

I 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・菓子野康浩・福永優子

Miyazawa A, Kashino Y and 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。凍結試料をクライオ電子顕微鏡で観察するためには凍結切片を作製する必要がある。これまでに海馬初代培養細胞の凍結切片の作製条件を決定し、無染色試料においてシナプス小胞や微小管などの細胞内小器官を観察することに成功した。

II 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・菓子野康浩・宮澤淳夫

Fukunaga Y, Kashino Y and 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、ナトリウムチャンネル、筋特異的受容体チロシンキナーゼなどの種々の機能分子が集積しクラスターを形成している。これら分子の分布や相互作用などが神経筋接合部の機能に大きく関与している。そこで、細胞レベルのクラスター全体像の観察とクラスター構成分子の構造や局在を共に合わせて観察するために、培養筋細胞で発現させたアセチルコリン受容体と筋特異的受容体チロシンキナーゼを蛍光と金粒子で標識し、光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡で相関観察する方法を確立した。さらに、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ため、運動神経細胞と筋細胞を用いた *in vitro* 神経シナプスの作製法の検討を行っている。神経筋シナプス部は、特殊なヒダ状構造を形成しており、この構造が機能分子の局在と密接に関係している。ヒダ状構造をもつ *in vitro* 神経筋シナプスの形成には、数週間に渡る長期共培養が必要である。培養基質をコラーゲンゲルにすることで、これまで困難であった筋細胞の長期培養を成功させた。

III 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・菓子野康浩・宮澤淳夫

Fukunaga Y, Kashino Y and 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。細胞応答の発現には、受容体の集積が重要な役割を果たすと考えられる。受容体の集積は、プレシナプスから放出された情報伝達分子を受容する上で有利だけでなく、細胞内情報伝達の効率という観点からも有利に働く。我々は、詳細な解析が遅れているシナプス外 NMDA 受容体の分布に関する微細構造レベルでの解析を行った。免疫走査電子顕微鏡法により、シナプス外 NMDA 受容体は、神経突起表面において集積した状態で島状に点在しており、その集積の大きさは、神経細胞の発達に依存していることを明らかにした。

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・福永優子・宮澤淳夫

Kashino Y, Fukunaga Y and 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。PsbP および PsbQ タンパク質は、高等植物や緑藻の機能的系 II 複合体のみで機能していると考えられていた。本研究では、シアノバクテリアの対応するタンパク質についての研究を進めた。

また、我々が光化学系 II 複合体に新たに見出した Sll1252 タンパク質の機能解析を進めた結果、このタンパク質がシアノバクテリアにおいて、光合成的電子伝達系の励起バランスの調節機構に関わっていることを示した。

V 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・福永優子・宮澤淳夫

Kashino Y, Fukunaga Y and Miyazawa A

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いう従来の仮説とは異なり、地衣菌が自身の細胞内浸透圧を調節し、共生光合成生物が乾燥状態に陥ることがないようにしていることを突き止めた。

さらに、このような環境応答を実現するために菌糸と共生藻が地衣体内でどのような空間的關係にあるのか、調べた。そのため、できるだけ広い範囲で測定を行うために X 線マイクロ CT による解析を試みた。大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL20XU を使用し、X 線マイクロトモグラフィの測定を行った。試料として葉状体のマツゲゴケ (*Rimelia clavulifera*) と、頭状体を有するオオキゴケ (*Stereocaulon sorediiferum*) を用い、まず乾燥試料をそのまま測定したが藻体や菌糸一本一本の判別が困難であることが分かった。そこで前処理として 2.5% グルタルアルデヒドで固定した後に 1% 四酸化オスミウムで染色して測定を行ったところ、コントラストが向上して藻と菌糸の判別が可能になった。

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。しかし、その堅い珪酸質の被殻のために、生理生化学的研究は限定的であった。本研究では、海洋の表面から深層まで非常に幅広く変化する光強度の下で、珪藻がどのように光合成電子伝達系のバランスを計っているかを解析した。その結果、環境中の光強度に応じて光化学系 I・系 II それぞれに結合するアンテナのサイズを大きく変化させていることが明らかとなり、また珪藻種により応答の様式が待った濃く異なることも判明した。これは、他の光合成生物には見られない新たな現象である。

VI 好冷性微細藻類についての生理・生化学的研究

Physiological and biochemical study on ice algae

菓子野康浩

Kashino, Y.

雪上藻類は、通常の藻類が十分な光合成を行うことができない雪上でのみ増殖する藻類で、黄金色藻や緑藻などを含む。日本では山形県・月山等で、またカナディアンロッキーや、ニュージーランド、スイスアルプスなど、世界各地で見出される。本研究では、月山から単離された *Ochromonas smithii* と *O. itoi* の光合成特性を、PAM を用いて非破壊的に解析した。*O. smithii* と *O. itoi* の最大光合成活性は、それぞれ 10°C と 5°C であった。またそれぞれ 500 および 1000 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ という比較的強い光強度で光障害が観察された。これは雪上の強光下でも光合成活動を行うことができることを示すものである。そしてそれは強光下で光化学系を保護するキサントフィルサイクルの活性が高いためであることが明らかとなった。

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、南洋の微細藻類の光環境適応戦略を解析した。珪藻類とハプト藻類が主要な構成種であったが、いずれの種類の藻類も深度にかかわらず、つまり環境中の光強度に関わらず、補助色素の比率を変えていなかった。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、海面に近いほどたくさん含まれていた。したがって、このような微細藻類は、弱光適応しつつ、環境中の光強度に合わせて保護機構をダイナミックに調節していることが明らかとなった。

VII バイオレメディエーション、その他

Development of Bioremediation System on Photosynthetic Organisms and others

菓子野康浩

Kashino, Y.

Synechocystis sp. PCC6803 は全遺伝子配列が解明され、形質転換が可能なシアノバクテリアである。一方、環境汚染物質 PCB 等のビフェニル化合物の酸化的分解に微生物を利用したバイオレメディエーションは以前から有望視されていたが、貧栄養環境下での微生物利用は難しい課題であった。そこで、この課題を解決するために光エネルギーを利用する光合成により貧栄養環境下でも生育可能なシアノバクテリアの開発に携わった。そして、この開発株により、貧栄養環境下においてもビフェニルを安息香酸まで分解することが可能であることが明らかとなった。

発表論文 List of Publications

- I-1 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、2011年、印刷中
- I-2 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
- I-3 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.)
- I-4 Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa: A genetically encoded metallothionein-tag for electron microscopy, China-Japan 3D-EM Forum 2010, (Beijing, China, 2010,Jan.)
- I-5 平瀬 愛・福永優子・西野有里・東原 愛・宮澤淳夫：遺伝的コード化標識(3MT)の CEMOVIS への応用、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会 (名古屋、2010年5月)
- I-6 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ー理化学研究所・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)
- I-7 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)
- I-8 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)

- II-1 西野有里、「アセチルコリン受容体複合体クラスターの構造生理学的解析」、東京都健康長寿医療センター研究所-理化学研究所・公開合同カンファレンス（東京、2010年4月）
- II-2 Yuri Nishino, Fukuchi Hiroaki, Ai Higashihara, Takuo Yasunaga and Atsuo Miyazawa : Structure of Nicotinic Acetylcholine Receptor in the Desensitized States, 3rd International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB 2010), (Paris, France, 2010, March)
- II-3 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・公開合同カンファレンス「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）
- III-1 福永優子・宮澤淳夫：「シナプスの形態」 *Clinical Neuroscience* (2010) 28(8), 852-854
- III-2 Fukunaga, Y.: Function and distribution pattern of extrasynaptic NMDA receptor. 20th Anniversary Joint-Symposium of School of Science, International Symposium on Bioimaging and Surface Science University of Hyogo (Hyogo, Japan, 2011)
- III-3 Fukunaga, Y., Momota, N., Yamamoto, Y., Ariga, R. and Miyazawa, A.: The Distribution of Extrasynaptic NMDA Receptors in Cultured Hippocampal Neurons. The 10th Biennial Meeting of the APSN Meeting in conjunction with 15th Thai Neuroscience Society Conference (Phuket, Thailand, 2010)
- III-4 福永優子、「シナプス外 NMDA 受容体の機能と神経細胞における分布様式」、東京都健康長寿医療センター研究所-理化学研究所・公開合同カンファレンス（東京、2010年4月）
- III-5 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－理化学研究所・公開合同カンファレンス「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）
- IV-1 Inoue-Kashino N, Kashino Y and Takahashi Y (2011) Psb30 is a photosystem II reaction center subunit and is required for optimal growth in high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. ***J Photochem Photobiol B: Biology***: 220-228.
- IV-2 Sekine F, Horiguchi K, Kashino Y, Shimizu Y, Yu L-J, Kobayashi M & Wang Z-Y (2011) Gene sequencing and characterization of the light-harvesting complex 2 from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. ***Photosynth Res, in press***.
- IV-3 Inoue-Kashino N, Kashino Y, Orii H, Satoh K, Terashima I & Pakrasi HB (2011) S4 protein Sll1252 is necessary for energy balancing in photosynthetic electron transport in *Synechocystis* sp. PCC 6803. ***Biochemistry* 50**: 329-339.
- IV-4 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.
- IV-5 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) (2010) Purification and characterization of a stable oxygen-evolving Photosystem II complex from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 1797: 160-166.
- IV-6 Kashino Y, Inoue-Kashino N, Takahashi T, Sugiura M (愛媛大), and Takahashi Y (岡山大), "Small Subunit Proteins In Photosystem II Complex" The 70th Okazaki International Conference on Molecular Mechanism of Photosynthetic Energy Conversion: The Present Research and Future Prospects (Dec 2010, Okazaki, Japan).
- IV-7 井上(菓子野)名津子・菓子野康浩・織井秀文・佐藤和彦・寺島一郎(東京大)、Himadri B. Pakrasi (Washington University in St. Louis) : 「S4タンパク質Sll1252のシアノバクテリア *Synechocystis* 6803 光合成系における機能」植物生理学会第52回年会(平成23年3月、仙台)(全国大会、ポスター発表)
- IV-8 井上(菓子野)名津子・菓子野康浩・織井秀文・佐藤和彦・寺島一郎(東京大)、Himadri B. Pakrasi (Washington University in St. Louis) : 「S4タンパク質Sll1252のシアノバクテリア *Synechocystis* 6803 光合成電子伝達系における機能」植物学会近畿支部大会(平成22年11月、京都)(地区大会、口頭発表)
- V-1 小杉真貴子(岡山大・兵庫県立大) 福永優子・菓子野康浩・宮澤淳夫・佐藤和彦・西田治文(中央大) 「X線マイクロトモグラフィ測定による地衣の三次元構造解析」日本地衣学会第9回大会(2010年7月、千葉県立博物館)
- V-2 Tanabe Y, Shitara T, Kashino Y, Hara Y, Kudoh S (2011) Utilizing the effective xanthophylls cycle for blooming of *Ochromonas smithii* and *O. itoi* (Chrysophyceae) on the snow surface. *PLoS ONE* 6: e14690.
- V-3 Hashihama F, Umeda H, Hamada C, Kudoh S, Hirawake T, Satoh K, Fukuchi M and Kashino Y (2010) Light acclimation states of phytoplankton in the Southern Ocean, determined using photosynthetic pigment distribution. *Mar Biol* 157: 1546-1554.
- V-4 Kosugi M, Kashino Y and Satoh K (2010) Comparative analysis of light response curves of *Ramalina yasudae* and freshly isolated *Trebouxia* sp. revealed the presence of intrinsic protection mechanisms independent of upper cortex for the photosynthetic system of algal symbionts in lichen. *Lichenol* 9: 1-10.
- V-5 Kashino Y, Inoue-Kashino N, Aikawa S, Fujimoto K, Kudoh S (国立極地研) and Satoh K "Different Strategies of Acclimation to the Light Environment among Marine Diatoms" VIIth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (CCM7) (Aug 2010, Awaji, Japan)
- V-6 菓子野康浩 「光強度変化に対する珪藻類の馴化機構」植物生理学会第52回年会シンポジウム 「真核藻類の光合成研究の低炭素社会への貢献を考える」(平成23年3月、仙台)
- V-7 Makiko Kosugi (岡山大・兵庫県立大), Akihisa Miyake (名古屋大), Yasuhiro Kashino, Yutaka Shibata (名古屋大), Kazuhiko Satoh and Shigeru Itoh (名古屋大) "Lichen assists the draught induced fluorescence quenching of photobiont green algae through arabitol." The 15th International Congress of Photosynthesis (August 22-27, 2010, Beijing, China)

- VI-1 Tanabe Y, Shitara T, Kashino Y, Hara Y, Kudoh S (2011) Utilizing the effective xanthophylls cycle for blooming of *Ochromonas smithii* and *O. itoi* (Chrysophyceae) on the snow surface. *PLoS ONE* 6: e14690.
- VI-2 Hashihama F, Umeda H, Hamada C, Kudoh S, Hirawake T, Satoh K, Fukuchi M and Kashino Y (2010) Light acclimation states of phytoplankton in the Southern Ocean, determined using photosynthetic pigment distribution. *Mar Biol* 157: 1546-1554.
- VI-3 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.
- VII-1 中山実樹・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：ビフェニル分解性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803株細胞内でのBphA3への電子伝達経路の探索、第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010) (2010年12月、神戸)
- VII-2 西澤明人・中山実樹・千田美紀・千田俊哉・菓子野康浩・福田雅夫・木村成伸：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、第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010) (2010年12月、神戸)
- VII-3 中山実樹・西澤明人・浅井翔太・千田美紀・千田俊哉・菓子野康浩・福田雅夫・木村成伸：*Synechocystis* sp. PCC6803株由来フェレドキシン還元酵素によるBphA3の還元、第10回日本蛋白質科学会年会 (2010年6月、札幌)
- VII-4 Kogo N, Tazaki A, Kashino Y, Morichika K, Orii H, Mochii M and Watanabe K (2011) Gern-line mitochondria exhibit suppressed respiratory activity to support their accurate transmission to the next generation. *Developmental Biology* 349: 462-469.

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 CaMKIIβ の電子顕微鏡観察

科学研究費補助金等

- 1 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ー
研究代表者 宮澤淳夫
- 2 文部科学省科学研究費補助金（学術創成研究・分担） 平成 22 年度 課題番号：18GS0318
研究課題 光合成・光エネルギー変換装置のダイナミクスと分子基盤の解明
（代表者 岡山大学・高橋裕一郎）
- 3 国立極地研究所共同研究 平成 22～24 年度 課題番号：22-22
研究課題 雪上藻類の光合成に関する研究
研究代表者 菓子野康浩

特許等

- x. 「芳香族化合物分解能を有する光合成生物および芳香族化合物の分解方法」
【公開番号】特開2011-10651(P2011-10651A)
【公開日】平成23年1月20日(2011/ 1/20)
出願人：茨城大学
発明者：木村成伸・西澤明人・菓子野康浩・福田雅夫