

I 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

Kashino, Y.

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はふたつの光化学反応中心（光化学系 I および II）複合体で行われている。機能的系 II 複合体は二量体であると広く信じられており、結晶構造モデルが二量体であったこともこの証左となった。しかし、二量体化は人為的なものであり、生体内で系 II は単量体として機能しているということを明らかにした。これは、系 II のライフサイクルを解明する上で重要な知見である。また、地球上の全光合成の 20% 程度を担うほどの重要な光合成生物である珪藻の光化学系 II 複合体を健全な形で精製し、その生化学的特徴を明らかにした。

最古の植物と言われる原始紅藻の光化学系 I 複合体の分析を行うことにより、3 種類の LHCI が結合していることを見出した。これは、真核光合成生物が誕生した早い時期に系 I 複合体に光捕集系が獲得されたことを示すものである。また、培養時の光強度により LHCI の結合量が調節されていることも明らかとなり、高等植物の光強度応答機構の原型となった可能性が示唆された。

II 光合成生物における環境応答機構の研究

Studies on responses of photosynthetic organisms to environmental stresses

菓子野康浩

Kashino, Y.

地衣は、噴火後の火山など、貧栄養で乾燥している環境にいち早く進出し、他の光合成生物が進出するための礎となるなど、地球環境にとっても重要な生物群であり、その乾燥耐性機構は生理学的にも興味深い存在である。本研究では、自生の地衣、単離した共生光合成生物、培養した共生光合成生物を用い、乾燥が光合成機能に及ぼす影響を詳細に解析した。またその際、緑藻共生型、シアノバクテリア共生型、両者を同時に共生させている型のいずれをも研究対象とした。その結果、地衣特有の物質である地衣酸や可溶性地衣成分が乾燥状態においても、また吸水状態においても、共生光合成生物の光阻害機構および過剰光エネルギー散逸機構を強化していることを明らかにした。そのような地衣成分を分画し、化学分析や生理活性解析を行い、とくにアラビトールが乾燥状態での光阻害回避機構の強化に密接に関わっていることを解明した。また地衣は、地衣菌が共生光合成生物から一方的に利益を得る寄生関係にあると考えられていたこともあった。しかし、各種共生光合成生物と地衣菌の細胞内浸透圧や乾燥ストレス、光合成機能の関係を解析することにより、地衣菌の細胞内浸透圧により共生光合成生物が乾燥状態に陥ることがないように自らの細胞内浸透圧を調整していることを突き止めた。

III Ice algae についての生理・生化学的研究

Physiological and biochemical study on ice algae

菓子野康浩・佐藤和彦

Kashino, Y.

北洋や南極海は海水温がかなり低いにもかかわらず、その生態系は非常に豊かである。その生態系を支える一次生産者として、好冷性微細藻類が非常に重要な役割を担っていることが明らかになっている。

本研究では、南洋において深度ごとの光合成色素の分析を行った。その結果、珪藻類とハプト藻類が主要な構成種であることが分かった。珪藻類が比較的高緯度域に、ハプト藻類が比較的低緯度域に分布していた。珪藻類がとくに優占した観測地点、ハプト藻類がとくに優占した観測地点をそれぞれ見出し、比較検討した結果、いずれの種類の藻類も補助色素の比率を深度が変わっても、したがって光強度が変わってもほとんど変えていなかった。しかし、光化学系を保護する機能があるキサントフィル色素は、海面に近いほど、したがって環境中の光強度が高いほど、たくさん含まれていた。したがって、アンテナサイズの大きなこのような微細藻類は、環境中の光強度に合わせてそのような保護機構をダイナミックに調節しつつ、光合成を行っていることが明らかとなった。

IV 分析方法、バイオレメディエーション

Development of bioremediation system on photosynthetic organisms and analytical methods

菓子野康浩

Kashino, Y.

シアノバクテリアの中で *Synechocystis* sp. PCC6803 は全遺伝子配列が解明された初めての生物である。このシアノバクテリアに PCB 分解系の一環の酵素遺伝子を導入し、光合成によるエネルギーを使って PCB を分解する系の開発に携わった。

近海における水塊の流れを分析するためにウラニンを放流する方法が知られているが、効率的なウラニンの定量法が求められていた。ソリッドフェーズ抽出法と HPLC 法を組み合わせ、高感度かつ簡便な方法を開発した。

V 電子顕微鏡法における細胞内タンパク質の標識法の開発

Development of protein-labeling in the cells for electron microscopy.

宮澤淳夫・福永優子

Miyazawa, A., Fukunaga, Y.

光学顕微鏡の分野では、GFP を始めとする蛍光分子を標識タンパク質の遺伝子に組み込んだ蛍光プローブの

開発により、生きたままの細胞の局所におけるタンパク質の局在情報が得られるようになった。我々は、電子顕微鏡の分野では開発が遅れていた細胞内のタンパク質標識法の開発に取り組んでいる。細胞が生きている時に近い状態を保持することができる電子顕微鏡用試料調整法として近年注目を集めている急速凍結・無染色試料に、我々が開発している標識法を応用することを目指している。

VI 神経筋接合部における機能分子の局在と機能の研究

Localization and function of molecules at the neuromuscular junction.

福永優子・宮澤淳夫

Fukunaga, Y., Miyazawa, A.

運動神経と筋細胞の間には、特殊に分化した神経筋接合部と呼ばれるシナプスが存在している。そこでは、筋収縮に関わるアセチルコリン受容体や、ナトリウムチャネルなどの機能分子が集積している。我々は、このような神経筋接合部に存在する機能分子の局在メカニズムの解明と機能解析を行うことを目指している。神経筋接合部は *in vitro* での作製が難しく、これまでは実験操作に制約がある *in vivo* の実験系が用いられてきた。そこで我々は、運動神経細胞と筋細胞を用いた *in vitro* シナプスの作製法の検討を開始した。また、株化筋細胞に発現したアセチルコリン受容体クラスターの電子顕微鏡観察に向けた取り組みも行っている。

VII 中枢神経系におけるグルタミン酸受容体の細胞内局在と機能の研究

Localization and function of glutamate receptors in the central nervous system.

福永優子・宮澤淳夫

Fukunaga, Y., Miyazawa, A.

興奮性神経伝達を担うグルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体は、記憶・学習などの高次機能や、細胞の生存・死の制御に関わる。この NMDA 受容体は、シナプスだけでなく、シナプス外領域においても存在しており、海馬においてシナプス NMDA 受容体が神経細胞の生存促進を引き起こすのに対し、シナプス外 NMDA 受容体は神経細胞死促進という全く逆の細胞応答を引き起こすことがわかっている。我々は、同じ細胞にある同じ受容体が、分布場所の違いにより、異なる細胞応答を起こす仕組みを明らかにすることを目指している。現在我々は、免疫走査電子顕微鏡法を利用して、シナプス外 NMDA 受容体の分布状態の解析を行っている。

発表論文 List of Publications

- I-1 Miwa Sugiura (愛媛大), Sayo Harada (愛媛大), Takeshi Manabe (愛媛大), Hidenori Hayashi (愛媛大), Yasuhiro Kashino and Alain Boussac (仏, iBiTec-S) (2010) Psb30 contributes to structurally stabilise the Photosystem II complex in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1546-1554.
- I-2 Ryo Nagao (東京理科大), Tatsuya Tomo (東京理科大), Eri Noguchi (東京理科大), Saori Nakajima (東京理科大), Takehiro Suzuki (理研), Akinori Okumura (日大), Yasuhiro Kashino, Mamoru Mimuro (京大), Masahiko Ikeuchi (東大) & Isao Enami (東京理科大) (2009) Purification and characterization of a stable oxygen-evolving Photosystem II complex from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 1797: 160-166.
- I-3 Takashi Takahashi, Natsuko Inoue-Kashino, Shin-ichiro Ozawa (岡大), Yuichiro Takahashi (岡大), Yasuhiro Kashino and Kazuhiko Satoh (2009) Photosystem II complex *in vivo* is a monomer. *J. Biol. Chem.* 284: 15598-15606.
- I-4 Yasuhiro Kashino (2009) "Proteomic analysis of photosystems in cyanobacteria and primitive red alga" The 5th German-Japan Binational Seminar "From Photoreaction to Biomass: Phototrophs in Ecosystems and Biotechnology" June 2009, Tsukuba, Japan
- I-5 西俊輔 (名古屋大)・小村理行 (名古屋大)・野路智康 (名古屋大)・川上恵典 (岡山大)・沈建仁 (岡山大)・高橋武志・柴田 穰 (名古屋大)・伊藤 繁 (名古屋大) : 光化学系II単量体と二量体でのエネルギー移動の比較: シアノバクテリアと原始紅藻の光化学系IIでの共通機構、植物生理学会第51回年会 (熊本、2010年)
- I-6 菓子野康浩・高橋武志・井上 (菓子野) 名津子・新居田寛人・山下淳平・小澤真一郎 (岡山大)・高橋裕一郎 (岡山大)・佐藤和彦 : 原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の光化学系、植物生理学会第51回年会 (熊本、2010年)
- I-7 菓子野康浩・高橋武志・井上 (菓子野) 名津子・小澤真一郎 (岡山大)・高橋裕一郎 (岡山大)・佐藤和彦 : 光化学系II複合体の *in vivo* での存在形態、ラン藻の分子生物学2009 (木更津、2009)
- I-8 菓子野康浩 : Proteomic Analysis of Photosystem II NAIST グローバルCOE 公開ワークショップ「光合成の環境応答」 (奈良、2009年)
- II-1 Makiko Kosugi, Maiko Arita, Ryoko Shizuma, Yufu Moriyama, Yasuhiro Kashino, Hiroyuki Koike (中央大) and Kazuhiko Satoh (2009) Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant Cell Physiol.* 50: 879 - 888.
- II-2 小杉真貴子・菓子野康浩・佐藤和彦・三宅博久 (名古屋大)・小村理行 (名古屋大)・柴田 穰 (名古屋大)・伊藤 繁 (名古屋大) : 地衣体に蓄積されたアラビトールが乾燥時における共生緑藻の光阻害防御機構を促進する、植物生理学会第51回年会 (熊本、2010年)
- II-3 小杉真貴子・菓子野康浩・佐藤和彦・三宅博久 (名古屋大)・小村理行 (名古屋大)・柴田 穰 (名古屋大)・伊藤 繁 (名古屋大) : 地衣 *Ramalina yasudae* と共生藻 *Trebouxia* sp. における光阻害防御機構について、日本植物学会第73回大会 (山形、2009年)
- II-4 三宅博久 (名古屋大)・小村理行 (名古屋大)・山岸篤史 (名古屋大)・柴田 穰 (名古屋大)・伊藤 繁 (名古屋大)・小杉真貴子・菓子野康浩・佐藤和彦 : 乾燥地衣類及び共生藻類の高速励起エネルギー消光機構の極低温時間分解蛍光測定による解析、日本植物学会第73回大会 (山形、2009年)
- II-5 小杉真貴子・菓子野康浩・佐藤和彦 : 地衣体内の光環境と光阻害防御機構について、日本地衣学会第8回大会 (京都、2009年)

- II-6 三宅博久 (名古屋大) ・小村理行 (名古屋大) ・山岸篤史 (名古屋大) ・柴田 穰 (名古屋大) ・伊藤 繁 (名古屋大) ・小杉真貴子・菓子野康浩・佐藤和彦：地衣類の過剰な光エネルギーを熱に変換する防護機構の解明；極低温での時間分解蛍光測定による解析、日本地衣学会第8回大会 (京都、2009年)
- III-1 Makiko Kosugi, Yuya Katashima, Shimpei Aikawa, Yukiko Tanabe (総研大), Sakae Kudoh (総研大、国立極地研), Yasuhiro Kashino, Hiroyuki Koike (中央大) and Kazuhiko Satoh (2009) Comparative study on the photosynthetic properties of *Prasiola* (Chlorophyceae) and *Nostoc* (Cyanophyceae) from Antarctic and non-Antarctic sites. *J Phycol* 46: 466-476.
- III-2 Aikawa S, Hattori H, Gomi Y, Watanabe K, Kudoh S, Kashino Y & Satoh K (2009) Diel tuning of photosynthetic systems in ice algae at Saroma-ko Lagoon, Hokkaido, Japan. *Polar Sci* 3: 57-72.
- III-3 菓子野康浩：南極海における植物プランクトンの光馴化、日本植物学会第73回大会、シンポジウム「氷雪藻類の環境適応」 (山形、2009年9月)
- III-4 田邊優貴子・設楽智文・菓子野康浩・工藤 栄・原 慶明：雪上藻類の生息環境への生理的適応、日本植物学会第73回大会、シンポジウム「氷雪藻類の環境適応」 (山形、2009年9月)
- III-5 菓子野康浩：アイスアルジーの光環境変化に応じた光合成機能調節、植物生理学会第50回年会、シンポジウム「地球環境を紡ぐ好冷性生物の光合成 一知られざる寒冷域の光合成」 (2009年3月、名古屋)
- IV-1 Ikeya T, Horimoto N & Kashino Y (2009) A practical method for sensitive determination of the fluorescent water-tracer uranine by reversed phase HPLC under alkaline conditions. *Talanta* 79: 818-823.
- IV-2 西澤明人・千田美紀・千田俊哉・菓子野康浩・福田雅夫・木村成伸 (2009) 「貧栄養環境下で芳香族化合物を分解できる新規光合成微生物」 *ケミカルエンジニアリング* 54 (10) 特集=バイオテクノロジーと実用技術: pp. 785-791 (発行：株式会社 化学工業社)
- IV-3 井上 (菓子野) 名津子・菓子野康浩 (2008) SDS-PAGE- 低温科学 67 (光合成研究法) : 359-372.
- IV-4 菓子野康浩 (2008) Blue-Native PAGE 低温科学 67 (光合成研究法) : 373-376.
- IV-5 菓子野康浩 (2008) Native-Green PAGE 低温科学 67 (光合成研究法) : 377-380.
- V-1 平瀬 愛・宮澤淳夫：「STEM トモグラフィーにおける電子線損傷の定量」 *顕微鏡* 2009年、44(4) 248-251
- V-2 西野有里・宮澤淳夫：「電顕観察に向けた遺伝的標識法の開発」、*細胞*、2010年、印刷中
- V-3 福永優子：神経スパインにおけるアクチンの電子顕微鏡観察、東京都老人総合研究所一理化学研究所・公開合同コンファレンス「神経筋シナプス解明に向けた構造生理学のアプローチ」 (兵庫、2009年4月)
- V-4 平瀬 愛：遺伝的ラベルを用いた細胞内 PSD-95 の電子線トモグラフィー、東京都老人総合研究所一理化学研究所・公開合同コンファレンス「神経筋シナプス解明に向けた構造生理学のアプローチ」 (兵庫、2009年4月)
- V-5 平瀬 愛・福永優子・西野有里・東原 愛・宮澤淳夫：細胞内タンパク質標識法の電子線トモグラフィーへの応用、日本顕微鏡学会第65回学術講演会 (仙台、2009年5月)
- V-6 西野有里・白石千夏・宮澤淳夫：アセチルコリン受容体のクラスター形成に対するカドミウムの影響、第32回日本分子生物学会年会 (横浜、2009年12月)

- V-7 Ai Hirase, Yuko Fukunaga and Atsuo Miyazawa: Application of a genetically encoded tag to detection of intracellular protein by electron microscopy. China-Japan 3D-EM Forum 2010 (Beijing, China, 2010,Jan.)
- V-8 Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa: A genetically encoded metallothionein-tag for electron microscopy, China-Japan 3D-EM Forum 2010, (Beijing, China, 2010,Jan.)
- VI-1 西野有里: アセチルコリン受容体複合体クラスターの細胞内三次元構造の解明、東京都老人総合研究所-理化学研究所・公開合同コンファレンス「神経筋シナプス解明に向けた構造生理学のアプローチ」(兵庫、2009年4月)
- VII-1 福永優子・宮澤淳夫: 「シナプスの形態」 *Clinical Neuroscience* (2010) 28(8), 852-854

大学院生命理学研究科

博士後期課程

- 西野有里 : C2C12 細胞で形成されるアセチルコリン受容体クラスターの分子観察
 平瀬 愛 : 電子顕微鏡法における細胞内タンパク質の標識法の開発

博士前期課程

- 伊藤紗也佳: 実験的虚血による中枢神経シナプスの超微細構造変化
 石原あゆみ: 培養細胞を用いた神経筋接合部モデルの作製
 上里真史 : メタロチオネイン標識した CaMKII β の電子顕微鏡観察

科学研究費補助金等

- 1 文部科学省科学研究費補助金(特定領域研究) 平成 20 年度 課題番号:20051021
 研究課題 光合成電子伝達系膜タンパク質複合体の離合集散と機能
 研究代表者 菓子野康浩
- 2 国立極地研究所共同研究 平成 19~21 年度 課題番号:19-27
 研究課題 南極のラン藻類を中心とした湖底の藻類群衆の光合成に関する研究
 研究代表者 菓子野康浩
- 3 JST/CREST 平成 18~23 年度
 研究課題 細胞内標識による生物分子トモグラフィ
 研究代表者 宮澤淳夫