

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・西野有里・宮澤淳夫

Fukunaga, Y., Kashino, Y., Nishino, Y., 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メタロチオネイン(MT)を3分子連結したもの)を用いて、神経シナプス後部においてクラスターを形成する PSD-95 を詳細に解析し、クラスターが微小なサブクラスターによって形成されることを明らかにした。また生きた状態に近い細胞の微細構造を観察できるクライオ電子顕微鏡法によって、このサブクラスターと類似したサイズの電子密度がシナプス後部で観察することができた。

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

西野有里・福永優子・菓子野康浩・宮澤淳夫

Nishino, Y., Fukunaga, Y., Kashino, Y., 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おり、ヒダの頂上部で、アセチルコリン受容体(AChR)が複数のタンパク質と共にクラスターを形成している。我々は、NMJ の成熟に関与すると考えられている agrin のシナプス後膜に対する作用について解析を進めた。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により、agrin によって AChR や筋特異的受容体チロシンキナーゼの分子局在が変化することを明らかにした。

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・西野有里・宮澤淳夫

Fukunaga, Y., Kashino, Y., Nishino, Y., Miyazawa, A.

中枢神経系において NMDA 型グルタミン酸受容体はシナプス内・外の両方に存在しており、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。我々はシナプス外 NMDA 受容体の活性化がシナプスの微細構造変化を起こす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詳細を明らかにした。

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・西野有里・宮澤淳夫

Kashino, Y., Fukunaga, 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 PsbP 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・西野有里・宮澤淳夫

Kashino, Y., Fukunaga, 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。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 種だけの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。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。

第 55 次南極観測隊・夏隊（平成 25 年 11 月～26 年 3 月）とともに、南極の湖沼に棲息する珪藻や緑藻、シアノバクテリアの光合成特性を解析し、低温・強光下で珪藻類が光化学系を保護しつつ光合成を行う仕組みの解明を目指した。

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・西野有里・宮澤淳夫
Kashino, Y., Fukunaga, Y., Nishino, Y., Miyazawa, A.

地衣は藻類と真菌の共生体である。共生藻類として緑藻とシアノバクテリアのタイプがある。また特殊な例として、一つの個体に緑藻とシアノバクテリアの両方を共生させるオオキゴケのような地衣も存在する。各種の地衣の細胞内浸透圧を評価することにより、緑藻タイプとシアノバクテリアタイプでは細胞内浸透圧が大きく異なることを見出した。さらに、オオキゴケでは、緑藻共生部位とシアノバクテリア共生部位では細胞内浸透圧が異なっていた。つまり、地衣の真菌が共生緑藻から光合成産物を得るだけの片利共生ではなく、真菌が共生藻に良好な環境を提供するという相利共生であることが明らかとなった。また、オオキゴケの緑藻共生部位とシアノバクテリア共生部位を SPring-8 で CT 解析を行い、藻類の局在部位の解析も行った。

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または白金ナノ粒子に結合させ、光エネルギーを用いて水分子から NADP^+ への電子伝達を行わせた。このシステムを用いて起電力を得る礎ができた。

微細藻類を光合成的に増殖させ、排水（下水）中の富栄養物質の除去装置としての利用を検討した。常温性のシアノバクテリアが良好な結果を示した。

発表論文 List of Publications

- I-1 Yuri Nishino, Yoshiko Ito (Leica Microsystems) and Atsuo Miyazawa : Cryo-scanning electron microscopy for cross-sectioned biological specimens、ISDSB2013 (名古屋)、2013 年
- I-2 八木清志・西野有里・宮澤淳夫：EC20 タグによる電子顕微鏡観察用の遺伝的細胞内タンパク質標識法の検討、第 36 回日本分子生物学会年会（神戸）、2013 年
- I-3 西野有里：クライオ走査型電子顕微鏡を用いた細胞観察法、日本顕微鏡学会・関西支部「若手の会」設立記念講演会（大津）、2013 年

- I-4 Yuri Nishino, Yoshiko Ito (Leica Microsystems) and Atsuo Miyazawa : Advantages of cryo-scanning electron microscopy for biological specimens、JSM-BA Seminar 2013 (米国 Jupiter) 、2013 年
- I-5 Ai Hirabayashi, Yuko Fukunaga and Atsuo Miyazawa: Structural analysis of the PSD-95 cluster by electron tomography and CEMOVIS: a proposal for the application of the genetically encoded metallothionein tag. *Microscopy* 63, 227-234. (2014)
- II-1 狩谷祐輔・西野有里・宮澤淳夫：クライオ走査型電子顕微鏡を用いた光子-電子相関顕微鏡法の確立と相関顕微鏡法を利用したアセチルコリン受容体クラスター内の分子局在解析、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸) 、2013 年
- II-2 Hiroshi Sekiguchi (JASRI) , Maki Tokue (東京大) , Yuri Nishino, Kouhei Ichianagi (東京大) , Naoto Yagi (JASRI) , Atsuo Miyazawa, Tai Kubo (AIST) , and Yuji C. Sasaki (東京大) : Single Molecule Motion Maps of Open and Desensitization States of Nicotinic Acetylcholine Receptors、Biophysical Society 58th Annual Meeting (米国 Sanfrancisco) 、2014 年
- III-1 福永優子・前田博毅・山本悠貴・有賀理瑛・桃田菜央・宮澤淳夫：第 36 回日本神経科学会大会 (名古屋) 、2013 年
- IV-1. Masaki Aoi (京都大) , Yasuhiro Kashino, Fumihiko Sato (京都大) & Kentaro Ifuku (京都大) :Function and association of CyanoP in photosystem II of *Synechocystis* sp. PCC 6803 "Photosynthesis and Artificial Photosynthesis Research" in *Res Chem Intermed: in press.* (2014)
- IV-2. Md. Rafiqul Islam, Koji Watanabe (中央大) , Yasuhiro Kashino, Kazuhiko Satoh & Hiroyuki Koike (中央大) : Spectral properties of a divinyl chlorophyll *a* harboring mutant of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Photosynth Res* 117: 245-255. (2013)
- V-1. 菓子野康浩：バイオマスエネルギーの現状と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、ひょうご産学官連携研究会「第 5 回新エネルギー研究会」(神戸) 、2013 年
- V-2. 菓子野康浩・伊福健太郎 (京都大) ・福澤秀哉 (京都大) : フィジオロミクスに基づく珪藻の分子育種、分子珪藻研究会スタートアップ会議 (神戸) 、2013 年
- VI-1. Makiko Kosugi, Hirohisa Miyake (名古屋大) , Hisanori Yamakawa (名古屋大) , Yutaka Shibata (東北大) , Atsuo Miyazawa, Takashi Sugimura, Kazuhiko Satoh, Shigeru Itoh (名古屋大) & Yasuhiro Kashino : Arabitol provided by lichenous fungi enhances ability to dissipate excess light energy in a symbiotic green alga under desiccation. *Plant Cell Physiol* 54: 1316-1325. (2013)

- VII-1. 田原一輝 (名古屋大)・河原弘典 (名古屋大)・長尾遼 (名古屋大)・加藤祐樹 (名古屋大)・井上名津子・菓子野康浩・森本樹 (名古屋大)・石谷治 (名古屋大)・野口巧 (名古屋大) : 光化学系Ⅱ蛋白質と無機触媒の共役による人工光合成系の開発、第4回「フォーラム：人工光合成」(名古屋市)、2014年

大学院生命理学研究科

博士後期課程

石原知子：珪藻の色素タンパク質複合体 FCP 機構解析

博士前期課程

菅原裕太：神経筋接合部形成におけるシュワン細胞の役割

武田諒也：珪藻の脂質合成系の解析

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)) 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 25～27 年度 課題番号：25-24
研究課題 好冷性微細藻類の脂質に関する研究
研究代表者 菓子野康浩
- 5 文部科学省科学研究費補助金 (若手研究(B)) 平成 25～26 年度
研究課題 珪藻の特異な光捕集系の構造および機能の解明
研究代表者 菓子野名津子
- 6 平成 25 年度公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団
海外派遣助成 (大学院生)
石原知子 (大学院博士後期課程)
- 7 公益財団法人日本極地研究振興会
平成 25 年度研究助成
石原知子 (大学院博士後期課程)