

I 含水試料観察のための低温電子顕微鏡法に関する研究

Study of electron microscopy for observation of intracellular proteins

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

含水率の高い細胞や水溶液中のタンパク質の微細構造を観察するためには、試料を急速凍結して凍結状態のまま観察する低温電子顕微鏡法が有効である。液体窒素冷却ステージを用いた低温走査型電子顕微鏡法や液体ヘリウムを用いて 4K での観察が可能な極低温透過型電子顕微鏡法を用いた含水試料観察法の可能性について検討を行った結果、細胞やタンパク質だけでなく幅広い含水材料や水以外の液体試料についても急速凍結を行い、凍結状態での微細構造観察が可能であることを明らかにした。

II ニコチン性アセチルコリン受容体を介したシナプス 情報伝達機構の研究

Study of synaptic signal transduction by nicotinic acetylcholine receptors

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

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、神経筋接合部や神経シナプスでの情報伝達に重要な役割を担っているタンパク質であり、nAChR のリガンド依存的なチャンネル開閉機構やシナプスにおける分子局在を明らかにすることはシナプスにおける情報伝達機構を解明する上で重要な課題である。そこで、神経筋接合部ポストシナプスの培養細胞モデルを用いて nAChR および nAChR と相互作用し nAChR の活性に関わるタンパク質の分子局在を調べるために、nAChR と筋特異的受容体チロシンキナーゼ (MuSK) を、抗体および特異的なリガンドを用いて蛍光と金コロイド粒子を用いてそれぞれ標識した。蛍光顕微鏡を用いて細胞が生きている状態でそれらの局在を観察した後、続いて、電子顕微鏡観察用の試料調製を行い、蛍光が観察された部位を特定して、nAChR と MuSK の分子局在を電子顕微鏡を用いて観察し、シナプス形成時の nAChR の動態について解明を進めた。

Ⅲ 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。また、ある種の藻類に見出される光化学系 I の第二次電子受容体となるナフトキノン誘導体の立体化学的構造を特定した。光合成電子伝達によって生産される還元力を他の反応に利用する系の開発にも取り組んだ。

Ⅳ 珪藻についての生理・生化学的研究およびその利用

Physiological and biochemical study on diatom and its application

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

海洋の珪藻は地球の光合成の約 25% を担っている重要な光合成生物であるが、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、珪藻の光合成について生理生化学的解析を進め、珪藻類が光環境に応じてアンテナを柔軟に調節することにより、ふたつの光化学系の励起バランスを調整している仕組みの解析を進めた。さらに、その詳細な調節機構を解明するため、ゲノムの解読も行った。

また、珪藻類は光合成産物を油滴として蓄積する。増殖と油滴蓄積に関する各種の環境要因の影響を詳細に検討した。その一環として、増殖過程における蓄積油脂に含まれる脂肪酸組成の解析を行い、対数増殖期から定常期に至るまで脂肪酸組成は大きくは変わらないことを明らかにした。そして、解読中のゲノム情報から、代謝系に関与するとみられる遺伝子の特定を進めた。また、その特質を温暖化抑止に利用し、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るとともに、その油滴を低エネルギー投入で回収するための技術開発を行った。その一環として、野外の開放系で野生株珪藻の培養技術確立を進め、ツノケイソウの環境変動に対する堅牢さを見出した。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。

発表論文 List of Publications

- I-1 宮崎加奈子・西野有里・貝瀬瑞穂・久保渕啓（資生堂）・西居可奈（資生堂）・吉川徳信（資生堂）・宮澤淳夫：エマルジョンをクライオ SEM で観察するために最適な急速凍結法の検討、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- I-2 久保渕啓（資生堂）・吉川徳信（資生堂）・西居加奈（資生堂）・西野有里・宮澤淳夫：高圧凍結法および cryo FIB - SEM を用いたエマルジョンの凍結断面観察、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- I-3 犬塚郷子（トヨタ自動車）・波多野和宏（トヨタ自動車）・宮澤淳夫・西野有里・伊藤喜子・垣花大（トヨタ自動車）・菅田裕之（トヨタ自動車）・前川諒介（トヨタ自動車）・駒林健太郎（トヨタ自動車）：Cryo-TEM による燃料電池触媒インク中の金担持カーボンへのアイオノマ吸着状態の観察、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- I-4 J. Shimanuki（日産アーケ）, S. Takahashi（日産自動車）, H. Tohma（日産アーケ）, A. Ohma（日産自動車）, A. Ishihara, Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Microstructural observation of fuel cell catalyst inks by Cryo-SEM and Cryo-TEM, *Microscopy*, *Microscopy*, 66, 204-208 (2017)
- I-5 清家奈央・桑原健太・福田恭子・仲宗根爽乃・野末馨・柴田今日子・大久保真理・森川作志・岡本晋一・垣口貴沙・米村重信・西野有里・野間有加里・宮澤淳夫・上杉健太郎・竹内晃久・鈴木芳生・八田公平：極限環境耐性生物クマムシの組織・細胞・細胞小器官レベルでの放射光 CT・光顕・電顕による統合・相関 3D 解析、第 2 回クマムシ学研究会（東京）、2017
- I-6 杉森秀一（FC-Cubic）・寺尾剛（FC-Cubic）・西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫・鴻巣祐一（東工大）・古賀舞都（東工大）・松本英俊（東工大）・植村豪（東工大）・亀谷雄樹（東工大）・笹部崇（東工大）・吉田利彦（東工大）・篠原和彦（FC-Cubic）・平井秀一郎（東工大）：クライオ電子顕微鏡法による固体高分子型燃料電池用触媒インク乾燥過程におけるアイオノマーのナノ構造観察、第 67 回高分子討論会（札幌）、2017
- I-7 高橋真一（日産自動車）・古谷佳久（日産自動車）・山本健介（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：リチウムイオン電池電極スラリーの分散状態が電極構造および電池性能に与える影響、化学工学会第 49 回秋季大会（名古屋）、2017
- I-8 H. Sugimori（FC-Cubic）, T. Terao（FC-Cubic）, Y. Nishino, Y. Ito, A. Miyazawa, Y. Konosu（東工大）, M. Koga（東工大）, H. Matsumoto（東工大）, S. Uemura（東工大）, Y. Kameya（東工大）, T. Sasabe（東工大）, T. Yoshida（東工大）, K. Shinohara（FC-Cubic）, S. Hirai（東工大）, Nanostructural Evolution during Catalyst Layer Formation Studied via Cryo-Electron Microscopy, 232nd ECS Meeting, Washington, 2017
- I-9 Y. Ito, A. Ishihara, Y. Nishino, A. Miyazawa, Cryo-electron Microscopy for Hydrated Materials (Emulsion and Fuel Cell) Prepared by Rapid and High-pressure Freezing Techniques, *Frontiers in cryo-electron microscopy*, Leicester, 2017
- I-10 杉森秀一（FC-Cubic）・寺尾剛（FC-Cubic）・篠原和彦（FC-Cubic）・西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫・鴻巣祐一（東工大）・古賀舞都（東工大）・松本英俊（東工大）・植村豪（東工大）・亀谷雄樹（東工大）・笹部崇（東工大）・吉田利彦（東工大）・平井秀一郎（東工大）：クライオ電子顕微鏡法による燃料電池触媒インク乾燥過程におけるナノ構造観察、プラスチック成形加工学会第 25 回秋季大会成形加工シンポジウム'17（大阪）、2017

- I-11 Y. Nishino, M. Kaise, Y. Ito, A. Ishihara, A. Miyazawa, Cryo-electron Microscopy for Hydrated Materials (Emulsion and Fuel Cell) Prepared by Rapid and High-pressure Freezing Techniques, The 3rd East-Asia Microscopy Conference, Busan, 2017
- I-12 K. Miyazaki, M. Kaise, Y. Nishino, Y. Kashino, A. Miyazawa, Examination of the most suitable rapid freezing method to observe emulsions by cryo-SEM, University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho, 2017
- I-13 T. Kamigaki (雪印メグミルク) , Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Microstructural observation of casein micelles in milk by cryo-electron microscopy of vitreous sections (CEMOVIS), *Microscopy*, 67, 164-170 (2018)
- I-14 M. Shiota (雪印メグミルク) , T. Kamigaki (雪印メグミルク) , R. Wakui (雪印メグミルク) , Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Nanostructured Fat Crystal and Solid Fat Content Effects on the Physical Properties of Water-in-Oil Semisolid Fat Blends, *Journal of Oleo Science*, in press
- II-1 野間有加里・西野有里・宮澤淳夫：相関顕微鏡法を用いた nAChR クラスターの分子局在解析、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会（札幌）、2017
- II-2 Y. Noma, Y. Nishino, A. Miyazawa, Endosomal localization analysis of nAChR and MuSK by correlative light-electron microscopy, The 3rd East-Asia Microscopy Conference, Busan, 2017
- II-3 Y. Noma, Y. Nishino, Y. Kashino, A. Miyazawa, Molecular localization analysis of internalized nAChR and MuSK by correlative light-electron microscopy, University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho, 2017
- III-1 菓子野康浩・磯部明日香・富家佑妃・井上（菓子野）名津子：光化学系 II の構築過程および関与因子、第 6 回近畿植物学会講演会（神戸）、2017
- III-2 M. Kosugi (中央大) , C. Lee, T. Misaki, Y. Kashino, M. Fujita & T. Sugimura "Stereochemical assignment of the unique electron acceptor 5'-hydroxyphyllanthrone, a polar analog of vitamin K1 in photosystem I", *Biosci. Biotech. Biochem.* 81(12), 1-9 (2017)
- III-3 A. Nishizawa (茨城大) , A. Otsuka (茨城大) , Y. Kashino, T. Suzuki (茨城大) , M. Senda (高エネ研) , T. Senda, M. Fukuda (長岡技科大) , S. Kimura (茨城大) "Biphenyl degradation by recombinant cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in oligotrophic environment" 19th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Groningen, The Netherlands, 2017
- III-4 深沢涼子 (茨城大) ・鈴木崇章 (茨城大) ・有川淳 (茨城大) ・西澤明人 (茨城大) ・菓子野康浩・生城真一 (富山県立大) ・木村成伸 (茨城大) : 光誘導型発現プロモーターを用いたシアノバクテリア細胞内での NADPH-P450 還元酵素および P450 遺伝子の共発現、ConBio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会) (神戸)、2017
- III-5 K. Maeda, A. Miyazawa, Y. Nishino, N. Kashino, Y. Kashino "Toward the structural understanding of reaction machinery photosystem II containing far-red light absorbing chlorophyll", University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho , 2017
- IV-1 Y. Endo, T. Hatanaka, K. Maeda, K. Arafune, T. Yamamoto, K. Itoh, H. Kuramochi (国立環境研) , Y. Kashino, K. Ifuku (京大) "Use of ethanol with triolein for fatty acid ethyl ester as biodiesel fuel in a Novozym® 435 fixed-bed reactor" *Biomass and Bioenergy*, vol. 108, pp.433-438, 2017

- IV-2 R. Yamasaki, Y. Nishino, A. Miyazawa, N. Inoue-Kashino, K. Ifuku (京大) and Y. Kashino, "Analysis of triacylglycerol metabolism in a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-3 R. Yamasaki, N. Inoue-Kashino, K. Ifuku (京大), Y. Nishino, A. Miyazawa, Y. Kashino, "Analysis of Triacylglycerol Metabolism in a Marine Centric Diatom, *Chaetoceros gracilis*", University of Hyogo International Symposium 2017 SCIENCE AND SOCIETY "Roles of Basic Science in Drug Discovery", Kamigori-cho, 2017
- IV-4 H. Tokushima, N. Inoue-Kashino, Y. Nakazato, A. Masuda (玉川大), K. Ifuku (京大) and Y. Kashino "Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-5 N. Inoue-Kashino, H. Tokushima, A. Masuda (玉川大), K. Ifuku (京大) and Y. Kashino "Outdoor cultivation of a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-6 K. Ifuku (京大), D. Yan (京大), H. Nishide (基生研), N. Inoue-Kashino, Y. Y. Yamamoto (岐阜大), I. Uchiyama (基生研), Y. Kashino "Genome Analysis and Genetic Engineering in the Diatom *Chaetoceros gracilis*" The 73rd Fujihara Seminar International Conference "Molecular Life of Diatoms", Kobe, 2017
- IV-7 前田光治・伊藤和宏・菓子野康浩・伊福健太郎・新船幸二・山本拓司：ツノケイソウ液の凍結濃縮操作、化学工学論文集，vol. 44, No. 1, 18-22, 2018
- IV-8 伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩：実用珪藻 *Chaetoceros* 属の新しい応用利用に向けた技術開発、ケミカルエンジニアリング, vol.62, No. 9, pp 15 - 21, 2017
- IV-9 菓子野康浩・伊福健太郎 (京大)：珪藻のバイオファクトリー化を目指した基盤技術の開発、化学と生物, vol.55, No. 11, pp 759-766, 2017
- IV-10 菓子野康浩：先端的低炭素化技術開発 (ALCA) への帯電性ナノバブル技術の実導入、日本マイクロ・ナノバブル学会 第6回総会 (東京)、2017
- IV-11 山崎瑠衣・西野有里・宮澤淳夫・井上(菓子野)名津子・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩：珪藻 *Chaetoceros gracilis* における脂肪酸の解析、近畿植物学会 (神戸)、2017
- IV-12 山崎瑠衣・西野有里・宮澤淳夫・井上(菓子野)名津子・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩：珪藻 *Chaetoceros gracilis* の脂質に含まれる脂肪酸の解析、第4回分子珪藻研究会 (大阪)、2017
- IV-13 梶川昌孝 (京大)・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩・福澤秀哉 (京大)：リシノール酸生産により促進される実用珪藻ツノケイソウの脂質蓄積、第19回マリンバイオテクノロジー学会大会 (仙台)、2017
- IV-14 本庄智也 (京大)・梶川昌孝 (京大)・伊福健太郎 (京大)・菓子野康浩・福澤秀哉 (京大)：リシノール酸生産により促進される実用珪藻の脂質蓄積、日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋)、2018
- IV-15 菓子野康浩：大量培養微細藻類からの直接的迅速な有用物質回収技術、イノベーションジャパン 2017 (東京)、2017
- IV-16 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 2017 (神戸)、2017

IV-17 「PCT 出願」 出願番号：PCT/JP2018/005317、出願日：2018 年 2 月 15 日、発明の名称：有用物質回収方法及び有用物質回収装置、発明者：菓子野康浩・伊藤和宏・前田光治・伊福健太郎、発明者所属：兵庫県立大学・京都大学、出願人：兵庫県立大学・京都大学

科学研究費補助金等

- 1 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）） 平成 26～30 年度
研究課題 バイオロジーにおける 3D 活性サイト科学
研究代表者 佐々木裕次（東京大学）、分担研究者 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 28～33 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 文部科学省科学研究費補助金（若手 B） 平成 28～30 年度
研究課題 アセチルコリン受容体のリガンド依存的構造変化の動的な解明
研究代表者 西野有里
- 4 共同研究 雪印メグミルク(株) 平成 29 年度
研究課題 乳および乳製品の電子顕微鏡による微細構造観察
研究担当教員 宮澤淳夫
- 5 共同研究 シスメックス(株) 平成 29 年度
研究課題 最先端バイオイメージング技術を活用したタンパク質の品質評価手法の確立
研究担当教員 宮澤淳夫
- 6 共同研究 トヨタ自動車(株) 平成 29 年度
研究課題 FC 電極触媒インク中のゲルダマ構造解析技術の検討
研究担当教員 宮澤淳夫
- 7 共同研究 日産自動車(株) 平成 29 年度
研究課題 リチウム電池電極および電極スラリーの構造解析に関する研究
研究担当教員 宮澤淳夫
- 8 共同研究 (株)日産アーク 平成 29 年度
研究課題 燃料電池触媒層および触媒インクの微細構造解析に関する研究
研究担当教員 宮澤淳夫

- 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) 平成 23～31 年度
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
- 10 国立極地研究所共同研究 平成 28～30 年度 課題番号 : 28-35
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
- 11 文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) 平成 27～29 年度
研究課題 光化学系 2 複合体の構築過程の解明
研究代表者 菓子野康浩
- 12 地域企業連携型大学院研究 平成 29 年度
研究課題 CO₂ 削減とバイオ燃料生産性強化を狙った珪藻の油脂代謝機構の研究
研究担当教員 菓子野康浩
- 13 兵庫県立大学特別研究助成 (先導研究 A) 平成 29 年度
研究課題 実用珪藻を用いた温暖化抑止のための再生資源生産・污水处理の技術開発
研究
研究代表者 菓子野康浩
- 14 (公財)ひょうご震災記念 21 世紀研究機構 兵庫海外研究ネットワーク (HORN) 事業
平成 29 年度
研究課題 微細藻類バイオマス回収に向けた費用効果の高いバイオ凝集法の開発
研究担当教員 菓子野康浩