

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

福永優子・宮澤淳夫

Fukunaga Y and Miyazawa A

我々が開発した電子顕微鏡用遺伝的標識である 3MT タグ（金属結合タンパク質であるメタロチオネイン(MT)を 3 分子連結したもの）は、細胞内において金属クラスターを形成することで細胞内での分子の同定を可能にした。今年度は、標識に用いる金属の種類を変えることで 3MT 標識の効率化をはかり、加えて九州工業大学との共同研究による画像解析システムの適用により、3MT タグを用いた電子顕微鏡法による一分子レベルの検出に成功した。

II 神経筋接合部の形態および機能分子の局在に関する研究

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

運動神経と筋細胞間に存在する神経筋接合部(NMJ)と呼ばれるシナプスでは、シナプス後膜がヒダ状構造をしている。ヒダの頂上部では、アセチルコリン受容体(AChR)や筋特異的受容体チロシンキナーゼ(MuSK)等がクラスターを形成している。本研究では、クラスター成熟前後の培養筋細胞を用いて、AChR と MuSK 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による相関観察を行った。また、株化した神経細胞と筋管細胞を共培養した結果、NMJ のヒダ状構造の成熟には神経細胞と筋管細胞以外の要素が必要である事が示唆された。

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に関する研究

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

NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) は、シナプスだけでなく、シナプス外領域にも存在しており、局在場所の違いによって逆の細胞応答を引き起こすことがわかっている。本研究では、シナプス外 NMDA 受容体の分布状態と細胞全体のカルシウムイオン上昇の間に関連性がある可能性を示した。また、虚血状態になった神経細胞では、細胞死に先立ってシナプスの微細構造変化が起こることが知られている。我々は虚血によるシナプス微細構造変化におけるシナプス外 NMDA 受容体の関与を明らかにした。

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。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。また光化学系 I の電子受容体の同定および機能の解析を行った。好熱性紅色硫黄細菌の光捕集色素タンパク質 2 を構成するタンパク質の同定および生化学的性質の詳細な分析を進めた。

V 珪藻についての生理・生化学的研究

Physiological and biochemical study on diatom

菓子野康浩・福永優子・宮澤淳夫

Kashino Y, Fukunaga Y and 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。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、珪藻の生化学的解析を進め、その結果を基にして、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明らかにした。

VI 地衣の乾燥耐性機構の研究

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、緑藻またはシアノバクテリアと真菌との共生体であり、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、地衣体のホストである菌類が生産するアラビトールが、地衣体内の共生光合成生物の乾燥・強光下での光化学反応中心の保護に重要であることを明らかにした。これは、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いう伝統的な仮説とは異なり、相利共生の関係にあることが示された。

VII 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、雪上でのみ増殖する藻類で、黄金色藻や緑藻などを含む。本研究では、月山で単離された *Ochromonas smithii* と *O. itoi* が強光下での光合成特性を解析した。両株ともにクロロフィル c とディアディノキサントフィル色素を有していた。しかし、強光に曝されたときに光化学系を保護するキサントフィルサイクルは、ディアディノキサントフィルではなく、ヴィオラキサントフィルであることが判明した。

VIII バイオレメディエーション

Development of Bioremediation System on Photosynthetic Organisms

菓子野康浩
Kashino, Y.

環境汚染物質 PCB 等のビフェニル化合物の酸化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。この課題を解決するために、光合成により貧栄養環境下でもビフェニルの水酸化が可能なシアノバクテリア株を開発した。そして、このビフェニル分解性シアノバクテリア変異株における、異種生物由来タンパク間の電子伝達を含む電子供給系の解析を進めた。

発表論文 List of Publications

- I-1 Yuko Fukunaga, Ai Higashihara, Yuri Nishino, Takuo Yasunaga, Mingyue Jin and Atsuo Miyazawa: Enhanced detection efficiency of genetically encoded tag allows the visualization of monomeric proteins by electron microscopy, **J Electron Microscop**, 61, (4), 229-236 (2012)
- I-2 Yuko Fukunaga, Ai Higashihara, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa: Improvement in

- detection sensitivity of a genetically encoded metallothionein tag. Joint Seminar of National University of Singapore and Structural biology division, the Japanese Society of Microscopy, (Singapore, 12-13 January 2012)
- I-3 Yuri Nishino, Yuko Fukunaga, Atsuo Miyazawa: Development and observation of a genetically encoded metallothionein tag for electron microscopy, Joint Seminar of National University of Singapore and Structural biology division, the Japanese Society of Microscopy, (Singapore, 12-13 January 2012)
- I-4 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*、43(10)、404-407、2011
- I-5 宮澤淳夫：遺伝的標識法による生体分子の電子顕微鏡観察、日本顕微鏡学会 関西支部講演会、(名古屋、2011年12月)
- II-1 Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N and Shigemoto K.: Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis, **American J. Pathology**, 180(2): 798-810, 2011
- II-2 西野有里・長谷川翔・狩谷悠輔・宮澤淳夫：Correlative light-electron microscopy of acetylcholine receptor clusters 第34回日本分子生物学会（横浜、2011年12月）
- II-3 石原あゆみ・福永優子・齊藤潤一・宮澤淳夫：In vitro formation of Neuromuscular junction with NG108-15 cells and C2C12 cells 第34回日本神経科学大会（横浜、2011年9月）
- II-4 石原あゆみ・福永優子・齊藤潤一・宮澤淳夫：培養細胞を用いた神経筋接合部作製法の検討、第4回兵庫県立大学シンポジウム -産学公連携による地域の活性化-（神戸市産業振興センター、2011年9月13日）
- II-5 石原あゆみ：Establishment of cell culture model of neuromuscular junction 東亜大学・兵庫県立大学国際交流会（兵庫、2011年8月）
- III-1 Yuko Fukunaga, Yuki Yamamoto, Nao Momota, and Atsuo Miyazawa: Distribution pattern of extrasynaptic NMDA receptors is developmentally regulated. 第34回日本神経科学大会（横浜、2011年9月）
- III-2 福永優子・山本悠貴・桃田菜央・宮澤淳夫：シナプス外 NMDA 受容体分布の発達性調節、第4回兵庫県立大学シンポジウム -産学公連携による地域の活性化-（神戸、2011年9月）
- III-3 伊藤紗也佳: Ultrastructural changes of synapses after ischemia in rat hippocampal neurons 東亜大学・兵庫県立大学国際交流会（兵庫、2011年8月）
- III-4 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, 2011)
- IV-1 Ozawa S (岡山大), Kosugi M, Kashino Y, Sugimura T & Takahashi Y (岡山大) : 5'-Monohydroxyphyloquinone is the dominant naphthoquinone of psi in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 53: 237-243 (2012).
- IV-2 Sekine F (茨城大), Horiguchi K (茨城大), Kashino Y, Shimizu Y (茨城大), Yu L-J (茨城大), Kobayashi M (茨城大) & Wang Z-Y (茨城大) : Gene sequencing and characterization of the light-harvesting complex 2 from thermophilic purple sulfur

- bacterium *Thermochromatium tepidum*. *Photosynth Res* 111: 9-18 (2012).
- IV-3 Inoue-Kashino N, Kashino Y and Takahashi Y (岡山大) : 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 (2011).
- IV-4 Inoue-Kashino N, Kashino Y, Orii H, Satoh K, Terashima I (東大) & Pakrasi HB (Washington Univ. in St. Louis) : S4 protein Sll1252 is necessary for energy balancing in photosynthetic electron transport in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 50: 329-339 (2011).
- IV-5 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 (東大) ・Himadri B. Pakrasi (Washington Univ. in St. Louis) : *Synechocystis* 6803の光化学系IIで見出された新規タンパク質Sll1252の光合成電子伝達系における機能、ラン藻ゲノム研究交流会 (東京)、2011年
- V-1 菓子野康浩・井上 (菓子野) 名津子・藍川晋平・藤本久美子・石原知子・工藤 栄 (総研大、国立極地研) ・佐藤和彦 : 光強度変化に応じた珪藻類の光合成系の調節、日本光合成学会第2回年会 (京都)、2011年
- V-2 菓子野康浩・井上 (菓子野) 名津子・藍川晋平・藤本久美子・石原知子・工藤 栄 (総研大、国立極地研) ・佐藤和彦 : 珪藻の光馴化、第9回クラミドモナスワークショップ・シンポジウム「藻類研究の今」 (岡崎)、2011年
- VI-1 Miyake H (名大), Komura M (名大), Itoh S (名大), Kosugi M, Kashino Y, Satoh K and Shibata Y (名大) : Multiple dissipation components of excess light energy in dry lichen revealed by ultrafast fluorescence study at 5 K. *Photosynth Res* 110: 39-48 (2011).
- VI-2 小杉真貴子 (国立極地研) ・菓子野康浩・宮澤淳夫・佐藤和彦 : 共生藻から見た、共生菌との共生関係、日本地衣学会第10回大会 (神戸)、2011年
- VI-3 小杉真貴子 (国立極地研) ・三宅博久 (名大) ・柴田 穰 (東北大) ・宮澤淳夫・菓子野康浩・佐藤和彦・伊藤 繁 (名大) : 地衣の共生藻の光阻害防御機構であるNPQは、地衣菌の生産するアラビトールによって促進される、第2回極域科学シンポジウム (東京)、2011年
- VI-4 Kosugi M (国立極地研), Shizuma R, Takeuchi A (国立極地研), Suzuki Y (国立極地研), Uesugi K (国立極地研), Fukunaga Y, Miyazawa A, Kashino Y & Satoh K : Lichenized fungi provide an ideal osmotic space by adjusting their own cellular osmolarity differently for chlorobionts or cyanobionts, 7th IAL Symposium (国際地衣学会シンポジウム) (Bangkok, Thailand)、2012年
- VI-5 Kosugi M (国立極地研), Miyake H (名大), Shibata Y (名大), Miyazawa A, Kashino Y, Itoh S (名大), Satoh K : Lichen assist the drought-induced NPQ of their photobiont by arabitol, 7th IAL Symposium (国際地衣学会シンポジウム) (Bangkok, Thailand)、2012年

VII-1 Tanabe Y (総研大、国立極地研), Shitara T (山形大), Kashino Y, Hara Y (山形大), Kudoh S (総研大、国立極地研) : Utilizing the effective xanthophylls cycle for blooming of *Ochromonas smithii* and *O. itoi* (Chrysophyceae) on the snow surface. *PLoS ONE* 6: e14690 (2011).

VIII-1 大塚朱理 (茨城大) ・中山実樹 (茨城大) ・西澤明人 (茨城大) ・千田美紀 (バイオ産業情報化コンソーシアム) ・千田俊哉 (産総研) ・菓子野康浩・福田雅夫 (長岡技術大) ・木村成伸 (茨城大) : 「NADPH特異的高活性BphA変異体遺伝子導入*Synechocystis* sp. PCC6803株のビフェニル分解活性」 第84回日本生化学会大会 (京都)、2011年

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 石原知子 : 珪藻の色素タンパク質複合体 FCP 機構解析
- 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 : CaMKII β と細胞骨格タンパク質との相互作用

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
研究代表者 宮澤淳夫

2 文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 C) 平成 23~25 年度

研究課題 クライオ電子顕微鏡を用いた相関顕微鏡法による神経筋接合部の分子メカニズムの解析
研究代表者 宮澤淳夫

3 文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究(C)・分担) 平成 23 年度 課題番号 : 23570063

研究課題 光化学系 2 複合体の初期構築過程の解明
研究代表者 菓子野康浩

4 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) -バイオテクノロジー分科会-

研究課題 珪藻のフィジオロミクスに基づく褐色のエネルギー革命
研究代表者 菓子野康浩

5 独立行政法人 科学技術振興機構(JST) 研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)

フィージビリティスタディ【FS】ステージ 課題番号 : AS232Z02228F
研究課題 等電点二次元電気泳動による膜タンパク質の高精細分離システム
研究代表者 菓子野康浩

6 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

7 兵庫県立大学特別教育研究助成金 平成 23 年度

研究課題 シナプス外 NMDA 受容体を介する細胞機能におけるカルシウムマイクロドメインの関与

研究代表者 福永優子

特許等

なし