

## I 細胞内蛋白質観察のための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・福永優子・菓子野康浩・宮澤淳夫

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

生きた状態に近い細胞の微細構造を観察するためには、細胞を急速凍結して凍結状態のまま観察するクライオ電子顕微鏡法が有効である。現在までに報告例の少ないクライオ走査型電子顕微鏡法を用いた細胞観察法の可能性について検討した結果、細胞小器官だけでなく細胞内に存在しているタンパク質複合体や染色体の形態観察が可能であることを見出した。

## II 神経筋接合部における情報伝達機構の研究

Study of signal transduction 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.

神経筋接合部において、ポストシナプス膜に存在するニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は情報伝達の中心的分子のひとつであり、nAChRのリガンド依存的なチャンネル開閉機構を明らかにすることは神経筋接合部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、本年度は、アセチルコリン受容体の分子内運動を、高速X線一分子追跡法を用いて解析し、アゴニストおよびアンタゴニスト存在下でのnAChR $\alpha$ サブユニット頭頂部の分子内運動の変化を捉えることに成功した。

## 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。我々はこれまでにシナプス外NMDA

受容体の活性化がタンパク質分解経路を介して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の生理的意義について検討し、シナプスの微細構造変化がシグナル伝達に影響を及ぼす可能性を見出した。

## 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。また高等植物の光化学系 II では PsbP タンパク質がルーメン側で機能しているが、シアノバクテリアにおいても光化学系 II に於いて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、その複合体を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遺伝子が 30 種も含まれるが、複合体の組成解析を行った結果、意外にも 3 種のみで構成されていることが判明した。また、過剰光消散機能が主要な機能として報告されていたが、過剰光消散というよりも光捕集が主要な機能であることが示された。

また、微細藻類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についてフィールド調査を行った。その得られたデータの解析を行うとともに、持ち帰ったサンプルの分析を行うことにより、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。

従来、珪藻の形質転換は効率が低かったが、新規プロモータを採用し、さらに珪藻では初めてエレクトロポレーションを実用化して、高効率形質転換系を構築した。

## 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., Nishino, Y., Miyazawa, A.

地衣は藻類と真菌の共生体であり、緑藻とシアノバクテリアを共生藻類とする二つのタイプに分けられるが、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特殊な例として存在する。一つの固体に緑藻とシアノバクテリアの両方を共生させてはいるものの、ふたつの共生藻は異なるコンパートメントに存在する。その原因を探ると、共生緑藻と共生シアノバクテリアの細胞内浸透圧の差であることが判明した。また、各種の地衣の共生藻の細胞内浸透圧は、オオキゴケの共生藻と同様、緑藻とシアノバクテリアの間に明確な差が見られた。これらの事実から、地衣の真菌が共生緑藻から光合成産物を得るとい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。

### 発表論文 List of Publications

- I-1 西野有里・伊藤喜子・宮澤淳夫：クライオ SEM を用いた新たな組織・細胞観察法、第 25 回電顕サマースクール 2014 (久留米)、2014
- I-2 Yuri Nishino, Yoshiko Ito and Atsuo Miyazawa: Observation method of cross-sectioned cells by cryo-scanning electron microscopy, 18<sup>th</sup> International Microscopy Congress (チェコ プラハ)、2014
- I-3 Yuri Nishino, Yoshiko Ito and Atsuo Miyazawa: Observation method of fully-hydrated biological specimens by cryo-scanning electron microscopy, 2nd International Picobiology Institute Symposium, Harima (兵庫)、2014
- I-4 伊藤喜子・西野有里・宮澤淳夫：エマルションの凍結切片作製のポイント、エマルションの特性評価と新製品開発、品質管理への活用、第 1 章 第 2 節、技術情報協会発行
  
- II-1 西野有里・狩谷祐輔・宮澤淳夫：光子・電子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の分子局在解析、日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 (千葉)、2014
- II-2 Hiroshi Sekiguchi (JASRI), Yasuhito Suzuki (東京大), Yuri Nishino, Suzuko Kobayashi, Yoshiko Shimoyama (AIST), Weiyan Cai (AIST), Masato Okada (東京大), Kouhei Ichianagi (東京大), Noboru Ohta (JASRI), Naoto Yagi (JASRI), Atsuo Miyazawa, Tai Kubo (AIST) and Yuji C. Sasaki (東京大): Real time ligand-induced motion mappings of AChBP and nAChR using X-ray single molecule tracking. Scientific Report, 4, 6384, (2014)
- II-3 関口博史 (JASRI)・徳江真紀 (東京大)・西野有里・一柳光平 (東京大)・久保泰 (AIST)・宮澤淳夫・八木直人 (JASRI)・佐々木裕次 (東京大)：高速 1 分子内ダイナミクス計測で捉えるアセチルコリン受容体・機能運動、第 14 回日本蛋白質科学会年会 (横浜)、2014
- II-4 関口博史 (JASRI)・徳江真紀 (東京大)・西野有里・一柳光平 (東京大)・久保泰 (AIST)・宮澤淳夫・八木直人 (JASRI)・佐々木裕次 (東京大)：高速 X 線一分子追跡法による

- ニコチン性アセチルコリン受容体の機能運動、第 52 回日本生物物理学会年会（札幌）、2014
- II-5 Shogo Furutani（近畿大）、Makoto Ihara（近畿大）、Yuri Nishino, Miki Akamatsu（京都大）、Andrew K. Jones（Oxford Brookes University）、David B. Sattelle（University College London）and Kazuhiko Matsuda（近畿大）: Exon 3 splicing and mutagenesis identify residues influencing cell surface density of heterologously -expressed silkworm (*Bombyx mori*) glutamate-gated chloride channels. *Molecular Pharmacology* 86, 686-695, (2014)
- II-6 Hiroshi Sekiguchi（JASRI）、Yufuku Matsushita（東京大）、Yuri Nishino, Keigo Ikezaki（東京大）、Atsuo Miyazawa, Naoto Yagi（JASRI）、Christele Huron（Pasteur Institute）、Jean-Pierre. Changeux（Pasteur Institute）、Pierre-Jean Corringer（Pasteur Institute）and Yuji C. Sasaki（東京大）: Single Molecule Motion Map of GLIC by diffracted X-ray Tracking、Biophysical Society 59<sup>th</sup> Annual Meeting（米国 Baltimore）、2015
- III-1 福永優子・伊藤紗也佳・中嶋絵里・波田野江梨花・宮澤淳夫：NMDA 型グルタミン酸受容体による神経シナプス微細構造変化の解析、日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会（千葉）、2014
- III-2 Yuko Fukunaga, Mai Egashira, Masayuki Toyoshima, Yasuhiro Kashino, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa : Signaling pathways involved in ultrastructural changes in hippocampal neuronal synapses by extrasynaptic NMDA receptor activation, 2nd International Picobiology Institute Symposium, Harima (兵庫)、2014
- III-3 Yuko Fukunaga, Sayaka Itoh, Eri Nakajima, Erika Hatano and Atsuo Miyazawa : Mechanism of changes in the postsynaptic ultrastructure after ischemic conditions、Neuroscience 2014 (米国 Washington, DC)、2014
- 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* 40: 3209-3217 (2014)
- V-1 Kentaro Ifuku（京都大）、Dongyi Yan（京都大）、Mado Miyahara（京都大）、Natsuko Inoue-Kashino, Yoshiharu Y. Yamamoto（岐阜大）、Yasuhiro Kashino: A stable and efficient nuclear transformation system for the diatom *Chaetoceros gracilis*. *Photosynth Res* 123: 203-211 (2014)
- V-2 Tomoko Ishihara, Sakae Kudoh（国立極地研）、Natsuko Inoue-Kashino, Yuko Fukunaga, Atsuo Miyazawa, Yasuhiro Kashino: Photosynthesis of diatom, green algae and cyanobacteria under the high light in the community developed in an Antarctic lake, The 5th Symposium on Polar Science, Tokyo, Dec, 2014
- V-3 Natsuko Inoue-Kashino, Tomoko Ishihara, Eiki Yamashita（大阪大） and Yasuhiro Kashino: Structural analysis of fucoxanthin-chlorophyll binding protein complex, a light-harvesting complex, of diatom, 2nd International Picobiology Institute Symposium, Harima, Hyogo, Oct. 2014
- V-4 Tomoko Ishihara, Sakae Kudoh（国立極地研）、Natsuko Inoue-Kashino, Yuko Fukunaga, Atsuo Miyazawa, Yasuhiro Kashino: Photosynthesis of diatom, green algae and cyanobacteria under

- the high light in an Antarctic lake, 2nd International Picobiology Institute Symposium, Harima, Hyogo, Oct. 2014
- V-5 Ryoya Takeda, Yuko Fukunaga, Atsuo Miyazawa and Yasuhiro Kashino: Analysis of triglyceride production in a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*, 2nd International Picobiology Institute Symposium, Harima, Hyogo, Oct. 2014
- V-6 Tomoko Ishihara, Sakae Kudoh (国立極地研), Yuko Fukunaga, Atsuo Miyazawa, Yasuhiro Kashino: Photosynthesis of diatom, green algae and cyanobacteria under the high light in an Antarctic lake, Short Period Student Exchange Program with Dong-A University, P02, Busan, Korea, August 2014
- V-7 菓子野康浩: 「持続可能・低炭素社会実現に向けた珪藻利用システム (ダイアトム・ファクトリー)」 近畿バイオインダストリー振興会議「バイオマス研究会」、大阪、2015年2月
- V-8 菓子野康浩: 微細藻“珪藻”の光合成が拓く持続可能未来社会、兵庫県立大学「知の交流シンポジウム2014」、姫路、2014年9月
- V-9 菓子野康浩: 珪藻の再生可能エネルギー産生装置としてのポテンシャル、兵庫県立大学「異分野融合若手研究者 Science & Technology クラブ」、姫路、2014年5月
- V-10 菓子野康浩: 自然界の多様性を生かした研究戦略: 珪藻の世界、第5回日本光合成学会年会公開シンポジウム「多様な光合成の世界」、奈良、2014年5月
- V-11 菓子野康浩: 珪藻による有用物質の高効率生産のための効率的形質転換法、関西公立3大学新技術説明会、東京、2014年11月
- V-12 菓子野康浩: 微細藻によるバイオディーゼルおよび有用物質の高効率生産系、JST「イノベーションジャパン2014」での出展およびショートプレゼンテーション、東京ビッグサイト、2014年9月
- V-13 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、姫路地域産学官連携事業実行委員会主催「企業・大学・学生マッチングイン姫路」での出展、姫路、2014年5月
- V-14 石原知子・工藤栄 (国立極地研) ・井上-菓子野名津子・福永優子・宮澤淳夫・菓子野康浩: 南極大陸湖沼における微細藻類共生コミュニティの光合成特性の解析、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月
- V-15 石原知子・工藤栄 (国立極地研) ・井上 (菓子野) 名津子・福永優子・宮澤淳夫・菓子野康浩: 南極湖岸に共存する微細藻類群集の光合成特性の解析、第5回日本光合成学会年会公開シンポジウム、奈良、2014年5月
- V-16 Ryoya Takeda, Yuko Fukunaga, Atsuo Miyazawa, Yasuhiro Kashino: Analysis of triglyceride production in a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*, 第5回日本光合成学会年会公開シンポジウム、奈良、2014年5月
- VI-1 Makiko Kosugi, Ryoko Shizuma, Yufu Moriyama, Hiroyuki Koike, Yuko Fukunaga, Akihisa Takeuchi (SPRING-8), Kentaro Uesugi (SPRING-8), Yoshio Suzuki (SPRING-8), Satoshi Imura (国立極地研), Sakae Kudoh (国立極地研), Atsuo Miyazawa, Yasuhiro Kashino, and

Kazuhiko Satoh: Ideal osmotic spaces for chlorobionts or cyanobionts are differentially realized by lichenized fungi. *Plant Physiol* 166: 337-348 (2014)

## 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 26～28 年度  
研究課題 培養シナプスモデルを用いた神経筋接合部の形態と機能に関わる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 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）・連携研究者 宮澤淳夫
- 3 共同研究 雪印メグミルク(株) 平成 26 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
- 4 共同研究 シスメックス(株) 平成 26 年度  
研究課題 電子顕微鏡を活用した試薬品質評価方法の検討  
研究担当教員 宮澤淳夫
- 5 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
- 6 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
- 7 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
- 8 日本科学協会・笹川科学研究助成 平成 26 年度  
研究課題 珪藻のトリグリセリド蓄積機構の解析  
武田諒也
- 9 公益財団法人ひょうご科学技術協会・地域連携大学院特別研究助成金 平成 26 年度  
研究課題 大量培養珪藻からのバイオディーゼル原料となる油滴回収のための低コスト細胞破壊方法  
武田諒也
- 10 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）「新エネルギーベンチャー技術革新事業」  
研究課題 珪藻を主軸とした低炭素社会実現のための大規模培養からバイオ燃料生産に至る技術開発  
実施機関 イーエス・テクノロジー株式会社・公立大学法人兵庫県立大学・国立大学法人京都大学  
兵庫県立大学研究代表者 菓子野康浩