

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 cryo-electron microscopy for hydrated samples

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

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

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では、細胞やタンパク質をはじめとした含水試料の微細構造を、脱水による変形のない状態で観察することができる。様々な含水・液体試料について、低温透過型電子顕微鏡法および低温走査型電子顕微鏡法による観察の可能性を検討した結果、含水試料だけでなく、アルコールを含む溶液中でコロイド状に分散した高分子化合物やエマルジョン溶液など、様々な液体試料の観察においても有効であることが明らかになった。

II 神経筋接合部におけるニコチン性アセチルコリン受容体と筋特異的受容体チロシンキナーゼの分子局在解析

Molecular localization of nicotinic acetylcholine receptor and muscle specific kinase at the neuromuscular junction

西野有里・菓子野康浩・宮澤淳夫

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

神経筋接合部 (NMJ) のポストシナプス膜では、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) が、足場タンパク質である rapsyn や筋特異的受容体チロシンキナーゼ (MuSK) とともに集積してクラスターを形成することにより効率の良い情報伝達が行われている。nAChR のクラスター形成機構を明らかにするために、NMJ ポストシナプスの培養細胞モデルを用いて、クラスター形成途中および形成後の分散が始まった段階での、nAChR、rapsyn、MuSK の詳細な局在を調べたところ、クラスター形成途中と分散が始まった段階で、クラスター内における MuSK の分布が異なることが示唆された。

III リガンド依存的なニコチン性アセチルコリン受容体の分子内運動解析

Ligand-dependent intramolecular dynamics of nicotinic acetylcholine receptor

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

nAChRは、NMJ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ネル開閉機構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。また、nAChRの活性は生体中では周囲の環境によって調節されていることが示されている。そこで、生きている細胞にX線を照射して、細胞膜に発現しているnAChRのリガンド依存的な分子内運動をX線1分子追跡法を用いて計測し、計測後の細胞の生存状態を蛍光顕微鏡を用いて評価した。

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・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。クロロフィル *d* を主要色素とするシアノバクテリアの光化学系複合体の構造解明に向けた解析を進めた。珪藻の光化学系 I 複合体の構造を解明した。南極のある種の緑藻が、南極の自然環境下で発現する赤外光を利用するための光捕集色素タンパク質の特性を解析した。また、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。

V 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。そのような珪藻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た。その一環として、野外の開放系で汚水を使った培養技術開発を進めるとともに、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 T. Kamigaki (雪印メグミルク), T. Hanazawa (雪印メグミルク), Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Immunoelectron microscopic observation of b-lactoglobulin in paneer cheese using the Tokuyasu method, *Milk Science*, 68, 94-99 (2019)
- I-2 櫻林靖哲 (トヨタ自動車)・前川諒介 (トヨタ自動車)・宮澤淳夫・西野有里・伊藤喜子・安永卓生 (九工大) : Cryo-TEMを用いた溶液中のアイオノマー凝集状態解析、第75回日本顕微鏡学会学術講演会 (名古屋)、2019
- I-3 T. Kamigaki (雪印メグミルク), Y. Ito, Y. Nishino, A. Miyazawa, Analysis of Structure Formation Mechanism in Whipped Cream by Cryo-transmission Electron Microscopy, *Food Science and Technology Research*, 25, 727-733 (2019)
- I-4 J. Omi (同志社大), M. Watanabe-Takahashi (同志社大), K. Igai (長崎大), E. Shimizu (同志社大), C.-Yi Tseng (同志社大), T. Miyasaka (同志社大), Tsuyoshi Waku (同志社大), S. Hama (同志社大), R. Nakanishi (同志社大), Y. Goto (同志社大), Y. Nishino, A. Miyazawa, Y. Natori (岩手医大), M. Yamashita (東大), K. Nishikawa (同志社大), The inducible amphosome isolates viral hemagglutinin and defends against influenza A virus infection, *Nature Communications*, 11, 162 (2020)
- II-1 西野有里・野間有加里・村松諒太・宮澤淳夫 : アセチルコリン受容体クラスター構成タンパク質の分子動態解析、第75回日本顕微鏡学会学術講演会 (名古屋)、2019
- II-2 Y. Nishino, Y. Noma, A. Miyazawa, Dynamic localization of acetylcholine receptor and related proteins studied by CLEM, 日本顕微鏡学会 生体解析分科会研究会 "Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen Preparation Techniques", Bristol, 2019
- IV -1 Ryo Nagao (岡山大), Koji Kato (岡山大), Takehiro Suzuki (理研), Kentaro Ifuku (京大), Ikuo Uchiyama (基生研), Yasuhiro Kashino, Naoshi Dohmae (理研), Seiji Akimoto (神戸大) (神戸大), Jian-Ren Shen (岡山大), Naoyuki Miyazaki (阪大) & Fusamichi Akita (岡山大) (2019) Structural basis for energy harvesting and dissipation in a diatom PSII-FCPII supercomplex, *Nature Plants* 5: 890-901.
- IV -2 Takaaki Suzuki (茨城大), Akito Nishizawa (茨城大), Masashi Kikuchi (茨城大), Chihiro Nonaka (茨城大), Mariko Komuro (茨城大), Miki Nakayama (茨城大), Yasuhiro Kashino, Masao Fukuda (長岡技科大) and Shigenobu Kimura (茨城大) (2019) Biphenyl degradation by recombinant photosynthetic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in an oligotrophic environment using unphysiological electron transfer, *Biochem J* 476 (23): 3615-3630 (<https://doi.org/10.1042/BCJ20190731>)
- IV -3 Makiko Kosugi (中央大), Shin-ichiro Ozawa (岡大), Yuichiro Takahashi (岡大), Yasuhiro Kamei (総研大、基生研), Shigeru Itoh (名大), Sakae Kudoh (極地研), Yasuhiro Kashino, Hiroyuki Koike (中央大) (2019) Red-shifted chlorophyll a bands allow uphill energy transfer to photosystem II reaction centers in an aerial green alga, *Prasiola crispa*, harvested in Antarctica, *Biochim Biophys Acta* 1861 (2): 148139 (<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148139>)
- IV -4 Ryo Nagao (岡山大), Fusamichi Akita (岡山大), Koji Kato (岡山大), Takehiro Suzuki (理研), Kentaro Ifuku (京大), Ikuo Uchiyama (基生研), Kashino Y, Naoshi Dohmae (理研), Seiji Akimoto (神戸大), Naoyuki Miyazaki (阪大) & Jian-Ren Shen (岡山大) "Cryo-EM structure of the diatom PSII-PCPII: Insights into the evolutionary development of light-harvesting complexes" 3rd International

Solar Fuels Conference (ISF-3) International Conference on Artificial
Photosynthesis-2019 (ICARP2019), Hiroshima, 2019/11/20-24

- IV -5 Yasuhiro Kashino, Kyoko Shinzawa-Itoh, Ko Maeda, Natsuko Inoue-Kashino, Eiki Yamashita (阪大), Kentaro Ifuku (京大), Keisuke Kawakami (大阪市大), Tasuku Hamaguchi (理研), Koji Yonekura (理研) "Photosystem II complex of a cyanobacterium, *Acaryochloris marina*" 3rd International Solar Fuels Conference (ISF-3) International Conference on Artificial Photosynthesis-2019 (ICARP2019), Hiroshima, 2019/11/22
- IV -6 長尾遼 (岡山大), 加藤公児 (岡山大), 鈴木健裕 (理研), 伊福健太郎 (京大), 内山郁夫 (基生研), 菓子野康浩, 堂前直 (理研), 秋本誠志 (神戸大), 沈建仁 (岡山大), 宮崎直幸 (阪大), 秋田総理 (岡山大) 「珪藻PSI-FCPI複合体のクライオ電顕構造解析」 第61回 日本植物生理学会年会、大阪大学、2020/3/19
- V -1 Kazuhiro Itoh, Yasuhiro Kashino, Kentaro Ifuku (京大), Maeda Kouji, Takuji Yamamoto, Shogo Taguchi (2019) Dispersed air flotation of microalgae using venturi tube type microbubble generator. *Biomass Bioenergy* 130: 105379
- V -2 Kazuhiro Itoh, Tomoki Nakasuji, Yasuhiro Kashino, Kentaro Ifuku (京大), Kouji Maeda, Takuji Yamamoto, Shogo Taguchi (2019) Influence of air flow rate on flotation of marine diatoms using venturi tube type microbubble generator, *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*: 73, 354 - 355.
- V -3 菓子野康浩 「珪藻の光環境変化応答の多様性」 光合成研究、Vol 30 (1); 46-54 (2020)
- V -4 Yasuhiro Kashino、Different acclimation strategies to the light environment among marine diatoms、RIIS International Symposium "Photosynthesis Research for the Future" Okayama、2019/11/19-20
- V -5 熊沢穰 (京大), 西出浩世 (基生研), 内山郁夫 (基生研), 井上 (菓子野) 名津子, 菓子野康浩, 中野雄司 (京大), 伊福健太郎 (京大) 「ツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* のゲノム解析とゲノム編集」 第61回 日本植物生理学会年会、大阪大学、2020/3/20
- V -6 菓子野康浩 「珪藻の光環境変化応答の多様性」、第10回日本光合成学会のシンポジウム 2 「藻類と環境との対話」 京都、2019/5/26
- V -7 伊福健太郎 (京大)、菓子野康浩 「実用珪藻ツノケイソウ の応用利用に向けた基盤技術の開発」 日本農芸化学会 2020年度大会 シンポジウム 「バイオエコノミー時代を切り拓く、遺伝子組換え微生物の新しい利用形態 「カルタヘナ第一種使用」 の可能性を探る」 福岡、2020/3/26
- V -8 特許
登録番号：特許第6 5 7 3 4 0 0 号
登録日：2019年8月23日
発明の名称：珪藻の新規形質転換ベクターおよびその含有する新規プロモーター配列
発明者：伊福健太郎 (京大)、菓子野康浩、福澤秀哉 (京大)、梶川昌孝 (京大)、小川順 (京大)
特許権者：兵庫県立大学
- V -9 特許出願
出願番号：特願2019-073016
出願日：2019年4月5日
発明の名称：微細藻培養方法および微細藻培養装置
発明者：中嶋祐二 (三菱重工)、上野大司 (三菱重工機械システム)、坪武夫 (三菱重工機械システム)、菓子野康浩・伊福健太郎 (京大)

発明者所属：三菱重工機械システム・兵庫県立大学・京都大学
出願人：三菱重工機械システム・兵庫県立大学・京都大学

大学院生命科学研究科

博士後期過程

大石 鴻一郎：生細胞を用いたアセチルコリン受容体の分子内運動解析

博士前期過程

杉本菜月：in vitro神経筋接合部モデルの作製

水谷 歩：光化学系II複合体の構築過程の解明

永森 繭：ポストシナプスタンパク質局在解析のための金粒子標識法の研究

井上祐大：大量培養技術開発を通じた珪藻の光合成機能の解析

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C） 平成31～令和3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機能構造に関わる分子動態の相関顕微鏡解析
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）学術研究支援基盤形成）平成28～令和3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 共同研究 トヨタ自動車(株) 令和元年度
研究課題 燃料電池触媒溶液中のアイオノマ吸着、凝集状態に関する研究
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里、伊藤喜子
- 4 共同研究 日産自動車(株) 令和元年度
研究課題 リチウムイオン電池の電極スラリーおよび電解液の可視化
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 5 共同研究 日産自動車(株) 令和元年度
研究課題 全固体電池電極スラリーの可視化に関する共同研究
研究担当教員 宮澤淳夫、西野有里
- 6 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～令和元年度

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

7 国立極地研究所共同研究 平成31～令和3年度

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

8 文部科学省科学研究費補助金（新学術領域研究・公募） 平成30～令和元年度

研究課題 近赤外光利用型天然光化学系IIの構造と機能

研究代表者 菓子野康浩

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) 令和元年度～

研究課題 亜リン酸を用いたロバスト且つ封じ込めを可能とする微細藻類の培養技術開発

研究代表者 廣田隆一（広島大学）、分担研究者 菓子野康浩