細胞質と核とを行き来しながらその一生を過ごすことを見出している。現在、この過程を司る分子機構の全貌を明らかにするため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を進めている。

さらに近年、tRNA のレパートリーが、生理的環境や生物の発生段階、組織形成に応じて変化するという証拠が得られつつある。我々は、tRNA 量の新規絶対定量法である OTTER 法を開発し、また、積極的な tRNA 量の改変系を構築することで、tRNA レパートリーの生理的環境に応じた動態の詳細や、それを可能にする機構、さらには、そうしたレパートリー変化が翻訳をはじめとする生理機能へ及ぼす影響を解析している。この中で、定常期における tRNA レパートリー形成への自食作用の影響についても研究を進め、一部の tRNA が選択的自食作用で液胞に取り込まれていることを明らかにしている。

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事が明らかとなった。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、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

II-1 Hayashi, S., Kato, H., and Yoshihisa, T. : Yeast tRNA-Leu^{CAA} modulates ribosome biogenesis and functions. : 第 22 回日本 RNA 学会年会 (オンライン) (2021)

- III-1 Hayashi, S., Iwamoto, K., and Yoshihisa, T. : Puf3p facilitates non-respiratory mitochondrial functions via monosome-enriched nuclear-encoded mitochondrial mRNAs in budding yeast. : 第 44 回日本分子生物学会年会 (オンライン) (2021)

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

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
- 3 日本学術振興会科学研究費補助金 (令和 3~4 年度) 学術変革研究(A)・公募研究 課題番号
21H05726
研究課題 tRNA レパートリーの変化が与えるタンパク質の多面性
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.

遺伝情報を維持するため、染色体 DNA は細胞周期において一度だけ正確に複製され倍加したのち、均等に分配される。また、細胞増殖の過程においてエピジェネティックな情報を維持するため DNA 複製に伴うクロマチン形成も正確に遂行されなければならない。我々は、このような遺伝情報の維持継承の基本となる制御機構の解析として、染色体の複製を“一回のみ”に制御する機構（ライセンス化制御）について解析を進めてきた。現在、1) ライセンス化制御の中心的な因子である Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作用機構、2) 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

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 DNA 複製のライセンス化因子で、S 期が開始すると、再複製を抑制するために速やかに分解される。この時に働く CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼは、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 損傷の修復時においても同様の機構で Cdt1 の分解が誘導される。我々はこれまでに、Cdt2 の C 末領域に存在する PIP ボックス及び DNA 結合領域が Cdt1 の分解を制御することを明らかにした。Cdt2 のこれらのモチーフやドメインや基質の有無がどのように CRL4-Cdt2 の機能に関わるのかを明らかにするため、細胞に局所的に紫外線を照射し DNA 損傷部位への集積をライブイメージングにて解析している。PCNA-GFP 発現細胞に、C 末端に mCherry を融合した Cdt2 の野生型(WT)、PIP ボックス変異体(PIPm)、DNA 結合部位欠失変異体(Δ DBD)あるいは N 末のみ(N-only)を導入し解析を進めた。WT 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が、PIPm は集積速度も量も低下した。 Δ DBD では大きな変化は見られなかった。一方、N-only では集積がほとんど見られなかった。基質認識に関わる Cdt2 の N 末による損傷部位への集積効果は低く、PIP ボックスが主要な働きを行い、また DBD の効果は PIP ボックスに依存していることが示唆された。

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、通常分解されるライセンス化因子 Cdt1 が蓄積し、DNA の過剰な複製が起こる。Cdt1 は、MLN4924 投与 3 時間後ごろから蓄積する。DNA 複製部位を反映する PCNA の foci のパターン、MCM2-7 のクロマチン結合の解析から、再複製は主に、通常の S 期 DNA 合成が終了し G2 期様の過

程を経たのちに開始される傾向が認められた。再複製が起こると DNA 損傷が発生することが知られている。その一つとして H2AX のリン酸化 (γ H2AX と呼ばれている) をマーカーとして調べると、過剰複製が誘導されるのに呼応して γ H2AX が生じる様子が認められた。

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、ゲノム維持機構で機能する因子の DNA 集合と、その反応制御に機能する。PCNA の DNA 結合と除去を行うのが RFC 複合体ファミリーで、RFC1-RFC と Ctf18-RFC が PCNA の DNA 結合を担っている。もう一つの RFC 複合体である Elg1-RFC については、PCNA の DNA からの除去を特異的に行っていることが私たちの解析から示された。ヒト細胞内の Elg1 発現を抑制すると、複製期の DNA に過剰に結合した PCNA や細胞周期進行の遅延、核内クロマチン構造や染色体構造の異常が見られた。以上のことから、PCNA の DNA 結合だけでなく、積極的な PCNA 除去もゲノム維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

一方、Elg1 発現抑制細胞でも複製が終了した G2 から M 期にかけて PCNA が DNA から除去されることが示され、M 期への進行過程で機能する新規 PCNA 除去機構の存在が示唆された。これについて解析を進めると、ユビキチンリガーゼの 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。さらに解析を進めたところ、TRAIP は S 期から M 期にかけて発現量が増加すると共に、CDK1 によるリン酸化で PIP box を介した PCNA との相互作用が安定化し、PCNA の除去に機能することが分かってきた。そこで現在は、TRAIP による PCNA 除去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 Mazian MA, Yamanishi K, Rahman MZA, Ganasen M, Nishitani H.: CRL4^{Cdt2} Ubiquitin Ligase, A Genome Caretaker Controlled by Cdt2 Binding to PCNA and DNA. *Genes (Basel)*. 2022 Jan 29;13(2):266. doi: 10.3390/genes13020266.
- 2 Nishitani H.: CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase, a critical factor to block re-replication of chromosomal DNA and its implication as a target for anti-cancer drug development 第94回日本生化学会大会 2021年11月3-5日
- 3 塩見泰史、田所あすか、西谷秀男：細胞周期進行におけるクロマチンからのPCNA除去 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)
- 4 田所 あすか、西谷 秀男、塩見 泰史：M 期進行時のPCNA 除去におけるTRAIP の機能解析 第26 回DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)
- 5 海老原溪、日下部将之、林晃世、塩見泰史、菅澤薫、西谷秀男：ゲノム安定性維持に関わる CRL4Cdt2 ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構の解析 第26 回DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)
- 6 渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：NEDD8 化阻害により誘導されるDNA 再複製の機構 第26 回DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)

- 7 海老原溪、日下部将之、林晃世、塩見泰史、菅澤薫、西谷秀男：DNA損傷修復において機能するCRL4Cdt2ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構のライブイメージ解析 第44回日本分子生物学会年会 2021年12月1日(水)～3日(金) パシフィコ横浜
- 8 田所 あすか、西谷 秀男、塩見 泰史：クロマチンからの複製因子除去に機能する、TRAIPの機能解析 第44回日本分子生物学会年会 2021年12月1日(水)～3日(金) パシフィコ横浜
- 9 塩見泰史、田所あすか、西谷秀男：クロマチンからのPCNA除去と、それに連係したゲノム維持の解析 第44回日本分子生物学会年会 2021年12月1日(水)～3日(金) パシフィコ横浜
- 10 塩見泰史：クロマチンからのPCNA除去機構の解析 国立遺伝学研究所研究会「染色体安定維持研究会」 2021年8月30日(月)～31日(火)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 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
- 飯田康介 : 再複製に伴う細胞内 Ca²⁺ シグナルの解析
- 田所あすか : PCNA 新規除去機構における TRAIP の機能解析
- 野原 颯 : リン酸化による Cdt2 の PCNA 結合制御の解析

科学研究費補助金等

- 1 令和3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 ユビキチン-プロテアソーム経路反応機構の解明

X-ray structural analysis of the ubiquitin proteasome pathway

水島恒裕・中井朋則・西尾和也
Mizushima, T., Nakai, T., Nishio, K.

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

II 病原菌エフェクタータンパク質の構造解析による感染機構の解明

Structural analysis of bacterial effector proteins to reveal the pathogenic mechanism

水島恒裕・中井朋則・西尾和也
Mizushima, T., Nakai, T., Nishio, K.

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

III 種子内部構造のX線CTによる解析

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

山内大輔・中井朋則・峰雪芳宣

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

種子は乾燥して休眠状態にあり、吸水するとその中の胚は生命活動を再開して発芽する。その過程に起こる種子中での構造変化を観察する時に、種皮が種子の周りを覆っており、支障となっている。しかし、X線CT技術を用いれば、固定や切片作製をしなくても種子内部構造を観察可能である。SPring-8のBL20B2を利用して種子の吸水過程を連続撮影する方法について検討を行った。また、富山大学などとの共同研究で植物のX線CTの画像解析法についても検討を行った。

VI なたまめ茶成分の解析

Analysis of peptides in a tea from roast sword bean seeds

山内大輔
Yamauchi, D.

ナタマメは漢方薬として利用され、その種子を煎って、お茶（なたまめ茶）として飲まれている。しかしながら、このお茶に含まれる成分に関する研究はほとんど行われていない。そこで、なたまめ茶を実際に作って、その中に含まれるペプチドを種子貯蔵タンパク質に対する抗体を用いて解析した。

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、ジベレリンがなくても造精器を形成する突然変異体についてジベレリンの生合成やその応答に関わる遺伝子発現の解析を行った。

VI 分裂準備帯の形成機構と機能の解析

Analyses of development and function of preprophase bands

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

分裂準備帯 (preprophase band) は、高等植物体細胞分裂の分裂面挿入位置決定に関与する微小管でできた装置である。この装置は G2 期に出現し、前期に完成するが核膜崩壊前後に消失する。しかし、この装置が存在した位置になんらかの位置情報が残され、細胞分裂の最後で、確実に細胞板はこの位置に向かって伸長する。我々は、どのようにして微小管が将来の分裂面の位置に分裂準備帯として並ぶのか、分裂準備帯が消失した後に残るメモリーは何か、また、そのメモリーの蓄積機構は何か、を明らかにすることを目的として研究を行っている。今年度は、分裂前期に発現するサイクリン依存リン酸化酵素、CDKB1 について解析を行った。

Ⅶ 植物の細胞分裂と細胞質分裂に関与するナノマシンの解析

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

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

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

Ⅷ 細菌由来セルロースの合成機構

Mechanism of cellulose production from bacteria

中井朋則・水島恒裕・峰雪芳宣
Nakai, T., Mizushima, T., Mineyuki, Y.

酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* が生産するセルロースは、他の細菌が合成するセルロースと比較して、高等植物のセルロースと結晶構造が近く、その合成機構の解明は植物由来セルロースの合成機構の解明にも直結している。特に、セルロース分解酵素であるセルラーゼが植物でも細菌でもセルロースの合成に深く関与していることが知られている。このセルラーゼの機能を調べるにあたり、セルラーゼ遺伝子破壊株の合成するフィブリルの形態を観察する必要がある。セルラーゼ遺伝子破壊株及び野生株の合成するセルロース繊維について、ネガティブ染色を行った試料から電子線トモグラムを作製し、3次元構造解析を進めている。

発表論文 List of Publications

I-1 Molecular basis for the disruption of Keap1-Nrf2 interaction via Hinge & Latch

- mechanism. Horie, Y., Suzuki, T., Iso, T., Wells, G., Moore, W. T., Mizushima, T., Dinkova-Kostova, AT., Kasai, T., Kamei, T., Koshiba, S., Yamamoto, M. *Commun Biol* **4**, Article number: 576. (2021)
- I-2 Structural insights into the targeting specificity of ubiquitin ligase for *S. cerevisiae* isocitrate lyase but not *C. albicans* isocitrate lyase. Hiragi, K., Nishio, K., Moriyama, S., Hamaguchi, T., Mizoguchi, A. Yonekura, K., Tani, K., Mizushima, T. *J. Struct. Biol.* **213**, 107748 (2021)
- I-3 Heterozygous missense variant of the proteasome subunit β -type 9 causes neonatal-onset autoinflammation and immunodeficiency 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, T., Tsumura, M., Yamashita, Y., Tamura, S., Orimo, T., Ozasa, T., Kato, T., Sasaki I., Fukuda-Ohta, Y., Wakaki-Nishiyama, N., Inaba, Y., Kunitomo, K., Okada, S., Taketani, T., Nakanishi, K., Murata, S., Yoshiura, K., Kaisho, T. *Nat Commun. Nat Commun.* **12**, Article number: 6819. (2021)
- I-4 平木慶人・西尾和也・水島恒裕：タンパク質工学によるリンゴ酸脱水素酵素の高活性化、兵庫県立大学 知の交流シンポジウム 2021 2021年9月28日～12月31日 WEB
- I-5 西尾和也・水島恒裕：植物由来ペルオキシソーム型クエン酸合成酵素の結晶構造解析、第4回ピコバイオロジー研究会 2022年3月14日 WEB
- II-1 Active site structure of the *Shigella flexneri* effector OspI. Nishide, A., Takagi, K., Kim, M., Mizushima, T. bioRxiv (2022)
- II-2 平木慶人・西出旭・高木賢治・Kim Minsoo・水島恒裕：赤痢菌エフェクターIpaH1.4/2.5のX線結晶構造解析および機能解析、第67回日本生化学会近畿支部例会、2021年5月29日、WEB
- II-3 平木慶人・西出旭・高木賢治・岩井一宏・Kim Minsoo・水島恒裕：赤痢菌エフェクターIpaH1.4/2.5による直鎖状ポリユビキチン鎖生成酵素(LUBAC)認識機構の解析、第21回日本タンパク質科学学会年会 2021年6月16日-18日 WEB
- II-4 水島恒裕：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 公益財団法人アステラス病態代謝研究会 第51回研究報告会 2021年10月16日 WEB
- II-5 平木慶人・西出旭・高木賢治・Kim Minsoo・水島恒裕：赤痢菌エフェクター IpaH1.4/2.5によるLUBAC複合体認識機構の解明、第4回ピコバイオロジー研究会 2022年3月14日 WEB
- III-1 山内大輔・中井朋則・玉置大介・上杉健太郎・星野真人・唐原一郎・峰雪芳宣：X線マイクロCTを用いたミヤコグサ種子吸水過程の観察：タイムラプスイメージングによる解析、第85回日本植物学会 2021年9月16日-20日 WEB
- III-2 米田早秀・山内大輔：第3回 技術・人材マッチング交流会 X線マイクロCTによるミヤコグサ種子吸水過程の3D観察 2021年12月9日 WEB
- III-3 Visualization of Arabidopsis root system architecture in 3D by refraction-contrast X-ray micro-computed tomography. Kurogane, T., Tamaoki, D., Yano, S., Tanigaki, F., Shimazu, T., Kasahara, H., Yamauchi, D., Uesugi, K., Hoshino, M., Kamisaka, S., Mineyuki, Y., Karahara, I. *Microscopy* **70**, 536-544 (2021)

- III-4 山浦遼平・玉置大介・蒲池浩之・山内大輔・峰雪芳宣・星野真人・上杉健太郎・矢野幸子・嶋津徹・笠原春夫・鎌田源司・鈴木智美・小野田雄介・久米篤・半場祐子・藤田知道・唐原一郎：ヒメツリガネゴケ仮根系の X 線 μ CT による可視化の試み、第 85 回日本植物学会 2021 年 9 月 16 日－20 日 WEB
- III-5 山浦遼平・玉置大介・蒲池浩之・山内大輔・峰雪芳宣・星野真人・上杉健太郎・嶋津徹・笠原春夫・鎌田源司・鈴木智美・久米篤・半場祐子・藤田知道・唐原一郎：ヒメツリガネゴケ仮根系の X 線マイクロ CT による可視化の試み、第 35 回日本宇宙生物科学会 2021 年 9 月 24 日－26 日 WEB
- III-6 唐原一郎・山浦遼平・黒金智文・山内大輔・峰雪芳宣・蒲池浩之・橋本博文・星野真人・上杉健太郎・谷畑昂士郎・玉置大介・西内巧・高尾泰昌・田浦太志・矢野幸子・谷垣文章・嶋津徹・笠原春夫・鎌田源司・鈴木智美・小野田雄介・久米篤・半場祐子・藤田知道・神阪盛一郎：宇宙おける植物の生活環－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－、第 35 回宇宙環境利用シンポジウム 2022 年 1 月 19 日－20 日 WEB
- VII-1 飯塚駿作・玉置大介・中井朋則・唐原一郎・峰雪芳宣：分裂準備帯成熟過程における微小管及びアクチン繊維の動態、第 33 回日本植物形態学会 2021 年 9 月 17 日 WEB
- VII-2 飯塚駿作・玉置大介・中井朋則・山内大輔・唐原一郎・峰雪芳宣：植物細胞の分裂前期に微小管帯の拡散を防ぐアクチンウォールは存在するか？、生体運動研究合同班会議 2022 2022 年 1 月 7 日－9 日 名古屋

大学院生命理学研究科

博士後期課程

大塚礼己：核由来の分裂準備帯形成制御因子の解析

平木慶人：病原細菌エフェクターによる宿主防御経路阻害機構の解析

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費助成事業（令和 2～令和 5 年度）基盤研究（B） 課題番号：20H03198
研究課題 病原細菌エフェクターによる NF- κ B 経路を標的とした感染機構の解析
研究代表者 水島恒裕
- 2 科学研究費助成事業（令和 2～令和 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～令和 5 年度）基盤研究（B） 課題番号：20H02878
研究課題 病原因子の分解を誘導する分子標的型新規抗菌剤の開発基盤の構築
研究代表者 Kim Minsoo、研究分担 水島恒裕
- 4 科学研究費助成事業（令和元～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 中井朋則

Functional Nanometry of Biological Macromolecules

生体高分子超精密計測学

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

松本奈央・石橋健太・佐川美咲・榊原 斉・小嶋寛明・大岩和弘
Matsumoto N, 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

中山慎太郎・指宿良太・古田 茜・大岩和弘・古田健也
Nakayama, S., 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 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 技術を活用し、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・小嶋寛明・大岩和弘
Tanaka, H., Kojima, H., Oiwa, K.

生体における情報処理を情報通信技術に活かす取り組みはバイオサイエンス、ナノテクノロジー、および情報技術を融合する技術開発の一つである。生体構成要素に見られる情報伝達や信号発信のメカニズムを応用して、ナノスケール機器間の情報伝達の実現を目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 S. Nakayama (大阪大), T. Yano (大阪大), T. Namba (東京大.), S. Konishi (大阪大), M. Takagishi (Univ. Texas), E. Herawati(Univ. Sebelas Maret), T. Nishida (J. Tex. Prod. Qual. Technol. Ctr.), Y. Imoto (J. Tex. Prod. Qual. Technol. Ctr.), S. Ishihara (東京大), M. Takahashi(名古屋大), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, A. Tamura (大阪大), S. Tsukita (大阪大): Planar cell polarity induces local microtubule bundling for coordinated ciliary beating, *J Cell Biol*, 220, e202010034 (2021) <https://doi.org/10.1083/jcb.202010034>
- I-2 S. Thayyil (北海道大), Y. Nishigami (北海道大), Md J. Islam (北海道大), P.K Hashim (北海道大), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, J. Yu (北海道大), M. Yao (北海道大), T. Nakagaki (北海道大), N. Tamaoki (北海道大) : Dynamic control of microbial movement by photoswitchable ATP. *Chemistry—A European Journal*, e202200807 (2022) <https://doi.org/10.1002/chem.202200807>
- I-3 I. Guido (MPI), K. Ishibashi (NICT), E. Bodenschatz(MPI), A. Vilfan(Jozef Stefan Inst), R. Golestanian(MPI), H. Sakakibara(NICT), K. Oiwa : Active beating of a reconstituted dynein-microtubule complexes. 日本生物物理学会 第59回年会 (Online), 2021
- I-4 H. Sakakibara(NICT), K. Ishibashi(NICT), H. Iwamoto(JASRD), H. Kojima(NICT), K. Oiwa: The flagellar waveforms of mbo1 a mutant moving backward only in the presence/absence of Ca²⁺. Dynein2021: International Workshop (Online), 2021
- I-5 K. Oiwa, Summary talk at Dynein 2021: Reply to the letters from Leeuwenhoek., Dynein2021: International Workshop (Online), 2021
- II-1 R. Ibusuki, T. Morishita, A. Furuta(NICT), S. Nakayama, M. Yoshio(NICT), H. Kojima(NICT), K. Oiwa, K. Furuta(NICT), "Programmable molecular transport achieved by engineering protein motors to move on DNA nanotubes", *Science*, 375, 1159-1164, 2022, <https://doi.org/10.1126/science.abj5170>
- II-2 K. Furuta (NICT), Engineering motor proteins to recognize DNA codes for programmable transport on DNA nanotubes. 3rd Conference on Biomotors, Virus Assembly, and Nanobiotechnology Applications (Online), 2021
- II-3 K. Furuta (NICT), Re-designing and measuring biomolecular motors. 日本生物物理学会 第59回年会 (Online), 2021
- III-1 H. Tanaka (NICT), Y. Kazuta (NICT), Y. Naruse (NICT), Y. Tominari (NICT), H. Umehara (NICT), Y. Sowa (法政大), T. Sagawa (NICT), K. Oiwa, M. Okada (東京大), I. Kawagishi (法政大), H. Kojima (NICT), "Bayesian-based decipherment of in-depth information in bacterial chemical sensing beyond pleasant/unpleasant responses", *Sci Rep*, 12, 2965 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06732-4>
- IV-1 大岩和弘: 脳情報通信融合研究センターのこれまでの10年とこれからの10年. 第11回 CiNet シンポジウム (東京), 2021

大学院生命理学研究科

博士後期課程

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

松本奈央 : 軸糸ダイニンと細胞質ダイニンの微小管結合部位の違いの運動特性への影響
 中山慎太郎 : 試験管内分子進化手法を用いた DNA モーターの運動創出メカニズムの解析

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 クシクラゲ櫛板の分子構造の解明と運動性フォトニック結晶開発に向けた基盤研究
研究代表者 稲葉一男 (筑波大学)
研究分担者 大岩和弘
- 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

I R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質の神経回路形成における役割の解析

Role of R-Ras subfamily small GTPases in neuronal network formation

生沼泉
Oinuma, I.

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

R-Ras サブファミリーは、R-Ras (R-Ras1)、TC21 (R-Ras2)、および M-Ras (R-Ras3) の3つの構成因子から成る低分子量 G 蛋白質サブグループである。われわれのこれまでの研究で、R-Ras は神経軸索の決定やその後の伸長や分枝の過程に関与していること (Oinuma *et al.*, 2007; Iwasawa *et al.*, 2012)、また、M-Ras が樹状突起の伸長と分枝を伴った成熟の過程に関与している (Saito and Oinuma *et al.*, 2009; Tasaka *et al.*, 2012) ことが明らかになっている。しかしながら、それら研究はいずれも、培養細胞レベルでの *in vitro* での研究に基づいた知見であり、*in vivo* における生理的役割に関しては調べられていなかった。そこで、われわれは、個体脳内での R-Ras の神経回路構築における生理的役割を解明することを目的として研究を行った。

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解析を行った。その結果、R-Ras 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、大脳皮質の皮質層の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 R-Ras タンパク質の発現量の変化を解析したところ、神経軸索の伸長および枝分かれ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、マウス大脳の体性感覚野の神経細胞の軸索伸長における R-Ras の役割について、*in utero electroporation* 法 (子宮内電気細孔法) を用いて検証した。R-Ras 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、大脳皮質体性感覚野 2 / 3 層の神経細胞に対しての特異的遺伝子操作により内在性の R-Ras に RNA 干渉を用いたノックダウンを行い、その表現型を解析した。胎生期早期

からのノックダウンでは、神経細胞の軸索投射時期よりも以前のイベントである **radial migration** (脳室側から皮質側への放射状移動) が阻害されることが明らかになった。そのため、その後の発達過程で起こる軸索伸長への影響を評価することが困難だったため、さらに、胎生期後期における時期特異的なノックダウンを、薬剤誘導による時期特異的なノックダウンシステムを構築し、それを用いて行うことで行い、軸索伸長期特異的な影響を観察した。その結果、神経細胞が移動を完了した生後1日目からの **R-Ras** のノックダウンにより、神経軸索の伸長が抑制されている様子が観察された。また、この軸索伸長抑制効果は **shRNA** 耐性ミュータントである **res-R-Ras** を共発現させることによって阻止された。また、軸索伸長期の体性感覚野神経細胞においては、野生型 **R-Ras** (**R-Ras-WT**) を過剰発現させることで、神経軸索の伸長促進が見られた。

以上の結果より、大脳皮質発達過程において **R-Ras** が神経細胞の移動、そしてその後の軸索伸長に寄与していることが示唆された。現在、**R-Ras** がどのようなエフェクターを介して上記機能を発揮するかの分子メカニズムについて、引き続き研究を進めている。

II 核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析

Interaction between nuclear lamina and heterochromatin

廣瀬富美子
Hirose, F.

核膜の裏側に存在する核ラミナは **A-type lamin (lamin A)** と **B-type lamin (lamin B)** タンパク質が重合した網目状の繊維構造である。核ラミナは、核膜とクロマチンの両者と相互作用し、転写・DNA複製・DNA修復など多岐にわたる核内反応の調節に関与していることが知られているが、これに関わる因子やその制御メカニズムについては、解明されていない。我々はこの問題を解決するために、核ラミナと相互作用するクロマチン結合因子の精製を試み、**lamin A** と **HP1(heterochromatin protein 1)** が相互作用することを見出した。まず、**lamin A** と **HP1** ファミリータンパク質(**HP1 α** , **HP1 β** , **HP1 γ**) との相互作用の特異性を調べたところ、**HP1 β** のみが **lamin A** と相互作用した。**HP1 β** はヘテロクロマチン特異的に結合することが報告されていることを考慮すると、**lamin A** が **HP1 β** との結合を介してヘテロクロマチンと相互作用している可。能性が考えられた。そこで、ヘテロクロマチンの核膜直下への配置に **lamin A-HP1** 間相互作用が関与しているかどうかを調べることを目的に、**HP1** と **lamin A** の核内ダイナミクスを追跡するために、両者の相互作用を生細胞で検出できる **Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)** 解析システムを樹立した。同調培養細胞を用いて細胞周期を通しての両タンパク質の相互作用の時期と場所を観察したところ、分裂期の終期の染色体の周りで始まり、**G1** 期初期の約5時間の間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ヘテロクロマチンの核内配置の決定に重要な役割

を担っていることを示唆する。現在、両タンパク質の相互作用の特徴を生化学的アプローチによって解析している。

発表論文等 List of Publications

- I-1 松田孝彦、生沼泉：精密・迅速・可逆的な遺伝子発現 ON/OFF 制御システムの開発と神経発生研究への適用。ポスター発表 第 94 回日本生化学会大会（令和 3 年 11 月、Web 開催）
- II-1 Takanobu Moriuchi and Fumiko Hirose: SUMOylation of RepoMan during late telophase regulates dephosphorylation of lamin A. *Journal of Cell Science* 134 (17), 247171 (2021). doi:10.1242/jcs.247171

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. 公益財団法人 島津科学技術振興財団 研究開発助成（令和 3 年度-令和 4 年度）
研究課題 遺伝子機能の *in vitro* ならびに *in vivo* における定量的比較計測法の開発
研究代表者 生沼 泉
3. 兵庫県立大学 女性研究者研究活動助成金（令和 3 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 液体試料微細形態観察への低温電子顕微鏡法の応用

Application of cryo-electron microscopy to the microstructure observation of liquid 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、化学固定や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。2種類の液体成分から成るエマルジョン溶液や、有機溶媒中でコロイド状に分散した高分子化合物、無機化合物などは、化学固定や脱水を行って本来の微細構造を観察できないことから、これらについて、低温透過型電子顕微鏡法または低温走査型電子顕微鏡法を用いた観察の検討を行った。その結果、様々な液体試料に対して幅広く、低温電子顕微鏡法を応用できることが示された。

II 胚性幹細胞から骨格筋細胞への分化誘導の研究

Study of inducing differentiation from embryonic stem cells into skeletal muscle cells

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

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

胚性幹細胞から様々な組織細胞への分化誘導法が知られているが、骨格筋細胞については、いまだに効率の良い分化誘導法が確立していない。これまでに、接着培養した胚様体にスペルミンを一時的に添加することによって骨格筋細胞に分化させる方法が報告されているが、再現性が低く、分化する細胞の割合が20~30%程度に留まっていた。そこで、この方法を最適化するために、胚様体の大きさ、スペルミンを添加するタイミングや濃度、培養日数の検討を行った。その結果、スペルミンを添加するタイミングを早めることにより、分化効率を約2倍に向上させることができた。

III 筋肉型ニコチン性アセチルコリン受容体ダイマーのナノディスクへの再構成

Re-constitution of dimeric nicotinic acetylcholine receptor into nanodiscs

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

筋肉型ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、4種のサブユニットで構成されたヘテロ5量体のリガンド依存性カチオンチャンネルで、少なくとも構造の異なる3つの状態 (静止状態、活性化状態、脱感作状態) をとることが知られている。近年、nAChRを豊富に含むシビレエイの電気器官から精製した nAChR を試料として、リガンド結合状態で nAChR の構造が解かれたが、脱感作状態への移行メカニズムについては不明瞭なままである。また、シビレエイの電気器官では nAChR はダイマーを形成していることが明らかにされており、ダイマーが形成されていることによってリガンドに対する感受性や反応性が增大することが推察されている。そこで、より天然に近い状態で脱感作状態への移行メカニズムを明らかにするために、ダイマー状態のまま nAChR を精製し、ナノディスクに再構成する方法を検討した。

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するとともに、構造解析によって得られた各色素の位置情報を利用して、色素間の光エネルギー伝達の理論計算を進めた。南極に自生するある種の緑藻が、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構造解析を行った。

V 珪藻などの微細藻類についての生理・生化学的研究およびその利用

Physiological and biochemical study on diatom and its application

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

海洋の珪藻は地球の光合成の約 25% を担っている重要な光合成生物である。そのような珪藻の特質を温暖化抑止に利用し、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・伊藤喜子・宮澤淳夫：クライオ SEM を用いた含水試料の観察、日本顕微鏡学会第 77 回学術講演会・シンポジウム「非晶質凍結した含水性試料におけるクライオ SEM 法の最前線」(筑波)、2021
- I -2 高橋真一(日産自動車)・在原一樹(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・西野有里・宮澤淳夫：電気自動車用電池開発における Cryo-SEM の活用、日本顕微鏡学会第 77 回学術講演会・シンポジウム「非晶質凍結した含水性試料におけるクライオ SEM 法の最前線」(筑波)、2021
- I -3 西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫：クライオ電子顕微鏡法を用いた生物試料の観察とソフトマテリアルへの応用、日本顕微鏡学会学際的顕微研究領域若手研究会(オンライン)、2021
- I -4 Yuri Nishino・Kanakano Miyazaki・Mizuho Kaise・Atsuo Miyazawa: Fine cryo-SEM observation of the microstructure of emulsions frozen via high-pressure freezing, *Microscopy*, In press (2021)
- IV -1 Tasuku Hamaguchi (理研), Keisuke Kawakami (理研), Kyoko Shinzawa-Itoh, Natsuko Inoue-Kashino, Shigeru Itoh (名大), Kentaro Ifuku (京大), Eiki Yamashita (阪大), Ko Maeda, Koji Yonekura (理研) & *Yasuhiro Kashino (2021) Structure of the far-red light utilizing photosystem I of *Acaryochloris marina*. *Nat Commun* 12: 2333 (<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22502-8>)
- IV -2 浜口祐(理研)、川上恵典(理研)、伊藤(新澤)恭子、菓子野(井上)名津子、伊藤繁(名大)、伊福健太郎(京大)、山下栄樹(阪大)、前田皐臣、米倉功治(理研)・菓子野康浩: *Acaryochloris marina* 由来光化学系 I 複合体の立体構造解析、第 28 回光合成セミナー(2021年6月26日開催・オンライン)
- IV -3 木村 明洋(名大)・鬼頭 宏任(神戸大)・浜口 祐(理研)・米倉 功治(理研)・川上 恵典(理研)・菓子野 康浩・浅井智広(立命)・大岡宏造(阪大)・伊藤 繁(名大)：細菌と植物のもつ多様な光合成 I 型反応中心の光捕集機能に関する比較、量子生命科学会第 3 回大会(オンライン)、2021年9月16日
- IV -4 Makiko Kosugi (アストロバイオロジーセンター), Masato Kawasaki, (高エネ研、総研大), Yutaka Shibata (東北大), Kojiro Hara (秋田県立大), Shinichi Takaichi (東京農大), Toshio Moriya (高エネ研), Naruhiko Adachi (高エネ研), Yasuhiro Kamei (総研大、基生研), Yasuhiro Kashino, Sakae Kudoh (極地研), Hiroyuki Koike (中央大), Toshiya Senda (高エネ研) ; Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in the Antarctic alga、口頭発表、The 12th Symposium on Polar Science、15 - 18 November 2021、東京(オンライン開催)
- IV -5 木村 明洋(名大)・鬼頭 宏任(神戸大)・浜口 祐(理研)・米倉 功治(理研)・川上 恵典(理研)・菓子野 康浩・伊藤 繁(名大) : *A. marina* の光化学系 I の光捕集機構 : *T. elongatus* の光化学系 I との比較、第 59 回日本生物物理学会(仙台、オンライン開催)、2021年11月25-27日
- IV -6 木村明洋(名大)・鬼頭宏任(神戸大)・青田俊道(名大)・浜口祐(理研)・米倉功治(理研)・川上恵典(理研)・新沢-伊藤恭子・井上-菓子野名津子・伊福健太郎(京大)・

- 菓子野康浩・山下栄樹 (阪大) ・伊藤繁 (名大) : クロロフィル *d* を持つ遠赤色光型反応中心 *A. marina* PSI の光捕集機構に関する理論解析: クロロフィル *a*-型 PSI との比較、日本物理学会 第 77 回年次大会 (オンライン開催)、2022 年 3 月 15 日
- IV -7 木村明洋 (名大) ・鬼頭宏任 (神戸大) ・青田俊道 (名大) ・浜口祐 (理研) ・米倉功治 (理研) ・川上恵典 (理研) ・新沢-伊藤恭子・井上-菓子野名津子・伊福健太郎 (京大) ・菓子野康浩・山下栄樹 (阪大) ・伊藤繁 (名大) : クロロフィル *d* を使い赤外光を利用するシアノバクテリア *Acaryochloris marina* の PSI 反応中心の理論モデルとクロロフィル交換モデルの作成、第63回日本植物生理学会年会、つくば国際会議場 (オンライン開催)、2022年3月24日
- IV -8 小杉真貴子 (アストロバイオロジーセンター) ・川崎政人 (高エネ研、総研大) ・柴田穰 (東北大) ・原光二郎 (秋田県立大) ・高市真一 (東京農大) ・守屋俊夫 (高エネ研) ・安達成彦 (高エネ研) ・亀井保博 (総研大、基生研) ・菓子野康浩・工藤栄 (極地研) ・小池裕幸 (中央大) ・千田俊哉 (高エネ研) ; Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in the Antarctic alga、ポスター発表、第63回日本植物生理学会年会、2022年3月22-24日、筑波 (オンライン開催)
- V -1 Minoru Kumazawa (京大) ・Hiroyo Nishide (基生研) ・Ryo Nagao (岡大) ・Natsuko Inoue-Kashino ・Jian-Ren Shen (岡大) ・Takeshi Nakano (京大) ・Ikuo Uchiyama (基生研) ・Yasuhiro Kashino & *Kentaro Ifuku (京大) (2022) Molecular phylogeny of fucoxanthin-chlorophyll *a/c* proteins from *Chaetoceros gracilis* and Lhcq/Lhcf diversity. *Physiol Plant* 174: e13598. (<https://doi.org/10.1111/ppl.13598>)
- V -2 Freisa M. Joaquín-Ovalle (University of Puerto Rico), Grace Guihurt (University of Puerto Rico), Vanessa Barcelo-Bovea (University of Puerto Rico), Andraous Hani-Saba (University of Puerto Rico), Nicole C. Fontanet-Gómez (University of Puerto Rico), Josell Ramirez-Paz (University of Puerto Rico), Yasuhiro Kashino, Zally Torres-Martinez (University of Puerto Rico), Katerina Doble-Cacho (University of Puerto Rico), Louis J. Delinois (University of Puerto Rico), Yamixa Delgado (San Juan Bautista School of Medicine) & Kai Griebenow (University of Puerto Rico) (2022) Oxidative stress- and autophagy-inducing effects of PSI-LHCI from *Botryococcus braunii* in breast cancer cells *BioTech* 11: 9 (<https://doi.org/10.3390/biotech11020009>)
- V -3 Hidetoshi Inoue (NITE) ・Kumiko Tajima (NITE) ・Cristina Mitsumori (NITE) ・Natsuko Inoue-Kashino N・Takamasa Miura (NITE) ・Kentaro Ifuku (京大) ・Ryuichi Hirota (広大) ・Yasuhiro Kashino ・Katsutoshi Fujita (NITE) & Hiroshi Kinoshita (NITE) (2022) Biodiversity risk assessment of genetically modified *Chaetoceros gracilis* for outdoor cultivation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (in press)
- V -4 廣田隆一 (広大) ・黒田章夫 (広大) ・菓子野康浩、菓子野名津子、渡部智 (東京農大) 「藍藻の培養方法および藍藻の形質転換体のスクリーニング方法」、【出願番号】特願 2021-148599、【出願日】令和 3 年 9 月 13 日 (2021.09.13)、【出願人】: 広島大学、兵庫県立大学、東京農業大学
- V -5 熊沢穰 (京大) ・西出浩世 (基生研) ・長尾遼 (岡山大) ・井上 (菓子野) 名津子・内山郁夫 (基生研) ・菓子野康浩・沈建仁 (岡山大) ・中野雄司 (京大) ・伊福健太郎 (京大) ; 集光性色素タンパク質 fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein (FCP) の紅色系統二次共生藻類における機能分担と多様性、第 11 回 日本光合成学会年会、静岡大学 (オンライン)、2021 年 5 月 29 日
- V -6 Minoru Kumazawa (京大) ・Hiroyo Nishide (基生研) ・Ryo Nagao (岡大) ・Natsuko Inoue-Kashino ・Ikuo Uchiyama (基生研) ・Yasuhiro Kashino ・Jian-Ren Shen (岡大) ・Takeshi Nakano (京大) & *Kentaro Ifuku (京大) : Molecular phylogeny of fucoxanthin-chlorophyll *a/c* proteins in the *Chaetoceros gracilis* genome suggests the

process of their diversification in red plant lineage、Molecular Life of Diatoms 6 (MLD6) (オンライン開催)、Jul 12 - 14, 2021

- V-7 菓子野康浩：下水処理場および周辺工場からの CO₂ を回収し、珪藻で有用物質に変換；下水処理場を CCS 拠点化、国土交通省 第 5 回下水道スタートアップチャレンジ「脱炭素社会実現に向けた下水道資源の活用」(オンライン開催)、2021 年 8 月 18 日
- V-8 菓子野康浩：珪藻のフィジオロミクスに基づく褐色のエネルギー革命～珪藻を軸にした太陽エネルギーにより大気中の CO₂ をリサイクル利用するクリーンで持続的な社会へ～、兵庫県立大学 知の交流シンポジウム(オンライン開催)、2021 年 9 月 28 日
- V-9 熊沢穰(京大)・西出浩世(基生研)・長尾遼(岡山大)・井上(菓子野)名津子・沈建仁(岡山大)・中野雄司(京大)・内山郁夫(基生研)・菓子野康浩・伊福健太郎(京大)：ツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* ゲノムデータベース ChaetoBase を利用した集光性色素タンパク質 fucoxanthin chlorophyll *a/c* -binding protein (FCP) の網羅的機能解析、第 63 回日本植物生理学会年会、つくば国際会議場(オンライン開催)、2022 年 3 月 22-24 日

生命科学専攻

博士後期課程

大石鴻一郎：アセチルコリン受容体の分子内運動解析

博士前期課程

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

小畑由紀子：神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体の分子動態解析

上野真悠子：光化学系 II 複合体の構築過程の研究

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 3 年度

研究課題 溶液中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3年度
研究課題 高分子電解質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3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の添加効果
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 6 共同研究 日産化学(株) 令和3年度
研究課題 幹細胞培養用培地の開発
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 7 共同研究 (株)日東分析センター 令和3年度
研究課題 高圧凍結法および急速凍結法とクライオ電子顕微鏡観察の技術開発
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 8 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
- 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
- 10 文部科学省科学研究費補助金(基盤B) 令和2～4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
- 11 独立行政法人 科学技術振興機構(JST)研究成果展開事業社会還元加速プログラム(SCORE 拠点都市環境整備型) 令和3年度
研究課題 持続可能社会実現のための珪藻の大量産生と販売
研究代表者 菓子野康浩
- 12 姫路市 尾上学術振興助成事業(産学協同研究助成金) 令和3年度
研究課題 珪藻とIoTによる栽培漁業の低コスト化、高品質化、安定化
研究代表者 上田澄廣(産学連携・研究推進機構)、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系の発生・再生の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development and regeneration of the enteric nervous system in the zebrafish

二階堂昌孝・八田公平
Nikaido M, Hatta K

多種、多数 (ヒトでは 20 種以上で約 1 億個) の神経細胞から成り、感覚神経系から運動神経系までの神経回路を有して中枢から半ば独立して活動できる腸神経系は第2の脳とも呼ばれる。我々はこの腸神経系を構成する各種神経細胞や、それらが存在する腸の各領域を規定する遺伝子を単離す

る目的でトランスクリプトーム解析を行っている。この解析の結果、分化した腸神経細胞に強い発現が見られる転写因子群、腸神経細胞の前駆細胞に強い発現を示す遺伝子群のリストを得ることができた。今後これらから転写因子を単離し発現部位を解析する。また、腸の前後軸に応じて異なる発現パターンを示す転写因子も 13 種特定することができた。一方、昨年度我々はゼブラフィッシュの腸神経細胞が再生することを示した。今年度は、Fgf をはじめとする各種分泌タンパク質の下流因子である ERK が再生過程で活性化しているかを調べることで、再生の分子機構を解明しようとしている。その結果、神経細胞除去後の神経細胞前駆体や分化した神経細胞で ERK の活性化が見られた。このことを手がかりに、どのような分泌タンパク質が、再生のどの過程に必要なのか、さらに詳細に解析する計画である。

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。本年度は、魚類におけるマウスナー細胞と類似した形態を持つホヤ幼生の ddNs が、機能的にも類似していることを、新たに大学院生（村田）が開発したプログラムを用いて明らかにした。

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

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、成魚の脳のグリア細胞のマイクロ CT による可視化に大きな進展が見られた。

発表論文 List of Publications

- I-1 Shin-ichi Okamoto, Kohei Hatta : Ca²⁺-imaging and photo-manipulation of the simple gut of zebrafish larvae in vivo. Scientific Report (2022年2月7日) doi: 10.1038/s41598-022-05895-4
- I-2 ○岩谷 将太、八田 公平、二階堂 昌孝、青木 滯：ゼブラフィッシュ幼生におけるマウスナー細胞の軸索起始部を取り囲む Axon Cap Glia の起源と発生（口頭発表）第44回日本神経科学大会（2021年7月28日 神戸）
- I-3 ○下村 晃大、二階堂 昌孝、八田 公平：フォトコンバージョン可能な蛍光タンパク質によるゼブラフィッシュ幼生の単一腸神経細胞の形態と支配領域の解析（ポスター発表；Web 参加）第44回日本神経科学大会（2021年7月31日 神戸）
- I-4 Daiji Takamido, Shin-ichi Okamoto, Koudai Shimomura, Koichi Kawakami（遺伝研）, Masataka Nikaido, ○Kohei Hatta : Activities and morphology of individual cells derived from three germ layers associated with the region-specific movements of the larval zebrafish gut（口頭発表；Web 開催）第54回日本発生生物学会年会（2021年6月18日 神戸）
- I-5 Daiji Takamido, Shin-ichi Okamoto, Koudai Shimomura, Koichi Kawakami（遺伝研）, Masataka Nikaido, ○Kohei Hatta : Activities and morphology of individual cells derived

from three germ layers associated with the region-specific movements of the larval zebrafish gut (ポスター発表 ; Web 開催)) The 16th International Zebrafish Conference (2021年6月16-22日、Montreal、Canada)

III-1 村田大夢、中川将司、○八田公平、堀江健生(筑波大) : 光遺伝学的手法によるホヤ幼生のマウスナー細胞様神経の機能解析 (ポスター発表 ; Web 開催) 第92回日本動物学会 (2021年8月25日、米子)

IV-1 ○高田将真、八田公平、岡田央人、上杉健太郎、星野真人 : SPring-8 を用いた骨鰓上目の咽頭顎の機能の解析 (ポスター発表 ; Web 開催) 第92回日本動物学会 (2021年8月25日、米子)

生命科学専攻

博士後期課程

村田大夢 : 光遺伝学を用いたホヤ幼生神経系の解析

博士前期課程

岩谷将太 : 逃避行動の指令ニューロンの軸索起始部を囲む特殊なグリアの発生期限

下村晃大 : ゼブラフィッシュ腸神経細胞の単細胞レベルでの形態解析

高田将真 : SPring-8 を用いた骨鰓上目の咽頭顎の機能の解析

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。体細胞系幹細胞から生殖系幹細胞が変化する仕組みを両幹細胞の代謝および発現遺伝子の違いから明らかにする。

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過程でどのようなシグナル因子が、どこでどのように働くのかを、遺伝子発現解析と機能解析により明らかにしようとする。

発表論文 List of Publications

- II-1 澤本・井上(鳥取大・医)・梅園: プラナリアにおける摂食調節に関わる神経細胞種同定. 日本動物学会第92回大会(オンライン)、2021

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 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
齋藤 あみ : プラナリア有性生殖器官の退縮
平岩 優佳 : プラナリア再生過程における創傷治癒と組織再生に関する研究
本多 和真 : プラナリアの成長と退縮におけるプロポーションの変化に関する研究
中村 悠 : プラナリア成体の体軸パターンの維持機構に関する研究

科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 (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

- 3 兵庫県立大学科学技術後援財団 教育研究助成
研究課題 アフリカツメガエル再生研究のためのゲノム編集技術の確立
研究代表者 餅井真

Supramolecular Structural Biology

細胞膜超分子複合体 機能解析学

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.

病原微生物が感染後に増殖していくためには、宿主（感染先）の体内に含まれるヒト赤血球ヘモグロビンなどから鉄を獲得することが必要となる。したがって、鉄取り込みの阻害は「兵糧攻め」による感染防御の第一線として機能を果たすと期待される。鉄イオンやヘム（鉄-ポルフィリン錯体）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 あるいはそのアナログ化合物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。構造解析の成功のカギを握るのは、試料の調製の際の界面活性剤や両親媒性分子の選択である。これまでの実験からヘムトランスポーターが安定化する界面活性剤を見出しており、SPRING-8 で稼働している低温電子顕微鏡を利用して画像データを収集した。3次元マップへの再構成計算を行い、高分解能での構造決定を進めている。構造解析とそれを基盤にした機能解析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的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、嫌気条件下での時間分解構造解析を見据えた基盤技術開発や、光解離性ケージド化合物の低温光解離を利用した金属酵素反応中間体の捕捉につい

て研究を進めた。今後は、これらの手法を SACLA での構造解析に応用し、金属酵素反応中間体の構造解析へと展開する予定である。

発表論文 List of publications

- I-1 木村哲就, 浅田拓也, 林沙英, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏 「ナノディスク再構成型 BhuUV-T による段階的な基質輸送の分光学的観察」 第 21 回蛋白質科学会年会、オンライン (富山)、2021 年 6 月 16-18 日 (口頭発表)
- I-2 仲絢香、小堀康博、鏑木基成、城宜嗣、杉本宏、木村哲就 “Structural analyses of ABC transporters in nucleotide bound states investigated by CW-ESR spectroscopy” 第 59 回日本生物物理学会年会、オンライン (仙台)、2021 年 11 月 25-27 日 (口頭発表)
- I-3 杉本 宏、西堀 英治、R. H. Pek、X. Yuan、I. Hamza 「ヘムの毒性回避のための細胞内結晶の生成と X 線粉末回析測定」 2021 年度日本結晶学会年会、オンライン (札幌)、2021 年 11 月 19-21 日 (ポスター発表)
- I-4 Hiroshi Sugimoto: Structure and dynamics of proteins involved in bacterial heme transport, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2021), Online (Honolulu, USA), Dec 16-21, 2021 (招待講演)
- II-1 K. Mukai, H. Sugimoto, K. Kamiya, R. Suzuki, T. Matsuura, T. Hishiki, H. Shimada, Y. Shiro, M. Suematsu, N. Kagawa: Spatially restricted substrate-binding site of cortisol-synthesizing CYP11B1 limits multiple hydroxylations and hinders aldosterone synthesis, *Curr. Res. Struct. Biol.* 3, 192-205 (2021)
- II-2 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)
- II-3 M. Nishinaga, H. Sugimoto, Y. Nishitani, S. Nagai, S. Nagatoishi, N. Muraki, T. Tosha, K. Tsumoto, S. Aono, Y. Shiro, H. Sawai: Heme Controls the Structural Rearrangement of Its Sensor Protein Mediating the Hemolytic Bacterial Survival, *Commun. Biol.*, 4, 467 (2021)
- II-4 H. Kwon, J. Basran, C. Pathak, M. Hussain, S. L. Freeman, A. J. Fielding, A. J. Bailey, N. Stefanou, H. A. Sparkes, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, H. Murakami, G. Ueno, H. Ago, K. Tono, M. Yamamoto, H. Sawai, Y. Shiro, H. Sugimoto P. C. E. Moody, E. L. Raven: XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60, 14578-14585 (2021)
- II-5 T. Nomura, T. Kimura, Y. Kanematsu, D. Yamada, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, T. Hisano, R. Yamagiwa, H. Takeda, C. Gopalasingam, R. Kousaka, S. Yanagisawa, O. Shoji, T. Kumasaka, M. Yamamoto, Y. Takano, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo, Y. Shiro: Short-lived intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2101481118 (2021)
- II-6 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, *YAKUGAKU ZASSHI*, 142, 487-494 (2022)

- II-7 H. Matsumura, A. S. Faponle, P.-L. Hegedoorn, T. Tosha, S. P. de Visser, P. Moënne-Loccoz: Mechanism of substrate inhibition in cytochrome-c dependent NO reductases from denitrifying bacteria (cNORs), *J. Inorg. Biochem.*, 231, 111781 (2022)
- II-8 城 宜嗣、澤井仁美、當舎武彦: 第4章、第2節 生体鉄の分子科学と細胞生物学、“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” エヌ・ティー・エス出版、城 宜嗣、津本浩平監修、126-138 (2021)
- II-9 榛葉幹治、松浦滉明、平田邦生、山本雅貴、城 宜嗣、當舎武彦: 酸素バリア性フィルムを用いた嫌気条件下での一酸化窒素還元酵素反応中間体の構造解析への挑戦, 第47回生体分子科学討論会(オンライン)、2021年6月4-5日(ポスター発表)
- II-10 加藤 優、吉田生未、増田侑也、當舎武彦、八木一三: 電極表面での脂質二分子膜形成に対する膜タンパク質-脂質相互作用の影響、15回分子科学討論会(オンライン)、2021年9月18-21日(口頭発表)
- II-11 當舎武彦: 光解離性ケージド基質を利用した一酸化窒素還元酵素の反応機構の解明, 第94回日本生化学大会(生体分子の高速分子動画撮影の最前線)(オンライン)、2021年11月3-5日(招待講演)
- II-12 平田邦生、松浦滉明、坂井直樹、竹下浩平、當舎武彦、榛葉幹治、山本雅貴: SPring-8 ZOOシステム 次の一手、令和3年度日本結晶学会(北海道大学+オンライン)、2021年11月19日-21日(口頭発表)
- II-13 杉本宏 「ヘムタンパク質の反応中間体の精密構造解析」第16回高速分子動画オンラインセミナー、2021年12月14日(口頭発表)
- II-14 T. Tosha, H. Takeda, Y. Shiro, M. Kubo: Time-resolved techniques provide mechanism for nitric oxide reduction by nitric oxide reductase, *Pacificchem 2021 (Novel Heme Proteins and Model Systems)*, オンライン, 12月16-21日(招待講演)
- II-15 平田邦生、松浦滉明、坂井直樹、竹下浩平、當舎武彦、榛葉幹治、山本雅貴: SPring-8 ZOOシステム 次の一手、第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(オンライン)、2022年1月7-9日(ポスター発表)
- II-16 H. Sugimoto “High-resolution structural analysis of the heme proteins using neutron and XFEL crystallography” 6th International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University, Online (Ibaraki), Feb 21-22, 2022 (招待講演)
- II-17 H. Sugimoto “Hydrogen atoms in protein structure: high resolution analysis of heme enzymes”, “SACLA User’s Meeting, Online (Sayo), Mar 2, 2022 (招待講演)

科学研究費補助金等

- 1 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
- 2 科学研究費補助金(令和3~5年度)基盤研究(B) 課題番号21H02064
研究課題 核共鳴散乱分光を駆使した鉄複核中心と気体分子の化学の解明
研究代表者 當舎武彦

- 3 科学研究費補助金（令和 1～5 年度）新学術領域研究（研究領域提案型）課題番号 19H05768
研究課題 細胞内生命金属動態を制御するタンパク質メタレーション
研究分担者 杉本宏
- 4 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）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
- 5 科学研究費補助金（令和 3～5 年度）基盤研究（B）課題番号 21H02421
研究課題 生体金属イオンの輸送システムで機能する膜タンパク質の構造解析
研究代表者 杉本宏

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] Usui, Y., Uyeshima, M., Ogawa, T., Yoshimura, R., Oshiman, N., Yamaguchi, S., Toh, H., Murakami, H., Aizawa, K., Tanbo, T., Ogawa, Y., Nishitani, T., Sakanaka, S., Mishina, M., Satoh, H., Goto, T., Kasaya, T., Mogi, T., Yamaya, Y., Shiozaki, I., & Honkura, Y. “Electrical Resistivity Structure Around the Atotsugawa Fault, Central Japan, Revealed by a New 2-D Inversion Method Combining Wideband-MT and Network-MT Data Sets” *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 126(4), e2020JB020904. (2021).
- [2] de Sa, V. R., Koike, K., Goto, T., Nozaki, T., Takaya, Y., & Yamasaki, T. “3D geostatistical modeling of metal contents and lithofacies for mineralization mechanism determination of a seafloor hydrothermal deposit in the middle Okinawa Trough, Izena Hole” *Ore Geology Reviews*, 135, 104194. (2021).
- [3] Wu, J., Goto, T., & Koike, K. “Estimating fractured rock effective permeability using discrete fracture networks constrained by electrical resistivity data” *Engineering Geology*, 289, 106178. (2021).
- [4] Ishizu, K., Siripunvaraporn, W., Goto, T., Koike, K., Kasaya, T., & Iwamoto, H. “A cost-effective three-dimensional marine controlled-source electromagnetic survey: Exploring seafloor massive sulfides” *Geophysics*, 87(4), E219-E241. (2022).

大学院理学研究科

博士前期課程

山下 風	活断層周辺の地下比抵抗構造の関係に関する研究
大島 由有希	電気探査法の人体トモグラフィへの適用
松浦 優介	正方晶系ボレ石の結晶構造解析

科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金（平成 30-令和 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 研究分担者 後藤忠徳
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 研究分担者 後藤忠徳
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 研究分担者 後藤忠徳