

## 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・菓子野康浩・宮澤淳夫

Fukunaga Y, Kashino 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タンパク質の同定を可能にした。遺伝的標識法は、免疫標識法を行うことが困難なクライオ電子顕微鏡法において非常に有効であると考えられる。本年度我々は、細胞内分子を観察するのに適した新たなクライオ走査型電子顕微鏡法を確立させた。

## 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。このヒダ状構造の成熟に関与すると考えられている agrin の分泌制御メカニズムについて解析を進めた。また、ヒダの頂上部では、アセチルコリン受容体が複数のタンパク質と共にクラスターを形成している。光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いたクラスターの相関観察を、乾燥による変形のない状態で行うため、クライオ走査型電子顕微鏡を用いた細胞表面の観察法の検討を行った。

## 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

海馬神経細胞では、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、これら局在場所の違いによって異なる細胞応答を引き起こすことがわかっている。我々はシナプス外 NMDA 受容体の活性化によりシナプスの微細構造変化が起こることを明らかにした。本年度は、シナプスの微細構造変化を起こすシグナル伝達経路の一部を明らかにした。

## 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 II のルーメン側に結合している P<sub>sb</sub>P タンパク質が、シアノバクテリアにおいても酸素発生反応および生育に重要な機能を果たしていることを明らかにした。

## 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た。多量の光捕集色素タンパク質を蓄えて光エネルギーを捕集しているが、それを複合体として精製することができた。ゲノム中には光捕集色素タンパク質をコードする遺伝子が 30 種も含まれるが、組成解析を行った結果、意外にも 3 種のみタンパク質で構成されていることが判明した。

また、微細藻類は細胞には脂質を油滴として蓄積することがあるが、本研究で用いた珪藻はその能力が非常に高いことが明らかとなった。

珪藻を材料にした研究においても、分子生物学的手法が重要となるが、従来、形質転換が容易ではなかった。本研究では世界で初めて、再現性良く、しかも高効率のエレクトロポレーションの方法を開発した。

## VI 光合成生物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

陸生ラン色細菌のイシクラゲ (*Nostoc commune*) は南極や日本にも生育する汎存種である。イシクラゲは細胞外多糖 (EPS) に遮光性物質を蓄積しており、これが苛酷な環境への適応に重要な役割を果たしていると考えられている。南極産の貴重なイシクラゲを材料にしてこの仮説を検証するためには、EPS を除去した細胞を高収率で回収する必要がある。そこでこれまでに報告のある EPS 除去方法を改良し、少量のイシクラゲを生理学実験に用いるのに適した細胞単離法を確立した。

## VII 光合成機構の応用的利用

Applied techniques of photosynthesis

菓子野康浩  
Kashino Y

再生可能エネルギー開発の基盤として、天然の光合成が注目されている。光化学系 I、系 II 反応中心複合体を金ナノ粒子に結合させた人工光合成システム開発を目指した。光化学系 I 複合体の一つのサブユニットの C 末端に Histidine-tag を遺伝子工学的に導入し、この Histidine-tag を利用して精製するとともに、Histidine-tag をアンカーとして金ナノ粒子に結合させた。そして、光化学系 I と II を同時に金ナノ粒子に結合させることが可能となり、今後、光エネルギーを用いて水分子から  $\text{NADP}^+$  への電子伝達を行わせ、起電力を得る礎ができた。

### 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 Microsc.**, 61, (4), 229-236 (2012)
- I-2 福永優子: 電子顕微鏡法に用いる遺伝的標識法—単量体タンパク質の検出を目指して 日本電子顕微鏡学会生体構造解析分科会 単粒子ワークショップ (東京、2012年9月)
- I-3 Tominari Kobayashi, Jun Yukigai, Kosaku Ueda, Kodai Machida, Mamiko Masutani, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa and Hiroaki Imataka: Purification and visualization of encephalomyocarditisvirus synthesized by an in vitro protein

- expression system derived from mammalian cell extract, **Biotechnology Letters**, 35, 309-314 (2013)
- I-4 西野有里・伊藤喜子(ライカマイクロシステムズ), 宮澤淳夫: クライオ SEM によって明かされる細胞のナノ～マイクロ構造、日本顕微鏡学会第 56 回シンポジウム(札幌、2012 年 11 月)
- I-5 伊藤喜子(ライカマイクロシステムズ)・西野有里・宮澤淳夫: クライオ SEM のための、凍結マイクロトームを用いた断面作製法とクライオトランスファー技法の紹介、日本顕微鏡学会第 56 回シンポジウム(札幌、2012 年 11 月)
- I-6 Yuri Nishino, Yoshiko Ito(Leica Microsystems) and Atsuo Miyazawa: Cryo-scanning electron microscopy for cross-sectioned cells、第 35 回日本分子生物学会年会(福岡、2012 年 12 月)
- I-7 Yuri Nishino, Yoshiko Ito(Leica Microsystems) and Atsuo Miyazawa: Observation method of intact cellular architectures by cryo-scanning electron microscopy、Nagoya Symposium - Frontiers in Structural Physiology(名古屋、2013 年 1 月)
- II-1 Hiroshi Sekiguchi(JASRI), Yohei Yamamoto(Univ of Tokyo), Mayuno Arita(Univ of Tokyo), Yasuhito Suzuki(Univ of Tokyo), Yuri Nishino, Suzuko Kobayashi(AIST), Kohei Ichianagi(Univ of Tokyo), Tai Kubo(AIST), Atsuo Miyazawa, Masafumi Yohda(Univ of Tokyo), Naoto Yagi(JASRI) and Yuji C. Sasaki(Univ of Tokyo): COOPERATIVE MOTION ANALYSES OF MULTI-SUBUNIT PROTEINS VISUALIZED BY X-RAY SINGLE MOLECULE TRACKING、揺らぎが機能を決める生命分子の科学第 6 回公開シンポジウム(京都、2012 年 12 月)
- II-2 Maki Tokue(Univ of Tokyo), Kentaro Hoshisashi(Univ of Tokyo), Hiroshi Sekiguchi(JASRI), Naoto Yagi(JASRI), Kohei Ichianagi(Univ of Tokyo), Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa, Tai Kubo(AIST), Yuji C. Sasaki(Univ of Tokyo): 3D Micro-second X-ray Single Molecule Tracking of Nicotinic Acetylcholine Receptor with Picometer Accuracy、Biophysical Society 57th Annual Meeting(米国フィラデルフィア、2013 年 2 月)
- III-1 Sayaka Itoh, Yuko Fukunaga and Atsuo Miyazawa: Post synaptic density enlargement after experimental ischemia is induced by signalling through extrasynaptic NMDA receptors. 第 35 回日本神経科学大会(名古屋、2012 年 9 月)
- III-2 福永優子: 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 平成 24 年度兵庫県立大学研究発表会(姫路、2012 年 11 月)
- IV-1. 青井政樹(京都大)・菓子野康浩・佐藤文彦(京都大)・伊福健太郎(京都大): シアノバクテリア型 PsbP (Cyanop) の分子機能に関する研究、第 54 回日本植物生理学会年会(岡山、2013 年 3 月)
- V-1. Miyahara M(京都大), Aoi M(京都大), Inoue-Kashino N, Kashino Y and Ifuku K

- (京都大) : Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by multi-pulse electroporation. Biosci Biotechnol Biochem 77: 874-876(2013).
- V-2. 菓子野康浩：光環境変化に対する珪藻類の応答、基生研研究会「微細藻類に関する多種多様な生物学的知見の統合」（岡崎、2012年7月）
- V-3. 菓子野康浩・石原知子・井上（菓子野）名津子・藍川晋平・高橋裕一郎：光環境変化に対する珪藻類の応答、日本植物生理学会第76回大会、シンポジウム「多様な光合成生物における色素タンパク複合体のダイナミクス」（姫路、2012年9月）
- V-4. 石原知子・井上（菓子野）名津子・福永優子・宮澤淳夫・松崎英典（岡山大）・高橋裕一郎（岡山大）・菓子野康浩：珪藻の光捕集タンパク質FCPの機能的な高次構造、第54回日本植物生理学会年会（岡山、2013年3月）
- V-5. 伊福健太郎（京都大）・宮原窓（京都大）・青井政樹（京都大）・井上名津子・菓子野康浩：多重パルスを用いたエレクトロポレーション法による珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* の高効率形質転換、日本農芸化学会2013年度大会（仙台、2013年3月）
- VI-1. Kosugi M(総研大、国立極地研), Kashino Y, Kudoh S(総研大、国立極地研) and Imura S(総研大、国立極地研) : Establishment of an isolation method of Nostoc commune cells free from extracellular polysaccharides (EPS) using Percoll centrifugation (in Japanese). Antarctic Record 56: 285-293 (2013).
- VII-1. 河原弘典（名古屋大）・井上名津子・加藤祐樹（名古屋大）・中西華代（名古屋大）・榎達也（東京理科大）・菓子野康浩・野口巧（名古屋大）：光化学系Iおよび光化学系IIの金ナノ粒子への結合による人工光合成ナノデバイスの開発、第54回日本植物生理学会年会（岡山、2013年3月）
- VII-2. 池谷仁里・一瀬諭（琵琶湖環境研）・池田将平（琵琶湖環境研）・古田世子（琵琶湖環境研）・馬場大哉（東レテクノ）・菓子野康浩・岸本直之（龍谷大）：琵琶湖に棲息するプランクトンの粘質鞘の糖解析、第21回バイオイメージング学会学術集会（京都、2012年8月）
- VII-3. 池谷仁里・玉置大介・岩田和佳・中瀬琢登・菓子野康浩・園部誠司・峰雪芳宣・新免輝男：顕微鏡システムGLIMを用いたアオミドロの接合子形成機構の解析、日本植物生理学会第76回大会（姫路、2012年9月）
- VII-4. 池谷仁里・玉置大介・菓子野康浩・園部誠司・新免輝男・峰雪芳宣：顕微鏡システムGLIMを用いたアオミドロの接合子形成の解析、2013年生体運動研究合同班会議、（広島、2013年1月）

## 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

狩谷悠輔：神経筋接合部アセチルコリン受容体クラスターの構造学的解析

前田博毅：シナプス外 NMDA 受容体による細胞内カルシウム濃度調節に関する研究

八木清志：遺伝的細胞内分子標識法の研究

## 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

### 2 文部科学省科学研究費補助金（基盤研究(C)・分担） 平成 23～25 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

### 3 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

### 4 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

### 5 財団法人日本科学協会 笹川科学研究助成 平成 24 年度 課題番号：24-444

研究課題 珪藻の光合成色素タンパク質複合体 FCP による光化学系保護機構の解明

研究代表者 石原知子（大学院博士前期課程）

### 6 財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団 教育研究助成金 平成 24 年度

研究課題 神経興奮に伴うシナプス構造変化に関する研究

研究代表者 福永優子

## 特許等

なし