



つくば生物ジャーナル

生物学類

Tsukuba Journal of Biology

Vol.12 No.1 January 2013

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



採取地: 銚子湾内のアマモ場

MOLLUSCA 軟体動物
Gastropoda 腹足類
Anaspidae 笠筒目
Aplysiidae アマモツミ
Aplysia kurodai
アマモツミ

アマモツミは腕や見殺を両側
に伸ばして包み隠す
形態で工夫
した
見殺
腕
外套

刺激を与えれば 茶汁腺
(外套葉右側) より紫色汁
を放出する。分泌物は
見殺の動きを止めて中
身を保護する。

前眼角
腹
生殖孔
精溝
アモツミの卵
小水管
環状
排尿管



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.12 No.1 January 2013
www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

平成 24 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 25 年 3 月 9 日

筑波大学
生物学類

第一会場 2C410教室

8:55 - 9:10	清水 天馬	複数遺伝子によるクロララクニオン藻の系統解析	2
9:10 - 9:25	中村 篤史	高度セシウム吸収藻nak-9株の分類学的位置	3
9:25 - 9:40	山梨 早希	ユーグリファ目生物における珪酸被殻構築様式の多様性に関する研究	4
9:40 - 9:55	春名 紗季江	雪上から得られた原生生物 <i>Spumella</i> sp.に関する研究	5
10:10 - 10:25	大石 智子	海洋酸性化が <i>Chrysochromulina</i> sp.に与える影響ー炭酸系調節による培養系の確立ー	6
10:25 - 10:40	北澤 佑果	西部北太平洋域における蛍光性溶存態有機物の分布と光分解の影響	7
10:40 - 10:55	船井 夏菜子	微生物群集による蛍光性溶存態有機物の生産に関する実験的研究	8
10:55 - 11:10	松下 幼奈	下田沖における炭酸系の季節変動とその支配要因	9
11:10 - 11:25	内海 邑	Wolbachia is Wolbachia and its circumstance	10
12:15 - 12:30	小長谷 達郎	キタキチヨウの夏型雄の精子生産過程と注入精子数	11
12:30 - 12:45	武藤 直樹	アゲハ類において精子注入数に影響を与える有核精子の運動活性	12
12:45 - 13:00	金崎 健太	温暖化処理が高山植物の葉に与える影響～かたち・はたらき・きせつはどうか～	13
13:00 - 13:15	市川 美沙紀	草原の管理手法の違いで植物の芽生えから定着はどのように異なるか？	14
13:15 - 13:30	西村 貴皓	冷温帯成熟林における土壌呼吸の空間的不均一性とその要因	15
13:45 - 14:00	藏満 司夢	カリヤコマユバチ <i>Cotesia kariyai</i> における寄主の餌によるパフォーマンスの違い	16
14:00 - 14:15	高谷 優那	<i>Chelonus inanitus</i> における寄主・非寄主に対する反応の違い	17
14:15 - 14:30	加藤 大智	菅平高原実験センター周辺の双翅目相(昆虫綱)	18
14:30 - 14:45	松嶋 美智代	ヤマトシロアリ <i>Reticulitermes speratus</i> (Kolbe)の発生学的研究(昆虫綱・シロアリ目・ミゾガシラシロアリ科)	19
15:15 - 15:30	石川 絵里	低強度の塩ストレス処理による耐塩性遺伝子組換えユーカリ評価手法の開発	20
15:30 - 15:45	古矢 加奈	<i>mangrin</i> 遺伝子を導入した環境ストレス耐性バレイショの作製と評価	21
15:45 - 16:00	中山 朋美	グローバリゼーションのもとで学術研究に対応した生物材料譲渡契約書の検討	22

第二会場 2C404教室

8:55 - 9:10	鈴木 崇哉	新規除草剤AAA-0965のカロテノイド生合成系への影響	23
9:10 - 9:25	高橋 直人	5-アミノレブリン酸とストロビルリン系殺菌剤の植物への生育促進効果	24
9:25 - 9:40	中野 香	植物生育抑制活性を有する薬用植物由来の揮発性物質の探索とクミンアルデヒドの作用特性	25
9:40 - 9:55	池田 俊	パラコートによるイネ根部伸長抑制作用の特徴とその発現要因	26
10:10 - 10:25	井原 希	円石藻の超長鎖脂質アルケノン・アルケンの代謝と生理機能: 明暗周期における組成変化からの解析	27
10:25 - 10:40	渡辺 祐太	超長鎖脂肪酸合成阻害剤を用いた円石藻によるAlkenone合成経路の探索	28
10:40 - 10:55	川口 美咲	モデルラン藻における遺伝子発現制御のための人工センサーの構築	29
10:55 - 11:10	曾根 薫	分岐鎖飽和脂肪酸を生産するラン藻の創出	30
11:10 - 11:25	西本 謙太郎	培地中のMn欠乏がラン藻のアルカリフォスファターゼの発現に与える影響の解析	31
12:15 - 12:30	森山 和	植物の茎における傷害に対する応答	32
12:30 - 12:45	三木 雄大	ポプラ根における導管液タンパク質の遺伝子発現	33
12:45 - 13:00	高野 葵	ミヤコグサにおける亜鉛集積と関連遺伝子の解析	34
13:00 - 13:15	野田 浩希	ミヤコグサにおけるセシウム吸収・輸送に関わる遺伝子の探索	35
13:15 - 13:30	上野 ひとみ	レタスにおけるVLP(Virus-Like Particle)の一過性発現によるエディブルワクチンの開発に関する研究	36
13:45 - 14:00	高橋 享佑	葉緑体形質転換による経口ワクチン開発に関する研究	37
14:00 - 14:15	徳嶋 賀彰	オブシンファミリーの分子系統解析	38
14:15 - 14:30	平澤 輝仁	カタブレファリス類 <i>Roombia</i> sp. のミトコンドリアゲノムの解読	39
14:30 - 14:45	山野 安規徳	シストにも有効な抗トキソプラズマ薬シード候補の探索	40
14:45 - 15:00	松尾 恵梨子	<i>Karenia</i> 属渦鞭毛藻類のハプト藻類由来葉緑体への移行シグナル様配列に関する研究	41
15:15 - 15:30	久米 慶太郎	Fornicata生物の持つミトコンドリア関連タンパク質に存在する輸送シグナルの探索	42
15:30 - 15:45	佐藤 瑛生	遺伝学的手法を用いたホヤ母性mRNA研究の展開	43
15:45 - 16:00	中澤 恵里	脊索、神経管の起源をギボシムシから探る	44

第三会場 2C411教室

8:55 - 9:10	飯田 顕久	Amyloid β の神経細胞への毒性を緩和する化合物の探索	45
9:10 - 9:25	鏡 大志郎	アクチン作用薬耐性酵母から精製したアクチンの特性	46
9:25 - 9:40	島田 悟	Irciniastatin A/Psymbberin 耐性酵母の解析	47
9:40 - 9:55	佐野 遥香	さび病菌冬孢子形成誘導因子精製過程の改善	48
10:10 - 10:25	太田 あずさ	mtDNA突然変異多発マウスが発現する呼吸欠損の原因解明	49
10:25 - 10:40	林 千彩音	新奇ミトマウス作製戦略:mtDNA体細胞突然変異の活用	50
10:40 - 10:55	森島 仁美	ERK activation in murine fibroblast under various growth conditions	51
10:55 - 11:10	重政 理紗	オルガネラ翻訳伸長因子の変異体がしめす発生異常	52
12:15 - 12:30	阿川 正	C57BL6/Jマウスを用いたアイスプラント抽出物の抗肥満作用の研究	53
12:30 - 12:45	新井 将人	線虫のストレス耐性に対するキノコ類抽出物の生理作用解析	54
12:45 - 13:00	小幡 恵里	マウス脂肪細胞と線虫に対するファイトケミカル類の生理作用解析	55
13:00 - 13:15	永井 卓真	赤ぶどう果皮抽出物による線虫の老化遅延効果の解析	56
13:15 - 13:30	齋藤 結希	放線菌におけるタンパク質新規生産系	57
13:45 - 14:00	永久保 利紀	新規酵素のスクリーニング研究	58
14:00 - 14:15	山野 史織	微生物由来アミノ酸変換酵素に関する研究	59
14:15 - 14:30	藤木 恵津子	植物由来生理活性物質の微生物による代謝	60
14:30 - 14:45	王 文琦	タンパク質分解系による炎症応答の新たな制御機構	61
15:15 - 15:30	福田 智美	酸化ストレスに対する細胞の新たな防御機構	62
15:30 - 15:45	加藤 恵美	ユビキチン様タンパク質NEDD8を制御する骨髄腫関連因子の解析	63

第四会場 2C412教室

8:55 - 9:10	池内 花穂子	酸化ストレス物質により生じるゾウリムシの行動反応とその制御機構の研究	64
9:10 - 9:25	吉田 二千翔	ゾウリムシのpHに対する集合反応に及ぼす順応pHの効果	65
9:25 - 9:40	伊藤 奈都美	ウシガエル味細胞の電気的特性の解析	66
9:40 - 9:55	佐藤 雄太	イモリ肢再生における位置情報の攪乱	67
10:10 - 10:25	阿部 真弓	染色体の高次構造を形成するリンカーヒストンH1バリエーションの機能制御機構	68
10:25 - 10:40	久保木 亮介	視覚認識における視覚的ノイズの影響の実験系構築	69
10:40 - 10:55	小林 彰	<i>Staphylococcus aureus</i> におけるカルジオリピン合成酵素のストレス応答メカニズム	70
10:55 - 11:10	加藤 哲男	iPS細胞誘導初期の転写調節機構の解析	71
11:10 - 11:25	加藤 俊貴	ステロイド薬投与によるヒト間葉系幹細胞分化に対する影響	72
12:15 - 12:30	大森 哲朗	出芽酵母細胞壁合成経路におけるポリA鎖分解酵素Ccr4、Pop2とデキャッピング酵素活性化因子Dhh1の機能解析	73
12:30 - 12:45	永田 邦彦	エンドスルファターゼ Sulf1によるヘパラン硫酸修飾と成獣マウスの神経新生の関係	74
12:45 - 13:00	新妻 耕太	自己免疫疾患におけるMAIR-IIの機能解明とヒトMAIR-II相同分子の同定	75
13:00 - 13:15	高見澤 広子	テトラヒメナの13種類の新奇ミオシン;RCC1ドメインを持つミオシン4種類の口部装置への局在と機能解析	76
13:15 - 13:30	弥益 聡志	テトラヒメナの13種類の新奇ミオシン;MyTH4ドメインとFERMドメインを持つミオシン7種類のGFP結合タンパク質を用いた局在解析	77
13:45 - 14:00	三松 沙織	核内を動く粒子の同定	78
14:00 - 14:15	新井 佑子	ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析	79
14:15 - 14:30	池尻 光輔	ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析	80
14:30 - 14:45	本多 隆利	光及び熱遺伝学によるショウジョウバエ幼虫学習パラダイムの開発	81
14:45 - 15:00	恩田 美紀	線虫 <i>C. elegans</i> の発生タイミングと寿命に関与する新規遺伝子の解析	82
15:15 - 15:30	小村 達也	昆虫ステロイドホルモン生合成酵素遺伝子の発現に関わる新規Zincフィンガータンパク質の機能解析	83
15:30 - 15:45	天久 朝恒	ショウジョウバエ成虫におけるステロイドホルモンの役割の解明	84
15:45 - 16:00	住友 洋平	細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> における増殖期特異的走化性関連遺伝子候補の逆遺伝学的解析	85

平成 24 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

永井 卓眞
生田 将之
市川 雄太
梅谷 絵梨香
遠藤 愛
大津 拓紘
岡澤 梨沙
菊田 遼
齋藤 史織
佐賀 友則
得田 奈央子
戸祭 森彦
中村 真之
村山 拓未

表紙画

恩田 美紀
本多 隆利

表紙画の解説：

タイトルは“Sense of Wonder”。 私たちが自然と向き合うとき、その驚きや着眼点は、観る人の数だけ存在する。スケッチはその象徴である。自然は美しく神秘的で、謎に満ちている。私たちが理解しようと試みても、自然はどこか超越したところにあるように感じる。しかし、神秘さや不思議さに目を見はる感性がある限り、私たちが歩みを止めることはないだろう。大切にしたい科学の“初心”をこの一枚に込めた。

本多 隆利（全体構成、画像編集、写真、スケッチ）

「美しさ」には様々な種類があります。中でも生き物が持つ美しさは、多様性に溢れ、規則正しいようで歪んでいて、グロテスクで、人の手では再現できない魅惑的なものです。こうした生物の美しさを、アナログで温かく表現できたらと思い、色鉛筆で描いてみました。

「生き物ってきれい！」

基礎研究ならではのピュアな精神を忘れずに、日々励んでいきたいものです。

恩田 美紀（カラーイラスト）

平成 24 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあって

永井 卓真 (筑波大学 生物学類 4 年)

3 月になり試験も一通り終わり、春の香りが近づいてくるこの時期になると毎年卒研発表会の季節だと実感します。3 月とはいえ、筑波はまだまだ肌寒く冬の厳しさを感じます。

いざこの時になると、きっと多くの方が感じているように大学四年間があつという間に過ぎ去ってしまったと感じるばかりです。何も知らずに筑波の生活に慣れるので必死だった 1 年生のころ、専門の授業や実験に追われた 2、3 年生、研究の一端に身をおいた 4 年生。気づけばもう卒業になってしまいました。

1 年生の私にとって、卒研発表会に参加することは大きな衝撃になりました。4 年生の発表内容のほとんどが理解できなかったからです。タイトルに興味を惹かれ拝聴した発表も話についていくことがやっとでした。生物学に関する自分の知識の少なさを痛感したイベントとなりました。そして、2 年生の発表会では出来るだけ質問しようと決心し発表会に臨みました。3 年生では卒研発表会の運営側として参加をしました。そして、今年は私たち自身が発表する立場になりました。

卒業研究はたった 1 年間しかありません。その中で意味のあるデータが出せたのかと問われると、恥ずかしながら私は自信を持ってないと思います。研究とは時に残酷で、とても正直で、上手くいかない営みの繰り返しだと分かりました。しかし、私たち 4 年生が 1 年間研究して新たにわかったことも多からずあると思います。卒研発表会はその内容を発表するととても素晴らしく、得

難い機会だと実感します。

1、2 年生の皆さんには私たちの卒研発表会が数年後の研究室選択の一助となれば幸いに思います。難しい内容かもしれませんが、理解しようとする積極性、疑問を抱いたら質問する習慣など普段の講義とはまた違った雰囲気味わって欲しいと思います。

3 年生の皆様には、卒研を準備・運営に尽力していただき心底感謝する所存であります。そして、こうして 1 年間研究ができたのは未熟な我々に愛想を尽かさず一から面倒を見ていただいた指導教官のおかげであると身にしみております。発表会ではどうか温かく見守っていただければと思います。

最後に私事で恐縮ですが、この時期になると、センター試験や 2 次試験などで高校生を多く見かけます。彼らを見ると、「私は大学で過ごした時間で何を得る事ができたのだろうか？」と自問することが多くなりました。概論から始まり、卒研まで確かに生物学の知識は身に付いたと思うのですが、果たしてそれ以外に何が得られたのだろうか。

その答えの一つがこの学校、学類で出会えた仲間だと思います。夜遅くまで続く実験やその結果が芳しくないときも仲間と支えあい、励まし合えたからこそ頑張れたのかなと痛感します。目指すものは違ってもかもしれませんがこの縁を大切に、これからの人生へ進んでいこうと思います。

Communicated by Mitsuru Hirota, Received January 29, 2013.

複数遺伝子によるクロララクニオン藻の系統解析

清水 天馬 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

クロララクニオン藻は捕食性原生生物と緑藻との二次共生によって葉緑体を獲得した海産単細胞真核生物の一群である。細胞は基本的にアメーバ性質をもつが、1本の鞭毛が細胞を螺旋状にとりまいて遊泳する遊泳性の種や、細胞壁をもつ球状の種も存在するなど、生活環は複雑で多様である。細胞内共生した緑藻由来の葉緑体には、ヌクレオモルフという縮小した共生藻の核が消失せずに残っており、二次共生の中間ステージを示す例だと考えられている。そのため二次共生を介した葉緑体獲得の進化を解明する上で重要な生物群の一つとして注目されている。また、本藻群は1984年にその存在が認識され、それ以来8属14種が記載されてきた。これらの系統関係は主に18SrDNAの分子系統解析によって推定され、各属の単系統性は強く支持されている。一方、属間の系統関係については強い統計的支持のある結果は得られておらず、本藻群における属より上位の科、目レベルの分類は大きくたち遅れている。本研究では、クロララクニオン藻における高次分類体系整備のための基礎データの一つとして、核コードの18SrDNA、28SrDNAの塩基配列とHSP90のアミノ酸配列を用いた複数遺伝子による系統解析を行い、属間の系統関係を明らかにすることを目的とした。

方法

系統解析に用いた一部の種の18SrDNAの塩基配列と28SrDNAの塩基配列、HSP90アミノ酸配列については、データベースに既に登録されているものを用いた。

SRT040株の18SrDNA配列は白鳥峻志氏より、*Chlorarachnion reptans*、*Amorphochlora amoebiformis*、*Lotharella globosa*、*Bigelowiella natans*のHSP90配列は平川泰久博士より、*Gymnochlora stellata*、*Gymnochlora dimorpha*のHSP90配列は矢吹彬憲博士より未発表のデータを提供いただいた。

28SrDNAの配列決定についてはOta et al.(2009)で用いられたクロララクニオン藻核コード28SrDNAプライマーを用いてPCR、シーケンスを行うことにより配列決定した。

HSP90の配列決定に関しては既知HSP90配列より特異的プライマーを設計し、PCR、シーケンスを行うことにより配列決定した。

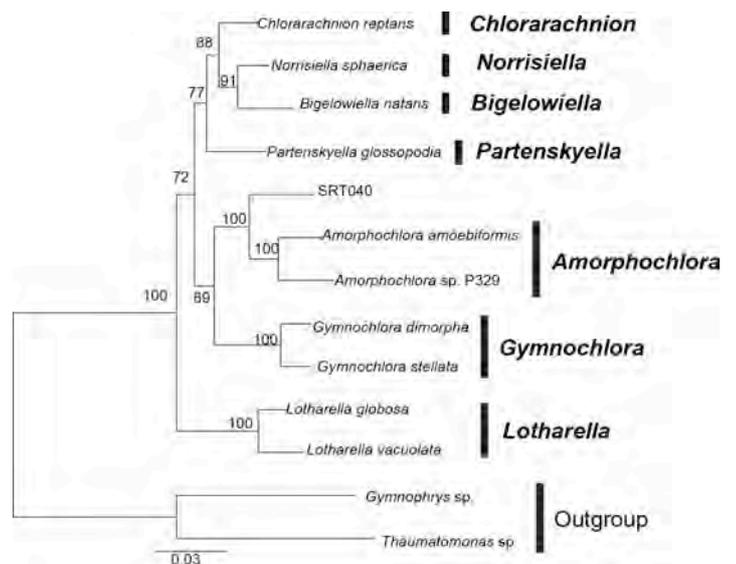
28SrDNA、18SrDNA、HSP90の複数遺伝子データセットを作成し、RAxML (ver.7.2.6)により計算、最尤系統樹を作成した。

結果と考察

本研究では、クロララクニオン藻SRT040株の28SrDNAとHSP90の配列、*Partenskyella glossopodia*、*Amorphochlora* sp. P329、*Lotharella vacuolata*、*Norrisiella sphaerica*のHSP90の配列を新たに取得した。これらの配列とデータベースや他研究者から取得した配列を用いて、複数遺伝子系統解析を行なった。

得られた系統樹(図1)から、複数種の配列を解析に用いた属(*Amorphochlora*、*Gymnochlora*、*Lotharella*)は、これまでの18SrDNAによる系統解析結果と同様に、それらの属の単系統性が強く支持された。一方、18SrDNA配列を用いた先行研究において系統的な位置が定まっていなかった*Lotharella*属の位置は、今回の解析では既知のクロララクニオン藻の中で最初に分岐したことが、ある程度の統計的支持(72%)で示唆された(図1)。また、その他のクロララクニオン藻は大きく2つの系統(*Amorphochlora*/*Gymnochlora*/SRT040系統と*Partenskyella*/*Chlorarachnion*/*Norrisiella*/*Bigelowiella*系統)に分かれることも、それぞれ89%、77%のブーツストラップ値で示唆された(図1)。

今回、クロララクニオン藻において初めて上記3つの高次系統群の存在が示唆された。得られた系統関係に基づくと、それら3つの系統群に対応する科あるいは目の高次分類群の設立が検討される。しかし、*Lotharella*属のみからなる系統群を除く他の2つの系統群には、それぞれを特徴づける明確な共有派生形質と呼べる特徴は見つかっていない。加えて、各系統群の統計的支持も十分とはいえないことを考えると、今回の分子系統解析の結果のみで分類学的な結論を出すのは次期尚早と思われる。今後、今回示唆された3つの系統群について、明確な共有派生形質がないか、詳細な検討を行うとともに、さらに頑健な系統樹の構築を目指して解析に加えるOUTと遺伝子数の増加をはかる必要がある。



(図1) クロララクニオン藻核コード28SrDNA、18SrDNA、HSP90を用いた最尤系統樹
BP値は100回反復により計算
28SrDNA、18SrDNAの塩基配列(4481bp)はGTR+Γモデルを用いて、HSP90のはアミノ酸配列(660aa)列はをLG+F+Γモデルを用いて、RAxMLにより計算

高度セシウム吸収藻 nak-9 の分類学的位置

中村 篤史 (筑波大学 生物学類)

指導教員：石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

20 世紀末に、中山剛博士により事務用液体糊から緑色の単細胞藻が単離・培養された (nak-9 株)。本藻は、2011 年の東日本大震災以後に行われた、藻類による放射性物質回収試験によって水溶液中の放射性セシウムの高効率吸収・除去能が示され、放射性物質除去剤の 1 つとして特許出願された。予備的な観察により、nak-9 株は真正眼点藻綱に属すると考えられたが、詳細な系統・分類学的研究は未だ行われておらず、nak-9 株の分類学的位置は明らかになっていない。

真正眼点藻綱は 1971 年に黄緑色藻綱から独立分離して設立された分類群である。真正眼点藻綱の主な特徴として、葉緑体はクロロフィル *c* やガードルラメラを欠き、葉緑体 ER が核膜に連続しない、ときに突出型ピレノイドをもつ、細胞質に層状の貯蔵物質を含む小胞 (lamellate vesicle) をもつ、遊走子は細胞前端に葉緑体とは独立している赤い顆粒の集合からなる眼点をもつ、遊走子の葉緑体にはピレノイドを欠く、といったものがあげられる。自生孢子や遊走子による無性生殖を行い、有性生殖は確認されていない。多くは淡水や陸上に生育するが、海産種も知られる。

本研究では 18S rRNA を用いた分子系統解析と、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた形態観察により、nak-9 株の系統・分類学的位置を明らかにすることを目的とした。

方法

nak-9 株を、20 °C、明時間 14 時間、暗時間 10 時間の環境下において AF6 培地で培養したものを観察に用いた。透過型電子顕微鏡 (TEM) による超薄切片の観察では、グルタルアルデヒドと四酸化オスmium で二重固定を行った細胞を樹脂包埋し、超薄切片を作成後に酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した試料を用いた。分子系統解析には横山亜紀子博士より nak-9 株の 18S rRNA 塩基配列を提供していただき、RAxML を使い、最尤法を用いた系統樹推定を行うと共に、ブートストラップ解析を行った。

結果

真正眼点藻綱内での nak-9 株の系統的位置を知るため、18S rRNA 遺伝子塩基配列を用いた分子系統解析を行った結果、真正眼点藻綱は大きく 2 つのクレードにわかれた。nak-9 株は、そのうち *Pseudostaurastrum* や *Goniochloris*、*Trachydiscus* を含むクレードと単系統群を形成した。

光学顕微鏡による形態観察の結果、nak-9 株の細胞は直径 8 - 9 μm、円形や卵形、楕円形であった (Fig. 1)。細胞は平滑な細胞壁で囲まれていた。細胞の内周に沿うように 1~2 個の緑色の葉緑体が見られ、葉緑体は突出形のピレノイドをもっていた。葉緑体周辺には楕円形~棒状の明瞭な反射性顆粒が多数見られた。細胞質には発達した液泡が存在した。多くの細胞に 1~2 個の赤色の顆粒が細胞質中に見られた。自生孢子により増殖し、遊走子は観察されなかった。1 ヶ月間培養をしたものでは、稀

に細胞直径 30 - 40 μm で多数の葉緑体・赤色顆粒・反射性顆粒を含む巨大な細胞が見られた。

TEM による微細構造観察の結果、細胞周囲には厚さ 50 - 60 nm の明瞭な細胞壁で囲まれていた (Fig. 2)。葉緑体には整然と並んだ三重チラコイドラメラが存在し、ガードルラメラは見られず、また突出形のピレノイドが観察された。細胞質には lamellate vesicle が多数見られた。ミトコンドリアは典型的な管状クリステをもっていた。

考察

18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析からは nak-9 株が真正眼点藻綱に属することが示され、今回観察された形態的特徴 (ガードルラメラの欠如、突出形ピレノイドや lamellate vesicle の存在など) はこの結果を支持している。真正眼点藻綱内において nak-9 株と形態的に類似するものとして、*Eustigmatos* 属が挙げられる。細胞は球状で細胞表面がなめらかであり、葉緑体が突出形のピレノイドをもつという共通の形態的特徴をもつが、*Eustigmatos* 属では遊走子が見られる点、最尤系統樹で nak-9 株とは別のクレードに属する点で nak-9 株とは異なる。最尤系統樹において nak-9 株と単系統群を形成した *Pseudostaurastrum* は細胞が腕状突起をもつこと、*Goniochloris* は細胞が多角形をしていること、*Trachydiscus* は細胞が円盤状をしていることが nak-9 株と形態的に異なる。以上の分子系統解析、微細構造観察の結果から nak-9 株は真正眼点藻綱の既知の属には当てはまらず、また黄緑色藻綱や緑藻として記載されているものの中にも該当する種がないことから、真正眼点藻綱の新属新種として扱うのが妥当であると結論した。



Fig. 1. nak-9 株の光学顕微鏡写真
矢頭：赤色顆粒

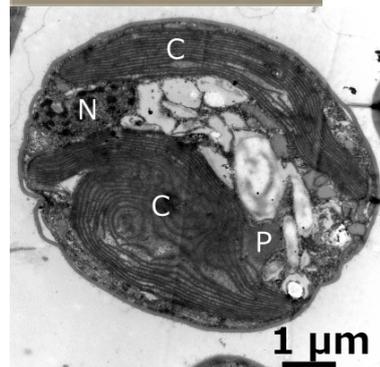


Fig. 2. nak-9 株の透過型電子顕微鏡写真
N：核、C：葉緑体、P：ピレノイド

ユーグリファ目生物における珪酸被殻構築様式の多様性に関する研究

山梨 早希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

ユーグリファ目生物は、リザリア系統群ケルコゾア門に属する有殻アメーバの一群で、その多くは珪酸質でできた複数枚の鱗片からなる壺型の被殻をもつ。被殻の形態や鱗片の形状・枚数などは種によって多様で分類の主要形質の一つにもなっている。本生物群の被殻形成様式は非常に特異的で、娘細胞のための被殻を細胞分裂より先に作っておくことが知られている (Ogden 1979)。また、鱗片は細胞後方の珪酸沈着小胞でつくられた後、細胞前方に移動し、細胞外へ分泌されセメント様の物質で他の鱗片と接着することがわかっている (Hedley *et al.* 1974; Anderson *et al.* 1994)。しかし、細胞外で鱗片がどのように組み立てられ、被殻が構築されるのかは一部の種で観察報告はあるが、多様性の観点から詳細に観察した例はなく、種によって異なる鱗片を持つユーグリファ目生物における被殻構築様式の多様性は未解明である。そこで、本研究では、被殻及び鱗片の構造が異なるユーグリファ目生物間で殻構築様式にどのような相違があるのかを明らかにすることを目的とした。

材料・方法

本研究では、被殻構造が異なる *Assulina muscorum* (CCAP1509/1), *Euglypha rotunda* (CCAP1520/1), *E. filifera* (MYN10), *Trinema lineare* (MYN11) の 4 種について、WarisH あるいは NCL 培地で培養し、観察に用いた。細胞形態は、光学顕微鏡を用いて観察した。被殻の微細構造や鱗片の形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。また、個々の鱗片は、有機物質を溶解するパイプユニッシュにより、鱗片を細胞から剥がして観察した。殻構築過程の詳細な観察には、デジタルビデオカメラを搭載した倒立型光学顕微鏡を用いてタイムラプス撮影を行った。被殻構築前後の核の様子は、核を DAPI で染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

結果

被殻と鱗片の形態

まず、光学顕微鏡と SEM 観察により 4 種の被殻形態を観察した。*T. lineare* の被殻は細長い卵形で、円形の開口部が頂端からやや外れた位置にあった。開口部には鋸歯をもつ鱗片が一層配置し、被殻の他の部分には円盤型の大きな鱗片 (直径約 3-6 μm) と、楕円形の小さな鱗片 (縦約 1.8-2 μm 、横約 1-1.3 μm) の二つが観察された。被殻を構成する鱗片は一層で、円盤状鱗片の隙間を楕円形鱗片が埋めていた。

E. rotunda の被殻は扁平な壺型で、開口部は楕円形であった。被殻側面はやや角ばった楕円形の鱗片 (縦約 5.5 μm 、横約 2.5 μm) が規則的に重なり合っていたが、頭頂部の鱗片は不規則に配置されていた。開口部の鱗片は鋸歯をもつ特殊な形をしていた。

A. muscorum の被殻も扁平な壺型で、開口部は楕円形であった。被殻は、楕円形の鱗片が規則的に配列してできており、開口部の鱗片に鋸歯等は観察されなかった。

E. filifera の被殻には 6-10 本程度の長い刺が観察された。これらの刺はセメント様物質で鱗片に接着しているようにみえた。

タイムラプスビデオ撮影

次に、4 種のうち最も増殖のよい *T. lineare* において殻構築の様子をタイムラプスビデオ撮影した。まず、開口部から細胞の一部が突出すると同時に、その表面が鱗片で覆われた。細胞の突出が徐々に増大すると同時に鱗片が押し広げられ配置されるように見えた。構築途中の被殻にはある程度柔軟性があり、被殻形態が完成した後硬くなった。このように *T. lineare* では細胞質の移動と被殻の構築が同時に進行した。30 分ほどで被殻は完成し、その後 40 分ほどで細胞質が分裂し、娘細胞が新被殻に移動した。

DAPI 染色

E. rotunda の被殻構築後の個体を DAPI で染色すると、親細胞内に核が二つあることが確認された。

考察

ユーグリファ目生物の被殻構築様式は、*Paulinella chromatophora* (野村 2010) と *E. rotunda* (Harald Netze 1972) において既に観察されている。*P. chromatophora* では、まず開口部の外側に新規鱗片を蓄え、太い仮足によって開口部側から鱗片が一枚一枚積み上げられる様子が観察されている。*E. rotunda* では、まず開口部の鱗片が配置され、続いて側面の新規鱗片 (3-4 枚の鱗片同士接着されたユニットをなす) を液胞の多い細胞質が押し出すようにして被殻が形成される。本研究で観察した *T. lineare* は、*P. chromatophora* のように鱗片を開口部に蓄えてから構築するのではなく、鱗片の排出と、構築が同時に行われる。また、*T. lineare* では構築中の殻内が細胞質で占められ、細胞質全体で鱗片を支えながら殻を構築する点で、*E. rotunda* の被殻構築様式に似る。また、構築中の被殻に柔軟性があることから、*P. chromatophora* のように構築と同時に鱗片同士が接着され固定されるのではなく、*E. rotunda* のように鱗片が緩く接着された状態で構築が進むと考えられる。SSU rRNA 遺伝子の系統解析から、*T. lineare* は *P. chromatophora* よりも *E. rotunda* と近縁であることがわかっている (Enrique Lara 2007)。今回、*T. lineare* の被殻構築様式が *P. chromatophora* よりも *E. rotunda* と類似していたことは系統解析の結果と合致する。しかし被殻構築様式の多様性の全体像を把握するには複数の種においてさらに被殻構築様式を観察する必要がある。

E. acanthophora と *E. strigosa* では、娘細胞の被殻形成後に母細胞内で核分裂がおこる (Ogden 1979)。今回被殻構築後の *E. rotunda* 細胞を DAPI で染色した結果、親細胞内に核を二つ確認したことから、*E. rotunda* も同様に、娘細胞の被殻構築後に母細胞内で核分裂が起こり、一方の核が娘細胞に移動すると考えられる。

雪上から得られた原生生物 *Spumella* sp.に関する研究

春名紗季江 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中山剛 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

積雪や氷河は低温や強光にさらされる環境であるが、そこに特異的に生育する生物も存在している。例えば動物としてユスリカやカワゲラ、クマムシなどが知られている。これらの動物の生存を支えているのが、雪氷藻とよばれる微細藻であり、さまざまなシアノバクテリアや緑藻、接合藻、黄金色藻などが知られている。また、近年は環境 DNA の研究などから分解者としてのバクテリアの存在も明らかになっている。こうした生物たちによって雪上では特異的な生態系が成り立っていると考えられる。

水界では動物、藻類、バクテリアに加えて従属栄養性の原生生物 (特にバクテリアを捕食する鞭毛虫やアメーバなど) が重要な働きを担っていることが知られており、雪上でもその可能性が考えられるが、まだその実態はほとんど明らかになっていない。

本研究では雪上にそのような従属栄養性原生生物が存在するのかを明らかにするとともに、低地に生育するその近縁種との比較を通して、雪上という低温環境での従属栄養性原生生物の特性を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

2012年5月16日、長野県四阿山の残雪を採集し、粗培養とマイクロピペット法により培養株 AZ9 株を確立した。TC1 株は2012年8月につくば市天久保の水田より作製された粗培養株を用いて、また、TC4 株は2012年9月20日に土浦市乙戸沼より作製された粗培養を用いて同様に確立した。3株は15°Cの暗条件で継続培養している。

以上の株を用いて (1) 光学顕微鏡観察、(2) 18S rRNA 遺伝子を用いた系統解析、(3) 異なる温度での培養実験をおこなった。

結果と考察

(1) 光学顕微鏡観察の結果、AZ9 株の細胞は卵形で貯蔵物質を持ち、細胞頂端付近から生じる2本の不等鞭毛をもっていった。また葉緑体を持たず、基質に着生または浮遊していた。このような形態的特徴から、この株は黄金色藻綱の *Spumella* 属の一種と同定した。TC1 株は球形の細胞で葉緑体を持たず、細胞頂端付近から生じる2本の不等鞭毛を持ち浮遊していたことから、AZ9 株と同様に *Spumella* 属の一種と同定した。また TC4 株は細胞頂端が平らな楕円形で、細胞頂端付近から生じる2本の不等鞭毛と小さな葉緑体を持ち、浮遊していた。これらの特徴から TC4 株は黄金色藻綱の光合成と捕食をおこなう *Ochromonas* 属の一種と同定した。

(2) AZ9 株と TC4 株について 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、すでに公表されている黄金色藻綱の配列を合わせて最尤系統樹作製とブートストラップ解析を行った。その結果、形態的特徴から推定されたとおり、両株は黄金色藻綱に属することが示された。さらに AZ9 株は黄金色藻綱の中でも従属栄養性の *Spumella* 属、TC4 株は混合栄養性の *Ochromonas* 属とそれぞ

れ単系統であることが示された。黄金色藻綱内において *Spumella* 属と *Ochromonas* 属は多系統であることが知られているが、分布する温度環境によって属するクレードが異なる傾向にあることを示す先行研究も存在する。本研究では AZ9 株は低温環境に生育する種が多いクレード、TC4 株は温暖な環境に生育する種が多いクレードに属し、光学顕微鏡観察結果と先行研究を支持する結果が得られた。

(3) 雪上から得られた AZ9 株が実際に低温でもより適応的に活動しているのかを確かめるため、AZ9 株、TC1 株、TC4 株を 5°C と 15°C で暗条件のもとそれぞれ培養し、24 時間おきに細胞を固定して細胞数を計測した。3 株はともに AF6 + YT 培地を用いて 15°C で 5 ~ 8 日間培養したものを新しい培地に 1,500 ~ 1,800 cells / ml の濃度で植え継いだものを利用し、餌としては AZ9 株の培養液を AF6 + YT 寒天培地に散布して生じたコロニーから単離したバクテリアの培養株を毎日添加した。その結果、15°C ではすべての株が増殖したが、5°C では AZ9 株のみで増殖が見られた (図 1)。

以上の結果から、雪上で得られた従属栄養性原生生物 *Spumella* 属 (AZ9 株) は低温でも生育が可能であり、低地の *Spumella* 属 (TC1 株) や混合栄養性の *Ochromonas* 属 (TC4 株) よりも低温に対して適応的であることがわかった。積雪における生態系ではこのような従属栄養性原生生物が生育し、バクテリア捕食者として働いていると考えられる。

今後は実際に低温でも捕食による従属栄養的な生活をおこなっているのか、蛍光ビーズやバクテリアの添加観察もおこなっていく予定である。また、TC1 株でも 18S rRNA 遺伝子の塩基配列決定と系統的位置の確認をおこなう。

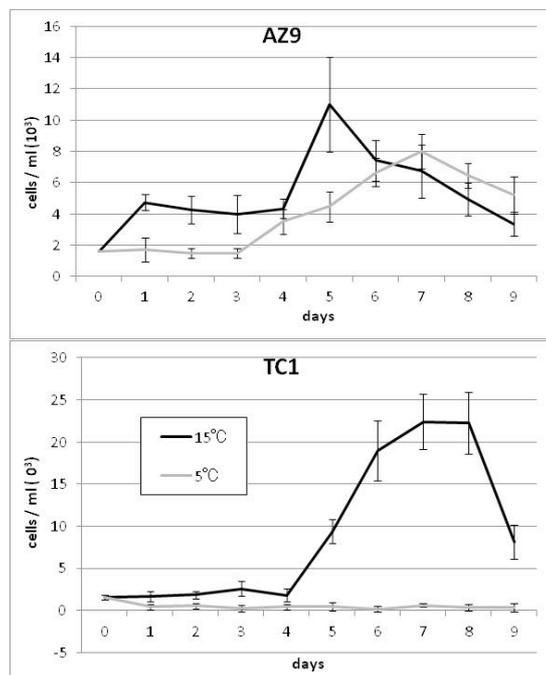


図 1：異なる温度での培養実験

海洋酸性化が *Chrysochromulina* sp. に与える影響—炭酸系調節による培養系の確立—

大石 智子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 濱 建夫 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

人類の化石燃料消費に起因する大気 CO₂ 濃度の増加に伴い、「もう一つの CO₂ 問題」とも呼ばれる海洋酸性化が深刻化してきている。海洋酸性化による海水の炭酸系の変動が生態系にも影響を及ぼす可能性があり、特に海洋の一次生産に大きな寄与を占める植物プランクトンへの影響は、海洋生態系全体に大きな影響を及ぼすと考えられている。

一般的に CO₂ 濃度の増加は植物プランクトンの光合成活性を高めるとい見が多いが、石灰質の殻をもたないハプト藻である *Chrysochromulina* sp. が、海洋の酸性化によって成長を阻害される可能性が、メソコスムタンクを用いた群集実験で示された。最新の論文でハプト藻は、海洋植物プランクトンの中で中心的グループを構成するほどの重要性があるとの発表もあり、海洋酸性化によって *Chrysochromulina* sp. の成長が阻害される場合、海洋の一次生産にも大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。

本研究において、培地の pH と *Chrysochromulina* sp. の増殖の関係を明らかにするため、CO₂ のバブリングにより炭酸系調節した実験を行なった。しかし、この種は非常に衝撃に弱く、バブリングをしながらの培養に耐えられなかった。そこで本研究では、個体に与えるバブリングの衝撃をできるだけ小さくして、*Chrysochromulina* sp. の炭酸系調節単独培養を確立することを目的とした。

方法

1. 空気によるバブリング実験

球形の培養容器 (マリンフラスコ) を用いて、バブリングによる衝撃を小さくして *Chrysochromulina* sp. の単培養株 (中山講師提供) 培養した。衝撃による *Chrysochromulina* sp. への影響を明らかにするためにまず空気を導入する実験を行った。培養室にて約一週間培養し、毎日フローサイトメーターと顕微鏡観察によって細胞数を計数した。

2. 分析

固定試料を細胞計数盤にのせ顕微鏡下で細胞数を数え、フローサイトメーターによる非固定試料の測定と合わせて分析した。

結果・考察

培養開始からバブリングを開始すると、*Chrysochromulina* sp. の個体数は急速に減少してしまった。そこで培養開始から増殖の立ち上がりを確認してから (1×10⁶ cells/ml まで) バブリング (10 ml/min、50 ml/min) を開始すると *Chrysochromulina* sp. の増殖速度に、影響は表れなかった (Figure)。これは

Chrysochromulina sp. が特に低密度時に衝撃に弱いということを示唆している。しかし炭酸系培養においては培地の pH を維持するため、培養開始から時間を空けずにバブリングを開始することが必要である。

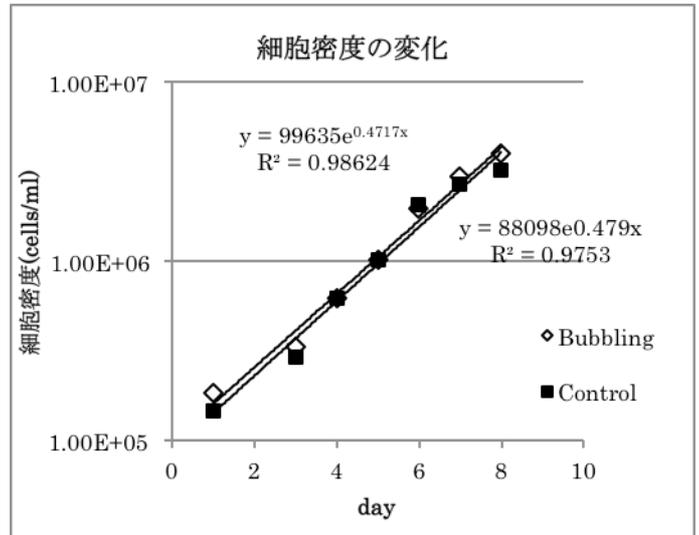


Figure バブリング (10 ml/min) の衝撃を与えた培養とコントロール培養の細胞密度の変化

今後の課題

今回の実験は、酸性化条件下での *Chrysochromulina* sp. の反応をより詳細に調べるための実験系の確立を目的とした。酸性化が植物プランクトンの生理的機能に与える潜在的ストレスを知るためにも、今後 *Chrysochromulina* sp. に与える影響の生理学的観察が必要である。

西部北太平洋域における蛍光性溶存態有機物の分布と光分解の影響

北澤 佑果 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 濱 健夫 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

海洋の溶存態有機物 (DOM) は、大気中の二酸化炭素量に匹敵する地球表層上の最大級の有機炭素リザーバーである。DOM プールの存在は海洋における炭素循環システムの重要な部分を占めていると考えられ、DOM の組成や環境的な動態を解明することは地球表層の炭素循環を理解するうえで非常に重要である。また、大気中の二酸化炭素が海洋に多く溶け込んでいるという観点からしても、我々の直面する温暖化などの地球環境問題解決への重要な情報源となるだろう。

微生物分解に耐性を持つ難分解性 DOM は、DOM のおよそ 9 割を占め、数千年~数万年のスパンで海洋中に滞留するため海洋の炭素システムに重要であると考えられているにもかかわらず、その動態は未解明な部分が多い。その中でも蛍光性をもつ DOM である FDOM (Fluorescent DOM) は、特に表層において難分解性 DOM が 40~50% を占めるといわれており、この蛍光は太陽照射によって失われる。また、近年の研究により主としてバクテリアによって生産されていることが明らかとなっている。

FDOM の生成及び分解など変動過程を明らかにすることは難分解性 DOM プールの動態を推測することにつながる。特に、FDOM の特性である蛍光が太陽照射によって失われるという点から、表層付近での光分解がどのように FDOM に対して影響しているか検討する必要がある。本研究では、西部北太平洋域における FDOM の分布を明らかにすることにより、FDOM の蛍光強度の変動に対する光分解の影響を明らかにする。

方法

海水試料の採水は気象庁気象研究所に依頼した。採水は気象庁の観測船 (凌風丸、啓風丸) の定期観測の際に行われ、2011 年 1 月 (東経 137 度、北緯 24-30 度)、2011 年 6 月 (東経 137 度、北緯 5-30 度) の二つのセクションで採水した。2011 年 1 月は北緯 30 度、28 度において 20 層 10~2000m、北緯 26 度、24 度において 20 層 0~1000m から採水した。また、2011 年 6 月では 18 層 10~2000m から採水した。海水はロゼット型採水器によって採水した後、450°C で 5 時間燃焼した 61mL ガラス管に移し、測定まで -20°C で冷凍保存した。

全有機炭素濃度 (TOC) は、680°C 燃焼触媒酸化法を用いて全有機炭素計 TOC-V (Shimadzu) で測定した。無機炭素の除去には、3N HCl の添加及び純空気 (無 CO₂) の通気 1.5 分によって行った。フタル酸水素カリウム水溶液を用いて標準化し、精度評価に Hansell Lab から提供される Deep Seawater Reference を用いた。

蛍光特性は、蛍光分光光度計 (Hitachi F4500) で Excitation-Emission Matrix Spectroscopy (EEMs) を Ex=250-450nm (2nm 間隔)、Em=300-500nm (5nm 間隔) で測定し、先行研究から海洋腐植様 FDOM のピークとされる Ex/Em=320/420

nm での蛍光強度を観測した。試料は暗環境のもと流水で自然解凍した後、1×1cm 石英セルを用いて測定し、Milli-Q 水の励起波長 350nm におけるラマンピークの面積で標準化し、単位には R.U. を用いた。また、解析に気象庁ホームページより水温、塩分、pH などの採水データを使用した。

結果・考察

(1) 表層における FDOM の分布と混合層との関連

TOC は表層で高く、深度に伴い低下した。FDOM は対照的に、表層で低く、深度に伴い増加する傾向を示した。水温や塩分の測定結果から、表層に水質が均一である混合層が発達したことがわかり、水温の低い 1 月の測線や北緯 30 度では、混合層が厚くなっていた。これは、表面の海水が冷却されることによって比重が重くなり、鉛直的な混合が起こりやすくなるためである。FDOM も混合層内でほぼ均一の蛍光強度を示した。これは表層で光分解を受けた低い蛍光強度の水塊が鉛直的にかきまぜられ、混合層内で蛍光強度が低く一定になったためと考えられる。

(2) 季節・緯度変化による FDOM の分布変動

1 月と 6 月のデータを比較することにより、季節変動による FDOM の動態を知ることが可能となる。北緯 24 度及び 30 度の各測線において、1 月は混合層が 200m 付近まで発達しているのに対し 6 月は 100m よりも浅くなっていた。(Figure 1, Figure 2) また、FDOM の蛍光強度は 6 月の方が表層で低い値を示した。これは、光強度が冬よりも強く、表層の水温も高くなるために鉛直的な混合があまり起こらず、光分解の影響を強く受けたことによる。以上の変動から、水温は海水における FDOM の分布を制御する重要なファクターであることが考えられる。

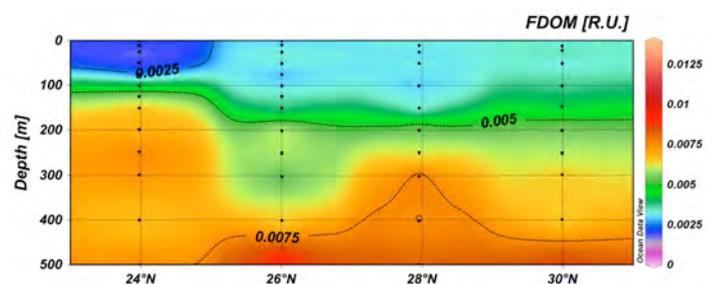


Figure 1: RF1101 表層 500m における FDOM の分布

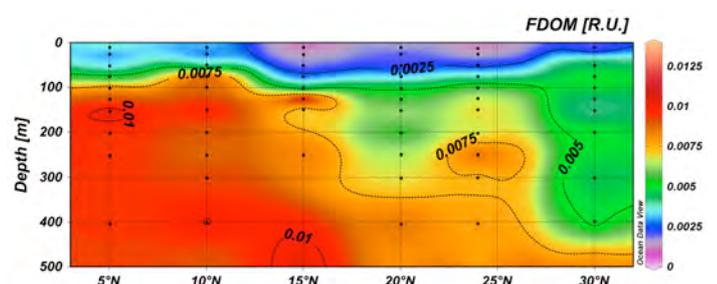


Figure 2: KS1107 表層 500m における FDOM の分布

微生物群集による蛍光性溶存態有機物の生産に関する実験的研究

船井 夏菜子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 濱 健夫 (筑波大学 生命環境系)

背景

海洋中の溶存態有機物(DOM)は地球表層最大の炭素リザーバールのひとつであるため、DOMが有する炭素(DOC)は地球表層の炭素循環に大きな重要性を持つ。この海洋DOMの5-25%を占めるとされる蛍光性溶存態有機物(FDOM)は、主にバクテリアによって生成されると考えられている。バクテリアは海洋表層で現存量が多く活性が高い一方、FDOMの蛍光強度は海洋表層で弱い。これはFDOMの蛍光が太陽光照射により消光する「光退色」という特徴を有するからである。このため海洋表層DOMプールにおけるFDOMの寿命は小さいと考えられてきたが、実際の海洋において、生物活動に伴うFDOMの蛍光の生成や、光照射による消光に関する実験的研究は行われていない。

そこで本研究では海水の培養実験により海洋腐植様FDOM(FDOM_M)の蛍光強度の変化を追跡した。これによりバクテリアを含む微生物群集によるFDOM_M生成速度、FDOM_M蛍光の消光速度の算出を試みた。

方法

本実験ではUV透過率約20%のポリカーボネート容器(PC)と、高いUV透過率を有する石英瓶(QU)を使用した。

1. 20 L 培養実験

2012年7月20日~24日、100μメッシュを通した下田沖表面水を20Lのポリカーボネート容器(PC)に導入し、栄養塩添加後、筑波大学下田臨界実験センター内の屋外実験池において培養した。日の出と日没を目安に、毎日6:00と19:00にサンプリングを行った。

2. FDOM 生成実験

20L培養の2日目(実験I)と4日目(実験II)に、培養海水を250mlのPCとQUそれぞれ8本ずつに分注した。各容器の半数をアルミホイルで遮光し暗瓶とした後、6:00に実験池に設置した。同日19:00と翌朝6:00に各容器の明瓶と暗瓶を2本ずつ回収した。

採取したサンプルは一部をガラス繊維ろ紙で濾過し、ろ紙についてChl.a濃度を、ろ液についてFDOM_M蛍光強度とDOC濃度を測定した。残りは原液のままグルタルアルデヒドで固定しバクテリア細胞数計数に使用した。

また実験期間中の可視光、UVの照射量を計測した。

結果・考察

(1) FDOM_M 消光速度

各容器において、日中(6時-19時)における暗瓶のFDOM_M生成量と明瓶の消光量の合計を、日中のFDOM_M消光速度として算出した(Figure 1, Table 1)。実験Iでは容器間で顕著な差が認められなかった一方、実験IIではQUでより大きな消光が見られた。これはday4のUV照射量がday2よりも多かったため、より光退色が生じたためと考えられる。

(2) FDOM_M 生成速度

各容器において、暗瓶から日中あたりのFDOM_M生成速度を算出したところ、実験I、IIを通して容器間での顕著な差は見られなかった。実験IのQUでは日中の生成量と消光量が同程度であったのに対し、実験IIのQUでは日中の生成量の約2倍の消光が起こっていたことから、実際の海洋表層ではUV照射量によって、日々FDOM_M蛍光強度が大きく変化していると考えられる。

(3) FDOM_M 生成速度(d⁻¹)

各容器において、暗瓶における1日(6時-翌6:00)あたりのFDOM_M生成速度を算出したところ、速度に変動が見られた。これは光照射のない夜間においてFDOM_M蛍光強度が減少したサンプルがあったからである。蛍光強度の減少と容器の種類、バクテリア細胞数の増減に明確な関係性を認められなかったため、今後他の要因の検討を進める。

	FDOM 生成実験 I		FDOM 生成実験 II	
	PC	QU	PC	QU
日中の消光速度 (×10 ⁻³ R.U./13 h)	1.23	1.26	1.14	2.59
日中の生成速度 (×10 ⁻³ R.U./13 h)	1.00	0.98	1.19	1.10
生成速度 (×10 ⁻³ R.U./day)	0.59	n.a.	1.23	0.84

Table 1. 各 FDOM 生成実験で得られた FDOM_M 消光速度、生成速度

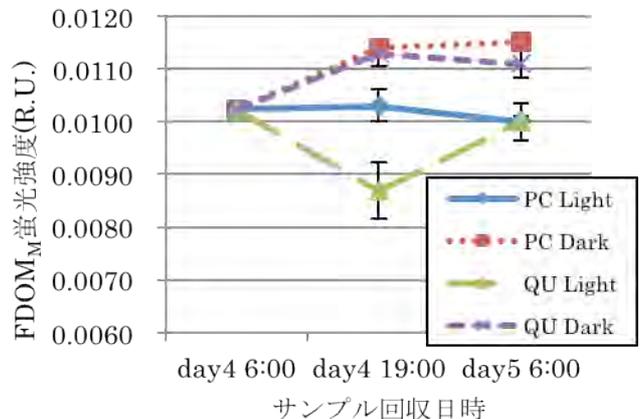


Figure 1. FDOM 生成実験 II (day4-5)における FDOM_M 蛍光強度の変化

下田沖における炭酸系の季節変動とその支配要因

松下 幼奈 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 濱 健夫 (筑波大学 生命環境系)

背景

海洋は大気中に放出される二酸化炭素の約 1/3 を吸収している。海水中の CO₂ は重炭酸塩、炭酸塩に変化する際に水素イオンを発生させ、それにより海水の pH が低下する海洋酸性化が近年問題となっている。産業革命以降、大気 CO₂ の増加に伴い、海洋表層の pH は約 0.1 低下しており、今世紀中には更に 0.3 程度の低下が予測されている。このような海水の pH 低下は、海洋の生態系や物質循環に影響を及ぼすと考えられ様々な研究が行われているが、その多くは現在外洋で行われている。沿岸域では淡水の影響、微細藻類の現存量の大きさ、大型藻類の影響など、外洋とは異なった環境で酸性化が進行していると考えられる。沿岸生態系への酸性化の影響を評価するためには、沿岸域に特徴的な炭酸系の動態を理解する必要がある。しかし、人為的な影響を評価するほどの精度を有した観測はまだあまり行われていない。そこで本研究では、沿岸域の炭酸系の動態とその支配要因を明らかにするため、下田大浦湾沖定点にて定期的に採水を行い、炭酸系のパラメータを高精度で測定した。

方法

2011 年 11 月 28 日から、筑波大学下田臨海実験センター近隣の大浦湾沖定点 (北緯 34° 38.951、東経 138° 57.010) にて、月 2 回の頻度で採水を行った。採水は 1、10、20、30 m の 4 層からニスキンボトルを用いて行い、その際 CTD センサーにより水温、塩分 (Salinity)、伝導度、クロロフィル a 濃度を同時に測定した。

溶存無機炭素 (DIC) と全アルカリ度 (TA) を測定するためのサンプルは、海水を 250 ml のガラス瓶に分取し、生物活性を止めるために飽和塩化水銀溶液を加えて保存した。また、採水した海水を粒子保持能 0.7μm の GF/F フィルターでろ過し、得られたろ液を溶存態有機炭素 (DOC)、フィルターを懸濁態有機炭素 (POC) のサンプルとして用いた。

DIC、TA は気象研究所にて、全炭酸・アルカリ度分析装置を用いて測定した。そして、計算プログラム CO₂SYS を用いて、得られた DIC、TA の値と、現場の水温、塩分の値から pH、pCO₂ の値を計算した。また、フィルター上に保持された POC は、元素分析計を用いて測定を行った。

結果・考察

観測地域の水温は 2 月に最も低くなり、それ以降は徐々に上昇した。特に 6 月以降は表層の温度が上昇しており、鉛直混合が起こりにくくなったことで、混合層も浅くなる傾向が見られた。

DIC は 2 月頃まで増加し、3 月以降は減少する傾向にあった。一方、POC やクロロフィル a 濃度は 3 月頃から大きく上昇していることから、DIC の減少は、春のブルームで植物プランクト

ンが増加し、DIC の取り込みが大きくなったためであると考えられる。また、2 月頃までの DIC 増加は、冬季の鉛直混合が活発化することにより、下層の DIC 濃度の高い水塊と混合したためと考えられる。pCO₂ も DIC と同様の季節変化を示した。対して pH は 2 月頃までは減少したが、3 月以降は増加傾向であり、DIC の変化に影響を受けていることが示唆される。POC、クロロフィル a 濃度は 7 月以降減少傾向であるため、今後 DIC は徐々に増加してくると考えられる。

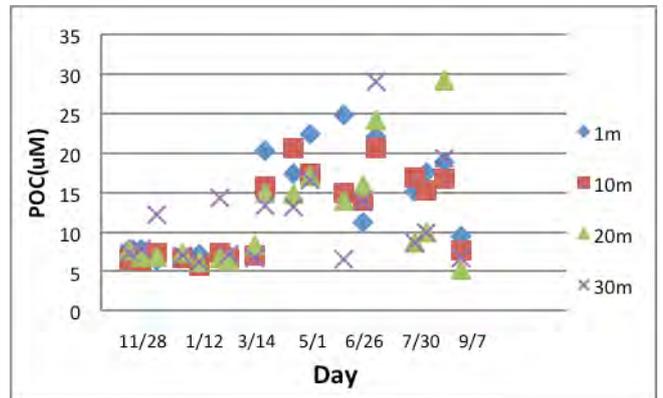
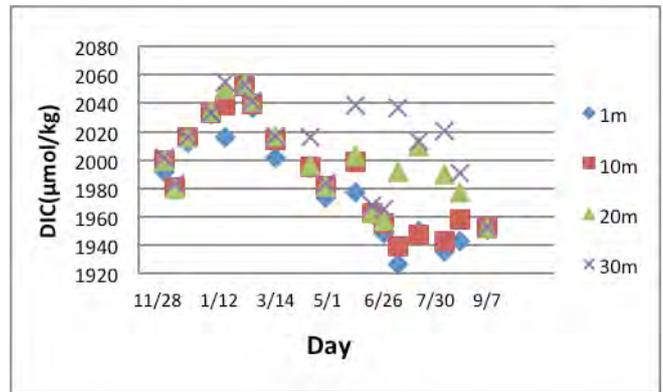


Fig.1 (上) 下田沖における DIC の時系列変化

Fig.2 (下) 下田沖における POC の時系列変化

今後の課題

今回観測された炭酸系の季節変動をより確かなものにするためには、引き続き観測を行い、同様のパターンを捉えることが望ましいと考えられる。また、今回は生物活性に関する測定を行っていないため、今後光合成生産量などを測定することで、生物活動と炭酸系の関係についてさらに解析を進める必要がある。

Wolbachia is Wolbachia and its circumstance

内海 邑 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 徳永 幸彦 (筑波大学 生命環境系)

【導入】

Wolbachia は *Rickettsia* に近縁な細胞内共生細菌であり、節足動物と線形動物に広く感染している。*Wolbachia* はミトコンドリアのように宿主の母親から子へと細胞質を通して垂直に伝わり、父親からの感染や他個体からの感染は知られていない。宿主の個体群中で感染拡大できるような *Wolbachia* は宿主の生殖様式を操作すること(生殖操作)が知られている。*Wolbachia* による生殖操作として、単為生殖化や雄殺し、感染個体-非感染個体間での細胞質不和合、雄宿主の雌化が報告されている。*Wolbachia* は生殖操作を通じて宿主の子の性比を偏らせたり、非感染個体の適応度を下げたりして、効率よく宿主個体群の中で感染を拡大している。

このように、*Wolbachia* は宿主の個体群中において効率よく感染を拡大するが、その感染経路については母-子間での垂直感染しか知られていない。しかし、*Wolbachia* は昆虫種全体の 65% 以上に感染していると推定されており、*Wolbachia* とその宿主の系統関係から水平伝播も繰り返し生じたと考えられているにもかかわらず、自然界において水平伝播がどのようにして行われているかはわかっていない。また、*Wolbachia* が非感染種へ新たに感染したときは、生殖操作が雄殺しから細胞質不和合へと変化したり、細胞質不和合が強くなったりすることが実験的に示されている。このため、*Wolbachia* における水平伝播の解明は、*Wolbachia* の感染がどのようにして多様な分類群へ拡大したのかを理解するだけでなく、生殖操作の機構を理解する上で重要である。また、このような垂直感染系における水平伝播の理解は、生物界全体に広く見られる真核-原核生物の内部共生機構に対して新しい知識を提供するものであろう。

本研究では、*Wolbachia* が非感染種に侵入したときの定着性に焦点を当てた。*Wolbachia* に感染している宿主から、*Wolbachia* 非感染の近縁種と抗生物質により *Wolbachia* を除いた宿主(元宿主)へ、人工的に *Wolbachia* を感染させ、非感染種と元宿主の感染成功率の比較を行った。これにより、1) *Wolbachia* は非感染種へ感染可能か、2) 元宿主と非感染種で感染成功率に差があるのかという問題に答えた。従来から、人工的な水平伝播の研究は行われていたが、そのほとんどは生殖操作に関する研究であり、水平伝播の仕組みは調べられてこなかった。

【材料と方法】

本研究にはコウチュウ目ハムシ科のアカイロマメゾウムシ *Callosobruchus analis* (*Wolbachia* 宿主) とヨツモンマメゾウムシ *C. maculatus* (非感染種)、抗生物質により人工的に *Wolbachia* を取り除いた *C. analis* (元宿主) を用いた。*C. analis* (宿主) の蛹から *Wolbachia* 抽出液を作製し、マイクロインジェクションにより *C. maculatus* (非感染種) と *C. analis* (元宿主) の蛹計 255 個体の体腔内に抽出液を注入した。宿主が羽化した後、*Wolbachia* の分子マーカーを用いた PCR から、感染宿主数を調べた。階層ベイズに基づいた統計モデルから、

MCMC 法により感染成功率の事後分布を推定した。これにより、非感染種と元宿主への感染成功率を比較した。

【結果と考察】

本研究では、1) 非感染種である *C. maculatus* に対して *Wolbachia* が感染できること、2) 非感染種に対する感染成功率の方が、元宿主に対する感染成功率よりも低いことが明らかになった (Fig. 1)。非感染種において、*Wolbachia* の人工的な感染が見られたことは、*Wolbachia* がコウチュウ目内で水平伝播できることを示す。また従来から、元宿主と非感染種間の進化的距離が遠いほど、非感染種に対する感染成功率は低下すると信じられてきたものの、これを示す先行研究はなかった。本研究で得られた結果は初めてこの予想を支持する。

先行研究との比較から、*Wolbachia* を注入する宿主の部位の違いが感染成功率の差の有無に影響している可能性が考えられる。本研究ではマメゾウムシの体腔への注入により宿主間での感染成功率に差が見られたのに対し、*Drosophila* における先行研究はその初期胚の細胞質へ注入し、宿主間での感染成功率に差が見られていなかった。*Wolbachia* は細胞内共生細菌であることから、体腔に注入された場合は、細胞内に注入された場合と異なり、宿主の免疫などを回避し、細胞内に侵入する必要がある。体腔への注入で宿主間における *Wolbachia* の感染成功率に差が見られたということは、*Wolbachia* の非感染種への感染において、このような免疫の回避や細胞内侵入に対する適応が重要であるということを示唆する。これをふまえ、*Wolbachia* が細胞侵入前過程に対して選択を受けているのかを実際に確かめる必要がある。今後は、新規宿主内で世代を経た後で同様の実験を行い、この宿主への感染成功率が上昇するか検証していく。

本研究と先行研究の比較は、非感染種に対する *Wolbachia* 定着機構での細胞侵入前過程の重要性を示唆した。このことから、*Wolbachia* は新たな宿主の免疫や細胞侵入に対して適応しながら、節足動物の多様な分類群を渡り歩いていったと考えられる。本研究が、非常に多様な節足動物が提供する変化に富んだ環境によって形作られた *Wolbachia* の柔軟な適応進化を理解する一助となることを期待したい。

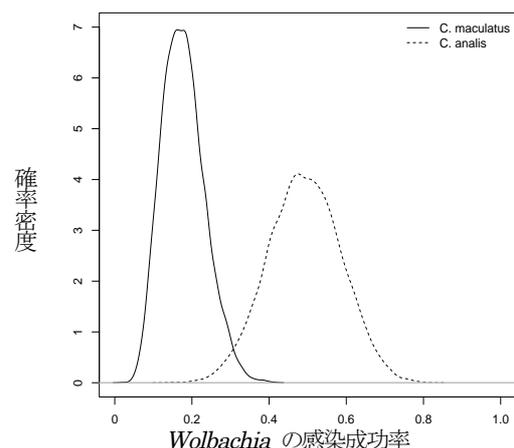


Figure 1: 非感染種(実線)と元宿主(破線)に対する感染成功率

アゲハ類において精子注入数に影響を与える有核精子の運動活性

武藤 直樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 渡辺 守 (筑波大学 生命環境系)

序 論

蝶類のオスは、核をもち卵と授精できる有核精子と、核がなく授精できない無核精子という2種類の精子を生産している。一方、蝶類のメスは、交尾中にオスから受け渡される精子などを含む物質を入れる交尾嚢と、精子を授精させるまで貯蔵しておく受精嚢という2種類の生殖器管をもち、オスは2種類の精子が含まれる精包というカプセル状の物質を交尾嚢へと注入する。したがって、精子は、メスに注入された後、精包から出て、交尾嚢から出て、受精嚢へ移動していかなければ卵に授精することができない。

オスが無核精子をわざわざ生産している理由について、これまでに多くの仮説が提出されてきた。その中に、無核精子は、有核精子が交尾嚢から受精嚢まで移動するのを助けるという説がある。もしそうなら、有核精子自身の活性が高い種は、無核精子の生産量を少なくしているかもしれない。そこで、本研究では、精子の活性と受精嚢に到達する精子数との関係を明らかにしながら、アゲハ類の精子生産戦略を考察した。

方 法

実験に使用したのは、メスの生涯交尾回数がどちらも約3回といわれるナミアゲハ (以下、ナミ) とクロアゲハ (以下、クロ) である。室内飼育し、羽化させた2日齢のオスを未交尾メスとハンドペアリング法によって強制的に交尾させた。

実験Ⅰ 交尾後のメス体内における精子移動

交尾させたナミのメスを、交尾直後と6時間後、24時間後に40倍の実体顕微鏡で解剖した。交尾嚢から精包を取り出し、精包内の有核精子束数を数えた。その後、直ちに、精子をサンプル管に移し希釈した。希釈液を10 μ lずつ6サンプル量り取り、100倍の光学顕微鏡を用いて有核精子と無核精子をそれぞれ計数し、希釈率から精子数を求めた。受精嚢内の精子数も、同様に算出している。

実験Ⅱ 精子移動数

交尾直後および24時間経過したメスをそれぞれ解剖し、実験Ⅰと同様に交尾嚢内および受精嚢内の両精子数を測定した。交尾直後の精包内の精子数を注入数、24時間経過したメスの受精嚢内と精包内で見出された精子数をそれぞれ到達数と残存数と定義した。また、注入数から到達数および残存数を引いた値を消失数とした。

実験Ⅲ 有核精子の回転活性

交尾終了後24時間経過したメスを解剖し、受精嚢を取り出し、凹字型で約1mmの深さの溝を作ったスライドガラスに乗せ、生理食塩水を一滴滴下した。受精嚢をピンセットで慎重に開き、精子を露出させ顕微鏡カメラで動画撮影した。撮影した動画はDippMotionPro 2Dで解析した。すなわち、有核精子は螺旋状になっているので、螺旋のピークの1つを特定し、回転運動することによるピークの移動距離とその間の時間から回転活性速度を算出している。

結 果

実験Ⅰ

ナミにおいて、注入直後の精包内で有核精子束は約63本見出された。しかし、6時間経過すると約3本まで減少し、24時間経過すると消失した。自由有核精子は、6時間の経過後に約7,000本出現したが、このとき既に60本の有核精子束が解け、約15,000本の自由有核精子となっていたはずである。したがって、その差の約8,000本の自由有核精子は受精嚢へ移動を開始していたと推定できる。24時間経過後の精包内には600本程度しか残存していなかった。無核精子は約273,000本注入され、6時間後は約150,000本、24時間後は約3,500本へと減少した。

受精嚢には、交尾後6時間で無核精子が到達し始めたが、有核精子は到達していなかった。24時間経過すると、受精嚢内には有核精子が約3,000本、無核精子が約10,000本数えられた。

実験Ⅱ

自由有核精子に換算すると、注入数はクロで約35,000本、ナミで約16,000本と、クロが2倍以上注入していることがわかった。一方、無核精子の注入数はクロで約160,000本、ナミで約270,000本と、ナミで多い結果となった。しかし、受精嚢に達した精子数は両種で違いは認められず、どちらも有核精子数は約3,000本、無核精子は約5,000本ほどであった。精包に残存していた精子数にも有意な差は無く、有核精子はクロで約1,000本、ナミで約600本、無核精子は前者で約2,000本、後者で約3,500本であった。有核精子の消失数は、クロでは約30,000本、ナミでは約12,000本となり、クロの方が多かった。無核精子は、クロで約150,000本、ナミで約260,000本が消失しており、ナミの方が多かった。

実験Ⅲ

クロの回転活性速度は、0.34 mm/s、ナミでは0.28 mm/sであった。この結果は、統計的に有意な差は認められなかったものの、クロのほうが活性の高い有核精子を生産していた可能性がある。有核精子長はクロで1,040 μ m、ナミで950 μ mであり、有意にクロの有核精子が長かった。無核精子は両種とも400 μ mほどで、差は認められなかった。

考 察

有核精子は束の状態では注入されるため、精包内で解けないと受精嚢に移動できない。したがって、注入直後から自由精子として存在する無核精子の方が移動を早く開始できるため、有核精子よりも先行して受精嚢に到達していたと考えられた。クロとナミを比較した結果から、有核精子の活性が高ければ無核精子の必要性が低くなるという仮説は満たせそうである。しかし、それぞれの種において無核精子を多く生産するコストと、活性の高い有核精子を生産するコストは未知数である。無核精子が有核精子の移動を助ける具体的な機構についても、未だ明確にされていない。今後は、同様に無核精子の活性も測定し比較検討すると共に、その機構についても解析する予定である。

温暖化処理が高山植物の葉に与える影響～かたち・はたらき・きせつはどうか～

金崎 健太 (筑波大学 生物学類)

指導教員：廣田 充 (筑波大学 生命環境系)

背景

地球温暖化は現在も進行中の現象であり、様々な生物への影響が懸念されている。特に高山植物はその影響を受けやすいと言われており、短期的には、形態、機能、およびフェノロジー (生物季節) の変化が報告されている。しかし、最も重要なのはこれらの変化を個別にではなく、複合的に見ることである。そうすることで、バイオマスの増減や生息域の変化といった長期的変化や温暖化に対する植物の応答機構の解明が可能となるからである。そこで本研究では、典型的な高山植物であるツツジ科の低木を対象に、実験的な温暖化処理によって高山植物がどのような影響を受けているのかを、形態、光合成、フェノロジーに着目して調べた。

実験内容

長野県木曾駒ヶ岳山頂付近 (標高約 2900 m) に設置されている温暖化実験区において、よく見られる 3 種のツツジ科低木を対象に実験を行った。この温暖化実験区には人為的に温度のみを上げる装置、オープン・トップ・チャンバー (以下、OTC とする) が設置されており、OTC 内外で約 1°C の温度差を生じさせている。この OTC は 1995 年の設置以降、今日まで継続して温暖化処理がなされている。OTC 内外に自生する 3 種のツツジ科低木ガンコウラン (常緑性低木)、ウラシマツツジ (落葉性低木)、ヒメクロマメノキ (落葉性低木) を対象に、以下の項目を調べた。

1) 形態

2012 年 8 月と 9 月に、ガンコウラン、ウラシマツツジ、ヒメクロマメノキの葉を OTC 内外からサンプリングし、FAA で固定した。現在葉の断面切片を作成し、断面構造の観察を行っている。

2) 光合成・呼吸特性

ガンコウラン、ウラシマツツジ、ヒメクロマメノキを対象に、2012 年 9 月に OTC 内外で IRGA センサーを用いた自作の閉鎖型チャンバーを用いて、CO₂ の濃度変化を測定した。得られたデータはソフトウェア「R」を用いて解析し、光合成速度や呼吸速度を算出した。

3) フェノロジー

落葉性低木であるウラシマツツジとヒメクロマメノキを対象に、OTC の内外に小型の自動連続撮影カメラ (GardenWatchCam, バイコム社製) を用いて、2012 年 6 月 21 日より葉の展葉から紅葉に至る過程を連続撮影した。本研究では、特に展葉と紅葉に焦点をあてて、得られた画像を Adobe Photoshop Elements 5.0 を用いて処理し、解析を行った。

結果・考察

1) 形態

現在観察中である。OTC 内外の 3 種の植物葉において、厚さや細胞のサイズについて比較していく予定である。

2) 光合成・呼吸特性

光合成・呼吸速度の計測に成功したガンコウランにおいて、OTC 内外で光合成・呼吸特性に大きな違いが見られた (図)。温暖化処理によって最大光合成速度が高くなり、呼吸速度が低くなった。さらに、光-光合成曲線の初期勾配で表される光利用率が、温暖化処理によって小さくなる傾向がみられた。また呼吸に関しては、温暖化処理により温度依存性が小さくなる傾向がみられた。これらの結果は、温暖化によって、温度変化や光変化に対する葉の応答特性が変化する可能性を示唆している。

また、最大光合成速度が高くなり、呼吸速度が低くなるという結果は、ガンコウランは、温暖化処理で効率のいい物質生産を行っている可能性を示唆している。このことは OTC 内のガンコウランのバイオマスの増大と関連があるかもしれない。

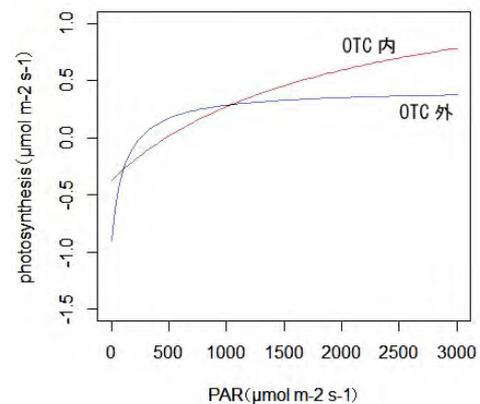


図. OTC 内外のガンコウランの光-光合成曲線

3) フェノロジー

展葉、紅葉ともに、2 種間で温暖化処理によるフェノロジーが異なることが確認された。

ヒメクロマメノキでは、温暖化処理で展葉・紅葉時期が共に 2～3 日早まった。一方でウラシマツツジでは、温暖化処理でも展葉の時期には変化が見られず、紅葉の時期が 3～5 日遅くなっていた。

温暖化処理によって、ヒメクロマメノキは同じ期間でもより早い時期から葉をつけて光合成を開始することが可能に、ウラシマツツジはより遅くまで光合成を続けることが可能になった可能性がある。このように、温暖化処理によるフェノロジー変化の種による違いは、競争といった種間関係、さらにはその結果としての生息域の変化にも影響を及ぼす可能性が考えられる。

草原の管理手法の違いで植物の芽生えから定着はどのように異なるか？

市川 美沙紀（筑波大学 生物学類） 指導教員：廣田 充（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

日本で草原を維持するには人による定期的な管理が必要である。管理にはいくつかの手法があるが、いずれも土壌水分、光条件、栄養状態などの劇的な変化（攪乱）を引き起こす。その結果、植物の出現種、個体数、成長量に変化し、草原が維持されている。管理手法の違いによる植生変化を観察することは容易だが、変化のメカニズムを明らかにすることは難しい。なぜならば、管理にともなう攪乱は我々の目に見える地上部の植生だけでなく、後の植生を形成するための、地下部の栄養体や埋土種子などにも影響を及ぼすからである。そのため、管理による植生変化のメカニズムを解明するためには、種子や栄養体における芽生えの由来にも着目した観察が必要である。

そこで本研究では、芽生え・成長・定着という草原成立の各段階に着目し、植生調査を行った。さらに、種子由来の芽生えの初期値となる、散布種子の定量を試みた。

方法

本調査は筑波大学菅平高原実験センター内の半自然草原で行った。ここでは2010年に刈草残置、火入れ、耕起の3種の管理を行った。それぞれを刈草残置区、火入れ区、耕起区とする。これら3つの区ではその後放棄している。一方、年1回9月に地上部植生を刈り取り、刈った植物体を運び出す管理を行う区も設けた。これを刈り取り区とする。これら4つの管理区で2012年5月から以下の4つの調査を行った。本研究では5月を芽生え期、9月を定着期とした。

1. 芽生えの由来・芽生え期、定着期に20 cm × 20 cm のコドラート内に出現した植物体を全て引き抜き、種子由来か栄養体由来かを調べた。
2. 植生の追跡・6月から9月間の各月、20 cm × 20 cm のコドラート内の植物種の確認および個体数を計測した。
3. 散布種子・8月から11月間の各月、各管理区の種子を集めるため、直径15 cm のシードトラップを土壌表面に設置し、植物種ごとに種子数を数えた。
4. 土壌物理化学特性・土壌表層の水分含有率、硬度、土壌三相、および炭素・窒素濃度を測定した。

結果・考察

全体の個体数は、刈草残置区、火入れ区、刈り取り区の順に多くなった。それらを由来と時期ごとに分けてみると、コドラート内の芽生え期の種子由来個体数は、耕起区で圧倒的に多く、刈り取り区、刈草残置区、火入れ区間に有意差はなかった (Figure 1a)。しかし、定着期の種子由来個体数は刈り取り区のみが有意に多いことが分かった (Figure 1b)。芽生え期から定着期までに、耕起区の個体数が激減し、刈り取り区でやや増加、刈草残置区および

火入れ区ではほぼ変化しないという傾向があった (Figure 1a,1b)。

栄養体由来個体については、芽生え期の個体数は、刈り取り区のみが有意に多く、刈草残置区、火入れ区、耕起区間に有意差はなかった (Figure 1c)。しかし定着期には全ての管理区間で有意な差は見られなかった (Figure 1d)。芽生え期から定着期までに栄養体由来個体数は刈り取り区でやや減少、火入れ区および耕起区でやや増加、刈草残置区ではほぼ変化しないという傾向があった (Figure 1c,1d)。

シードトラップで回収された散布種子数を管理区間で比較すると、8月から11月の合計種子数は耕起区が他の管理区よりも3倍程度多かった。さらに各管理区の種子を種子散布様式で分類すると、耕起区では重力散布種子の割合が特に高く、他の管理区では風散布種子の割合が高かった (Figure 2)。また、全ての区において、散布種子のほとんどが多年草の種子であった。

本研究によって、管理手法の違いは実生の総数のみならず、その由来（種子由来か栄養体由来か）の割合、さらには芽生え期から定着期までの間の実生の個体数の変化にも影響を及ぼすことが分かった。散布種子については管理手法の違いで種子数や出現種の割合が異なることがわかった。これらから、管理手法の違いは、種子・栄養体からの発芽、定着のしやすさに影響し、その結果として植生が変化することが示唆された。

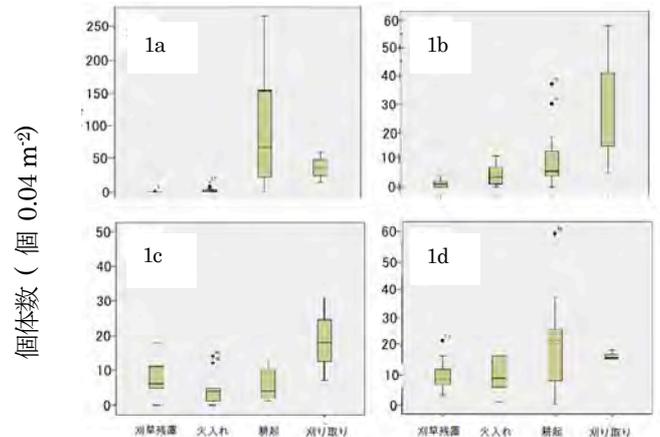


Figure 1 各管理の種子由来、栄養体由来個体数の変化

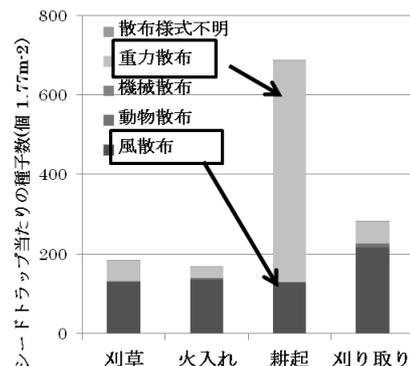


Figure 2 各管理区の散布種子数と散布様式の内訳

冷温帯成熟林における土壌呼吸の空間的不均一性とその要因

西村 貴皓 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 廣田 充 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

生態系は大気との間で CO₂ の吸収や放出を行なっている。これら CO₂ フラックスの中でも、植物体の地下部および土壌中の従属栄養生物の呼吸の合計である土壌呼吸は、生態系からの CO₂ 放出量の約半分を占める重要なフラックスである。そのため、多くの研究によって土壌呼吸の把握が行われてきた。しかし、土壌呼吸は空間的な不均一性が大きく、その正確な推定は困難である。このことから、生態系を特徴づける CO₂ フラックスである土壌呼吸量を正確に見積もるために、土壌呼吸の空間的不均一性の解明が必要である。そこで私は、成熟林を対象地として土壌呼吸の不均一性の評価とその要因の解明を目的とした。成熟した老齢な樹木が優占する成熟林においては、倒木等によって形成される樹冠の空いたギャップ構造が顕著であり、同一林内においても環境が大きく異なる。この特徴に着目し、植生を含む環境の不均一性と土壌呼吸の不均一性の関連に焦点を当てて研究を行った。

方法

長野県志賀高原カヤノ平に広がる成熟林を調査地とした。調査地は、樹齢 100 年から 300 年のブナ (*Fagus crenata*) が優占する成熟林であり、ギャップ-モザイク構造が顕著となっている。この林内に既に設置してある固定調査区 (100 m x 100 m, 1 ha) にて、下記の 5 項目の調査を行なった。

1. 土壌呼吸速度の測定

密閉可能な直径約 30 cm のポリプロピレン製の円筒を 10 m 間隔に格子状に計 121 個設置し、2012 年 7 月から月 1 回の頻度で土壌呼吸を測定した。測定方法は、円筒内に CO₂ 吸収剤 (ソーダライム) を一昼夜静置し、吸収剤の重量増加分から CO₂ の放出量を求めるソーダライム法を用いた (木部 & 鞠子, 2004)

2. 土壌呼吸に占める植物地下部の割合の推定

測定点の内の 6 地点において、塩化ビニルの板によって土壌を仕切り、植物の根の含まれない区画であるトレンチ区を設けた。トレンチ区と非トレンチ区の土壌呼吸速度を比較することで、土壌微生物のみの呼吸量と植物地下部の呼吸量の比率を推定した。

3. 土壌微環境の測定

土壌呼吸にとって重要な環境要因である、土壌水分量 (地表下 0-12 cm) および土壌温度 (地表下 5 cm) を測定した。また、採取した土壌の湿重と乾燥後の重量の比から、重量含水率を算出した。

4. 土壌有機物量の測定

各測定地点から土壌を採取し、3 日間風乾させた後、2 mm の篩にかけた。この土壌を、550°C の電気炉内に 4 時間置き、重量の減少率 (Loss of Ignition: LOI) を求めた。この減少率を用いて土壌中の有機物量を推定した。

5. 植生の樹冠構造の評価

植生構造の評価のため、2012 年 10 月下旬に調査区内の外周を除いた 81 地点において、魚眼レンズを装着したカメラを用いて全天写真を撮影した。各測定地点の真上における樹冠の開き具合を、全天写真中の空の面積の割合で定量化し、開空度とした。

結果・考察

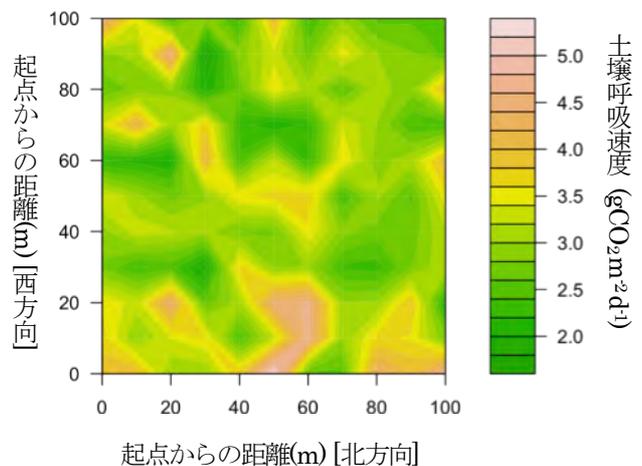
植物の成長期間における 121 地点の土壌呼吸速度の平均は 3.09 gCO₂ m⁻² d⁻¹ であり、測定値からは正規分布に近い頻度分布が得られたが、土壌呼吸速度は空間的にばらつく傾向がみられた (下図)。

土壌有機物量は、LOI の最大値が 0.72、最小値は 0.22 と高い不均一性が観測された。植生構造についても、開空度の最大値が 98.7%、最小値が 34.0% と極めて高い不均一性が観測された。これらの結果から、やはり成熟林では同一林内においても環境が大きく異なることが確認された。

土壌呼吸と各地点の土壌環境と植生の関係を調べたところ、土壌有機物量と呼吸速度の間に相関関係は見られなかった。一方、林冠の開空度の増加に伴って土壌呼吸量はわずかに減少する傾向が見られた。さらに、開空度が高い地点において LOI が低い傾向も明らかになった。

トレンチ区と非トレンチ区の比較から、土壌呼吸に占める植物地下部の呼吸量の割合は約 11% と算出された。温帯の森林において根の呼吸量が占める割合は 33 から 50% とされており (Raich & Tufekcioglu 2000)、先行研究よりも低い値となった。

以上の結果より、植生の不均一性は土壌呼吸の不均一性に影響を与えるが、その主な要因は植物地下部の呼吸量の大小ではなく、土壌有機物や環境の変化を介した土壌微生物の呼吸量の変化である可能性が示唆された。



調査地内の土壌呼吸速度の空間的不均一性

カリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* における寄主の餌によるパフォーマンスの違い

藏満 司夢 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 戒能 洋一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

チョウ目をはじめとする多くの植食性昆虫にとって捕食寄生者は最大の天敵であり、捕食寄生者による寄生を免れることは重要な課題である。寄生を免れる方法としては、寄生者に見つからないあるいは寄生されにくい場所に身を隠す物理的な防御 (Amano et al. 2008) や、体内に侵入した捕食寄生者を包囲化するなどして殺してしまう免疫的な防御システム (仲井ら, 2009) などが知られている。

これらの他の防御システムとして、寄主植物の2次代謝産物等を体内に取り込むことでそれを利用して捕食寄生者への防御に利用している例がいくつか示されている (Ode et al. 2004)。この防御機構は植物の持つ2次代謝産物等の物質に依存するとされるが、その物質の種類や量は植物種ごとに異なる。そのため広食性の植食者において、利用する寄主植物の種類によって寄生者による寄生成功率が異なるという現象が生じることが一部の種で知られている (例えば Singer & Stireman, 2003)。この事実は、一部の植食性昆虫が持つ性質である広食性についてその利点の説明の一つになりうると考えられている (Singer & Stireman, 2003)。ただし、この現象について実験的に示した例は少なく、また各植物-植食者-捕食寄生者の系においてどのような植物成分が寄生に対する防御の効果をもたらしているのかを突き止めた例もほとんどない。

これらの状況を踏まえ、本研究では植食者の寄主利用植物が寄生者の寄生成功率に影響を与えていることを実験的に示すことを目的に、これまでに報告の無いアワヨトウ、カリヤコマユバチと数種の植物といった系を用いて実験を行った。本研究では明確な宿主特異性を有する捕食寄生者を用いる点が新規的である。また、アワヨトウ-カリヤコマユバチの系は比較的多くの研究で利用されており、行動学や生理学的な知見が多く蓄積されているため、研究を行う上で背景となる情報を得やすいこともこの系で研究を行う利点である。

材料

1. 植食者

・アワヨトウ *Mythimna separate* (チョウ目ヤガ科)

トウモロコシやイネ、ムギをはじめとするイネ科植物の葉を主な食草するが、野外環境において大発生するなどして個体密度が高くなった場合などにマメ科やアブラナ科などの植物を寄主として利用することが知られている広食性の植食者である。実験には筑波大学応用動物昆虫学研究室で長年継代してきたものを用いた。

2. 捕食寄生者

・カリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* (ハチ目コマユバチ科)

アワヨトウ (チョウ目ヤガ科) の2-6齢幼虫のみに寄生する多寄生性内部幼虫捕食寄生蜂である。同じく、実験には筑波大学応用動物昆虫学研究室で長年継代してきたものを用いた。

3. 植食者の餌

- ・シルクメイト 2M (人工飼料, 日本農産工業株式会社)
- ・トウモロコシ *Zea mays*
- ・イネ *Oryza sativa*
- ・オオムギ *Hordeum vulgare*
- ・ダイコン *Raphanus sativus*
- ・インゲンマメ *Phaseolus vulgaris*

方法

まず各植物がアワヨトウの成長に与える影響を調べるため、人工飼料を与えて育てたアワヨトウの幼虫の餌を3齢1日目から各植物の葉に替えて個別飼育した。その後幼虫の生存率、蛹重量、羽化までの日数を記録した。また、餌を替えるタイミングを4齢1日目、5齢1日目にずらして同様の実験を行った。

次に、各植物がカリヤコマユバチの寄生成功率に影響を調べた。まず人工飼料を与えて育てたアワヨトウの5齢1日目の幼虫に対して交尾済みで産卵経験のないカリヤコマユバチのメス1頭を寄生させた。次に寄生されたアワヨトウに各植物の葉を餌として与え、カリヤコマユバチの寄生成功率や羽化数、羽化までの日数、アワヨトウの羽化率などを記録した。なお、実験に用いた全ての昆虫は25°C16L8Dの環境下で飼育した。

結果と考察

予備実験において、未寄生のアワヨトウ幼虫の餌を3齢1日目、4齢1日目から替えた場合は、インゲンマメとダイコンを餌として与えたグループの生存率が10%を下回る結果となった。そのため寄生蜂の寄生成功率を比較するには適さないと考え、寄生・未寄生の双方の実験においてアワヨトウの餌は5齢1日目から替えて実験を行った。この時未寄生のアワヨトウの生存率はいずれの植物においても30%を超え、アワヨトウの生存率はトウモロコシ、イネ、オオムギ、インゲンマメ、ダイコンの順に高かった。一方でカリヤコマユバチの寄生成功率にも違いが見られ、トウモロコシ、オオムギ、イネ、インゲンマメ、ダイコンの順に高かった。またアワヨトウ、カリヤコマユバチ共に成長に要する時間が植物によって違うという結果も得られた。このことから食草の違いがカリヤコマユバチの寄生成功率に影響を与えることが示唆された。

今後の展望

上記の寄生成功率の差異の原因を明らかにするために次の実験を行う予定である。この差異の原因の一つとして植物中の2次代謝産物の違いが考えられる。そこで今回寄生成功率が低くなった植物が持つ2次代謝産物の中から候補となる物質に見当をつけ、それを人工飼料中に混ぜてアワヨトウに与えカリヤコマユバチの寄生成功率を比較することで検証を行いたい。

Chelonus inanitus における寄主・非寄主に対する反応の違い

高谷 優那（筑波大学 生物学類） 指導教員：戒能 洋一（筑波大学 生命環境系）

背景と目的

安定した食料生産を生み出すために害虫の防除は重要な問題である。有機合成農薬の乱用は野生動物、環境へ影響を及ぼし、害虫の抵抗性を高めてしまうといった問題も報告されている。この問題を解決するために、生物的防除を利用することは効果的であると言えるだろう。生物的防除に関する研究では、農作物の害虫に寄生する捕食寄生性昆虫を用いた例が多く報告されている。捕食寄生性昆虫に寄生され寄主となった昆虫は死亡する。捕食寄生性昆虫が農作物の害虫に寄生することで、被害を軽減できる。害虫やその捕食寄生性昆虫の生態を研究することが生物防除を効率よく低リスクで行うために必要不可欠である。

Chelonus inanitus は単寄生・内部寄生性の卵・幼虫寄生蜂である。生息地はエジプト、ヨーロッパ、イスラエルであり、多くのチョウ目昆虫の卵に産卵する。*C. Inanitus* に関する論文の多くは幼虫の生態や生理についてのものが多いため、成虫を生物的防除の資材として研究した例は少ない。本研究では寄主および非寄主の卵塊の抽出物を使用し、*C. Inanitus* がそれらの化学刺激に対してどのように反応するかを調べた。

材料と方法

C. inanitus ハチ目コマユバチ

東京農工大学により提供され、筑波大学の応用動物昆虫研究室で累代飼育した個体を用いた。実験には、日齢2～7日の未交尾のメスを用いた。成虫には蜂蜜を与え、実験及び飼育は16L・8D明暗周期で行った。

ハスモンヨトウ

本実験では寄主として、筑波大学で累代飼育したハスモンヨトウを用いた。ハスモンヨトウの幼虫には人工飼料のシルクメイト2M（日本農産）を与え、実験及び飼育は16L・8D明暗周期で行った。

実験では、寄主及び非寄主の卵塊10mgに対してエタノール40mlを用いて抽出液を作った。ガラスシャーレに10×10mmのろ紙を置き、その上に置いたろ紙へ抽出液2mlを処理し乾燥させた。その後ガラスシャーレ内に*C. inanitus*のメスを一頭放し、メスの行動をそれぞれ観察した。メスが対象に接触して触角を振るわせる行動（触角による探索行動）と産卵管を挿入する試行を行った時間をメスを放してから15分間記録した。コントロールとしてエタノールのみを同量処理したものをを用いた。

結果と考察

今後これらの実験を行い結果を報告する。

菅平高原実験センター周辺の双翅目相（昆虫綱）

加藤 大智（筑波大学 生物学類） 指導教員：町田 龍一郎（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

双翅目は昆虫綱で最も繁栄している完全変態類の一群である。現在までに157科約15万種が記載されており、鞘翅目、鱗翅目、膜翅目に次いで種数が多いとされている。しかしながら、双翅目の分類学的研究はこれら3目と比べて大幅に立ち遅れており、推定種数は鞘翅目に匹敵する35万種に上るとされ、潜在的多様性の高さが指摘されている(Gaston, 1991)。

双翅目全体をみると、熱帯雨林のような温暖湿潤な環境から砂漠や雪上などの過酷な環境まで広く分布するほか、脊椎動物や節足動物などに寄生するものなど、その生態・生活史の多様性は極めて高い。したがって、農業害虫や衛生・不快害虫として人間に不利益を及ぼすものや、送粉者や生物農薬として活躍するものなど、人間の生活に密接に関わる種も数多く存在する。双翅目の分類学的理解は応用の面においてもたいへん重要である。

以上の背景から、私は、双翅目の分類学的研究を志した。その第一段階として、卒業研究では双翅目の分類学的研究がほとんどなされていない、菅平高原の双翅目相解明を目指し、筑波大学菅平高原実験センター周辺の双翅目の検討を行った。

方法

調査・採集は筑波大学菅平高原実験センター構内を中心に行った。菅平高原実験センターは標高1,250–1,350 m、年平均気温約6°Cの亜寒帯気候で、12月から4月にかけて積雪する。センター構内は、多様な樹木が植栽されている樹木園、ススキ草原、アカマツ林、大明神沢が流れる夏緑広葉樹林に区分される。

採集は2012年3月より開始し、主に樹木園、夏緑広葉樹林において捕虫網によるルッキング、スウィーピングで週3回程度実施し、採集と採集の間で標本作成、同定を行った。

結果・考察

合計1,946個体を採集し、89科約950種を確認した（平嶋・森本, 2008の体系に基づく）。これらの中には日本新産2科（Acartophthalmidae、ヒゲナガシヨウジョウバエ科）および日本新産3属（キノコバエ科 *Azana* 属、ヒメホソバエ科 *Leiomyza* 属、チーズバエ科 *Amphipogon* 属）5種が含まれていた。Acartophthalmidae の *Acartophthalmus nigrinus* はチーズバエ科の種と同様に5月下旬に発見したニホンカモシカの死体周辺で採集できたため、死肉により効率的に採集できる可能性がある。採集された双翅目の中で、ガガンボ上科、クロキノコバエ上科、オドリバエ上科、ハナアブ上科に属する種が多くを占めており、山地性の種が多く含まれていた。双翅目相は5月後半から6月後半にかけて最も多様化する。積雪が始まる12月からめつき

り数が少なくなり、1月に入るとほとんどは姿を消して、ユスリカ科、ヒメガガンボ科、ガガンボダマシ科、トゲハネバエ科、ノミバエ科などに属す、冬期に出現が限られる種が優占して採集されるのみである。本研究で作成した採集リスト、一部の標本とともに菅平高原実験センターに寄贈した。

今回は捕虫網の届く範囲のみの調査・採集であった。樹上性の種やトラップでより効率的に採集できる種は十分に採集できていないものと思われる。また、今回の調査・採集は菅平高原実験センター構内のごく一部をカバーしたものであり、実際の生息種数は数倍に及ぶものと考えられる。



図1 左: *Acartophthalmus nigrinus* (Acartophthalmidae)
右: *Champichoeta* sp. (ヒゲナガシヨウジョウバエ科)

参考文献

- Gaston, K.J., 1991, The Magnitude of Global Insect Species Richness. *Conservation Biology*, 5, 283-296.
平嶋義宏・森本桂 (監修) (2008) 新訂原色昆虫大図鑑第3巻、北隆館, 654 pp.

ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* (Kolbe) の発生学的研究

(昆虫綱・シロアリ目・ミゾガシラシロアリ科)

網嶋 美智代 (筑波大学 生物学類)

指導教員：町田 龍一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

有翅昆虫類は昆虫類の約 99%を占めるグループで、旧翅類と新翅類に大別される。その新翅類は昆虫類の約 98%を占める巨大なグループであり、多新翅類、準新翅類、貧新翅類(完全変態類)の 3 群からなる。この 3 群の中で最も祖先的なグループが 11 目からなる多新翅類であり、新翅類の初期進化に関わる重要なグループである。しかしながらその分岐は非常に深く、また、爆発的な初期放散を遂げたことにより、目間の系統関係を理解するのは非常に困難とされてきた。

網翅類(=カマキリ目+ゴキブリ目+シロアリ目)は、こうした多新翅類において唯一その単系統性が広く支持される 1 群である。網翅類内の系統関係については長く議論が続けられてきたが、近年の比較形態学的研究および分子系統解析ではシロアリ目とゴキブリ目の近縁性を認め、この 2 目を Blattodea という 1 群とする傾向が強い。しかしながら、Blattodea 内の系統関係は議論が定まっておらず、シロアリ目はしばしばゴキブリ目の内群とされるなど、特にシロアリ目の系統学的位置付けが問題視されている。

そこで私はこの系統学的問題に対し、比較発生学的な視点からアプローチしたいと考え、本研究のテーマとした。シロアリ目の発生学的研究はこれまでいくつか報告されてきたが(e.g., Knowler, 1900; Geigy & Striebel, 1959; Striebel, 1960)、科間での研究例の偏りや、知見が断片的であるといった問題を抱えている。以上のような背景から、私はシロアリ目全科の比較発生学的研究を行うことを最終的な目標とし、今回、その第一歩としてミゾガシラシロアリ科のヤマトシロアリの発生学的研究に着手した。

材料・方法

ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* (Kolbe) を材料に発生学的研究を行った。採集は長野県上田市菅平高原と茨城県筑波大学構内にて行い、25°Cのインキュベーターで飼育した。得られた卵は Carl 液(エタノール:ホルマリン:酢酸:DW=15:6:2:30)で一昼夜固定し、70%エタノールで保存した。保存卵は 30%エタノールに移し DAPI で染色した後、蛍光実体顕微鏡下で胚発生の概略を観察した。

また、同様の方法で固定した卵をアルコールシリーズで 100%まで脱水し、第 3 プチルアルコールを介して凍結乾燥、金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡で卵構造を観察した。

結果・考察

卵(図 1)は淡黄色、長径約 500 μm の回転楕円体である。卵後極よりの卵腹面に 5~15 個の漏斗型をした卵門(図 2)が観察される。卵期は 25°Cで約 30 日であった。

小さな胚域が卵後極よりの卵腹面に形成され、その中央部が陥

入することにより袋状の胚が形成される。やがて胚は尾部方向へと伸長、卵の背面に位置し、胚軸は逆転する。胚は分節、付属肢を発達させながらさらに伸長し最長期胚となる。そして、胚は後端で屈曲し卵黄内に沈み込み、そこで一定期間成長する。その後、胚反転が起こり、胚軸を逆転させながら胚は再び卵表に現れる。胚は前極に向かって卵腹面を移動、卵腹面中央に位置して胚反転が完了する。胚反転を完了させた胚は、さらに付属肢を発達させ成長を続け、やがて卵内で胚軸を中心に 180 度回転する。この結果、胚の背腹軸は形成時の背腹軸と正反対になる。その後背閉鎖が進行し、やがて孵化にいたる。

以上がヤマトシロアリの胚発生の概略であるが、他のシロアリ類に関する先行研究の結果ともよく合致するものであった。そこでシロアリ目の胚発生を他の網翅類と比較すると、網翅類の中では胚反転の様式に関して大きな違いのあることが分かる。すなわち、シロアリ目の胚反転は胚軸の逆転を伴う大規模なものであり、ゴキブリ目のゴキブリ亜目の胚反転は同様の様式である。一方、カマキリ目とゴキブリ目のオオゴキブリ亜目の胚反転は胚軸の逆転を伴わないものである。すなわち、網翅類は胚反転の様式で 2 タイプに分けることができる。この胚反転における違いが系統を反映している可能性もあるであろう。

今後、引き続きヤマトシロアリのより詳細な発生学的研究を進めると同時に、他の科のシロアリ類の研究にも取り掛かりたい。



図 1. ヤマトシロアリの卵

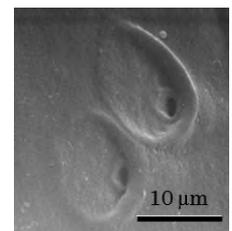


図 2. ヤマトシロアリの卵門

引用文献

- Geigy, R. & H. Striebel (1959) Embryonalentwicklung der Termiten *Kaloterme flavicollis*. *Experientia*, **15**, 474-475.
- Knowler, H. (1900) Embryology of a termite (*Eutermes rippertii*). *Journal of Morphology*, **16**, 505-588.
- Striebel, H. (1960) Zur Embryonalentwicklung der Termiten. *Acta Tropica*, **17**, 193-260.

低強度の塩ストレス処理による耐塩性遺伝子組換えユーカリ評価方法の開発

石川 絵里 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

近年、地球規模での環境変動、およびそれに伴う森林面積減少が引き起こす二酸化炭素収支の悪化や耕作可能な土地の減少、その結果としての温暖化の促進や食糧不足問題が深刻化することが危惧される。そこで、この問題の解決策の一つとして、半乾燥地や塩害地でも植林可能な遺伝子組換え樹木の開発・実用化が期待されている。本研究では、以前から植生限界地での植林を目標とし、遺伝子組換え技術を用いた環境ストレス耐性樹木の開発・評価に関する研究を行っている。本研究が実験に用いている樹木は、早生樹種であるユーカリである。ユーカリは産業上重要な樹木であるため、植林するにあたってかなり有用性があると考えられる。また、ユーカリは日本に近縁野生種がないため、他の植林木と比べて周辺生態系への遺伝子流動等の環境リスクも低いと考えられる。しかし、実際の塩害地を想定した場合、塩存在下で持続的に成長する形質がより重要になると考えられる。そこで本研究では、新たに低強度の塩ストレスをユーカリに与えるための塩処理方法の検討および、本条件で栽培した際の成長量による耐塩性評価方法の開発・検討を行った。

材料と方法

1. 植物材料

異なる耐塩性遺伝子を導入した遺伝子組換えユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) 9 系統及び、非組換え体 2 系統 (CML2, cam6) を植物材料とした。遺伝子組換え体はいずれも共同研究先の日本製紙 (株) で作出されたもので、その内訳は塩生土壌微生物 (*Arthrobacter globiformis*) 由来の *codA* 遺伝子導入系統を 4 系統 (A1, A2, A10, B25)、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) 由来の *RBP* 遺伝子導入系統を 3 系統 (R1, R4, R10)、マングローブ (*Bruguiera sexangula*) 由来の *mangrin* 遺伝子導入系統を 2 系統 (*man15*, *man40*) である。まず、日本製紙で生産した *in vitro* 苗を栽培室 (閉鎖系) で馴化した後、特定網室で直径 10.5 cm の黒丸ポットに移植し、2 ヶ月以上の馴化を行った。馴化後、高さを基準に通常灌水と塩水処理の 2 つのグループに分け、耐塩性評価試験を開始した。

2. 耐塩性評価試験

特定網室で馴化した植物を 70mM NaCl 水溶液を底面吸水で与え栽培し、系統間、および、水道水を底面吸水した対照区との間で成長量を比較することで、耐塩性を評価した。塩処理は、2012 年 5 月 9 日から 2012 年 10 月 24 日まで 24 週間、週 3 回実施した。塩処理による土壌中の塩環境を評価のため、灌水の度に土壌の電気伝導度 (EC 値) を測定した。塩処理期間中は、およそ 1 週間毎に樹高および基部直径を計測した。また、試験終了後の乾燥重量を計測した。これらの測定値から各個体のバイオマス量および成長量、成長速度を算出した。

結果と考察

塩処理条件

実験開始から約 1 ヶ月後、塩水処理区の土壌の EC 値が 8~10 ms/cm 程度で安定し、この状態を実験終了時までのおよそ 20 週間に渡って維持することができた。これは、比較的塩害に強い植物でも塩ダメージが出始める塩濃度である。この条件の下植物を栽培したところ、いずれの系統もほぼすべての個体が生き残った。このことから、本研究で行った塩処理条件は、塩害地で育成するという観点からユーカリ (*E. camaldulensis*) の耐塩性を評価するにあたって適切な実験方法であると考えられる。

評価方法の開発

各系統のバイオマス量 (基部直径×基部直径×高さ) の経時の変化を見ると、いずれの系統も塩処理条件下での成長量の低下が見られたが持続的に成長を続けた。より詳細に成長の比較を行うために、処理区間・系統間で最終的なバイオマス生産量を比較した。バイオマス容積の最終値を比較したところ、いずれの系統でも、塩処理条件下でのバイオマス量が通常灌水に比べて低下していて、特に非組換え体での低下が著しかった。絶対成長量では、*RBP* 導入系統である R4, R10 以外の組換え体系統で非組換え体に比べて塩ストレス下でのバイオマス生産が向上していることが分かった。特に *codA* 導入系統が、塩処理条件下でも非組換え体と比べて良好な成長を示すことが分かった。しかし、塩処理条件で良好な成長を示した系統は、総じて塩処理開始時の個体サイズが大きい傾向があった。このため、植物サイズを考慮するために相対成長量を算出することにした。絶対成長量を塩処理開始時のバイオマス量で割った値を相対成長量として比較したところ、*mangrin* 遺伝子導入系統である *man40* 系統は初期サイズの 2.7 倍であった。それに対し *man40* 以外の系統では、いずれも平均で初期サイズの 1.6 倍程度であった。このことから、*mangrin* 遺伝子は、低強度の塩ストレスに対する耐性の付与に関して優れていることが示唆される。また、*mangrin* 遺伝子導入系統は、塩処理開始の早い段階から下方の成熟した葉を落とすという特徴が確認された。現在、ユーカリの形質転換は種子由来の胚軸を対象として行っているため、今の技術では系統ごとに遺伝的背景の差が生じる。したがって、この遺伝的背景が植物の耐塩性に影響することを考慮する必要がある。例えば、今回使用した組換え体系統のもととなった非組換え体の耐塩性試験をして、宿主の元来の耐塩性を評価する必要があるだろう。今後耐塩性試験についての結論を出すには、今回開発した耐塩性評価法での再現性を確認しなくてはならない。本耐塩性評価法は、不毛な土地での産業植林や環境植林に適した環境ストレス耐性ユーカリの選抜に有効であると考えられる。今後、選抜されたユーカリに対して適切な環境リスク評価を行うことで、半乾燥地や塩害地での実用化を果たし、地球温暖化や食糧不足といった現代が抱える問題の解決策となることが期待される。

mangrin 遺伝子を導入した環境ストレス耐性バレイショの作製と評価

古矢 加奈 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

背景

地球温暖化など、環境悪化が進行している今日、深刻な水不足に陥る地域が増加している。地下水の過度な汲み上げによる地下水位の低下や、不適切な灌漑により地表への塩類集積が起り、植物が生育できない土地が増加している。これに対して、遺伝子組換え技術を用いた環境ストレス耐性の付与は、塩類集積地の緑化につながる有効な手段の一つであると考えられる。

先行研究により、マングローブより単離された *mangrin* 遺伝子が植物に耐塩性を付与することが報告されている (Yamada et al 2002, Yu et al 2013)。そこで、食糧・工業製品として用いられているバレイショ (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) に *mangrin* 遺伝子を導入し、環境ストレス耐性遺伝子組換えバレイショの作製を試みることにした。あわせて、作製された遺伝子組換えバレイショに塩ストレス耐性評価試験を行う。

材料と方法

1. 材料

バレイショは MS 固形培地上で 25°C (Murashige and Skoog 1962)、16 時間明期、8 時間暗期の光条件下で培養した。アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* LBA4404 株) に、*mangrin* 遺伝子を含むコンストラクト (東京農工大学より譲渡、pAB7113-mang: 図 1) を導入したものを遺伝子導入に使用した。

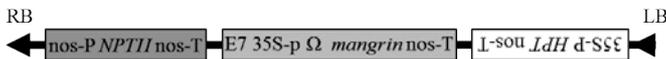


図 1: pAB7113-mang の構成図

pBI101 の RB-LB 間にある β -Glucuronidase を E7 ~ 35S-pro ~ Ω ~ *mangrin* 遺伝子に置き換え、その LB 側に 35S-pro ~ *HPT* 遺伝子 ~ Nos-ter を逆向きに加えたものである。

2. 遺伝子組換えバレイショの作製

バレイショの葉柄を除いた葉、及び、脇芽を含まない節間を 1 cm 程度に切断し、pAB7113-mang を保有するアグロバクテリウムに感染後、共存培地にて 25°C、暗条件下で 2 日培養した。その後、除菌培地にてカルスの形成が確認されるまでの数日間を 25°C、暗条件下で培養した。形成されたカルスは再分化培地にて 25°C、暗条件下で培養を行った。カルスは 2 週間毎に新しい培地に継代し、カルスが枯死するまで培養を継続した。得られた再分化個体は切り出し、材料植物の培養と同じ条件で培養した。

3. 導入遺伝子の確認

得られた再分化個体に対し、2 種類のアグロバクテリウム残存性試験を実施した。すり潰し法では 500 μ l の YEB 液体培地中で葉を 1 枚すり潰し、ミラクロスで濾過し、50 mg/L Rifampicin の入った YEB 固体培地に 100 μ l まく。振盪法で

は、1 mL の YEB 液体培地に葉を 1 枚入れて 1 時間振盪し、50 mg/L Rifampicin の入った YEB 固体培地に 100 μ l まく。その後、28°C・暗所で 3 日間培養を行った。これにより、アグロバクテリウムの除菌を確認した。次に、植物への遺伝子導入を確認するため、簡易 SDS 法により DNA を抽出し、Genomic PCR により *mangrin* 遺伝子の導入を確認した。

4. 塩ストレス耐性評価試験

植物の茎頂を 1 cm の大きさに切り、塩含有培地 (0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl) で 4 週間培養した後、地上部の長さや根の本数を測定した。1 区画 5 本の NT を使用して条件検討を行った結果を図 2 に示す。非組換え体 (NT) の地上部の長さが約 1/2 になった 50 mM と根がほぼ生えなくなった 150 mM を組換え体の耐性評価試験条件とした。

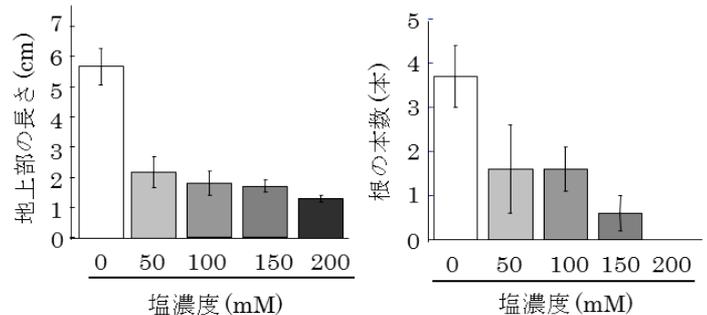


図 2: 塩に対する NT の成長変化

結果と考察

現在までに、17 系統の遺伝子組換えバレイショが作製された。これら遺伝子組換えバレイショに塩ストレス耐性評価試験を行ったところ、50 mM NaCl 培地での成長は NT に近いものの、150 mM NaCl 培地で M20、M26、M27、M33 で発根が認められたことから、この 4 系統は耐塩性を持つと考えられる。

参考文献

- Yamada A, Saitoh T, Mimura T, Ozeki Y (2002) Expression of Mangrove Allene Oxide Cyclase Enhances Salt Tolerance in *Escherichia coli*, Yeast, and Tobacco Cells. *Plant and cell physiology* 43: 903-910
- Yu X, Kikuchi A, Shimazaki T, Yamada A, Ozeki Y, Matsunaga E, Ebinuma H, Watanabe KN (2013) Assessment of the salt tolerance and environmental biosafety of *Eucalyptus camaldulensis* harboring a mangrin transgene. *Journal of Plant Research* 126: 141-150.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

グローバル化のもとで学術研究に対応した生物材料譲渡契約書の検討

中山 朋美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 渡邊 和男 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

従来、生物学研究において、研究者どうしの研究材料の提供や交換は比較的自由に行われてきた。材料譲渡の自由が学問や産業の発展に貢献してきたともいえる。しかし、今日では所有権と成果の担保のために研究材料の譲渡は契約書に基づいて行わなければならない。例え学術研究が目的であったとしても例外ではない。研究材料譲渡の際に、提供者と受領者の合意事項として、権利の所在や使用条件・利益分配等について明文化したものがMTA(Material Transfer Agreement: 材料譲渡契約書)である。研究者はMTAの条件に基づき研究・研究発表・研究成果の利用を行わなければならない。MTAの目的は提供者・受領者双方の権利保護と交渉の簡易化、そして将来起こり得る問題を未然に防ぐことである。現在もっとも一般的に使われているMTAとして、UBMTA(Uniform Biological Material Transfer Agreement)が挙げられる。これは米国のNIH(National Institute of Health)とAUTM(Association of University Technology Manager)が生物遺伝資源の材料譲渡に使用する統一のMTAとして作成したものである。米国をはじめ、多くの海外大学・研究機関で、学術目的の材料譲渡におけるスタンダードになりつつあるといえる。一方このUBMTAが生物多様性条約(CBD: Convention of Biological Diversity)に対応しているとは言えず、MTAの国際条約対応は課題として挙げられている。先行研究として、UBMTAと日本国内の大学・研究所で使用されているMTAを比較し、それぞれの条項の有無が調査されている。その結果をもとに、条項の取捨選択、生物遺伝資源だけではなく広く生物資源を対象として利用できること、グローバル化と諸国際法へ対応することを目指した統一のMTAフォームを作成することにより、材料譲渡における問題を解決できると考えられる。本研究ではグローバル化に対応した統一のMTAフォームを作成することにより、現在抱えているMTAの問題点を解決することを目的とする。そして統一のMTAフォームが使用されることで、材料譲渡の面から生物学研究の発展・促進や研究者の権利保護に繋げたい。

調査

1) MTA間の比較

a. UBMTA, BMTA, MTAハンドブックなどMTA関連の媒体に記載されている条項を整理し、一覧としてまとめた。

b. 生物多様性条約などの国際条約と対応させること、生物遺伝資源だけではなく生物資源全般を対象とすることを目的に、条項・表現の取捨選択を行った。

2) グローバリゼーションに対応した新たな生物資源の材料譲渡契約書の作成

日本国内だけではなく、国際条約に対応することにより世界各国で使用可能な生物資源の材料譲渡契約を新たに作成する。必要な

条項を並び替え体裁を整え、英語版も作成することによりuniversal formとして提案する。

結果・考察

1) 後に取捨選択を行うことを前提とし、条項をまとめ、一覧にした。各MTAを整理した結果、用語の使用方法など異なる点が多数存在した。特に生物多様性条約をに加盟していない米国が作成したUBMTAは、表記の異なるものも見受けられた。

特に、従来のものは倫理面へ配慮しなければならないという認識が薄いことが分かった。

2) 生物多様性条約や名古屋議定書の決定に基づき、条件や表現を取捨選択した結果、統一のMTAフォームの内容は以下のようになった。倫理面への配慮は序文と目的に盛り込んだ。主な内容は、生命倫理への配慮、国内外の法律の理解と遵守、社会的責任の認識である。

- ・序文
- ・目的
- ・第二条: 用語の使用
- ・第三条: 提供機関の保有所有権
- ・第四条: 受領機関の保有所有権
- ・第五条: 受領者の秘密保持義務
- ・第六条: 使用者・使用場所
- ・第七条: 使用条件
- ・第八条: 第三者提供の禁止
- ・第九条: 再分与
- ・第十条: 権利の帰属
- ・第十一条: 商業利用
- ・第十二条: 特許出願
- ・第十三条: 受領者作成物質の取り扱い
- ・第十四条: 保証
- ・第十五条: 損害賠償・免責事項
- ・第十六条: 成果の公表・出所の明示
- ・第十七条: 準拠法
- ・第十八条: 存続条項

英訳は随時進めていく。

参考文献

- ・生物多様性条約サイト <http://www.cbd.int/>
- ・『生物遺伝資源のアクセスと利益配分-生物多様性条約の課題-』(財)バイオインダストリー協会 生物資源総合研究所[監修] 磯崎博司、炭田精造、渡辺順子、田上麻衣子、安藤勝彦[編集] 信山社 (2011)
- ・他

新規除草剤 AAA-0965 のカロテノイド生合成系への影響

鈴木 崇哉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

除草剤は作物生産性向上、または耕地等の管理において、雑草など不要な植物を枯らすことを目的として全世界で使われている。しかし同じ除草剤を使用し続けるとやがてその薬剤が効かない抵抗性雑草が出現することがある。さらに除草剤には全ての植物を枯らす非選択性のものである植物種には影響が少なくその他の植物種を枯らす選択性のあるものがある。したがって抵抗性雑草や除草剤の選択性等の面から、新規な除草剤を開発することが求められている。

除草剤 AAA-0965 は新規の水稲用薬剤であり特に広葉雑草やカヤツリグサ科雑草を防除に有効である。本剤は感受性雑草に白化症状を引き起こし、その症状からカロテノイド生合成系を阻害する剤と考えられているがその作用機構は解明されていない。既知のカロテノイド生合成系阻害剤には主にフィトエンデサチウラーゼ(PDS)と 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(4-HPPD)の 2 つを阻害するものが知られている。先行研究で本剤を処理した葉の症状は PDS 阻害剤よりも 4-HPPD 阻害剤に近いことが報告されているが、作用点も不明である。

本研究では AAA-0965 のカロテノイド生合成系への影響を調べるために、感受性であるレタスとウキクサを用いて生物試験を行い、さらにウキクサを用いて標的となる可能性のある酵素の産物を用いた添加回復試験を行うことにより本剤の標的に迫ることを目的とした。

材料

供試植物:

レタス(*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes366)

アオウキクサ(*Lemna paucicostata* Hegelm. cv. 6746)

供試薬剤:

AAA-0965

ベンゾフェナップ

(2-[4-(2,4-Dichloro-*m*-toluoyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-5-yl]oxy]-4'-methylacetophenone)

実験方法

・生物試験

発芽させたレタス種子を、培養管に入れた AAA-0965 を含む 0.5%寒天培地上に播種し、グロースチャンバー(明/暗:12h/12h, 25 °C/20°C)で生育させ、処理 4 日後の根長と新鮮重を測定した。また茎葉部を DMSO に 48 時間浸漬し分光光度計でカロテノイドとクロロフィル含量を測定した。

アオウキクサ 8 枚(2 枚×4 個体)を、シャーレ(直径 5cm 程度)に入れた AAA-0965 またはベンゾフェナップを含む SIS 培地に

浮かべ、グロースチャンバー(24h 連続明期, 25°C)で生育させ、処理 7 日後の葉状体数と新鮮重を測定した。また植物体を DMSO に 48 時間浸漬し分光光度計でカロテノイドとクロロフィル含量を測定した。

・アオウキクサを用いた添加回復試験

生物試験と同様にアオウキクサの葉状体が 2 枚のもの 4 個体を、シャーレ(直径 5cm 程度)に入れた AAA-0965 またはベンゾフェナップを含む SIS 培地に浮かべ、さらにそこに 4-HPPA とホモゲンチジン酸を加えた。その後グロースチャンバー(24h 連続明期, 25°C)で生育させ、処理 7 日後の葉状体数と新鮮重を測定した。また植物体を DMSO に 48 時間浸漬し分光光度計でカロテノイドとクロロフィル含量を測定した。

結果・考察

生物試験において、AAA-0965 はレタスでは 20 μ M 以上でカロテノイドとクロロフィル含量、40 μ M 以上で根長と新鮮重も減少させた。可視症状においては展開子葉が濃度依存的に白化症状を引き起こしていた。アオウキクサでは 1 μ M 以上で新鮮重と葉状体数の現象が見られ、5 μ M 以上でクロロフィルとカロテノイド含有量の現象が見られた。可視症状においては 1~5 μ M 程度では新しく展開した葉状体の変形が見られ、それ以上の濃度では新しく展開した葉状体が白化症状を引き起こしていた。これらの可視症状から本薬剤はカロテノイド生合成系に影響を及ぼしていることが示唆される。

アオウキクサにおける添加回復試験では、まず供試薬剤として 4-HPPD 阻害剤であるベンゾフェナップを用いて行った。その結果、ベンゾフェナップのみを加えた時のアオウキクサの生育がコントロールに比べて 30%程度だったのに対し、4-HPPD によって産生されるホモゲンチジン酸 150 μ M を加えた時の生育が 60%程度に回復した。このことから AAA-0965 によって低下した生育がホモゲンチジン酸の添加によって回復した場合、AAA-0965 が 4-HPPD 阻害剤であること、また回復しなければ AAA-0965 が 4-HPPD 阻害剤でない可能性が示唆される。

今後の予定

- ・アオウキクサを用いた添加回復試験を AAA-0965 でも行う。
- ・植物体から PDS の前駆物質であるフィトエンを抽出、TLC や HPLC で分離してフォトダイオードアレイでの検出を行う。
- ・アミノ酸解析やプロテオーム解析を行い、PDS 阻害剤や 4-HPPD 阻害剤との比較を行う。

5-アミノレブリン酸とストロビルリン系殺菌剤の植物への生育促進効果

高橋 直人 (筑波大学 生物学類)

指導教員：松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

現在、世界の食糧事情は非常に切迫している。国際連合食糧農業機構によると、世界の穀物利用量は上昇傾向にあり、食料価格指数も近年急激に上昇している。世界の人口増加傾向を考慮すると、食糧問題は今後さらに深刻化することが予想される。

この問題の解決に寄与するもののひとつとして、Plant Growth Regulator (PGR) が注目されている。PGR とは植物の生長を変化させる化学物質のことであり、PGR 処理による作物収量の増加が期待されている。本研究ではこのような収量増加につながる可能性のある植物生育促進効果が期待される物質として、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) とストロビルリン系殺菌剤であるピラクロストロビンとオリサストロビンを用いた。

5-ALA は生体内に存在する物質であり、クロロフィルやヘムといった生理学的に重要な物質の前駆体である。5-ALA を植物に対して外部から処理をすると、高濃度では枯殺作用を示すが、低濃度では生育促進効果や増収効果を示すことが報告されている。

ストロビルリン系殺菌剤は農業用殺菌剤の一群であり、その成分は担子菌類に分類される食用キノコである *Strobilurus tenacellus* などに由来する。近年、その抗菌活性の他に植物への生理学的作用がいくつか報告されている。本研究では5-ALA およびストロビルリン系殺菌剤に分類されるピラクロストロビンとオリサストロビンの植物へ与える影響を解明することを目的とした。

材料・方法

供試植物として以下の植物を用いた。

イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)

キュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Shimoshirazujibai)

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.)

ダイズ (*Glycine max* L.)

1) 5-ALA の植物生育に与える影響

水耕法により生育させたイネ・トウモロコシ・キュウリ・インゲンマメに5-ALA を処理 (根部 24 h 浸漬または茎葉短時間浸漬) した。処理後 0・4 日目における新鮮重を測定し、新鮮重の増加量を得た。

2) 5-ALA のクロロフィル含量に与える影響

1) と同様の方法で生育および5-ALA 処理をした植物の葉からリーフディスクを作成し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に浸漬して 30°C 暗条件で静置し、クロロフィルを抽出した。抽出液の 664 nm、648 nm の吸光度を測定しクロロフィル含量を算出した。

3) ストロビルリン系殺菌剤の植物生育に与える影響

1) と同様の方法で生育させたイネ・ダイズに対してオリサストロビン・ピラクロストロビンをそれぞれ処理した。処理後 0・10 日目における新鮮重を測定し、新鮮重の増加量を得た。

結果・考察・今後の予定

5-ALA を処理した植物での新鮮重増加量の有意な増加はみられなかったが、増加の傾向が見られる場合があった。また、5-ALA 処理による新鮮重あたりのクロロフィル含量の増加はみられなかった。このことから、本研究の実験条件では5-ALA が植物体内に取り込まれにくい、または5-ALA が植物体内でクロロフィルなどの最終産物に代謝されにくいといった理由から、生育促進効果につながらなかったことが考えられる。今後は、生育促進効果を安定して再現するために光・栄養条件といった植物生育条件や5-ALA 処理法の違いによる5-ALA の生育促進効果の違いを検証するとともに、クロロフィル合成経路の中間体および5-ALA の植物体内への蓄積を検証し、生育促進効果の妨げとなっている要因を解明していく予定である。

オリサストロビンを処理したイネでの新鮮重増加量の有意な増加はみられなかったが、濃度依存的な増加傾向がわずかにみられた。このことから、オリサストロビンはイネの植物体内で生育促進につながる何らかの生理学的な変化を引き起こしていることが示唆される。今後は、さらに大きな生育促進効果がみられるような生育条件や処理法を検証するとともに、増加傾向を示す要因となる生理学的な変化を解明していく予定である。

ピラクロストロビンを処理したダイズでは新鮮重増加量の増加はみられず、濃度依存的な減少がみられた。このことから、ピラクロストロビンはダイズに対し何らかの生理学的な変化をもたらし、その変化は生育条件や処理法によっては生育抑制という形で現れるということがわかった。今後は、生育促進がみられる条件の有無を検証するとともにオリサストロビンとの作用性比較も行い、ピラクロストロビンの植物生理に与える影響について検証していく予定である。

植物生育抑制活性を有する薬用植物由来の揮発性物質の探索とクミンアルデヒドの作用特性

中野 香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

アレロパシーとは植物がある物質(アレロケミカル)を放出し、他の植物に生理・生化学的に影響を与える現象である。このアレロケミカルの放出経路は主に3つあり、根からの滲出、葉やリターからの溶脱、葉などからの揮発である。このうち滲出物や溶脱物の研究は多く行われているが、揮発物質の研究は揮散後大気中で拡散して濃度が下がるため、アレロパシー作用を及ぼすほどの影響はほとんどないと考えられてきた。しかし、近年、揮発性物質が周囲の植物の生育に影響を与えるという研究報告がなされ、注目され始めた。揮発性物質は、研究例が比較的少なく、新規の薬剤開発に応用可能な生理活性物質を発見できる可能性がある。

そこで、本研究では、生理活性物質を多く含む薬用植物を探索対象として、植物生育抑制活性を有する揮発性物質を見出し、その作用性を明らかにすることを目的とした。

材料

供試植物:

アオビユ、イチビ、イネ、インゲン、エノコログサ、オヒシバ、キュウリ、クサネム、コムギ、トウモロコシ、メヒシバ、レタス

薬用植物:

ガイシ、カイニンソウ、ガジュツ、カッコウ、カルダモン、カンキョウ、キキョウコン、キョウカツ、キョウニン、クミン、コウコウ、コウホン、ゴシュユ、ゴミシ、コリアンダー、サンシシ、シオン、シヤクヤク、ジャスミン、シユクシヤ、セージ、セキシヨウコン、セネガ、センキュウ、センコツ、センナ、センブクカ、ダイオウ、タイソウ、タイム、タクシヤ、ニクジュヨウ、パイモ、バクモントウ、バケンシ、ハコシ、ボタンピ、マンケイシ、モッコウ、モツヤク、ヤカン、リュウソウ、リュウタン

方法

1. 植物成育抑制効果のある揮発性物質を放出する薬用植物種のスクリーニング

薬用植物を磨碎し、マルチディッシュの1つの穴に添加した。残りの穴にレタスの発芽種子を添加し、蓋をして密閉した。25°C・暗条件で3日間生育させ、胚軸長と根の長さを測定した。破砕物を添加していないコントロールと比較して成長率を算出した。

2. 薬用植物種から放出される揮発性物質の同定 植物抑制効果のあった薬用植物を磨碎し、バイアル瓶に入れて密閉した。25°C・暗条件で24時間静置し、バイアル瓶のヘッドスペースに十分に揮発性物質を充満させ、ガスタイトシリン

ジで採取した。それをガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)にて分析し、揮発物質の同定を行なった。

3. 同定された揮発性物質の標準物質によるレタスの生育抑制作用

バイアル瓶にレタスの発芽種子を添加し、任意の濃度に調製した揮発性物質を封入した。25°C・暗条件で3日間生育し胚軸長と根の長さを測定してその成長率を算出し、さらにGR50値を求めた。

4. クミンアルデヒドの選択作用性の検討

作物種・雑草種を含めた12種の植物を対象にしてクミンアルデヒドを用いて3と同様の実験を行った。

結果

1. スクリーニング

41種の薬用植物のうち、クミン、シユクシヤ、カルダモン等の9種の植物種に特に高いレタスの生育抑制活性が認められた。また生育抑制活性の程度は磨砕物を添加した穴から距離依存的に変動した。

2. 揮発性物質の同定

上記9種の薬用植物種を分析したところ、主にクミンからβ-ピネン、クミンアルデヒド、シユクシヤからカンフェン、ボルネオール、カルダモンからα-ピネン、1,8-シネオール等の11種の揮発性物質が同定された。

3. 同定された揮発性物質によるレタスの植物生育抑制作用

同定された11種の揮発性物質のうち、特にボルネオールやクミンアルデヒド等が、レタスに対して高い生育抑制作用を示すことを見出した。

5. クミンアルデヒドの選択作用性

クミンアルデヒドは、多くの植物種に対して生育抑制作用を示し、特にメヒシバに対して高い生育抑制作用を示した。一方、トウモロコシに対しては、生育抑制作用は低く、クミンアルデヒドの植物生育抑制作用には、選択性があることが示された。

今後の予定

今後は、クミンアルデヒドに高い感受性を示したメヒシバと耐性を示したトウモロコシを用いて、クミンアルデヒドの植物生育抑制作用の作用機序について検討していく予定である。

パラコートによるイネ根部伸長抑制作用の特徴とその発現要因

池田 倭 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 田中 俊之 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

近年イネの栽培において雑草イネの発生が長野県などの地域において問題となっている。雑草イネは栽培種の近縁種で、収穫時に作付けした栽培品種に混入し、収穫米品質の低下を招く。また脱粒性が大きく、収穫時に地表に落下し、翌年にも発生する。雑草イネは栽培種と生理的特性が変わらないため、防除が難しい。

この雑草イネの防除法として最近除草剤パラコートの耕起前処理が注目されている。先行研究においてパラコート液剤の種子処理が発芽を停止させ、根部の伸長抑制効果を示し、雑草イネの防除に有用であることがわかっている。

パラコート (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride) は非選択的除草剤として知られ、茎葉部に散布することにより光照射下で枯殺作用を示す。その作用機序はパラコートが光合成の光化学系 I の還元側から励起電子を奪うことでパラコートラジカルとなり、酸素分子へその電子を渡すことで発生したスーパーオキシドの酸化障害によるものである。電子を渡したパラコートラジカルは再び非ラジカルに戻り、パラコートはこの反応サイクルを繰り返す。

一方で、前述の雑草イネの防除法におけるパラコートの非光依存的な伸長抑制作用の発現機序はわかっていない。本研究ではパラコートの非光依存的なイネの根部抑制作用の発現機序を解明することを目的とする。

材料

供試植物

イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)

供試薬剤

パラコート (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride)
放射性パラコート (paraquat-methyl-¹⁴C dichloride hydrate)

方法

・生物試験

1) 播種後処理

種子を一晩吸水し、濾紙を敷いたシャーレに播種後、パラコート溶液を加えた。30 °Cの暗条件で培養し、4日後根長と茎葉長を測定した。

2) 播種前処理

種子を3秒間パラコートに浸漬し、風乾させ、濾紙を敷いたシャーレに播種した。蒸留水で30 °Cの暗条件で培養し、4日後根長と茎葉長を測定した。

・嫌氣的条件下での培養

種子を一晩吸水し、濾紙を敷いた容器に播種後、パラコート溶液を加えた。容器を窒素ガスで充満し、密閉して30°Cの暗条件で4日間静置した後、茎葉長と根長を計測した。

・オートラジオグラフィ

遮光条件下で放射性パラコートを含む溶液にて種子をシャーレ培養し、4日後のサンプルを乾燥させ、台紙に貼り付けた後、暗室にてX線フィルムと密着させ、カセットに入れて保存した。数週間後にX線フィルムを現像した。

結果と考察

生物試験において暗条件でも根部に濃度依存的な伸長抑制作用が見られたが、茎葉ではあまり大きな作用は見られなかった。

嫌氣的条件下培養においてパラコートによる伸長抑制作用は茎葉部においては回復したが、根部においては回復しなかった。光依存的な根部の抑制作用は酸素を必要とせず、茎葉の伸長抑制作用と発現機序が明らかに異なるものと思われる。

オートラジオグラフィでは根部の先端近くにパラコートの集積が見られ、イネにおけるパラコートの伸長抑制作用が根部成長部位に対する影響によるものである可能性がある。

今後の予定

イネ以外の植物でのパラコートの分布を見ることでイネにおける根部伸長抑制作用とパラコートの集積の関連性を調べる。また、過酸化脂質の定量等の試験を行い、イネにおける根部伸長抑制作用と活性酸素との関連性を調べ、結果によっては活性酸素による酸化障害以外の抑制因子についても考慮する。

円石藻の超長鎖脂質アルケノン・アルケンの代謝と生理機能：明暗周期における組成変化からの解析

井原 希（筑波大学 生物学類） 指導教員：白岩 善博（筑波大学 生命環境系）

背景および目的

円石藻 *Emiliania huxleyi* は、ハプト植物門に属する海洋性の微細藻類であり、アルケノンと呼ばれる炭素数が 37~39 (C₃₇~C₃₉) で 1 つのケト基と *trans* 型の不飽和結合を持つ直鎖の超長鎖不飽和脂質を蓄積する。また、*E. huxleyi* はこの他に C₃₁ (*cis* 型)、C₃₃ (*cis-trans* 未決定)、C₃₇ (*trans* 型)、C₃₈ (*cis-trans* 未決定) の不飽和結合を持つ超長鎖のアルケンも合成する[1]。これらの超長鎖脂質は、その構造からバイオ燃料として有用な物質となり得ることが期待される。一方、これらの脂質の生理機能に関しては、膜脂質[2]や貯蔵脂質[3]であるとの報告があるが、生合成経路に関する知見は皆無である。

本研究では、これらの超長鎖脂質の生理機能の詳細や生合成経路を明らかにすることを目的に、*E. huxleyi* 4 株のアルケノン、アルケン、脂肪酸の比較解析を行い、更にその内の 1 株については、更に明暗条件による脂質組成変化を分析し、光合成や呼吸との関連を解析した。

材料および方法

比較解析では *E. huxleyi* CCMP2090 (南太平洋で単離された無菌株)、NIES837 (グレートバリアリーフ採集株)、RCC1217 (タスマン海採集株、n 体) および NIES2697 株 (タスマン海採集株、RCC1217 株の 2n 体) を使用した。

各 *E. huxleyi* 株を連続光 (100 μmol m⁻² s⁻¹。増殖と光合成の飽和光強度) 下で通気培養し、対数増殖期~定常期の細胞から脂質を抽出し、GC-FID を用い脂質の組成と量を測定して株間で比較した。温度は 25°C とした。

次に、CCMP2090 株を用いて、連続光下で定常期まで培養後、培養液を二分し、一方を暗所に移して培養した。細胞の回収後、脂質を抽出し、GC-FID を用い脂質の組成と量を測定した。回収した細胞の一部を、中性脂質を特異的に染色する Nile Red で染色し、アルケノンを含む中性脂質の細胞内局在、存在量を蛍光顕微鏡で観察した。

結果・考察

(1) 比較解析

全ての株でアルケノン (C₃₇~C₃₉)、アルケン (C₃₁, C₃₃) および脂肪酸 (C₁₄~C₂₄ 間の偶数) が検出された。また、種類と量において、株による顕著な違いはなかった。しかし、NIES837 株で C₂₉ アルケンが、RCC1217 と NIES2697 株では C₃₇ アルケンが株特異的に検出された。

細胞あたりの各脂質の蓄積量について、NIES837 株では総アルケノン量が 70% 以上で最も高い値を示した。他の株では、総アルケノンと総脂肪酸が同程度(40~50%)であり、総アルケン量はどの株でも 2~10% 程度であった。

以上より、*E. huxleyi* 株間では合成されるアルケンの分子種に多様性が存在することが明らかとなった。

(2) 明暗条件下での脂質の変化

細胞内総脂質蓄積量は、明条件下では細胞の生育に伴い増加した。定常期において暗条件に移行させたとき、3 日後では移行前の約 42% に減少した。総アルケノン、総アルケンおよび総脂肪酸量はそれぞれ移行時の約 24%、18% および 79% にまで減少した。しかし、GC-FID 解析パターンでは、暗条件で顕著に増加したピークは検出されず、代謝産物がガス化しない物質に変化した可能性がある。さらに、明条件で培養した細胞では、Nile Red 染色により Lipid Body (LB) と考えられる顆粒の蛍光が明瞭に観察されたが、暗条件に移行した細胞では消失した (図 1)。

アルケノンやアルケンの蓄積量が暗条件で顕著に減少したことから、分解系の存在が明らかとなった。さらに、LB 内の Nile Red ポジティブな中性脂質も暗条件で減少したことと併せ、アルケノンやアルケンは LB に蓄積されているエネルギー貯蔵脂質である可能性が極めて高い。その為、脂肪細胞の LB に存在する Acyl-CoA synthase[4] のように、アルケノンやアルケンの分解に関与する酵素も LB に局在する可能性が考えられる。

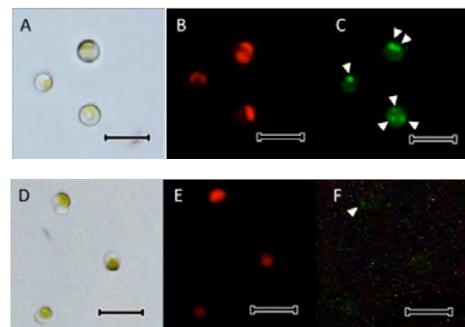


図 1：Nile Red 染色した *E. huxleyi* 細胞 (Bar=10 μm)

(A, B, C：コントロール、D, E, F：暗条件(72 時間))

(A, D：明視野、B, E：クロロフィル蛍光、C, F：Nile Red による蛍光。矢印：LB)

今後の展望

脂肪酸アシル CoA のようなガス化しない物質の検出も可能な LC/MS を用い、アルケノン代謝産物の同定を行う予定である。もし中間代謝産物が脂肪酸アシル CoA であれば、脂肪酸の代謝系である β 酸化がアルケノン代謝にも関与している可能性がある。この点に着目して研究を行い、最終的にはアルケノンの分解・細胞内利用に関わる代謝経路の全体像を明らかにし、ハプト藻に特異的な超長鎖脂質の生理機能を解明する。

参考文献

- [1] Rieley *et al.* (1998) *Lipids* 33, 617-625
- [2] Prahl *et al.* (1988) *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 2303-2310
- [3] Epstein *et al.* (2001) *Organic Geochemistry* 32, 867-875
- [4] Brasaemle *et al.* (2004) *The Journal Of Biological Chemistry* 279, 46835-46842

超長鎖脂肪酸合成阻害剤を用いた円石藻による Alkenone 合成経路の探索

渡邊 祐太 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 白岩 善博 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

円石藻 *Emiliania huxleyi* はハプト藻類に属する微細藻類で、円石と呼ばれる炭酸カルシウム結晶構造体を有する単細胞の植物プランクトンである。さらに、超長鎖の脂肪酸鎖を持つ多価不飽和ケトン (アルケノン) を産生することが知られている。これまでに *E. huxleyi* を含む 5 種のハプト藻 (*Chrysothila lamellosa*, *Emiliania huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, *Isochrysis galbana*, *Pseudoisochrysis paradoxa*) でのみ産生されることが知られ、有機地球化学ではバイオマーカー分子として古海洋温度復元に利用されている。アルケノンは C₃₇₋₃₉ といった非常に長い直鎖状の炭素鎖に trans 型の不飽和結合をもつ。さらに C₂₉-C₃₃ のアルケン分子も存在する。しかし、それら分子の合成系や細胞内の局在、生理学的役割に不明な点が多く、その解明が待たれている[1]。

先行研究ではアルケノンの超長鎖は、真核生物が普遍的に有する脂肪酸伸長経路を経て伸長されると予想されてきた[2][3]。しかし、代謝生化学的な手法によりこれを検証した報告はなく、本研究ではアルケノンの炭素鎖伸長過程の仕組みの解明を目的とした。

Alachlor は陸上植物における研究から、植物型超長鎖脂肪酸 CoA 縮合酵素(KCS)の阻害剤として機能することが報告されている[4]。そこでシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の KCS のアミノ酸配列を用いて相同性検索を行ったところ、円石藻 *E. huxleyi* も植物型 KCS を持つ可能性を得た (未発表)。そこで本研究では、Alachlor の阻害作用を利用して、植物型 KCS による超長鎖脂肪酸伸長経路がアルケノン合成と連結しているか否かについて解析した。

さらに、Alachlor がアルケノン・アルケンの蓄積器官と考えられる脂質体 (lipid body: LB) の形態に影響するか否かを、光学顕微鏡を用いた蛍光観察により行った。その際、アルケノン合成を阻害することが明らかとなっている脂肪酸合成酵素 (KAS) の阻害剤 Cerulenin [3] を比較のために用いた。

材料および方法

本研究ではハプト植物門円石藻 *Emiliania huxleyi* CCMP2090 株 (draft の塩基配列が公開され、Blast 検索が可能) を実験に用い、以下の方法で実験した。

(1) 培養: 増殖の飽和強度の連続光照射および 20°C で、静置培養もしくは通気培養を行った。(2) 脂質分析: GC/MS を用いて定量的に解析した。(3) 脂質体の観察: 細胞をナイルレッドで染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。

結果

(1) Alachlor が脂質蓄積量に与える影響

Alachlor 処理後 6 日目では、細胞増殖の抑制は細胞濁度変化で 20% 程度、クロロフィル濃度変化では約 40% であった。ただし、クロロフィル a/c 比には影響がなかった。さらに、アルケノ

ンとアルケンの蓄積量に Alachlor による影響は見られなかった。また、脂肪酸総量にも大きな差は見られなかった。炭素数 20 以上の超長鎖脂肪酸 (ドコサヘキサエン酸 DHA など) の量についても顕著な変化はなかった。

次に、0-20 μM Alachlor 処理において、12 日間にまで培養を長期化した結果、6 日目以降、濃度依存的な細胞増殖の阻害が観察された。またクロロフィル量も Alachlor 濃度依存的に減少していた。このとき、合成されるアルケノンや超長鎖アルケンの蓄積量や組成には大きな差はなかった。一方、Alachlor により C₁₄₀、C₁₈₀、C₁₈₄、C₁₈₅ 脂肪酸の量が減少していることが分かった。特に、C₁₈₄ や C₁₈₅ の多価不飽和脂肪酸の蓄積量の減少が大きく見られた。ただし、C₂₂₆ (DHA) 量の変化に大きな影響はなかった。

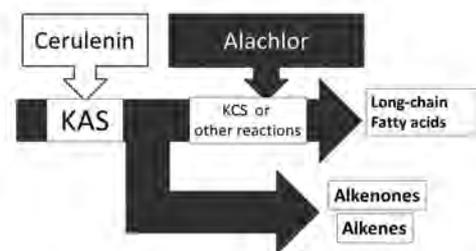
(2) Alachlor が LB の形態に与える影響

クロロフィルの自家蛍光は正常に見られ、細胞が死滅しなかった 0-40 μM Alachlor による処理細胞では、顕微鏡による形態観察の結果、LB の形状や大きさに顕著な変化は認められなかった。

考察

脂肪酸合成酵素の阻害剤を用いた実験から、Cerulenin は長鎖脂肪酸合成とアルケノン・アルケン合成のすべてを抑制し、Alachlor は長鎖脂肪酸合成と C18 脂肪酸の不飽和過程を抑制することを明らかにした。この結果から、アルケノン・アルケン合成は Alachlor 阻害部位の上流で分岐すると推測した (図)。

また、円石藻類における長鎖不飽和脂肪酸合成や不飽和化酵素群の Alachlor に対する応答の特性は、陸上植物のそれとは違いがある可能性も示唆された。脂質種ごとの構成脂肪酸種の更なる詳細な解析による全容解明が期待される。



参考文献

- [1] M. L. Eltgroth et al., *J. Phycol.*, 2005.
- [2] J. F. Rontani et al., *J. Phycol.*, 2006.
- [3] Y. Shiraiwa et al., *Recent Advances in Marine Science and Technology*, 2004.
- [4] S. Trenkamp et al., *PNAS*, 2004.

モデルラン藻における遺伝子発現制御のための人工センサーの構築

川口 美咲 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

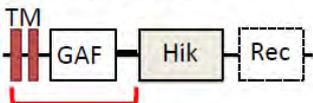
ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は酸素発生型光合成を行う淡水性の原核生物である。全ゲノム配列が解読済みであること、相同組換えにより遺伝子導入が可能なことなどから、近年、代謝系を改変し、光合成により脂質などの有用物質を生産する研究が盛んに行われている[1]。将来、改変ラン藻を利用した産業的な物質生産を行うためには、導入した遺伝子の人工的な発現制御系が不可欠である。

本研究では、二成分制御系と呼ばれるシグナル伝達経路を利用した、外来の刺激に応答する人工的な遺伝子発現制御システムの構築を試みた。二成分制御系は、刺激を受容するセンサーのヒスチジンキナーゼ(Hik)と、Hikによりリン酸化を受ける転写因子のレスポンスレギュレーター(Rre)から構成される。先行研究から、ある Hik のシグナル受容ドメインを、別種の Hik のそれと入れ替えると、入れ替えた Hik の受容するシグナルにより元々の Hik が制御する遺伝子群の発現を制御できることが分かっている[2]。本研究では、ラン藻がもつ二成分制御系の一つ、SphS-SphR系を基本骨格とし、SphSのシグナル受容ドメインを、*Arabidopsis thaliana*のエチレンセンサーの受容ドメインに置き換えることで、エチレンに応答するキメラセンサーの構築を目的に、研究を行った。

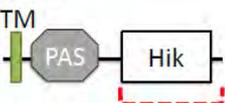
材料と方法

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた。*Arabidopsis*のエチレンセンサーは ETR1、ETR2、ERS1、ERS2、EIN4 の5つが知られている。これら5つのシグナル受容ドメインと、SphSのキナーゼドメインを繋げたキメラセンサー遺伝子を作製した[Fig.1]。キメラセンサーはSphSのORFを置き換える形でラン藻に導入し、内在性の遺伝子のプロモータから発現させた。

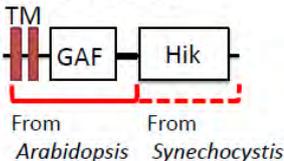
Ethylene sensor



SphS



Chimera sensor



[Figure1:キメラセンサーの構造]

TM: 膜貫通ドメイン、
GAF: GAFドメイン、
PAS: PASドメイン、
Hik: キナーゼドメイン、
Rec: レシーバドメインを示す。
太くなっている部分が
リンカードメインである。

SphR が制御するアルカリフォスファターゼ(AP)の活性を指標に、キメラセンサーのエチレン応答性を評価した。植物のエチレンセンサーは細胞内でエチレンを受容するとシグナル伝達が抑制されるネガティブセンサーとして働くことから[3]、このキメラセンサーは、エチレン非存在下ではAP活性を発現するが、

エチレン存在下では発現が抑制され AP 活性が減少すると予想した。加水分解によりエチレンを発生する農薬のエテホンを経最終濃度 0.01%(w/v)、あるいは含エチレン水を最終濃度 225 μM とするよう培地に添加し、24 時間後の AP 活性を測定した。

結果と考察

【キメラセンサーを発現する株の AP 活性測定】

キメラセンサーを持つ形質転換体 5 株の AP 活性を、エチレン非存在下、存在下で測定した。その結果、ETR1、ETR2、EIN4 のキメラセンサーをもつ株では、エチレンの有無に関わらず恒常的な AP 活性が観察された。ERS1、ERS2 のキメラセンサーをもつ株はどちらの条件でも AP 活性は検出されなかった。活性が確認された 3 株で AP の mRNA を定量した結果、エチレンの有無に関わらず mRNA の量は一定であり、エチレンの応答性は観察されなかった。

【Cu 添加実験】

エチレンの受容には Cu イオンが必要とされている。Cu イオンの量が不十分なためにエチレンの結合能と応答性が損なわれ正常な制御が観察されなかったのではないかと考え、培地中の Cu イオンを 0.3 μM から 5 μM に増やして同様の実験を行った。しかし、エチレンによる AP 活性の変化は観測されなかった。

【リンカードメインの改変】

2 種の Hik をキメラにすることで構造変化を引き起こし、エチレンと結合できても正常なシグナル伝達ができなかったのではないかと考え、ETR1 のキメラセンサーの、α-ヘリックス構造を持つリンカー部分のアミノ酸 (335 から 341 番目) を一つずつ削っていくことで、シグナル受容ドメインとキナーゼドメインの配位を順次変化させた株を作製した。その結果、いずれの株でもエチレンの応答性は見られなかったが、興味深いことに、リンカーを順次削ると定常状態の AP 活性が周期的に変化した。この変化は欠失により上下のドメインの配位が少しずつ変化することから生じると考えられた。この結果は、リンカー部分の長さを調節することで下流の遺伝子発現の強弱を調節できる可能性を示すとともに、Hik によるシグナルの受容によりキナーゼドメインの配置が変化することで下流に伝達されることを示唆している。

今後の展望

実際に培地に存在したエチレンの定量をガスクロマトグラフにより試みたが、エテホンあるいは含エチレン水を培地に添加後 30 分以内で検出できなくなった。そのため、今後はエチレン 0.01%(v/v)を含む空気を通気して、恒常的にエチレンに曝した条件下で AP 活性を測定する予定である。

参考文献

- [1] Andreas, S. et al. (2010) *Science* 329: 559-562
- [2] Shimura, Y. et al. (2012) *Plant Cell Physiol.* 53: 1255-1266
- [3] Brenda, H. et al. (2007) *J. Plant Growth Regul.* 26: 118-130

分岐鎖飽和脂肪酸を生産するラン藻の創出

曾根 薫 (筑波大学 生物学類)

指導教員：鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

光合成生物を利用した有用炭化水素の生産が注目を集めている。特に微細藻類は、高等植物に比べて生育が速く、限られた培養面積で多くのバイオマスが得られることから、バイオ燃料の生産への応用が強く期待されている[1]。しかしながら、藻類が生産する炭化水素の多くは、炭素骨格中に二重結合をもつ多価不飽和脂肪酸に由来しており、二重結合部分が容易に酸化を受ける性質を持つため、長期の保存に向かないという欠点がある[2]。また二重結合をもたない飽和脂肪酸に由来する炭素数18以上の炭化水素は融点が高く、常温で固体となってしまう、液体燃料として用いることができない。

本研究は、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の代謝系を改変し、分岐鎖飽和脂肪酸を合成させ、長期間保存可能で、かつ常温で液体となるような炭化水素の生産系の構築を目指すものである。分岐鎖飽和脂肪酸を合成する生物として、枯草菌 *Bacillus subtilis* が知られており、その分岐鎖脂肪酸合成経路は既に同定されている。 *bkd* オペロンにコードされている7つの酵素は、ロイシン、イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸から分岐鎖アシル CoA を合成する (図1) [3]。その分岐鎖アシル CoA を基質にして、 *fabHA* と *fabF* にコードされている酵素が脂肪酸合成を行う (図2) [4]。これらの分岐鎖脂肪酸合成に関わる遺伝子を *Synechocystis* に発現させることを試みた。

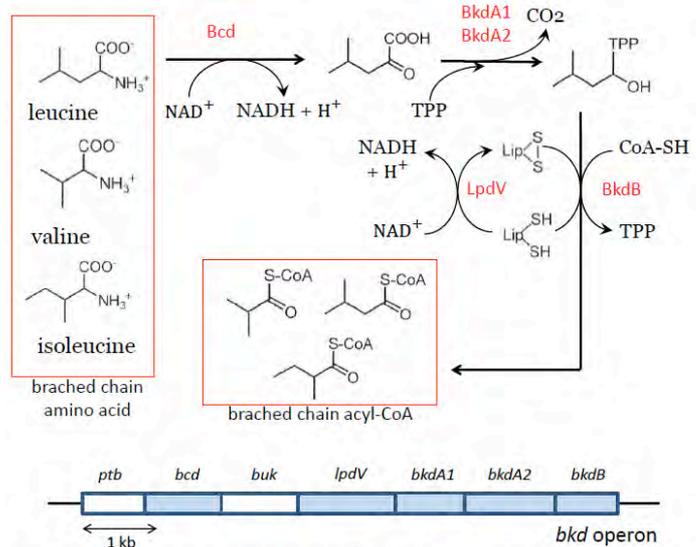


図1. 分岐鎖飽和脂肪酸合成経路①(分岐鎖アミノ酸から分岐鎖アシルCoAまで)

方法・結果

B. subtilis 由来の分岐鎖飽和脂肪酸の合成遺伝子を、相同組換えにより *Synechocystis* に導入する。まず、 *B. subtilis* のゲノムから DNA を鋳型として、 *fabHA-fabF* 領域を PCR で増幅し、ラン藻用発現ベクター (Trc プロモーター、クロラムフェニコール耐性) に In-fusion 法により導入した。同様に、 *bkd* オペロンに含まれる7つの遺伝子のうちの1つである *bcd* と、連続する4つの遺伝子 *lpdV-bkdA1-bkdA2-bkdB* を PCR により増幅し、2

つのフラグメントを得た (図1)。これらを In-fusion 法により、別のラン藻用発現ベクター (Trc プロモーター、カナマイシン耐性) に導入した。2つのベクターは *Synechocystis* ゲノム上の異なる部位に相同組換えにより遺伝子を挿入するよう設計されている。ベクターの複製には大腸菌 *Escherichia coli* HST16CR 株を用いた。

fabHA-fabF を有するベクターを、 *Synechocystis* の培養液に加えて相同組換えにより形質転換を行い、クロラムフェニコールあるいはカナマイシンを含むプレート培地に塗布した。

今後の実験

現在、形質転換体のスクリーニングを行なっている。それぞれの形質転換体が得られたら、もう一方の遺伝子群をそれぞれに導入し、二重遺伝子導入株を作製する。全ての遺伝子をもつラン藻が得られた後に、分岐鎖脂肪酸が合成されているかどうかを、ガスクロマトグラフィーにより検出したい。

また *Synechocystis* を形質転換している間、大腸菌を用いた発現チェックを行いたい。用いた Trc プロモーターは大腸菌内でも常時発現していると考えられるため、ベクターを保持している大腸菌から全タンパク質を抽出し、目的タンパク質の有無を SDS-PAGE により確認する。大腸菌でも7つの遺伝子を全て発現することができれば、 *Synechocystis* 形質転換体と同様に分岐鎖脂肪酸を合成できると考えられるため、同じく大腸菌の形質転換体でもガスクロマトグラフィー解析を行いたい。

bkd オペロンを導入することで、分岐鎖アミノ酸の含量が低下してしまわないかを確認するため、遊離アミノ酸の定量も行う予定である。

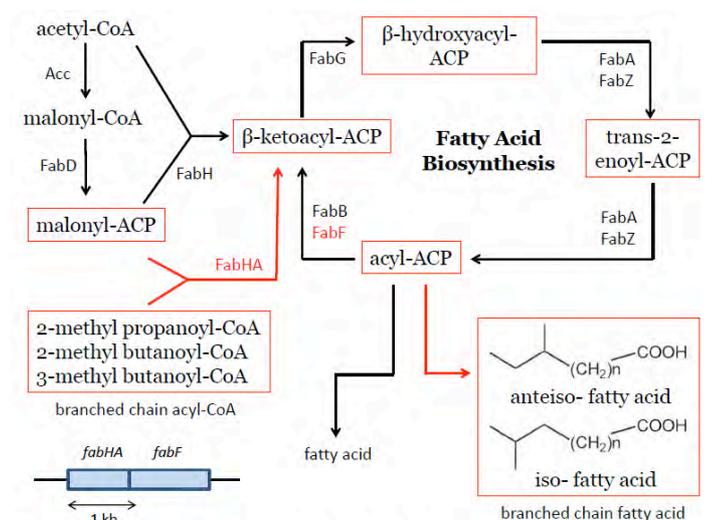


図2. 分岐鎖飽和脂肪酸合成経路②(分岐鎖アシルCoAから分岐鎖飽和脂肪酸まで)

参考文献

1. Yanqun *et al.* (2008), *Biotechnol. Prog.*, 24: 815-820
2. Frankel. (1980), *Prog. Lipid Res.*, 19: 1-22
3. Debarbouille *et al.* (1999) *J. Bacteriol.*, 181: 2059-2066
4. Choi *et al.* (2000) *J. Bacteriol.*, 182: 365-370

培地中の Mn 欠乏がラン藻のアルカリフォスファターゼの発現に与える影響の解析

西本 謙太郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員：鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

生物は常に外界の環境変化に曝されて生育している。光や温度、栄養塩濃度の変化など様々な環境変化をいち早く検知し、適応することは生物にとって重要な生存戦略である。細菌や真菌、高等植物は、環境シグナルの検知・伝達のため二成分制御系という機構をもつ。二成分制御系は、環境変化を検知するセンサータンパク質のヒスチジンキナーゼ (Hik) と、Hik からリン酸化を受け遺伝子発現の調節を行う転写因子のレスポンスレギュレーター (Rre) の 2 つのタンパク質で構成される。

私は光合成生物の金属の利用機構に興味を持っている。中でも Mn は、光化学系 II の反応中心やスーパーオキシドディスムターゼなどの補因子として働き、それらのタンパク質の活性に必須な金属である。ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、Mn 充足条件では Hik の ManS が Rre の ManR をリン酸化し、Mn トランスポーターオペロン (*mntCAB*) の発現を抑制する。一方、Mn 欠乏条件では、脱リン酸化型 ManR が *mntCAB* オペロンを発現する [1]。しかしながら、ManS がどのような分子機構で培地中の Mn イオン濃度を検知しているのかは明らかでなく、細胞内 Mn 濃度の恒常性維持の機構に興味を持ち研究を行った。Hik は N 末端側のシグナル検知ドメインと C 末端側のキナーゼドメインの 2 つのドメインからなり、Hik のシグナル検知ドメインを、別の Hik のものと入れ替えても機能すること [2] から、ManS シグナル検知ドメインを、リン酸欠乏応答性 Hik である SphS のシグナル検知ドメインと置換した ManS-SphS キメラセンサーを *Synechocystis* に発現させた。SphS が本来制御するアルカリフォスファターゼ (AP) 活性をレポーターにして ManS の Mn 応答性を評価することにした。その過程で Mn 存在量が SphS の活性に何らかの影響を及ぼすことを見出したので、その原因について解析することとした。

材料と方法

ManS シグナル検知ドメインと SphS キナーゼドメインを繋げた ManS-SphS キメラセンサー遺伝子を、SphS の ORF と置換する形で *Synechocystis* に導入し、SphS のプロモータから発現させた。ネイティブな ManS は Mn の存在下でシグナル伝達が止まるネガティブセンサーであるため、ManS-SphS を発現する株は通常培養 (Mn 充足) 条件下では AP 活性があり、Mn 欠乏条件に移すと AP 活性が減少すると予想した。通常培養した細胞を、Mn 欠乏培地に移し 24 時間後の AP 活性を計測した。また野生株 (WT) と、 Δ PAS 株と呼ばれる常に AP 活性を有する変異株の 2 株をコントロールとして用いて比較した。

結果・考察

ManS-SphS キメラセンサーを発現する株は、通常培養条件下で高い AP 活性 (1.4 μ mol PNP/mg Chl/min) を示した。ManS は Mn 存在下で ManR をリン酸化するため、ManS-SphS は下流の SphR をリン酸化し、AP を発現させたと考えられた。先行

研究で作製された SphS の PAS ドメインを欠損した変異株 (Δ PAS 株) は、構成的に活性型となり、リン酸濃度に関わらず高い AP 活性を示すが、両者の AP 活性は同程度であった。 Δ PAS 株、ManS-SphS 発現株を Mn 欠乏培地で培養した結果、ともに通常培養に比べて約 3~4 倍高い AP 活性が誘導された。それに対して、WT では Mn 濃度に関わらず AP 活性はほとんど観察されなかった。コントロールである Δ PAS 株でも Mn 欠乏下で AP 活性が上昇したことから、Mn 欠乏と AP の関係について何らかの関連が考えられた。その理由を解決するため、いくつかの仮説を立て実験を行った。

酵素反応液中の Mn 濃度を変化させる実験

まず AP 活性の上昇が、細胞のシグナル伝達の結果ではなく、AP 酵素タンパク質そのものが、反応液中の Mn により活性が抑制されているという仮説を立てた。そこで WT、 Δ PAS 株、ManS-SphS 発現株を通常培養条件下で培養し、AP 活性測定時の反応液に含まれる Mn 濃度を 0、0.1、1、5、10 (コントロール)、100 μ M と変化させた。その結果、どの Mn 濃度においても AP 活性はほとんど変化しなかったため、この仮説は否定された。

Mn 欠乏時のクロロフィル量の変化

次に Mn 欠乏状態が細胞にとってストレスとなり、細胞あたりの Chl 量が減少してしまったという仮説を立てた。AP 活性の値は Chl 量で補正して求めるため、Chl 量が減ると結果として AP 活性は高く見積られる。そこで通常培地と Mn 欠乏培地で 24 時間培養した細胞の Chl 量と濁度 (OD₇₃₀) を比較した。結果、Mn 欠乏に曝しても細胞の Chl 量と濁度は、通常培養に比べて変化しなかった。

Mn 欠乏とリン酸欠乏による AP 活性の上昇

次に WT のみを用いて実験を行った。WT を Mn 欠乏培地、リン酸欠乏培地、Mn/リン酸欠乏培地の 3 つの条件でそれぞれ培養した後の AP 活性を比較した。その結果、リン酸欠乏、Mn/リン酸欠乏条件の 2 つでのみ AP 活性が観察され、Mn/リン酸欠乏条件での活性は、リン酸欠乏での活性に比べて約 5 倍大きくなった。これらの実験から、Mn 欠乏は、AP 酵素自身ではなく既存の SphS-SphR シグナル伝達経路に影響を与えること、その結果、Mn 欠乏条件では AP 活性の上昇が引き起こされることが示唆された。SphS のシグナル伝達系は通常培養条件下では働かないため、WT では Mn 欠乏のみでは AP 活性は観察されないと考えられる。今後は、AP をコードする遺伝子の mRNA 量の変化を調べるなどして、なぜ Mn 欠乏で AP 活性が上昇するのか、その原因を絞り込みたい。

参考文献

- [1] Yamaguchi et al. (2002) *Plant Cell*, 14: 2901-2913
- [2] Kimura et al. (2009) *Microbiol*, 155: 2256-2264

植物の茎における傷害に対する応答

森山 和 (筑波大学 生物学類)

指導教員：佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

背景

陸上植物は根を張っているため自ら移動する事が出来ない。そのため低温や乾燥、食害などのストレスから逃れる事は困難であり、代わりにそれらのストレスに移動する事なく応答する能力を獲得してきた。物理的な傷害については組織癒合という傷を塞いで治す応答が行われることが知られているが、組織癒合の機構は未だ多くの不明な点を残しているため、私の所属する研究室では植物の茎部の皮層や髄における組織癒合過程における分子機構を明らかにする事を目的として研究を行っている。

先行研究により、モデル植物であるシロイヌナズナの花茎に人為的に傷害を加えると、その3日後には髄組織での細胞分裂が再開し、7日後には組織の修復がほぼ完了することや、そのための細胞分裂には植物ホルモンの1つであるオーキシンが関与していることが判明している。また、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析から、処理の1日後から3日後にかけて、癒合部において植物ホルモン関連遺伝子や転写制御因子関連遺伝子、細胞分裂関連遺伝子の発現が特異的に上昇する事が示されている。

私の行う研究では、その中でも処理の1日後に素早く発現が上昇するという特徴を持つ遺伝子、*EXP10* (At1g26770) に着目することとした。*EXP10*は細胞壁の構造に影響してこれを緩める作用をもつタンパク質エクспанシンをコードしている遺伝子だが、傷害応答に関わる詳しい働きは未判明であるため、形質転換などを利用して調査を進めることとした。

また、植物の組織癒合は農業技術である接ぎ木に深く関連するものだが、主にシロイヌナズナで研究が進んでいる反面、接ぎ木を直接利用するキュウリやトマトなどの農業作物ではあまり研究が進んでいない。このため私は農業的に接ぎ木の対象とされることの多いトマトの茎部での組織癒合についても調査した。

材料・方法

1. シロイヌナズナの形質転換

モデル植物であるシロイヌナズナの、一般的に用いられる野生型品種 Columbia-0 を background として用いた。過剰発現のための *EXP10* の全長 cDNA と、その RNAi 導入形質転換体作製のための DNA をエンターベクター (pENTR/D-TOPO) に導入し、大腸菌を用いてプラスミドを増やして抽出した。その後シーケンスタックを行なって導入が成されたことを確認し、過剰発現のためのもの、RNAi 導入形質転換体のためのものをデスティネーションベクター (それぞれ pK2GW7.0、pK7GWIWG2(II),0、ともにカナマイシン耐性とスペクチノマイシン耐性を与える遺伝子をコード) に導入した。再び大腸菌を用いてプラスミドを増やして抽出、シーケンスタックを行なって導入を確認し、完成したベクターを *Agrobacterium* 法を用い、シロイヌナズナに形質転換を行なった。シロイヌナズナは 4°C、暗所にて 2~3 日間吸水させた後、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度 1%) に Tween-20 を、2、3 滴加えた混合液に 5 分間浸して滅菌し、DW で 10 回洗浄して、1/2 濃度の

ムラシゲ・スクーグ培地 (和光純薬工業) 上に無菌播種し、インキュベーター内にて生育させ ($32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 22°C, 連続光)、ロゼット葉が十分に展開した後、育苗用培土 (コープケミカル株式会社) とバーミキュライトの混合培養土上に植物体を移植し、さらに育成したものをを用いた。

2. トマトの組織観察

観察用のトマトは、接ぎ木の下側となる台木用の品種として広く用いられる LS-89 品種 (サカタのタネ) を用いた。もっとも発芽率がよく成長も安定していた、育苗用培土 (コープケミカル株式会社) を培養土として用い、培養室内 (26°C、明期 16h/暗期 8h) で育成した。播種後 14 日後の胚軸部の中心或いは播種後 21 日後の第一節間部の中心に、マイクロサージカルナイフで茎部直径の半分の深さとなるような切断傷を与える切断処理をそれぞれ行ない、その1日後、7日後に傷を与えた部位周辺約 5mm を切り出し、2.5% グルタルアルデヒド、1% パラフォルムアルデヒド混合液 (100mM リン酸バッファー pH7.4) 中にて、約 30 分間脱気した後、一晚固定した。同バッファーで 4 回洗浄したあとエタノールシリーズ (30%、50%、70%、90%、100%。50% エタノールによる脱水までは 4°C 下で行い、その他は室温) による脱水と、テクノビット樹脂と 100% エタノールの混合溶液による置換を行なった後に、テクノビット樹脂内に試料を包埋した。続いて切片をガラスナイフとマイクロトーム (Reichert EM-ULTRACUT, Leica, Wetzlar, Germany) を用いて作成した。また、同実験を、無傷の播種後 14 日後の胚軸部の中心或いは播種後 21 日後の第一節間部の中心が輪切りとなるような形で行ない、胚軸部の組織と第一節間部の組織の相違を、切片を 0.1% (w/w) トルイジンブルーにて染色した後、光学顕微鏡 (DMRBm Leica, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

結果・考察

1. シロイヌナズナの形質転換

T3 世代に於いてヘテロ接合の個体まで作製と選抜が完了した。

2. トマトの組織観察

輪切りの試料の比較によって、維管束と表皮の組織が胚軸部と第一節間部で大きく異なり、第一節間部では中央に髄が存在することを確認した。維管束は配置が異なり、表皮組織は細胞層数が異なっていた。

切断処理を行なった試料では、切片作製を行った。

今後の展望

1. シロイヌナズナの形質転換

継代を重ねて、ホモ接合の個体を得、その形質を組織癒合の観点から観察し、*EXP10* の組織癒合に於ける機能を調査する。

2. トマトの組織観察

組織癒合過程を確認し胚軸と茎での基本的な形態変化を確認した後、植物ホルモンの作用や細胞壁成分の組織癒合に於ける変化に着目して、解析を行う。

ポプラ根における導管液タンパク質の遺伝子発現

三木 雄大 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ポプラのような落葉広葉樹は、自然条件下では四季の日長・温度の変化によって、春に開芽・展葉し秋に休眠・落葉する年周期性を示す。そのメカニズムにおける地上部器官の役割については詳しく調べられているが、根の成長や機能と年周期性との関係は、よく知られていない。そこで我々は、年周期性形成への根の機能の関与に着目して研究を行っている。

先行研究において、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*) の導管液を分析したところ、根で吸収された導管液の成分が年間で変動していることが明らかになった。その中で、冬期に量が増える有機物に着目し、それらが休眠中や休眠解除後の成長に関与していると考えた。そこで、メジャーな冬期に量が増える導管液タンパク質 (Xylem sap protein) 2つを XSP24, XSP25 とし、それらを TOF-MS により解析をしたところ、XSP24 は Cupin family に属し、XSP25 は BSP (Basic secretory protein) であると分かった。また、XSP25 は高い親水性を示したことから、タンパク質や細胞膜を凍結によるストレスから保護している可能性が考えられる。

また、ドロノキ (*Populus maximowiczii*) に ABA を添加した実験により、XSP25 は ABA に誘導されることが明らかになった。

水耕栽培のドロノキを用いて、光条件や温度を LD (長日) → SD (短日) → 低温 → LD と変化させ、インキュベーター内で休眠と休眠解除を誘導し、各状態のサンプルを RT-PCR により解析した先行研究によると、XSP24, XSP25 は SD や低温によって発現が上昇した。この、根での XSP24, XSP25 の発現上昇の挙動は、導管液中での挙動と類似していた。

それにより、次のような仮説が考えられた。多年生の落葉性木本植物は、SD により地上部で ABA が合成され、それが根へと運ばれる。根では運ばれてきた ABA に誘導され XSP24, XSP25 などの導管液タンパク質が合成され、導管液を介して地上部へ運ばれる。XSP24 や XSP25 などの導管液タンパク質は、冬の低温や乾燥等のストレスから地上部器官を保護している可能性、もしくは春先の開芽に関わっている可能性が考えられる。

以上の仮説を確かなものとするため、根で合成される有機物の低温や短日による遺伝子発現の様子を RT-PCR で再現をとり、また、Real time PCR を用いて遺伝子発現の挙動を詳しく解析する。

材料・方法

16h 明期 8h 暗期 (LD) 26°C に十分期間置いておいた土植えのドロノキ (*Populus maximowiczii*) を、8h 明期 16h 暗期 (SD) 8 週間 → 無照明 4°C 4 週間 → LD 26°C 3 週間と環境条件を変化させ、2 週間おきにサンプリングした。(一度サンプリングした個体は

再度利用しない。) そのサンプルを RT-PCR と Real time PCR により解析する。

結果・考察

詳細は発表会にて紹介する。

ミヤコグサにおける亜鉛集積と関連遺伝子の解析

高野 葵 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 純 (筑波大学 生命環境系)

背景

植物は動物と異なり移動する事ができない。このような環境下で生育するため、植物は師管を通して光合成で得た有機物を植物体内に循環させ、また導管を発達させる事で土壤中に存在している水やミネラルを全身に輸送している。この導管の能力を利用して、可食部のミネラル含量を適正に保つため、ダイズなどを用いた金属集積の研究が進められている。ダイズと同じくマメ科のミヤコグサはモデル植物として知られており、ゲノムサイズが小さく生活環が短いという特徴がある。そこで、当研究室ではミヤコグサを用いた金属集積についての研究が進められている。当研究室の先行研究において、2系統のミヤコグサ MG-20 と B-129 を用いて ^{65}Zn の取り込み実験を行ったところ、B-129 が地上部により亜鉛を集積している事が分かった。また、Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) によって、植物体中の亜鉛動態を解析したところ、根から地上部への亜鉛の輸送活性が高い事が示唆された。これらの結果から MG-20 と B-129 の組換え自殖系統 125 系統を用いた QTL 解析を行い、トランスポーターなどの原因となる遺伝子の特定が試みられた。その結果、地上部での亜鉛の集積に関与すると考えられる 16 の遺伝子座が特定された。以上のような先行研究から、本研究では亜鉛集積に対する栄養条件の影響、QTL 解析で得られた遺伝子座に座乗している亜鉛集積に関与すると考えられる候補遺伝子の発現量の解析を目的とした。

方法

亜鉛集積に関わる遺伝子の機能を調査するため、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の主要実験系統である Miyakojima MG-20 と Gifu B-129 の 2 系統を実験に供した。種子を吸水・発芽させた後、およそ 1 ヶ月間 Hoagland 水耕液にて水耕栽培させた。その後、Hoagland 水耕液から亜鉛を取り除いた水耕液を用いて 4 日間または 11 日間処理したものと通常の水耕液で処理したものを対照区として用意した。通常の水耕液は亜鉛濃度が $0.4 \mu\text{M}$ 、欠乏用の水耕液は $0 \mu\text{M}$ となっている。

それぞれのサンプルに放射性同位体 ^{65}Zn を取り込ませた後、BAS イメージングによって亜鉛局在を、ガンマカウンタによって相対放射能を地上部と根において計測した。また、リアルタイムイメージング (PETIS) により亜鉛の挙動を非侵襲で連続的に観察した。さらに、QTL 解析により得られた 16 の遺伝子座に座乗する遺伝子の中から、機能予測により亜鉛の輸送に関わる可能性の示された 13 種類の遺伝子について両系統での発現量を比較するため、これらのサンプルの RNA を抽出し RT-PCR により発現解析を行った。

結果

亜鉛欠乏条件の検討

MG-20 と B-129 をおよそ 1 ヶ月間水耕栽培し、一定期間の欠乏処理期間を設け、その後亜鉛を取り込ませたところ、欠乏 4

日目において亜鉛の吸収量が多い事が示された。系統別の特徴として MG-20 よりも B-129 も方が欠乏に対する応答が顕著である傾向が示された。また BAS イメージングにおいても同様に 4 日間の欠乏処理をかけた植物の方がより亜鉛を集積しており、対照区に比べて亜鉛欠乏処理区の植物では、根から地上部にかけて全体的に亜鉛が分布しており、対照区では根に亜鉛を集積し、地上部への移行量が少ない事が示唆された。以上より、欠乏処理により誘導される遺伝子の発現解析には 4 日程度の亜鉛欠乏条件が好ましいと考えられた。

同様に亜鉛欠乏 4 日を欠乏処理区の条件として、リアルタイムイメージングによる亜鉛動態の解析を行った。根全体、地上部全体、茎頂部分、胚軸部分を対象として放射能の経時変化をグラフ化したところ、地上部での亜鉛蓄積量については対照区と亜鉛欠乏区どちらにおいてもリアルタイムイメージング開始約 12 時間後から増加した。しかしながら蓄積の傾向については系統間で差が認められ、MG-20 では初期の輸送量が多いのに対し B-129 では時間経過と共に輸送量が増加していた。また、MG-20 においては亜鉛欠乏処理 4 日による吸収・輸送量の増加は明瞭ではなかった。

亜鉛欠乏により誘導される地上部への亜鉛輸送を司る遺伝子の探索

QTL 解析によって得られた 13 の候補遺伝子について、それぞれ MG-20 と B-129 を用いて発現解析を行っている。現在上記の解析から得られた欠乏により誘導される亜鉛輸送活性の上昇と発現量の変化が相関する遺伝子の有無について解析中である。

今後の展望

先行研究において、亜鉛以外の金属含量を調べた結果、B-129 において鉄の地上部への輸送活性が低い事が示されており、地上部への鉄輸送の滞りが植物の鉄欠乏症状を引き起こし、他の金属の集積を誘導している可能性もある。このように、欠乏している金属とは異なる金属が集積されるような現象は、モデル植物のシロイヌナズナでも報告例があることから、今後は地上部への鉄輸送活性との関連性も踏まえて、亜鉛の集積メカニズムを解明する必要がある。

ミヤコグサにおけるセシウム吸収・輸送に関わる遺伝子の探索

野田 浩希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 純 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

2011年3月11日に東日本の太平洋沖を震源とした地震が起き、大津波が東京電力福島第一原子力発電所を襲った。これにより燃料棒の冷却機能が失われ、大量の放射性核種(主にヨウ素とセシウム)が広範囲に放出される事態となった。結果、農地と農産物の広範囲な汚染が生じ、今もなお大きな問題となっている。なかでも放射性セシウムは植物や動物に取り込まれるのはもちろんのこと、半減期が30.17年と長期間にわたって環境を汚染し続けるため、特に問題となる物質である。

セシウムはカリウムに似た化学的特性をもつ第1族のアルカリ金属である。カリウムと性質が似ているために、植物体へはカリウムと競合的に取り込まれるという報告がなされている。すなわち、必須元素であるカリウムの輸送系を通してセシウムが植物体内に取り込まれることが示唆されているが、カリウム輸送系は多岐にわたるため、実際にどのような輸送系を経由してセシウムが植物に取り込まれているのかは未だ明らかとなっていない。

事故以降、農作物を中心に多くの植物種について放射性セシウム濃度の調査が進められてきた。その結果、ダイズが比較的高い値を示すことが報告され、マメ科植物のセシウム吸収・輸送機構についての関心が高まっている。予備実験の結果から、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ(*Lotus japonicus*)の主要実験系統である Miyakojima MG-20 と Gifu B-129 を用いてセシウムの取り込みを比較すると、MG-20 が B-129 よりも多量のセシウムを吸収し、また地上部の濃度と比較すると、B-129 よりも MG-20 において根のセシウム濃度が高くなる傾向が示された。以上から本研究では、ミヤコグサにおけるカリウム輸送系に注目し、それらがセシウム輸送に関わっているのか調べることを目的とした。

方法

Miyakojima MG-20 および Gifu B-129 の種を吸水・発芽させた後、1/10 Hoagland (Control) 水耕液に移し、1ヶ月水耕栽培を行った。ただし、最後の3日間または1週間はカリウム欠乏処理区も用意した。

・トレーサー実験

同程度に成長した3個体ずつを選抜し、水耕液中に放射性セシウムである¹³⁷Csを添加した溶液を用いて、ミヤコグサへの取込み実験を行った。その際処理溶液中のカリウムは無添加のものと、1/10 Hoagland 水耕液と同濃度のものを用意し、またセシウムについてはキャリアとして非放射性のセシウムを10 μM 添加したものとキャリア無添加のものを用意した。24時間処理の後、地上部と根に切り分けて、イメージングプレートを用いた放射性セシウムの局在解析を行った。また部位ごとの相対放射能をガンマカウンタによる測定から得た。

結果・考察

イメージングプレートを用いてセシウムの挙動を系統間で比較したところ、MG-20 では B-129 よりも多量のセシウムが吸収

されており、また根組織、特に根端に多く存在していることが示された。ガンマカウンタでの測定結果から根におけるセシウム濃度を求めると、B-129 では地上部の約2倍であったのに対し、MG-20 では地上部の約3倍の濃度で蓄積されており、根組織におけるセシウム保持能が高いことが示唆された。しかしセシウムと類似の挙動を示すと想定されているカリウムの濃度は両系統間に顕著な差がなかった。そのため、カリウム輸送系以外によってもセシウムの挙動が制御されている可能性が示された。また、対照区に比べて3日間のカリウム欠乏処理区では、根においてMG-20 で約5倍、B-129 で約69倍の、地上部においてMG-20 で約10倍、B-129 で約28倍のセシウム濃度であった。カリウム欠乏を感知した植物がカリウムの獲得機構を活性化させた結果、セシウムを多く吸収したためと考えられ、今後予定しているカリウム輸送体の発現解析においては、対照区に比べて欠乏3日の処理区において発現量が上昇しているカリウム輸送体に着目することとした。一方でカリウム欠乏処理1週間の植物では欠乏3日間処理よりもセシウム吸収量が低下しており、カリウム欠乏による植物体の生育不良の影響を強く受けたものと考えられる。

またセシウム取込み時の水耕液にカリウムを添加すると、カリウム欠乏処理区の植物体で見られたセシウム吸収量の増加が著しく弱くなった。これはカリウム欠乏によって誘導されたカリウム獲得機構の全て、あるいは一部が水耕液中のカリウムを吸収したことにより速やかに通常状態に回復したことを示唆している。セシウム吸収が水耕液へのカリウム添加後、どのタイミングで低下しているかを明らかにできれば、セシウムを輸送している輸送体を特定する上で有効な手がかりとなることから、セシウム吸収のリアルタイムイメージングによる解析を予定している。

根圏からのセシウム吸収を担っているカリウム輸送体として、先行研究から AKT1、HAK5 などが候補として挙げられている。また、カリウムを導管にローディングして根から地上部への輸送を制御する輸送体の候補として SKOR が有力である。これら遺伝子の発現解析を上記の条件下で行うと同時に、セシウム吸収に関連する遺伝子をより多く同定するために、MG-20 と B-129 を交配した後代である組換え自殖系統を用いた QTL (Quantitative Trait Locus) 解析を予定している。QTL 解析は、遺伝子型が既知の組換え自殖系統間の表現型の違いを解析することで、対象としている表現型を制御する遺伝子座を特定する解析手法である。現在35系統についてセシウム吸収特性を解析済みであり、最終的には約130系統まで増やす予定である。

ミヤコグサはモデル植物として分子生物学的な研究基盤も整備されており、マイクロアレイや遺伝子欠損株の利用も可能である。今後、これらのリソースを活用することによりセシウム吸収や輸送に関与する遺伝子を同定し、発現の抑制や活性を阻害する手法を開発することで土壌から植物体へのセシウム移行低減に貢献したい。

レタスにおける VLP(Virus-Like Particle)の一過性発現による

エディブルワクチンの開発に関する研究

上野 ひとみ (筑波大学 生物学類)

指導教員：小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

エディブルワクチン(食べるワクチン)は、植物内で抗原となるタンパク質を作り、経口投与するワクチンである。従来の注射型ワクチンと異なり、器具の衛生管理や冷蔵運搬・保管などの高度な技術が不要であるため、医療インフラが不十分な国でも使用できる可能性がある。さらに食べるワクチンは、注射型が誘導できない粘膜免疫を誘導できることから、病原菌の感染を防ぐ免疫応答が可能となる。

しかしエディブルワクチンが機能するためには、ワクチンが消化されずに腸管の免疫応答細胞まで届く必要がある。そこで本研究ではウイルス状粒子(VLP)というウイルスのコートタンパク質を用いた。VLP はウイルスの遺伝情報がないため、それ自体には病原性がない。さらに消化耐性があるため、目的の抗原を腸管まで届けられるという画期的なキャリアタンパク質である。

本研究ではレタスでの一過的な発現系を用いて、数種の動物ウイルスのコートタンパク質の中で植物細胞内で効率的にVLPを形成するものの選抜を目的とした。

材料・方法

実験植物としてレタス (*Lactuca sativa*、品種‘レッドファルダ’)を用いた。種子はロックウールに播種し、12 light/12 dark、20°C設定のチャンバーで約6週間生育させたものを使用した。

<ベクター作成>

pBYR2fp は、ジェミニウイルスのレプリコンを持つため、導入した植物細胞の中で大量に複製されることにより大量の目的タンパク質を発現するベクターである。このベクターに (1)E 型肝炎ウイルス(HEV)-VLP と HSV-tag とインフルエンザの M2 抗原(エンベロップ上にある膜イオンチャネルのアミノ酸配列の一部)を連結したコンストラクト (2)ノロウイルス (NoV) の NV68、TCH、Saga、Saitama の4種の VLP を発現するコンストラクト (3)サポウイルス(SaV)の MC114、NK24 の2種の VLP を発現するコンストラクトを LR 反応により導入した。コンストラクトの塩基配列は DNA シークエンス解析により確認した。

<レタスへの感染>

完成したベクターは、アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 virG)に形質転換した。レタスの葉をアグロバクテリウムの培養液に浸し、減圧 (65~75cmHg) 処理を20分行った。培養液を拭き取ったレタスは、5日間 12 light/12 dark 20°C条件のチャンバーに静置した。感染効率を可視化するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を導入したアグロバクテリウムも感染させ、blue light により緑色蛍光を確認した。

<タンパク質解析>

葉からタンパク質抽出を行い、SDS-PAGE とウエスタンブロットティングを用いて、タンパク質の発現と分子量を確認した。また Bradford Assay によりタンパク質の収量を確認した。ポジティブコントロールとして、大腸菌(BL21star)で発現させたタンパク質を使用した。

結果・考察

blue light を照射した結果、レタスの葉に緑色蛍光が観察でき、アグロバクテリウムが高い頻度で感染していることが確認できた。

Western blotting の結果、(1)ではバンドが 55 kDa 付近に検出された。これはポジティブコントロールとほぼ同等の分子量だった。

(2)では、NV68 種と TCH 種でポジティブコントロールと同等の大きさのバンド (60 kDa) が検出されたので、レタスで VLP の生産が大量に出来ていることが確認できた。

(3)は現在実験中である。タンパク質の収量も現在測定中である。

今後の計画としては(1)でタンパク質の発現量を増加させるために、導入する遺伝子のコドンを植物に最適化させたコンストラクトを用いて、レタスへの感染を行う予定である。

謝辞

本研究を行うにあたり、ベクターを提供していただきましたアリゾナ大学の Hugh Mason 博士、三浦謙治博士、遺伝子の cDNA クローンと特異抗体をご用意して下さった筑波大学人間総合科学研究科の竹内薫准教授、森川一也准教授、(独) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター長 保富康宏博士に心より感謝申し上げます。

またご指導頂きました、植物発生生理学研究室の鎌田博教授、小野道之准教授、小野公代博士をはじめ研究室の方々に心より御礼を申し上げます。

葉緑体形質転換による経口ワクチン開発に関する研究

高橋 享佑 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

現在使われているワクチンには、運搬・保存にコールドチェーン (低温流通体系) を必要とすることや、生産・精製に多くのコストがかかること、また、注射器を用いることによる事故や衛生面への問題が生じてしまうことなどの問題がある。これらは特に発展途上国においては致命的な問題となり得る。そこで、提案されたのが、経口ワクチンである。植物にワクチンを作らせ、そのまま経口接種ができれば、これらの問題点の大部分を改善することができる。また、経口ワクチンのもう一つの利点は、粘膜性免疫と全身性免疫の両方を誘導することができることである。粘膜性免疫はウイルスが体内に侵入する前の防御、全身性免疫は侵入後の防御であり、この2段階の防御で効果的に感染を防ぐことができる。しかし、ワクチンタンパク質を経口接種した場合、それらが消化により分解されてしまうことが問題となる。そこで、本研究ではワクチンタンパク質を消化から守るキャリアータンパク質として VLP (Virus-like Particle) という核酸を欠いたウイルスのコートタンパク質を用いた。

経口ワクチン開発に向けて、葉緑体形質転換技術を応用することを考えている。葉緑体は組換えタンパク質生産の場として注目されている。その理由は、葉緑体ゲノムが多コピー存在することから、形質転換により大量のタンパク質の発現が期待できるからである。また、葉緑体は母性遺伝することが知られていて、花粉による環境中への導入遺伝子の拡散が起こりにくいということも利点である。

本研究では、葉緑体形質転換のモデル植物として知られるタバコを用いて、インフルエンザに対するワクチンタンパク質を HEV (E 型肝炎ウイルス) の VLP との融合タンパク質として発現させ、その蓄積量、構造、免疫原性を調べ、食用植物への応用に向けた知見を得ることを目的としている。

材料・方法

植物はタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR-1) を用いた。タバコは無菌状態で育て、葉を採取して遺伝子導入を行った。ワクチン抗原タンパク質には、インフルエンザウイルスの M2 (Membrane ion channel 2) を用い、キャリアータンパク質として、HEV-VLP を用いた。また、HEV-VLP と M2 との間のリンカータンパク質として HSVtag を用いた。

1. タバコ葉緑体ゲノムへの遺伝子導入

採取したタバコの葉を約 5 mm 角に切り刻み、培地上に並べ、葉緑体形質転換用ベクター (pKMS24-HEV-HSVtag-M2) をバイオリスティック法により導入した。ベクターには目的遺伝子の他に、スペクチノマイシン耐性遺伝子と GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子が含まれている。

2. 遺伝子導入後の選択培養

遺伝子導入後の葉片を、スペクチノマイシン含有培地に移し、組織培養を行った。遺伝子が葉緑体ゲノムに入っていれば、再分化し、新たなシュートが誘導される。得られたシュートに対し、GFP の蛍光観察、PCR 解析を行い、目的遺伝子が葉緑体ゲノムに入っているかを確認した。遺伝子導入が確認できたら、組織培養による選択と再分化を繰り返し、ホモプラズミー (全ての葉緑体が形質転換葉緑体となった状態) 系統の作出を目指した。

3. タンパク質の発現解析

目的タンパク質が発現・蓄積しているかを確認するためにウェスタンブロッティングを行った。葉からの抽出液を SDS-PAGE で分画後、PVDF 膜に転写した。ブロッティング後、膜を anti-HSVtag 抗体と反応させた。その後、標識された二次抗体と反応させ、発光を観察した。

結果・考察

いくつかの系統で目的遺伝子の葉緑体ゲノムへの導入が確認された。PCR 解析の結果、それらはいずれもヘテロプラズミー (野生型葉緑体と形質転換葉緑体が混在した状態) であることがわかった。ヘテロプラズミー系統を繰り返し再分化させているが、ホモプラズミー系統は未だ得られていない。ヘテロプラズミー系統では、GFP の蛍光は見られ、ベクター上の遺伝子の発現は確認できた。しかし、ウェスタンブロッティングの結果、バンドが確認できず、目的のタンパク質の蓄積量は検出限界量以下であると考察する。今後は、引き続きホモプラズミー系統の作出を目指す予定である。

謝辞

本研究に際し、VLP 遺伝子は (独) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 長保富康宏博士に提供していただきました。コンストラクトは筑波大学人間総合科学研究科 竹内薫准教授に頂きました。厚く御礼申し上げます。葉緑体形質転換をご指導くださいました (独) 農業生物資源研究所 田部井豊博士、奥崎文子博士の両氏に心から感謝いたします。形質転換ベクター pKMS24 を快く提供してくださった米国ラトガース大学 ワクスマン研究所の Pal Maliga 博士に心から感謝いたします。ご指導いただいた鎌田博教授、小野公代博士、植物生理学グループの皆様にも心から感謝いたします。

オプシンファミリーの分子系統解析

徳嶋 賀彰 (筑波大学 生物学類)

指導教員：橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

背景

視物質であるロドプシンは補欠分子族であるレチナールとアポタンパク質より構成される。ロドプシンは光を受容する事によりカスケード反応の引き金となり、G タンパク質を介してシグナルを下流へ伝える。このような働きをするタンパク質はロドプシンの他にも多く知られており、それらはオプシンファミリーとして概括される。オプシンファミリーはさらに G タンパク質共役受容体 (GPCRs) に包含される。オプシンにより活性化される G タンパク質の種類によりオプシンファミリーはいくつかのサブタイプに類別される。サブタイプはさらに発現部位等により類別される。下位分類間の分子系統学的関係は、色覚を有する脊椎動物や節足動物のオプシンに注目したものは数多く研究されているが、それ以外の動物群のデータを用いた研究はあまりなされていない。オプシンは真正後生動物の共通祖先で獲得されたと考えられており、真正後生動物の中で最も古くに分岐した動物は刺胞動物であると目されている。近年、刺胞動物のオプシンを用いた分子系統解析がなされているが、刺胞オプシンは単系統群を構成するという仮説と多系統群を構成するという仮説の両方が提唱されており、いずれの系統樹も統計学的に高い支持を得ていない。また、いずれにおいても、刺胞オプシンを網羅的に使用したわけではなく、使用された刺胞オプシンの配列数も少ない。この問題を解決するべく、本研究では刺胞オプシンを網羅的に用いた大規模分子系統解析を行った。

方法

オプシン配列を問い合わせ配列とした Basic Logical Alignment Search Tool (BLAST) による検索とキーワード検索を配列データベースである Genbank に対して行い、様々な後生動物種がもつ 308 の様々なオプシン配列を収集した。特に刺胞オプシンについては、全ゲノムが解読されている 2 種のゲノムデータベースに対する検索も行い、*Nematostella vectensis* (イソギンチャク) については 32、*Hydra magnipapillata* (ヒドドラ) については 5 のオプシン配列を得た。GPCRs に属しオプシンファミリーに属さない 38 配列を外群として用い、全 340 配列からなるアラインメントを作製した。アラインメントで不揃いな座位を視察により検出・除去し 184 座位を選択して分子系統解析のデータセットとした。これをもとに RAxML プログラムを用いて最尤法により分子系統樹を推定した。進化速度の不均質性を考慮に入れた解析を行うため、 Γ モデルを導入し、アミノ酸置換モデルとして LG モデルを仮定した。アミノ酸組成の定常分布は用いたデータセットより推定した。10 個の初期系統樹を作製し、それぞれを出発点として尤度のより高い樹形を探索し、得られた 10 個の最適系統樹の中から尤度最大のものを最尤系統樹として選択した。この系統樹の信頼性を評価するべく、100 個のリサンプリングデータに基づくブートストラップ解析を行い、各内部枝に対するブートストラップ値を算出した。

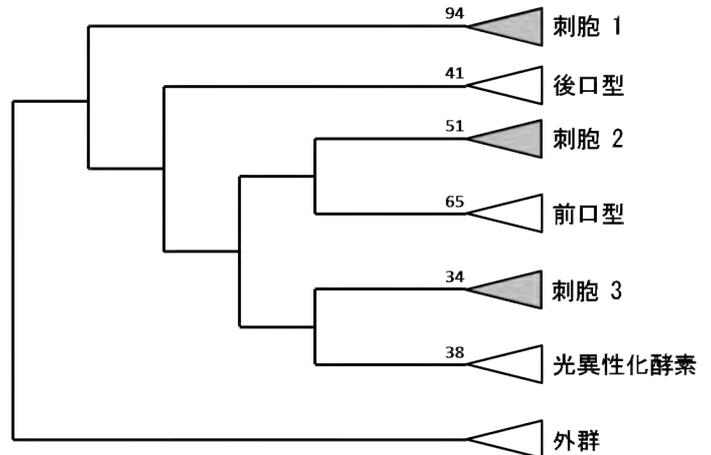


図 1: オプシンの最尤系統樹の概形。数値は Bp 値を表す。刺胞動物のオプシン (刺胞オプシン) は 3 つの部分系統樹に分割された (刺胞 1, 2, 3)。後口動物型オプシン (後口型)、前口動物型オプシン (前口型)、光異性化酵素は単系統群を構成し、後二者はそれぞれ刺胞オプシンと姉妹群を構成した。

結果

推定した最尤系統樹の概形を図 1 に示した。刺胞オプシンは 3 つの部分系統樹に分割され、多系統群を構成した。Bp 値 94 で支持されたクレード (刺胞 1) はオプシン系統樹の根もとより最初に分岐した。Bp 値 51 のクレード (刺胞 2) は前口動物型オプシンと姉妹群を構成し、Bp 値 34 のクレード (刺胞 3) は光異性化酵素と姉妹群を構成した。しかしながら、これら各刺胞オプシンの位置付けについては系統樹の深い分岐に対する Bp 値が低いために確実なものとはいえなかった。

考察

刺胞オプシンの多系統性が真実であれば、多様なオプシンを生じさせた遺伝子重複の一部が刺胞動物の分岐以前に既に起きていたという可能性が考えられる。多系統性をさらに詳細に検証するために、現在、類似度の高い配列を取り除き配列数を少なくしたデータセットを用い、統計検定により分岐パターンの信頼度を評価している。

カタブレファリス類 *Roombia* sp. のミトコンドリアゲノムの解読

平澤 輝仁 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

目的と背景

真核生物は、細胞内共生した α プロテオバクテリアを起源とするミトコンドリア (mt)、もしくは mt 関連オルガネラを持つ。mt ゲノムのサイズは、 α プロテオバクテリアのゲノムサイズに比べはるかに小さいため、オルガネラ化の過程で強い縮小圧が働いたと考えられる。また真核生物系統間で、mt ゲノムにコードされる遺伝子の構成やその構造に大きな多様性があることが分かっている。mt ゲノム進化中では縮小圧が定常的に働いてきたと考えられるが、mt ゲノムでは配列内にタンパク質 (IEP) をコードした転移性イントロンの獲得と喪失が繰り返されていることが明らかとなりつつある。従って、mt ゲノムの進化はこれまで考えられてきたような縮退のみのシンプルなものではないと考えるべきである。本研究では、これまでにカタブレファリス類 *Leucocryptos marina* における mt ゲノム断片配列を決定し、その cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子に菌類由来グループ I (gI) イントロンが挿入されていることを明らかとした。しかし、本イントロンがカタブレファリス類の共通祖先で獲得されたものであるのか、*Leucocryptos* において近縁種から分岐後に獲得されたのかは不明であった。そこで本研究では、同じくカタブレファリス類の一種 *Roombia* sp. の *cox1* 遺伝子構造を明らかとし、カタブレファリス類の *cox1* イントロン進化の理解を深めることを目的として実験を行った。

方法と材料

本研究で確立された *Roombia* sp. のトランスクリプトームデータのコンティグ配列に対してカタブレファリス類に近縁であるクリプト藻類 *Rhodomonas salina* および *Hemiselimis andersenii* の mt 遺伝子配列をクエリとして相同性検索を行い、*cox1* 遺伝子転写産物配列を決定した。本トランスクリプトームデータ中のコンティグ配列が正しいことを確認するため、以下の手順で実験を行った。

URO+UY 培地、20 °C で培養した *Roombia* sp. 細胞から、CTAB 法によりゲノム DNA (gDNA) を抽出した。RNA の抽出には TRIzol Reagent を用いた。RNA の逆転写反応には SuperScript II 及びランダムヘキサマーを用いた。gDNA 及び cDNA を鋳型として、上述のコンティグ配列から作成した exact match primer を用い遺伝子配列の増幅を行い、増幅産物はクローニング後塩基配列を決定した。gDNA 及び cDNA から増幅された塩基配列を比較することでエキソン領域およびイントロン領域を同定した。

結果と考察

本研究により *Roombia* sp. の *cox1* 遺伝子配列約 26 Kbp を解読した。本配列断片は合計約 1.3 Kbp のエキソン領域と、合計約 25 Kbp のイントロン領域で構成されていた。本遺伝子には 13 個のイントロンが含まれており、cDNA 配列との比較結果から、すべてのイントロンについてスプライシングが正常に機能していることが確認された。同定された 13 個のイントロンはすべて、グループ II (gII) イントロンに特徴的な末端コンセンサス配列と、gII イントロンのスプライシングに重要なステム/ループ構造を取りうる領域を持つため、gII イントロンであると考えられる。*Roombia* sp. *cox1* 遺伝子には gI イントロンは挿入されておらず、近縁種である *Leucocryptos* が有する *cox1* gI イントロンは、*Leucocryptos* が *Roombia* から分岐した後に獲得されたと考えるのが妥当である。13 個のイントロンのうち、10 個はそれぞれ一つずつイントロンコードタンパク質 (IEP) を有しているが、5'側から 2 番目と 13 番目のイントロンは IEP を持たず、4 番目のイントロンは IEP を 2 つ持つことが分かった。mt ゲノム解析が進んでいる菌類以外では、mt ゲノム上の 1 つの遺伝子中に 13 個ものイントロンを持つ例は珍しく、これらのイントロンの大部分、もしくは全てが水平転移によって獲得したと考えられる。現在、挿入部位の比較解析や IEP を用いた系統解析を行っており、それらの起源を決定することを試みている。

シストにも有効な抗トキソプラズマ薬シード候補の探索

山野 安規徳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はアピコンプレクサに属する細胞内寄生生物であり、ヒトにも感染する病原微生物である。トキソプラズマはすべての温血動物のすべての有核細胞に感染能を持っていると言われており、多くの場合、原虫は宿主に何ら症状を起こさず不顕性感染として宿主に一生寄生し続けることができる。主な感染経路は経口感染であり、腸管壁から宿主体内に侵入し、宿主の細胞に侵入すると寄生体胞 (parasitophorous vacuole) を形成しその中で増殖する。原虫の増殖に伴い寄生体胞は肥大化していき、最終的には細胞を破裂させ、ふたたび周囲の細胞に侵入することを繰り返す。この時期の原虫を急増虫体 (tachyzoite) と呼ぶ。急増虫体は通常宿主免疫系の作用によって排除されるが、免疫系の作用が及びにくい筋肉や脳でシスト壁 (cyst wall) を形成してその中で緩やかに増殖を続ける。シスト壁は外部ストレスなどからトキソプラズマを守る役割を担っている。このシスト壁中の原虫を緩増虫体 (bradyzoite) と呼ぶ。宿主の免疫能が HIV 感染などによって低下すると、緩増虫体は急増虫体に再分化し、宿主に重篤な症状を与える。急増虫体に対する治療薬としてはピリメサミン、スルファジアジンなどが存在するが、シスト壁に囲まれた緩増虫体に対する治療薬は存在しない。

先行研究で、トキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) を産生し、原虫はこのホルモンにより自身の増殖を調節していることが明らかになった (Nagamune *et al.* 2008)。ABA 生合成阻害薬であるフルリドンの培養中への添加により ABA の生合成を阻害すると、原虫のシストへの分化が誘導された。以上の結果より、トキソプラズマのステージ転換に植物ホルモンが重要な役割を担っていると考えられる。そこで本研究では、まだ解明されていないシストからの再分化する仕組みの解明や緩増虫体の治療薬のシード候補探索を、植物ホルモンまたは阻害剤を用いることで行うことができるのではないかという発想に至った。

材料・方法

材料: トキソプラズマ PLK/DUAL 株、HFF 細胞 (宿主細胞)

●薬剤スクリーニング

通常培養培地から RPMI1640 培地 (1 % FBS, 50 mM HEPES, 0.1 % Gentamicin をそれぞれ添加, pH 8.1) に培地を交換し、通常大気中で7日間培養することによってトキソプラズマの急増虫体を緩増虫体に分化誘導した。分化した緩増虫体にさまざまな植物ホルモンや阻害剤を 100 μ M 添加し、

48 時間後に蛍光顕微鏡観察を行った。スクリーニングによって顕著な差が認められたものに関しては再現性およびより低濃度での効果を確認した。

●薬剤の宿主細胞への影響

コンフルエントな HFF 細胞に、スクリーニングにより顕著な差が認められた薬剤をさまざまな濃度で添加し、48 時間後に Cell Counting Kit-8 (同仁堂) を用いて細胞毒性試験を行った。

結果・考察

用いた薬剤のうち A, B は有意に急増虫体・緩増虫体いずれをも減少させた。また宿主細胞への影響を調べたところ、どちらの薬剤も HFF 細胞に影響を及ぼしたが、B に関してはその感受性はトキソプラズマより低かった。そのため薬剤 B に関してはトキソプラズマ抗シスト薬として利用できる可能性がある。

A, B 処理により、どのような作用機序によってトキソプラズマが死滅するのか、また *in vivo* での効果はあるのかについて現在探索中である。

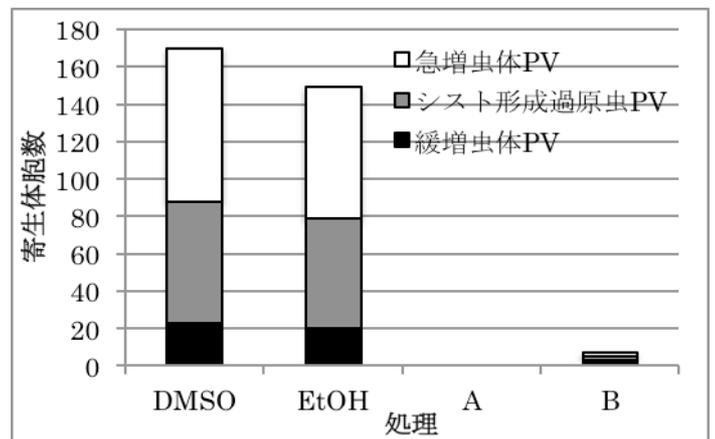


Figure 1: 薬剤 A, B はトキソプラズマの急増虫体と緩増虫体の寄生体胞 (PV) 数を減少させる。値は 630 倍、40 視野あたりの寄生体胞数で示す。

Karenia 属渦鞭毛藻類のハプト藻類由来葉緑体への移行シグナル様配列に関する研究

松尾 恵梨子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

背景

光合成性渦鞭毛藻類の一種である *Karenia* 属の宿主核ゲノムには、進化的起源は異なるが機能的に相同だと考えられる 2 種類の葉緑体型 GAPDH がコードされている。GAPDH 系統樹中では、それぞれ典型的な光合成性渦鞭毛藻類の葉緑体で働く GAPDH タンパク (GapC1-p)、渦鞭毛藻類とは別系統の二次植物であるハプト藻類の葉緑体で働く GAPDH タンパク (GapC1-h) との近縁性が復元された。この進化的起源の異なる 2 種類の葉緑体型 *gapdh* 遺伝子を持つという特徴は、*Karenia* 属渦鞭毛藻類における特異な葉緑体進化を反映していると考えられる。

祖先渦鞭毛藻類は細胞内共生した紅藻類細胞から、渦鞭毛藻類特異的な補助色素であるペリディニンを含む「ペリディニン型葉緑体」を確立したと考えられている。光合成性渦鞭毛藻類の大多数はペリディニン型葉緑体を持つが、*Karenia* 属はハプト藻類を細胞内共生体として獲得し、元々持っていたペリディニン型葉緑体をハプト藻類細胞由来の葉緑体に置換した。したがって *Karenia* 属における進化的起源の異なる 2 種類の *gapdh* 遺伝子は、以下に述べる進化的背景を持つと考えられる: *gapC1-h* 遺伝子は *Karenia* 属の祖先細胞が持っていたペリディニン型葉緑体からハプト藻由来葉緑体へ置換した際、Endosymbiotic gene transfer (EGT) により獲得されたものであり、*gapC1-h* 遺伝子はかつてペリディニン型葉緑体で使用されていた *gapdh* 遺伝子の名残である。

ただし上述の仮説は配列データのみに基づき、2 種類の「葉緑体型」GAPDH が本当に葉緑体で働くかどうかは実験的な裏付けがない。

本研究では *Karenia* 属渦鞭毛藻類における 2 種類の「葉緑体型」GAPDH の細胞内局在を解明を目指す。そこでまず、それらのタンパクの N 末端プレ配列を GFP に付加した融合タンパクをコードしたプラスミドコンストラクトを作製した。このコンストラクトを渦鞭毛藻類の近縁生物であり形質転換系が確立されている *Toxoplasma gondii* (アピコンプレクサ類) 内で発現させ、GFP の蛍光により融合タンパク質の局在を観察することを目指している。

材料・方法

・GAPDH の N 末端プレ配列の取得

K. brevis 細胞からの RNA 抽出は Trizol を用いて行った。*K. brevis* の RNA を用いて、GapC1-p および GapC1-h の N 末端伸長配列を含む領域を逆転写 PCR によって得た。塩基配列決定後、データベースに基づいて入力したアミノ酸配列からシグナル配列を予測するプログラムである signalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) によりシグナル配列の有無を確認した。

・プレ配列を GFP と連結したコンストラクトの作製

GapC1-p および GapC1-h の N 末端プレ配列をコードした二

本鎖 DNA に対し、*EcoRI* の制限サイトを 5' 末端に付加したフォワードプライマーと、GFP センス鎖 5' 末端に相補的な配列を付加したリバースプライマーを設計して PCR を行った。また同様に、GFP をコードした二本鎖 DNA に対し GAPDH センス鎖 3' 末端に相補的な配列を付加したフォワードプライマーと、*PacI* の制限サイトを付加したリバースプライマーを設計して PCR を行った。各 PCR 産物をアニーリングし、伸長反応によって各 GAPDH 遺伝子の N 末端プレ配列が付加された改変 GFP 遺伝子断片を作成した。これらの遺伝子断片を *EcoRI* および *PacI* で処理し、同様に処理した *T. gondii* 発現用 pBS ベクターに組み込んだ。作成されたプラスミドの塩基配列を決定し、フレームシフトや塩基配列に誤りがないことを確認した。

結果と考察

K. brevis GapC1-h の N 末端プレ配列を PCR 増幅後複数クローンの塩基配列を決定したところ、配列の違いから大きく 2 つのタイプに大別された。どちらのタイプもシグナル配列を持つと予想され、シグナルペプチド切断部位から成熟タンパク質領域にトランジットペプチド様配列と思われる数十アミノ酸残基の中間領域が認められた。それぞれのタイプから代表的なプレ配列を 1 つ選び、GFP 遺伝子の 5' 末端配列に本配列を付加することで N 末端にプレ配列が融合した 2 種類の GFP 遺伝子 (hGFP) を作成できた。一方、GapC1-p の N 末端プレ配列にはシグナル配列が予測されなかった。しかし開始メチオニンから約 25 アミノ酸残基までの S-score (シグナル配列と非シグナル配列の比較によって導出された、あるサイトがシグナル配列である尤もらしさを示す尺度) は、いずれのサイトでも少なくとも 0.2 より上で、最大は 0.6 に達した。成熟タンパク質領域も含むそれ以降の配列の S-score は全てのサイトで 0.2 未満だったことから、この N 末端プレ配列がシグナル配列として機能しないとはまだ断定できない。また、GapC1-p の N 末端プレ配列はクローン間に有意な多型が認められなかったため、1 種類の N 末端プレ配列が融合した GFP 遺伝子 (pGFP) を作成した。それぞれの GFP 遺伝子をベクターに組み込むことにより、計 3 種類のプラスミドコンストラクトの作成に成功した。

今後作成したプラスミドコンストラクトにより *Toxoplasma* 細胞を形質転換し、蛍光により融合 GFP タンパク質の局在を観察することで、*Karenia* 属 GapC1 タンパクの N 末端プレ配列が葉緑体局在シグナルとして機能するかどうかを検討してゆく。

Fornicata 生物の持つミトコンドリア関連タンパク質に存在する輸送シグナルの探索

久米 慶太郎 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Fornicata 生物群は嫌気性または微好気性の単細胞生物から構成される単系統の分類群である。この分類群には Diplomonads、Retortamonads、*Carpodomonads-like organisms* (CLOs) などが含まれており、すべての系統で典型的なミトコンドリアを欠く。その代り、ミトコンドリアから進化し、機能が縮退しているミトコンドリア関連オルガネラ (MRO) を有している。その代表例が *Giardia intestinalis* (Diplomonad) の持つマイトソームである。Fornicata 生物群は同じく MRO を有する *Trichomonas vaginalis* が含まれる Parabasalia と互いに姉妹群の関係にある。*Trichomonas* が有する MRO を特にヒドロゲノソームと呼ぶ。

本研究室におけるこれまでのトランスクリプトーム解析で、CLOs の一種である *Dysnectes brevis* NY0165 株および未記載種 NY0171 株における核コードミトコンドリア関連遺伝子が同定され、それらは MRO 内で機能している可能性が高い。典型的なミトコンドリアや *Giardia* のマイトソーム、*Trichomonas* のヒドロゲノソームでは、細胞質で翻訳されたミトコンドリア用タンパク質は N 末端に伸長領域を有し、それらがトランジットペプチドとして認識されることでミトコンドリアや MRO へと輸送されることが知られている。

しかし、*Dysnectes* や NY0171 株において細胞質で翻訳された核コード MRO タンパク質がどのように MRO 内に輸送されるかは不明である。そこで本研究では、トランスクリプトーム解析で同定された MRO 遺伝子がコードするタンパク質が持つ輸送シグナルがどのような特徴を有しているか調べることを目的として実験を行った。

Materials and Methods

全長配列決定:

MRO 遺伝子配列は *Dysnectes* と NY0171 株のトランスクリプトームデータから相同性検索により抽出した。

取得した配列が mRNA の一部しかカバーしていない場合は、それぞれの株の培養細胞から抽出した total RNA を用いて 5' RACE および 3' RACE を行い、mRNA の完全長を決定した。

配列比較:

MRO 関連タンパク質に加え、*Trichomonas* のヒドロゲノソーム、*Giardia* のマイトソーム、そしてミトコンドリアの起源に近いとされる α -proteobacteria の相同タンパク質を用いて、MAFFT v7.015b プログラム及び手動によりアライメントデータを作成した。N 末領域に伸長が見られた配列について、伸長領域の二次構造を、PSIPRED v3.3 プログラムに加え DSC、MLRC、PHD 及び Predator をもちいて予測した。

Results and Discussion

本研究により、トランスクリプトーム解析及び RACE 法により MRO 関連タンパク質遺伝子について、*D. brevis* 及び NY0171 株からそれぞれ 24 個と 23 個の全長 mRNA 配列を決定することに成功した。また、 α -proteobacteria と比較して、その MRO 関連タンパク質の内、それぞれ 20 個と 19 個のタンパク質について N 末端側に 6-87 アミノ酸残基の伸張配列が存在し、それら以外には N 末端側の伸長は認められなかった。

21 個の MRO 関連タンパク質は、N 末端側に α -ヘリックスを形成する部分を含むことが推測された。さらにこのヘリックスは、疎水性面及び正に帯電した面を共に含むヘリックス (amphipathic helix) であることが示唆された。この特徴は典型的なミトコンドリアへの輸送シグナルにみられる特徴と類似している。すなわち、機能が縮退した MRO であっても、典型的ミトコンドリアと相同なタンパク質輸送経路を有している可能性が高い。しかし、本研究で推定された MRO タンパク質配列の内、26 個は上述のような特徴を持たなかった。このことは *Dysnectes* や NY0171 株において、新規なタンパク質輸送機構も同時に存在することを示唆している。

伸張配列領域を互いに比較した結果、*Dysnectes* では共通したモチーフは見られなかった。しかし NY0171 株では多くのタンパク質に共通したモチーフ様配列 $\Phi(R/K)\Psi\Phi X(R/K)$ が存在した (疎水性アミノ酸残基: Φ 、親水性アミノ酸残基: Ψ)。その配列は N 末端より 1-30 アミノ酸残基の範囲に存在していた。このモチーフが NY0171 株における新規輸送経路の一端を担っている可能性が考えられた。

遺伝学的手法を用いたホヤ母性 mRNA 研究の展開

佐藤 瑛生 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 笹倉 靖徳 (筑波大学 生命環境系)

・背景・目的

動物の卵には、母親由来の mRNA やタンパク質などの分子が蓄積されており、これらを総称して母性因子という。これらの分子は、発生過程において胚性の遺伝子発現が始まる以前から分化制御や形態形成などに重要な役割を果たしていることが知られており、動物の発生を理解する上でそれらの機能解明は欠かせない。また母性因子には卵や初期胚の特定の領域に局在して機能するものがあり、特にそのような因子は初期発生において中心的に働くため、その局在メカニズムや機能に興味を持たれている。脊索動物であるホヤの卵は典型的なモザイク卵であることで 100 年以上も前から発生の好材料として研究が進められてきた。このホヤ卵の中では特徴的な局在パターンを示す一群の mRNA が見つかっており、postplasmic/PEM RNA 群と呼ばれている。この RNA 群は未受精卵では卵表層に存在しているが、受精後の細胞質再配置によりまず植物極側に、ついで後極へと輸送される。この過程にはアクチン繊維や微小管等の細胞骨格が必須であることが示されているが、実際に mRNA を卵の中で移動させる分子の実態については未だ分かっていない。私は細胞骨格上を移動して物質の輸送を行うモータータンパク質に注目して mRNA 局在メカニズムに関わる因子の解明を目指している。本研究の達成のためには、ホヤの卵で発現しているモータータンパク質を同定する必要があり、本研究ではゲノム情報を元にしてその同定を試みた。

また、卵での発現が確認されたモータータンパク質に関しては、その遺伝子を機能阻害することを通じて局在への機能を検討する。この遺伝子機能阻害には、当研究室で確立されている母性での遺伝子機能を特異的に阻害する遺伝学的手法を用いる。しかしこの技術に関しては不明な点が多い。そのため、この手法において母性での遺伝子機能阻害を起こすために必要な条件について検討した。

・方法・結果

1. mRNA 局在に関わる因子の同定

ホヤの一種カタユレイボヤではゲノム配列が解析されている。ホヤの遺伝子データベースにおいて、カタユレイボヤのモータータンパク質関連遺伝子の検索を行った。検索結果のリストから、actin や tubulin など、既に機能が判明している遺伝子ならびに mRNA 局在への関連がないと強く予想される遺伝子を除いた。続いて EST 情報を利用して、卵で EST が確認されていない遺伝子(すなわち卵で発現しないことが強く示唆される遺伝子)を候補から除外した。その結果、17 遺伝子を得た。

これら 17 遺伝子が実際に卵で発現していることを確かめるため、これらの遺伝子の発現の様態を whole-mount in situ ハイブリダイゼーション法 (WISH) により解析した。WISH のサンプルには受精卵と 8 細胞期胚を用いた。その結果、10 種類の遺

伝子について卵及び初期胚における発現を確認できた。そのうち、6 種類が myosin ファミリー、2 種類が kinesin ファミリーの遺伝子であった。kinesin とは対照的に、今回の実験では卵における dynein の発現は確認されなかった。また、motor activity への関与が示唆されている DACH1、PIK3C2 の遺伝子も発現が確認された。

2. 遺伝子機能阻害に向けた条件検討

現在確立されている遺伝子機能阻害方法では、標的とする遺伝子の転写調節領域並びに 5' UTR の下流に GFP をコードする遺伝子を繋いだ DNA をホヤに導入してトランスジェニック系統を作成することでノックダウンを起こす。この手法において、レポーター遺伝子 GFP への依存度を確かめる目的で、GFP を他のレポーター遺伝子に換えた場合にノックダウンが起こるか検討した。GFP を DsRed, Kaede, Azami Green のそれぞれに換え、pem 遺伝子を標的としてノックダウンの有無を観察したところ、これらの系統において pem 遺伝子のノックダウンが確認された。

・考察

postplasmic/PEM RNA に関して、「背景」にも書いたように局在は 2 ステップで生じることが判明している。最初のステップである植物極側への移動にはアクチン繊維を介していると考えられており、その後の後極への輸送は微小管を介して行われる。今回の実験では卵における myosin と kinesin の発現が確認された。この結果は、植物極側への mRNA 輸送には myosin が、後極への輸送には kinesin がそれぞれ関わっている可能性を示唆する。また、今回 dynein の発現が確認されなかったが、このことは、微小管のマイナス端方向へ移動する性質の dynein が一般的に細胞の中心方向への輸送に関わっていることを踏まえ、postplasmic/PEM RNA が細胞表層に局在することと矛盾しない。

機能阻害の条件検討については、ノックダウンを起こすために GFP が必須で無いことが示された。ノックダウンの起こるメカニズムに関しては依然不明であるが、組み込んだ遺伝子の転写産物が何らかの理由で断片化されて small RNA 様の機能を果たした結果、標的遺伝子の転写抑制が起こるのではないかという仮説が考えられる。

・今後の実験計画

今回の実験で、mRNA 局在メカニズム関連遺伝子の候補をいくつか絞り込んだ。今後はこれらの遺伝子の母性発現をノックダウンする系統を作製することを通じて、母性 mRNA の局在メカニズムを解明したい。また、当研究室の母性遺伝子機能阻害法がなぜ生じるのかについてもアプローチしたい。

脊索、神経管の起源をギボシムシから探る

中澤 恵里 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

脊索動物を特徴づける主な形質として、神経管、脊索、鰓裂がある。本研究の目的は、これらの形質の一つである脊索がどのように進化の過程で獲得されたのか、その起源を探ることである。

脊索動物は後口動物に属する動物門である。後口動物には脊索動物の他に棘皮動物と半索動物が含まれる。近年の分子系統学の研究から、棘皮動物と半索動物は姉妹群を形成し、脊索動物との共通祖先から枝分かれしたとされている。よって、脊索動物に至る過程で獲得された脊索の起源の手がかりを探るためには、脊索動物に近い棘皮動物や半索動物と脊索動物との比較が重要である。しかし、棘皮動物は進化の過程で五放射相称型の体制や水管系などの形質を新たに獲得しており、脊索動物との形態比較を困難にしている。そこで、半索動物に着目する。半索動物にはフサカツギが属する翼鰓綱、ギボシムシが属する腸鰓綱、また化石種としてフデイシ綱が含まれる。フサカツギやギボシムシの成体は、脊索動物と同じように、背腹軸、前後軸、左右軸を持つ。これは脊椎動物の持つ体軸と同じであり、体制の比較がしやすい。フサカツギは固着生活性であり、日本国内での報告例は少ない。一方、ギボシムシは蠕虫型で自由生活性であり、日本では静岡県九十浜においてシモダギボシムシ *Balanoglossus simodensis* の集団が確認されている。また、シモダギボシムシはその生活環や発生も調べられており、安定したサンプルの確保、維持が可能である。これらの特徴から、後口動物に含まれる他の動物に比べ、脊索動物との比較を容易に行うことができ、かつ、実験動物として適するシモダギボシムシを材料に研究を行う。

過去に、ギボシムシの口盲管が脊索の相同器官と考えられたこともあった。口盲管はギボシムシの咽頭部が背側前方で吻内部に突出した構造である。しかし、現在では、口盲管に脊索のマスターコントロール遺伝子である *brachyury* の発現がないことや、脊索動物に至る過程で背腹軸の逆転が起こっているとしたときに脊索の相同物は腹側に位置しているだろうという予測から、口盲管は脊索の直接の相同構造ではないという見方が有力になっている。

口盲管以外に、脊索の起源を考えるうえで重要なギボシムシの構造としてピゴコードがあげられる。ピゴコードはギボシムシの体幹後方腹側に存在し、前後軸に沿って腸管壁中央が表皮方向に索状に垂れ下がった構造である。先に述べたように、脊索動物へ至る過程で背腹軸の逆転が起きているとすると、脊索の起源となるような構造は腹側に位置しているはずであり、ギボシムシの腹側に存在するピゴコードを脊索の起源となった構造であるとしても位置的に矛盾がない。さらに、背腹軸に沿ったピゴコードの位置を見ると、体の中心部から体表に向かって、腸管、ピゴコード、腹側神経束、表皮の順番に並んでいる。これは脊索動物の背腹軸に沿った脊索の位置を見たときの、腸管、脊索、神経管、表皮の順番に一致している。脊索とピゴコードを比較したときのこれらの位置的な類似性は脊索とピゴコードを関連付ける重要な根拠になっている。

しかし、ピゴコードについては、ギボシムシ腸管の腹側面にあ

る構造であるということしかわかっていない。そこで本研究ではシモダギボシムシを用いて、始めにピゴコードの形成過程を観察する。腹側に特異的な構造であるピゴコードがどのように他の腸管壁から区別され、形成されていくのかを組織切片観察によって明らかにする。また、脊索で発現が見られる *brachyury* や *collagen* などの遺伝子がピゴコードでも発現しているかを観察する。形成過程と遺伝子発現との双方向からの比較をすることでピゴコードと脊索の相同性を検証する。

Amyloid β の神経細胞への毒性を緩和する化合物の探索

飯田 顕久 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

高齢社会の進展に伴い、認知症患者の増加が問題となっている。その患者数は2002年には149万人であったのに対し、2012年には倍の300万人を突破した。認知症の主なものに、レビー小体型認知症、脳血管性認知症、アルツハイマー病がある。この中で脳血管性認知症の患者数は、治療法や予防法の進歩に伴い減少傾向にあるものの、アルツハイマー病患者は未だ増加傾向を示しており、認知症患者のうち約6割を占めるまでになっている。以上のことからアルツハイマー病の治療薬開発は喫緊の課題となっている。

アルツハイマー病は、年齢に関係した進行性の記憶障害や見当識障害、大脳巣症状(脳の限定した領域が欠損したために現れる症状)、精神症状などを臨床的特徴とする神経変性疾患である。アルツハイマー病患者の脳では、細胞間質への老人斑の蓄積や、神経細胞内の神経原線維変化が特徴的に起こっており、これらの存在がアルツハイマー病の確定診断に用いられているとともに、症状の原因とも考えられている。老人斑とは、機能不明な膜タンパク質APP (amyloid precursor protein) から切り出された、主に40-42残基のペプチドであるAmyloid β が細胞外で凝集・沈着したものであり、細胞膜上のイオンチャネルを遮断することでカルシウム恒常性の破綻を引き起こし、最終的に神経細胞死を引き起こすことが報告されている。また、神経原線維変化は細胞内微小管系が破綻した状態であり、凝集したAmyloid β が何らかのシグナル伝達系を介してタウタンパク質(神経特異的微小管結合タンパク質)を過剰にリン酸化することが原因だと考えられている²⁾。これらのことから、アルツハイマー病の治療戦略として、Amyloid β の凝集・沈着を防ぐ薬剤の開発が盛んに行なわれているものの、未だ根本的治療薬は見つかっていない。

アルツハイマー病の発症機構において、凝集したAmyloid β による神経細胞死が根本原因だと考えられる。このことはAmyloid β 存在下でも神経細胞の死を防ぐことができれば、アルツハイマー病の発症を抑えられる可能性を示唆している。そこで今回、Amyloid β の細胞毒性を緩和する薬剤探索を行うための薬スクリーニング系の構築を行い、薬剤探索を行うこととした。

材料

- SH-SY5Y
ヒト神経芽細胞腫由来細胞
15% FBS を含む DMEM + Ham's F12 (1 : 1) 培地で培養
- Amyloid β
PBS に溶かし、4°C で保存

方法

SH-SY5Y を 96 穴プレート (フィブロネクチンコート) に蒔き、24 時間培養した。細胞の定着を確認後、無血清培地 OPTI-MEM へと培地を交換するとともに Amyloid β を添加し、3-5 日後に顕微鏡撮影した。細胞写真は画像解析ソフト Image J を用いて二値化・定量を行い、細胞凝集割合を判定した。

また、5 日後の写真撮影後、WST-8 法を用いて細胞生存率を調べた。

結果

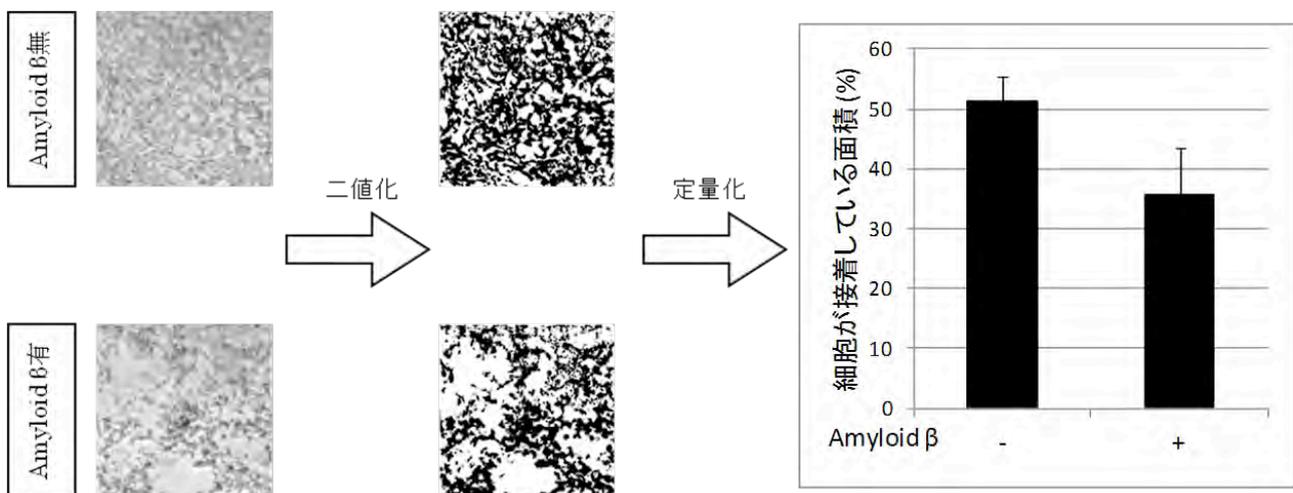
Image J による二値化・定量法 (下図)、及び WST-8 法による細胞生存率測定から、Amyloid β 処理により SH-SY5Y が凝集する様子や細胞生存率低下が確認できた。

現在、細胞内シグナル伝達経路に関わる化合物や、カルシウム恒常性を変化させる化合物などを中心に、Amyloid β による神経細胞への毒性を緩和する化合物探索を行っている。

詳細は発表会にて報告する。

参考文献

- 1) 服部尚樹, 北川香織, 中山靖久, 稲垣千代子「アミロイド β タンパクの神経毒性機構」日薬理誌 **131**, 326-332 (2008)
- 2) Tokutake T., Kasuga K., Yajima R., Sekine Y., Tezuka T., Nishizawa M., and Ikeuchi T., Hyperphosphorylation of Tau Induced by Naturally Secreted Amyloid- β at Nanomolar Concentrations Is Modulated by Insulin-dependent Akt-GSK3 β Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.*, **287**, 35222-35233 (2012)



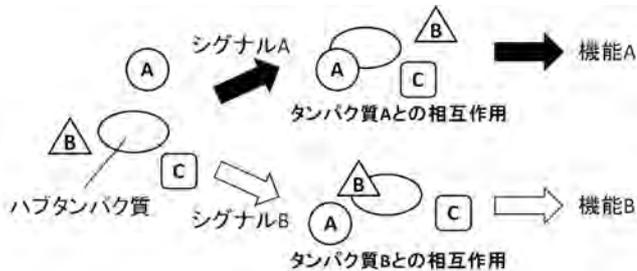
アクチン作用薬耐性酵母から精製したアクチンの特性

鏡 大志郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員：臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

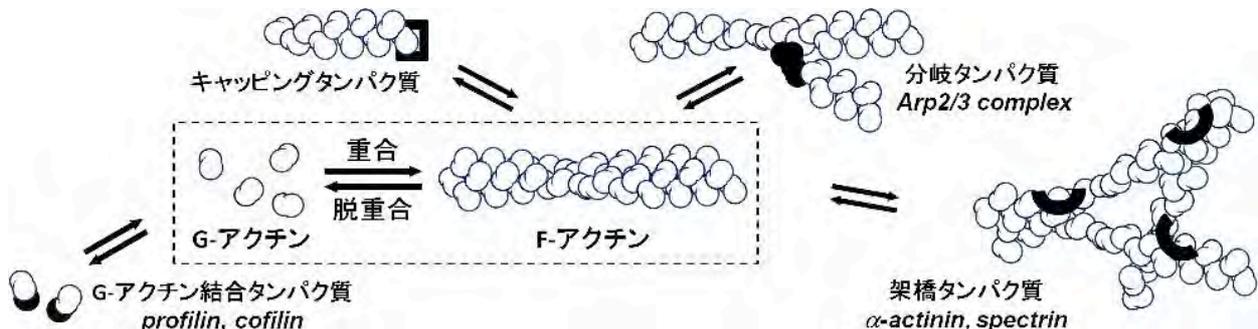
背景・目的

タンパク質は細胞内に高密度、かつ多量に存在する生体高分子であり、安定な複合体を形成して機能を果たしていることはよく知られている。しかしながら最近、一過的な結合・解離といったタンパク質-タンパク質相互作用 (protein-protein interaction: PPI) を頻繁に行っていることが明らかになってきた。このような結合・解離は決してランダムに起きているわけではなく、外的要因や細胞種、発生段階、細胞周期といった細胞の状況、リン酸化等の修飾や他の結合タンパク質の存在といった細胞内での状況などの様々な条件により制御されている¹⁾。特にシグナル伝達系では一つのタンパク質が異なる複数のタンパク質との間で PPI を起こす“ハブタンパク質”と呼ばれるタンパク質が存在し、外部のシグナルを柔軟かつ迅速に細胞内部に伝達している。



しかし、上記のような一過的な PPI の機能解析は一般に困難が伴う。特にハブタンパク質の機能解析では、遺伝子破壊や RNA 干渉によるタンパク質発現阻害では複数の PPI が同時に消失してしまうため、特定の PPI 機能の解析は不可能である。このような場合、特定の相互作用のみを阻害、あるいは強める小分子化合物が有用なツールとなる。例えば免疫抑制剤である FK-506 が結合した FKBP は calcineurin と PPI ができるようになるため、FK-506 は calcineurin の機能解析によく用いられている。しかし一般的に PPI は扁平かつ広い接触面同士が弱い結合により結合しているため、わずかな接触面しか持たない小分子化合物は結合することができず、阻害剤開発は困難なことが多い。

アクチンは細胞骨格の 1 つで、細胞内で重合・脱重合を繰り返す、細胞運動や細胞分裂、細胞の形態変化などの様々な生命現象において重要な役割を担っている。細胞内でのアクチン重合は、非常に多くのアクチン結合タンパク質 (Actin-binding proteins: ABPs) により、時空間的に制御されている (下図)。このことは、アクチンは ABPs との PPI によって重合・脱重合動態が制御されているともいえる。またアクチン重合そのものも、G-アクチン同士の PPI であると考えられる。



このような観点で既存のアクチン作用薬を見ると、アクチン重合阻害剤 latrunculin A は G-アクチンに結合し G-アクチン同士の PPI を弱めており、重合促進・安定化剤である jasplakinolide は F-アクチンのアクチン-アクチン界面に結合し、その PPI を強めているといえる。

本研究室では、薬剤耐性に関わる 12 遺伝子を破壊した多剤超感受性酵母を作成し、薬剤解析に用いている²⁾。昨年、この多剤超感受性酵母を用いて、アクチン作用薬に対し超感受性や耐性を示す、変異型アクチンのみを発現する酵母の作製に成功した (仙波 2011 年度卒論発表会)。今回これらの酵母の中から薬剤耐性を示した変異型アクチン発現酵母に着目し、精製酵母アクチンを用いて薬剤耐性機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

方法

1. 酵母アクチンの精製

野生型アクチン、またはアクチン作用薬耐性変異型アクチンのみを発現する酵母より、DNase I カラム及び陰イオン交換カラムを用いて酵母アクチンを精製した。

2. アクチン同士の相互作用 (アクチン重合) に対する影響

精製したアクチンに塩、及び薬剤を加え 25°C で 1 時間反応後、超遠心 (48,000 rpm, 40 分) し、上清と沈殿に分けた。これらを SDS-PAGE した後、CBB 染色により観察した。

3. アクチンと ABPs との相互作用に対する影響

ABPs の一つである spectrin のアクチン結合ドメインのみからなる minispectrin と F-アクチンを混合し、25°C で 30 分反応後、薬剤を加えさらに 30 分反応させた。超遠心 (48,000 rpm, 40 分) し上清と沈殿に分け、これらを SDS-PAGE した後、CBB 染色により観察した。

結果・考察

詳細は発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) De Las Rivas J., and Fontanillo C., Protein-Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLoS Comput. Biol.*, **6**(6): e1000807. (2010)
- 2) Chinen T., et al., Construction of Multidrug Sensitive Yeast with High Sporulation Efficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)

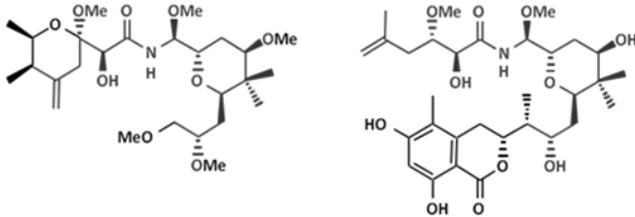
Irciniastatin A/Psymberin 耐性酵母の解析

島田 悟 (筑波大学 生物学類)

指導教員：臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

Irciniastatin A (以下 ISA、別名 psymberin) は抗腫瘍活性、タンパク質合成阻害活性を持つ Pederin 類¹⁾ に属する海産由来の天然小分子化合物である。しかしながら従来の pederin 類にはない非環式、及び dihydroisocoumarin 様側鎖を持ち、他の pederin 類よりも強い細胞毒性を動物細胞に示す²⁾ ことから、その標的分子・作用機構には興味を持たれている。



Pederin

Irciniastatin A (ISA)

そこで ISA の作用機構を検討したところ、タンパク質合成を阻害すること、ミトコンドリアから ROS 生産を介して p38/JNK 長期活性化とアポトーシスを誘導することが明らかになった³⁾。さらに、ISA がタンパク質合成阻害を示したことから chemical footprinting (リボソームと薬剤の結合を検討する手法の一つ) を行ったところ、25S rRNA に ISA 結合によるシグナルが検出された (Ota Y., 未発表)。以上の結果は ISA はリボソームに直接結合し、タンパク質合成を抑えることを示しているものの、他の pederin 類と比べて強い細胞毒性を示す理由は不明のままである。

以上の背景の元、我々は多剤超感受性酵母⁴⁾ を用いて、優性耐性変異株からの標的分子同定を試み、現在解析を進めている。一方、最近、多細胞生物のモデル生物である線虫 *C. elegans* を用いた解析から、リボソーム大サブユニット構成タンパク質である *RPL41* 中の P56L 変異が ISA 耐性を付与するとの報告がなされた²⁾。そこで ISA 優性耐性酵母の解析とともに、*RPL41* パラログである出芽酵母 *RPL42A* 遺伝子に P56L 変異を導入し、その薬剤感受性を検証することにした。

材料

・多剤超感受性出芽酵母株

薬剤非特異的耐性に関わる 12 遺伝子を破壊する事で、多くの薬剤に対し、高い感受性を示す株

・pRS315, pRS305

ロイシンマーカー (*LEU2*) を持つ、単コピー型、及びゲノム挿入型の出芽酵母—大腸菌シャトルベクター

方法

実験 1：優性耐性変異株からの標的分子同定

先行研究によって得られていた ISA 優性耐性変異株の戻し交配を行い、ISA 特異的耐性変異の絞り込みを行った。

実験 2：変異 *rpl42A* 発現酵母の作製と ISA 耐性検討

・方法 1-1：*rpl42A* (P56L) 発現 plasmid の作製

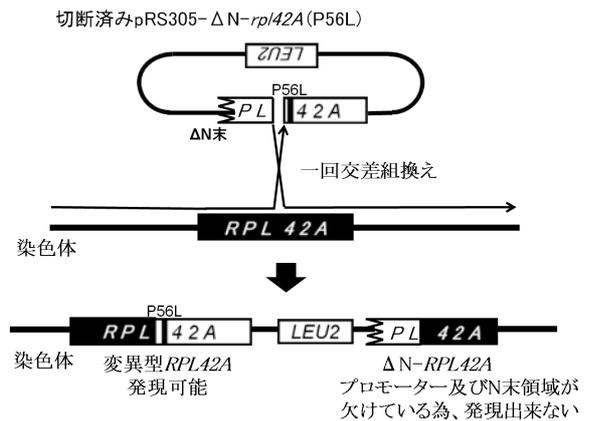
RPL42A 及び *rpl42A* (P56L) を pRS315 に組み込み、pRS315-*RPL42A*、pRS315-*rpl42A* (P56L) を作製した。

・方法 1-2：ゲノム組込型 *rpl42A* (P56L) 発現 plasmid 作製

RPL42A 及び *rpl42A* (P56L) の N 末を欠失させ、pRS305 に組み込んだ pRS305- Δ N-*rpl42A*、及び pRS305- Δ N-*rpl42A* (P56L) を作製した。作製した plasmid は変異部位より N 末側にある制限酵素部位で消化した。

・方法 2：*RPL42A* (P56L) 株の作製

方法 1-1 で作製した plasmid 及び pRS315、また方法 1-2 で作製した消化済みのゲノム組込み型 plasmid を多剤超感受性株に形質転換した。N 末欠失型 *rpl42A* は一回交差組換えによりゲノムに挿入され、変異型のみを発現する株が得られる (下図)。



・方法 3：*RPL42A* (P56L) 株の薬剤感受性試験

形質転換体を液体培養後、希釈系列を作製し、濃度の異なる ISA を含む寒天培地に 3 μ l ずつ添加した。2 日間培養後、plasmid の種類ごとに薬剤感受性の比較を行った。

結果と考察

詳細は研究発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) Burres NS., et al., Antitumor activity and mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide-A and-B and onnamide. *Cancer Res.*, **49**, 2935-2940 (1989).
- 2) Wu CY., et al., Studies toward the unique pederin family member psymberin: structure-activity relationships. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 18998-19003 (2012)
- 3) Chinen T., et al., Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.*, **199**, 341 - 346 (2010)
- 4) Chinen T., Ota Y., Construction of Multidrug Sensitive Yeast with High Sporulation Efficiency. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)

さび病菌冬孢子形成誘導因子精製過程の改善

佐野 遥香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 山岡 裕一 (筑波大学 生命環境系)

1. 背景および目的

さび菌は担子菌門さび菌目に属する植物寄生菌で、機能的および形態的に異なる複数の孢子世代を持つ。冬孢子はさび菌の分類および同定に重要であり、また感染拡大に機能する夏孢子世代から休眠性の冬孢子世代へ人為的に移行できれば感染拡大の制御も可能となることから、冬孢子形成誘導に関する研究は重要である。野沢ら (1996) は、冬孢子形成を誘導する物質がコムギ赤さび病菌 (*Puccinia triticina*) の冬孢子堆が多量に形成されている罹病コムギの抽出物に存在することを確認した。また同様の物質の存在はさび菌が感染したコムギ以外の宿主植物の抽出液でも報告されている (近藤 1997, 野沢ら 1999)。しかし、これらの冬孢子形成誘導活性因子は精製途中で活性が失われてしまったため構造決定に至っていない。その原因として、1) 活性を示すために複数の物質が関与しておりそれらが分離されたため、2) 不安定な物質で容易に分解されてしまったため、3) 分画中に含まれ、pH を安定化していた共雑物が除かれたため等が考えられる。本研究では、pH を安定化させることで冬孢子形成誘導因子の活性を保つことができると考え、緩衝液を用いたバイオアッセイ法の確立を目的とした。

2. 材料および方法

(1)成分抽出と供試する分画の精製

供試材料として、*Puccinia miscanthi* の冬孢子堆を多量に形成していたススキの葉を筑波大学菅平高原実験センター内のススキ草原で9月30日および10月1日に採集した。採集した葉は乾燥後、 CH_2Cl_2 で脱脂し MeOH と蒸留水で抽出した。この粗抽出液を下記の方法でバイオアッセイを行い、水粗抽出液中に冬孢子形成誘導因子が含まれることを確認した。水粗抽出液は HP21 カラムクロマトグラフィーにかけ、得られた分画を下記の方法でバイオアッセイを行った。活性が確認された水溶出分画 W7 及び 10% メタノール溶出分画 M10 を以下の実験に用いた。

(2)バイオアッセイ

コムギ赤さび病菌の単孢子堆分離菌株 1 株を供試菌とし、播種後約 6 日のコムギ (品種: 農林 61 号) の子葉に夏孢子を接種した。夏孢子堆が裂開を開始した子葉の先端 4cm を切り、供試液 2 ml の入ったサンプル瓶に入れ 20°C、14 時間照明 (7400 lux) : 10 時間暗黒条件下で 10 日間培養した。冬孢子堆の形成レベルを近藤ら (1997) の判定基準に従い、0 から 3 までの 4 段階に判定した。サンプル毎に 3 反復行い、その平均値を求めた。

(3) pH と緩衝液の効果

水粗抽出液を KOH および HCl を用いて pH 2.31 から 11.99 の範囲に調整しバイオアッセイを行った。

HP21 精製後に活性が確認された分画 W7 と M10 について、酢酸カリウム緩衝液、トリス緩衝液、CAPSO 緩衝液を用いて、それぞれ pH 3.49 から 6.95、pH 6.05 から 8.52、pH 9.00 から 10.03 の範囲でバイオアッセイを行った。

3. 結果および考察

KOH、HCl で pH を調整した水粗抽出液を用いてバイオアッセイを行った結果、pH 3.59 から 10.89 の範囲で安定的な冬孢子堆の形成が確認された。pH 2.31 と 11.99 ではコムギ子葉に枯れが見られた。また、pH 3.06 では子葉に枯れはみられなかったが冬孢子堆は形成されなかった。pH 11.18 と 11.48 では冬孢子堆はわずかに形成された。

3 種類の緩衝液を用いた分画 W7 と M10 のバイオアッセイ結果をそれぞれ図 1 と 2 に示した。酢酸カリウム緩衝液では、分画 W7 では pH 4.48 から 6.95、M10 では pH 3.68 から 6.95 の範囲で冬孢子堆の形成が見られほぼ同程度の結果が示された。トリス緩衝液と CAPSO 緩衝液では、分画 W7 と M10 でバイオアッセイの結果が異なった。分画 W7 では、トリス緩衝液 pH 6.05 から 8.52 および CAPSO 緩衝液 pH 9.00 から 10.03 で冬孢子堆は形成されたが安定しなかった。分画 M10 では、トリス緩衝液 pH 6.05 から 8.52 の範囲、CAPSO 緩衝液 pH 9.00 から 10.03 の範囲で安定的な冬孢子堆の形成が見られた。

以上の結果より、酢酸カリウム緩衝液を用いて pH 4.48 から 6.95 に調整することで、冬孢子形成誘導因子の活性を失うことなく精製された分画のバイオアッセイを行える可能性が高いと考える。

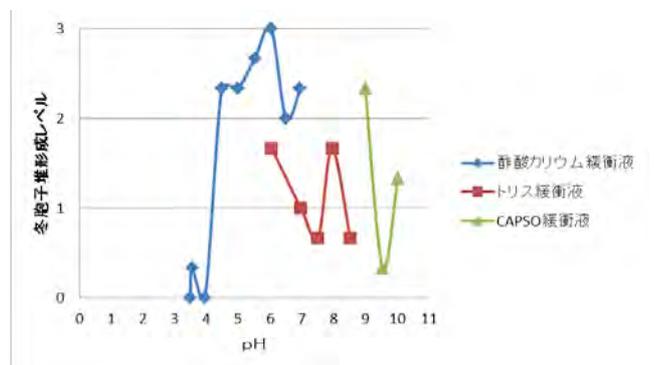


図1、3種類の緩衝液を用いた分画W7のバイオアッセイ結果

冬孢子堆形成レベル
0; 冬孢子堆の形成が見られないまたは僅かに見られるもの、
1; 冬孢子堆が散在的に形成されているもの、
2; 冬孢子堆がグリーンアイランドの周りに断続的に形成されているもの、
3; 冬孢子堆の形成がグリーンアイランドの周りで、取り囲むように形成されているもの。
各サンプル毎に3反復行いその平均値を求めた。

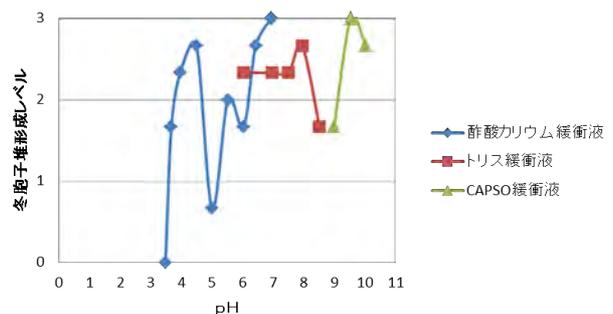


図2、3種類の緩衝液を用いた分画M10のバイオアッセイ結果

mtDNA 突然変異多発マウスが発現する呼吸欠損の原因解明

太田 あずさ (筑波大学 生物学類) 指導教員: 林 純一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ミトコンドリアは核ゲノムとは異なる独自のゲノム(ミトコンドリア DNA : mtDNA) を有する細胞小器官であり、酸化的リン酸化によって生命活動に必要な大部分の ATP 産生を担っている。mtDNA には酸化的リン酸化に寄与する呼吸酵素複合体のサブユニットの一部 (13 種) と、これらを翻訳するために必要な rRNA (2 種) と tRNA (22 種) がコードされており、細胞あたり数百から数千コピー程度存在する。したがって mtDNA に病原性の突然変異が生じると、ミトコンドリア呼吸機能が低下し、多様な病態を発症する可能性がある。実際に、mtDNA の病原性突然変異が全身性のミトコンドリア機能異常を呈するミトコンドリア病になることが示唆されている。

近年、mtDNA の多様な突然変異とミトコンドリア呼吸機能低下が老化の一因であるという「老化ミトコンドリア原因説」が提唱されている。この仮説では、老化と共に mtDNA 分子に多様な突然変異が蓄積し、このような多様な変異型 mtDNA から転写、翻訳された異常なタンパク質群がミトコンドリア呼吸酵素複合体からの活性酸素種の漏出を増加させるとともに、ミトコンドリア呼吸機能を低下させ、さらに漏出した活性酸素種によって mtDNA 分子に多様な突然変異が再誘発されるという悪循環に陥ることで、結果として老化が進行すると想定されている。一方、所属研究室の先行研究では、細胞内のミトコンドリアは分裂・融合を介して遺伝子産物の交換を行うという「ミトコンドリア間相互作用」の存在を証明している (Nature Genet., 2001; Nature Med., 2001; PNAS, 2005)。「ミトコンドリア間相互作用」の存在は、仮に老化に伴って mtDNA 分子に多様な突然変異が生じたとしても、他の正常な mtDNA 分子に由来する遺伝子産物が供給されるために、変異の病原性は発揮されず、ミトコンドリア呼吸機能は正常に維持されることを意味している。ところが最近、「老化ミトコンドリア原因説」を支持するモデルマウスとして、mtDNA mutator mice の作製が報告された (Nature, 2004; Science, 2005)。mtDNA mutator mice は、ミトコンドリア唯一のポリメラーゼであるポリメラーゼ γ の校正機能のみを破壊することで、mtDNA の複製の際に後天的な突然変異が生じるように遺伝子操作されている。実際に、このマウスにおいて、多様な変異型 mtDNA 分子種が蓄積し、ミトコンドリア呼吸機能低下や、早期老化表現型 (寿命短縮・脱毛・脊柱後湾など) が引き起こされることが示されている。しかしながら、mtDNA mutator mice においてミトコンドリア呼吸機能低下が引き起こされる機構は未だに明らかにされていない。mtDNA mutator mice におけるミトコンドリア呼吸機能低下の原因は、欠失突然変異型 mtDNA の蓄積であるとする説や、mtDNA へのランダムな点突然変異の蓄積であるとする説が提唱されているが、これらの説を実験的に証明した例はこれまでに存在しないばかりか、ミトコンドリア呼吸機能低下の原因が mtDNA の突然変異であるという直接的な証拠さえ未だに示されていない。そこで本研究では、mtDNA mutator mice 由来の mtDNA を有するサイブリ

ッドを作製することで、mtDNA mutator mice のミトコンドリア呼吸機能低下の原因が mtDNA の突然変異であるか否かを検証し、さらに、同サイブリッドを用いてミトコンドリア呼吸機能低下が引き起こされる機構を解明することを目的とした。

方法

細胞質移植法によって mtDNA mutator mice 由来の mtDNA と正常マウス由来の核を有する細胞質雑種 (サイブリッド) を作製し、COX/SDH 染色および酸素消費量測定によってミトコンドリア呼吸機能を評価した。また、同サイブリッドにおいて、クローニング・シーケンシングによって点突然変異を、サザン・ブロットティングによって欠失突然変異型 mtDNA を、それぞれ検出した。

結果・考察

本研究で作製した mtDNA mutator mice 由来の mtDNA を有するサイブリッドでは、COX/SDH 染色および酸素消費量測定のいずれの方法においても呼吸機能低下が確認された。また、クローニング・シーケンシングによってランダムな点突然変異が多数検出されたが、サザン・ブロットティングの結果から、欠失突然変異型 mtDNA は存在しないことが明らかとなった。以上の結果から、mtDNA mutator mice のミトコンドリア呼吸機能低下の原因が mtDNA の突然変異であることが直接的に証明された。また、mtDNA mutator mice 由来の mtDNA を有するサイブリッドにおける呼吸機能低下は、欠失突然変異型 mtDNA ではなくランダムな点突然変異によって引き起こされることが示唆された。さらに、本研究の結果は、ミトコンドリア間相互作用の存在にもかかわらず、ランダムな点突然変異がその病原性を発揮し得る未知の機構の存在を強く示唆している。今後は、本研究で作製したサイブリッドを用いて同機構を具体的に明らかにしていきたいと考えている。

新奇ミトマウス作製戦略：mtDNA 体細胞突然変異の活用

林 千彩音（筑波大学 生物学類）

指導教員：林 純一（筑波大学 生命環境系）

背景および目的

ミトコンドリアは酸化的リン酸化を行い ATP を合成する細胞小器官であり、独自に有するミトコンドリア DNA (mtDNA) は一細胞あたり数千コピー存在する。mtDNA に病原性突然変異がある一定の割合以上蓄積することでミトコンドリアの呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病と総称される多様な病態を引き起こすことが知られている。しかし、その発症機構ははっきりとわかっておらず治療法も確立していないため、mtDNA 病原性突然変異を有するマウスを用いて mtDNA とミトコンドリア病をはじめとする様々な疾患との関係を見出すことが有効な研究手法と考えられる。すでに所属研究室では数種類のモデルマウス（ミトマウス）が作製されたが、多様な病態を呈するミトコンドリア病との関連を深く追究するには、mtDNA の多様な領域に病原性突然変異を有するモデルマウスを作製する必要がある。今までに作製されたモデルマウスは、マウス培養がん細胞内にすでに高率で有する mtDNA 体細胞突然変異を利用していましたが、変異探索の候補を拡大するには低率で存在するものを利用しなければならない。しかし、病態発症には低率で存在する mtDNA 病原性突然変異を 50% 以上の高率へと蓄積させる必要がある。そこで、培養細胞内で自然に生じた mtDNA 体細胞突然変異の中から特定の変異部位に着目し、突然変異を低率で有する細胞から高率で有する細胞を樹立し、モデルマウスの作製へとつなげることを本研究の目的とする。

方法および結果

所属研究室が所持し、すでに mtDNA の全塩基配列決定が行われた低転移性マウス肺がん細胞株 P29 をリクローニングして分離した 127 クローンを利用した。進化的に保存されている部位は進化の過程で変化することが許されなかった重要な部位であると推測される。すなわち、そのような部位の突然変異は呼吸機能低下を引き起こす可能性があると考えられるため、それらに着目して体細胞突然変異の探索を行った。

① tRNA の機能異常をもたらす突然変異

ミトコンドリア病の三大病型である CPEO, MELAS, MERRF は、それぞれ大規模欠失突然変異 Δ 、tRNA^{-Leu(UUR)}、tRNA^{-Lys} の点突然変異が原因であると言われている。所属研究室では CPEO のモデルマウスのみが作製されており、残り 2 つのモデルマウスの作製には至っていない。P29 の mtDNA の塩基配列解析の結果より tRNA^{-Lys} をコードする領域に機能異常をもたらすと思われる突然変異が存在しており、何らかの病態を示す可能性がある。

② 活性酸素種 (ROS) を産生する突然変異

ROS は主にミトコンドリアの酸化的リン酸化経路において発生し、転移などががんの悪性化の原因になることが示唆されている。所属研究室では有意な ROS 産生を示すモデルマウスを 1 種類作製しており、このマウスは他のモデルマウスが示す呼吸機能低下や乳酸値の増加に加え、B リンパ腫や転移能の増加といった表現型を示している。このような表現型が ROS の産生によって誘導されたものかどうかを検証するには、他の突然変異を有し ROS を有意に産生するようなモデルが必要である。したがって、P29 の mtDNA の塩基配列解析の結果から、ROS 産生に関与している可能性のある呼吸酵素複合体のサブユニットの突然変異を探索する。

現在 PCR および制限酵素処理を行い、これらの突然変異を有する細胞を探索している。

今後の展望

特定の mtDNA 体細胞突然変異を有する細胞を樹立し、これらの体細胞突然変異を高率で有するマウス ES 細胞を作製することを第一の目標とする。そして、その ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、交配を繰り返すことで新奇ミトマウスの作製へとつなげる予定である。

ERK activation in murine fibroblasts under various growth conditions

森島仁美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 林 純一 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Raf/MEK/ERK pathway is known to regulate numerous cellular events such as cellular proliferation, senescence, differentiation, apoptosis, and transformation. It is known that differences in duration and intensity of ERK activation signals effect these decisions of different biological responses in fibroblasts (1). For intensity, it is known that strong prolonged activation of ERK leads the cells to go in senescence (2). On the other hand, weaker ERK signal leads cellular proliferation. Even though it remains unclear how the activation of one signaling molecule ERK leads to specific cellular responses (3), accurate regulation of ERK signal could be the key to balance these responses (1). By regulating the ERK activation signals, the cells could have totally different cellular outcomes such as senescence or cell growth. For further research of the pathway, analysis of ERK activation for the growth induction of murine fibroblasts was done. The aim of the research was to see if the cellular outcomes activated by ERK could be controlled by conditional Raf using different activation kinetics, and to adjust parameters to induce accelerated cell growth in 3T3BXB-ER cells by activation of Raf constructs.

Materials and MethodsCell Culture

Murine immortalized fibroblasts (NIH3T3) and engineered cells (3T3BXB-ER) were used. 3T3BXB-ER cells are NIH3T3 cells, expressing Raf-1 kinase domain-estrogen receptor fusion proteins, which could be regulated by tamoxifen or estrogen (4). The cells were kept in a humidified incubator at 37°C with 5.0% carbon dioxide in the DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (SIGMA), 1% 200mM L-glutamine (SIGMA), and 1% penicillin streptomycin.

Proliferation Rate/Cell Counting

The cells were counted on the 4th to 5th day of the experiments. Images were taken with Canon IXY 14.1 mega pixels with an inverted light microscope.

Western Blot

Samples were loaded to 12% acrylamide gels for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The following antibodies were used. [Primary antibody: P-p44/42 MAPK (T202/Y204) (Cell Signaling) / Anti-MAP Kinase (ERK-1, 2) (SIGMA), Secondary antibody: antibody rabbit (Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Rabbit (Thermo))] Luminata Crescendo/Classico Western HRP Substrate (Milipore) was used for protein detection.

Results and Discussion

Using the fibroblasts NIH3T3 and 3T3BXB-ER, ERK activation for the growth induction was analyzed. It was tested to see if the cellular outcomes could be controlled by changing intensity of ERK activation, investigating parameters which may stimulate accelerated cell growth by BXB-ER activation. Using Western blots and cell counting, differences of ERK signals between activation by serum and by BXB-ER were compared. As expected, the induction of ERK seemed to be optimal in fibroblasts at various concentrations of serum, but BXB-ER activation by 100nM tamoxifen induced robust ERK activation signal which led cells to go in senescence. To change the cellular outcome, activation levels of ERK were adjusted using different concentrations of tamoxifen/estrogen which acutely regulate BXB-ER activation. First, tamoxifen/estrogen concentrations were decreased to see the signal intensity and cell growth. By lowering, it produced the similar growth rates as the control, but BXB-ER activation could not induce additional growth. Second, MEK inhibitor, PD184352, was used to regulate the intensity of ERK activation with various serum concentrations. When ERK activation was inhibited by PD184352 (0.2μM-4μM), the cells grew slower than the control. Then, BXB-ER activation was induced by tamoxifen 100nM in addition to PD184352. Under the condition, the additional BXB-ER activation could restore ERK phosphorylation levels, and also growth rates to the levels they were before MEK inhibition, but not more. Therefore, the cells seemed to control the level of ERK activity very tightly, to be optimal for growth. It is possible that additional research should have been completed with smaller intervals for PD184352 concentrations. Although the parameter, which induces accelerated cell growth, was not found with the research, I showed the trends of how cells react with different activation kinetics. For future research, I wish to find out about the mechanism of how ERK activation gives the specific cellular outcomes by the precise investigation of ERK activation and growth induction.

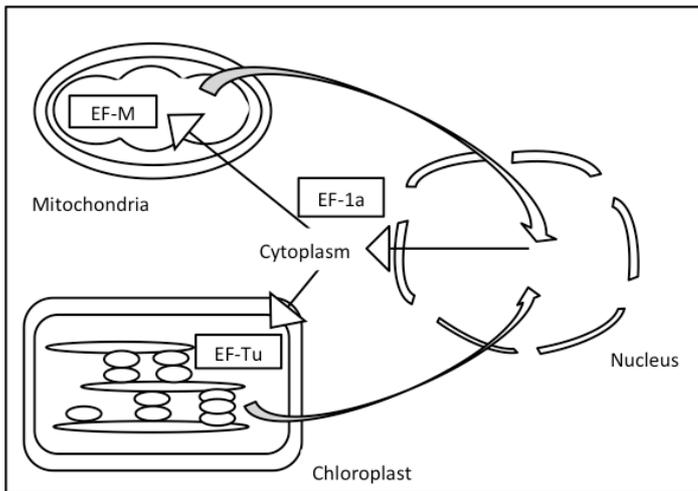
References

- (1) Wellbrock C, *et al. Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:875-886.
- (2) Martin, C, *et al. PLoS ONE* 2010;5(10):e13322.
- (3) Ebisuya, M, *et al. J Cell Sci* 2005;118:2997-3002.
- (4) Lovric, J., *et al. J Biol Chem* 1998;273:22848-22855.

オルガネラ翻訳伸長因子の変異体が示す発生異常

重政 理紗 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

真核生物のミトコンドリア、プラスチドには、核内の DNA とは別の独自の DNA が存在する。現在の分類学において、生物界は真核生物ドメイン、真正細菌ドメイン、古細菌ドメインの3つのドメインに大きく分類される (Woese *et al*, 1990)。それによれば、真核生物は古細菌の姉妹群にあたるが、真核細胞のオルガネラのうち、ミトコンドリアや葉緑体はそれぞれ自由生活性の α プロテオバクテリアやシアノバクテリアといった真正細菌に由来すると考えられている (Gray M.W. *et al*, 1989, Smith. *et al*, 2000)。現在の真核生物のオルガネラに存在する DNA は、元の真正細菌のゲノムサイズに比べて非常に小さいものとなっており、元の遺伝子領域の大部分が核に移行した、もしくは完全に失われたことが分かってきている。このように進化の過程で移行して核 DNA にコードされるようになったオルガネラタンパク質は、細胞質で翻訳され、N 末端にある移行シグナルに従って目的のオルガネラに輸送される。

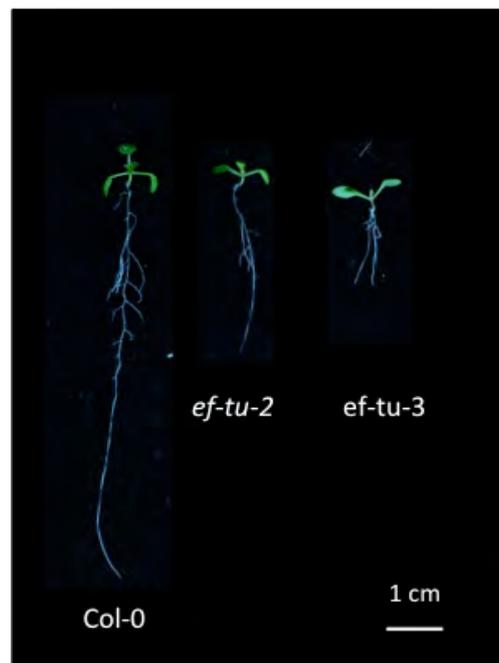
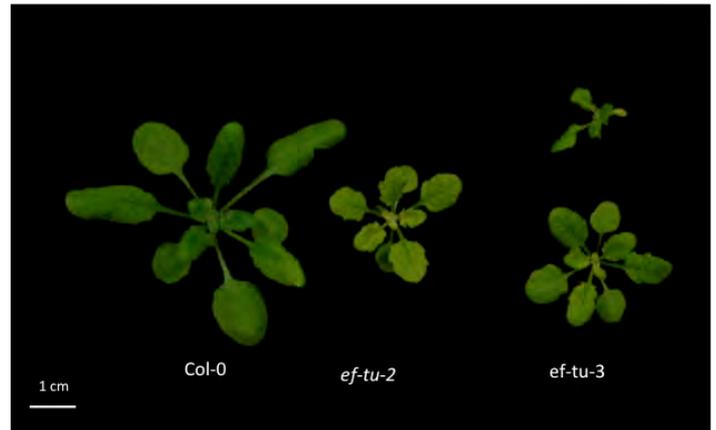


EF-Tu (elongation factor thermo unstable) とは GTP 依存的にアミノアシル-tRNA をリボソーム上に運搬する役割を持ち、原核生物に広く保存されたタンパク合成に関わる翻訳伸長因子である。シロイヌナズナの EF-Tu (At4g20360) は 476 アミノ酸からなる分子量 51K のプラスチドタンパク質で、GTPase 活性を持つドメイン I、アミノアシル-tRNA やリボソームとの結合に重要であるドメイン II と III の3つのドメインから構成される。別名を RabE1b とも呼ばれるが、この RAB ファミリーとはある共通したドメインが構造変化を起こすことで GTP 結合型、GDP 結合型の間で相互変換し、様々な生体反応のスイッチとして働く一群の低分子量 G タンパク質である。実際に EF-Tu も GTP と高い親和性を示し、GTP 結合型るとき a.a.-tRNA と複合体を形成する。EF-Tu は N 末端移行シグナル配列によりプラスチドへと移行される核コードタンパク質と考えられ、動物にはないものである。ミトコンドリアや細胞質の elongation factor は別に存在しており、それぞれ EF-M (At5g02930) と EF-1a (At5g60390) と呼ぶ (Kuhlman *et al*, 1995)。

今回、私は *Arabidopsis thaliana* の EF-Tu 遺伝子について複数の T-DNA 挿入変異体を用いて、その表現型を調べ、“寄生体”

が植物に与える影響をみた。その結果、Null allele 変異体は胚発生が進行せず、種子を形成することはなかった。また、EF-Tu の転写開始上流に T-DNA 挿入された変異体、SAIL_659_G09 (*ef-tu-2*) と SALK_069644 (*ef-tu-3*) の2つの weak allele 変異体においては T-DNA 挿入位置に応じて表現型に違いが見られた。*ef-tu-2* 変異体では地上部地下部ともクロロフィル含量の低下が起こっており、地上部では淡色化した個体となった。一方 *ef-tu-3* 変異体はクロロフィル含量においては *ef-tu-2* 変異体ほどの低下は見られなかったものの、地上部の形態、個体差ともに大きく、主根は短かった。よって EF-Tu の転写開始点上流に T-DNA が挿入されることで葉と根で異なる表現型を示すことが明らかとなった。

これより、変異体では、EF-Tu の発現、機能低下によってプラスチドでのタンパク質合成が下がり、プラスチドの発達も阻害され、さらに植物本体で多面的に発達阻害が起こったものと考えられている。プラスチドは単なる寄生ではなく、そのタンパク質合成が、細胞の分化、発生にも深く関与していることが示された。



C57BL/6J マウスを用いたアイスプラント抽出物の抗肥満作用の研究

阿川 正 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

現代における不規則かつ日常的な高カロリー食の摂取は、高血圧や高血糖、高脂血症さらには肥満の引き金となる。これらの生活習慣病はまとめてメタボリックシンドロームとして一般的に広く認知されており、多くの現代人を悩ませている。このような症状を防ぐためには、まず肥満の予防・改善が不可欠であり、抗肥満作用を持つ機能分子の探索が急がれている。抗肥満作用とは、脂肪細胞の分化の抑制、脂肪細胞における脂肪蓄積の減少・分解などが挙げられる。本研究室では、これまで赤ブドウ由来のレスベラトロールやカテキンなどの抗肥満作用をもつ物質に注目してきた^{1,2,3}。

アイスプラントはヨーロッパ、西アジア、アフリカ原産の塩性植物であり、これに含まれるミオイノシトールやピニトールなどの成分が抗肥満作用をもつと考えられ、近年健康食材として注目を浴びている。本研究室の先行研究では、アイスプラント抽出物をマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 に与えたところ、脂肪細胞への分化抑制、脂肪蓄積の減少、活性酸素種の除去、脂肪分解の促進などの効果が認められた⁴。

本研究は、高脂肪食下で飼育したマウスに対するアイスプラント抽出物の抗肥満効果を調べることを目的とした。

方法

8 週齢の雄 C57BL/6J マウスを 6 つの実験群に分け、それぞれ、通常食のみ、高脂肪食のみ、高脂肪食に異なる 4 つの濃度 (0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml) のアイスプラント抽出物を混ぜ合わせたものを与えた。アイスプラント抽出物 (日本アドバンストアグリ株式会社) はパウダーを水に溶かし、高脂肪食に混ぜ合わせて自由摂食により与えた。体重と摂食量は週に一度計測し、活動量の測定 (ロコモシステム) を行った後、解剖を行い、血液採取と肝臓の摘出を行った。血液から血清を分離し、トリグリセライド量、コレステロール量、血糖値を調べた。摘出した肝臓は液体窒素で直ちに凍らせ、遺伝子発現の解析に用いた。

結果

比較的低い濃度のアイスプラント抽出物を与えたマウスでは、高脂肪食のみを与えたマウスと比べ体重増加の抑制がみられた。また、アイスプラント抽出物 0.05 mg/ml の群を除いた他の実験群では、摂食量の低下がみられた。運動性の測定では、アイスプラントを摂取したすべての実験群において運動量の増加がみられ、特に夜間における活動の増加が顕著であった。アイスプラント抽出物 0.1 mg/ml を摂取した実験群が最大の運動量を示した。

考察

体重増加、摂食量といった結果からも 0.05、0.1 mg/ml といった低濃度のアイスプラント抽出物のほうがマウスの生体内に及ぼす効果が大きいと思われる。アイスプラント抽出物の摂取によって高脂肪食による体重増加が抑制され、したがって運動量が増えたのではないかと考えられる。今後の課題として、マウスを解剖し血液検査や肝臓の遺伝子発現を調べたい。また、マウス脂肪前駆細胞を用いて、アイスプラントの有効成分の同定を行いたいと考えている。

参考文献

1. Riadh Drira, Shu Chen, Kazuichi Sakamoto (2011) Oleuropein and hydroxytyrosol inhibited adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Life Sciences*, 89, 708-716
2. Hyojung Kim and Kazuichi Sakamoto (2011) (-)-Epigallocatechin gallate suppresses adipocyte differentiation through the MEK/ERK and PI3K/AKT pathways, *Cell Biology International*, 36, 147-153, 2011
3. Hyojung Kim, Ako Hiraishi, Keita Tsuchiya and Kazuichi Sakamoto (2010) (-) Epigallocatechin gallate suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through transcription factors FoxO1 and SREBP1c, *Cytotechnology*, 62, 245-255
4. Megumi Kurosu and Kazuichi Sakamoto (2012) *Mesembryanthemum crystallinum* extract suppressed the early differentiation of Mouse 3T3-L1 preadipocytes, *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2(4), 184-189

線虫のストレス耐性に対するキノコ類抽出物の生理作用解析

新井 将人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

キノコ類は、血圧・血糖低下、抗腫瘍作用など様々な生理作用を持つことが知られている。また、近年では、健康維持や疾病予防のための機能食品として注目を浴びている。一方で、キノコ類の有効機能成分の分析や、生理作用の生化学的または分子生物学的な解析は進みつつあるが、多くはまだ不明のままである。

線虫 (*C.elegans*) は、飼育や遺伝学的解析が容易であり、当研究室では機能食品の一次スクリーニングに用いている。また、転写因子 FoxO は、一般に代謝・老化・寿命・ストレス耐性など様々な生理作用に関与することが知られている。線虫においても、FoxO のホモログとして Daf16 が知られている。

本研究は、キノコ類抽出物 (霊芝、まいたけ) を線虫に与え、DAF-16 の核局在を始め、その生理作用の解析を目的とした。

【材料・方法】

キノコ類抽出物は、霊芝、YM-2A、YM-2G の三つの試料を用いた。

霊芝は粗抽出物であり、YM-2A、YM-2G はまいたけから抽出した α グルカンである。(分岐率: YM-2A < YM-2G)。

いずれの試料も、水に溶かして実験に用いた。

これらキノコ類抽出物と大腸菌 (OP50 株) 培養液を NGM 寒天培地 (Nematode Growth Medium: NGM) 上に塗布し、線虫に与えた。

線虫は、NGM 培地上で 20°C で培養した。実験では主に、野生型 N2 系統を用いた。以下の 2 と 6 では、それぞれ *col-19::gfp*、*daf-16::gfp* 系統を用いた。

1. 体長測定

同調処理 (発生段階を揃える処理) をした線虫を、キノコ類抽出物が塗られた NGM 培地上で 72 時間培養した。その後、線虫を固定し、体長を測定した。

2. 成長速度測定

線虫は *col-19::gfp* 系統を用いた。*col-19* は線虫が成虫に移行する際に発現上昇する遺伝子である。*col-19::gfp* 系統の線虫を 1 と同様に培養し、成虫になる時期 (48~60 時間) に固定し、GFP 発現個体を測定した。

3. 脂肪蓄積量 (Nile red 染色) 測定

同様に、96 時間培養した線虫を、Nile red で染色し、脂肪蓄積量を測定した。

4. 産卵数測定

72 時間培養した線虫を新しい NGM 培地に移し、一定時間培養後、線虫が産んだ卵の数を測定した。

5. 熱ストレス耐性 (運動性) 測定

96 時間培養した線虫に熱ストレス (35°C、4 時間) を与え、0, 12, 24 時間後の全身運動の回数を測定した。

6. DAF-16 核局在測定

線虫は TJ356 株 (*daf-16::gfp*) を用いた。大腸菌 (OP50) のみで 96 時間培養した TJ356 株の線虫に対し、キノコ類抽出物を 24 時間与えた。その後、DAF-16::GFP の核への局在度合いを測定した。

【結果】

1. 線虫の体長は、各キノコ類抽出物により変化しなかった。
2. 成長速度は、霊芝と YM-2G により増加し、YM-2A により減少した。
3. 脂肪蓄積量は、各キノコ類抽出物により減少した。
4. 産卵数は、霊芝により増加し、YM-2A、YM-2G では変化しなかった。
5. 熱ストレス耐性 (運動性) は、各キノコ類抽出物で上昇した。
6. DAF-16 の核局在の割合は、各キノコ類抽出物で増加傾向を示した。

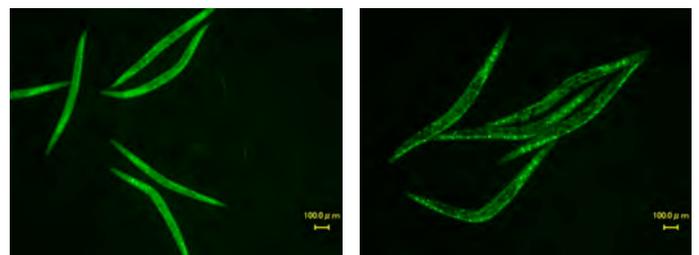


図 1. DAF-16 の核局在。左がコントロール。右が霊芝。

【考察・課題】

以上の結果から、キノコ類抽出物は線虫の DAF-16 を活性化し、熱ストレス耐性を上昇させる可能性が示された。また、キノコ類抽出物は線虫の発生や生殖にも作用を持つ可能性がある。

今後は、遺伝子発現を調べ、キノコ類抽出物の作用メカニズムを明らかにする予定である。また、線虫の老化や寿命に対するキノコ類抽出物の作用についても解析する予定である。

マウス脂肪細胞と線虫に対するファイトケミカル類の生理作用解析

小幡 恵里 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ファイトケミカルは植物中に存在する天然の化学物質で、その多くは抗酸化作用を通じて肥満・糖尿病の改善や予防などの多様な生理効果をもつことが知られている。近年、様々なファイトケミカルが、健康機能食品、サプリメント、医薬品などの形で生活習慣病の予防・改善や老化防止などの目的で利用されつつある。しかしながら、膨大な数存在するファイトケミカルの中で、現在効果が解明されているものはごく一部にすぎず、さらなる探究が求められている。

一方、FoxO は進化的に保存された転写因子で、細胞周期、DNA 修復、糖代謝、抗酸化ストレスなど様々な生理機能に関わることが知られている。近年、一部のファイトケミカルが FoxO を活性化し、様々な生理活性機能や寿命の延長をもたらすことが明らかになっている。

本研究では、モデル生物である線虫 (*C. elegans*) を用いて、7つの植物粗抽出物の中から、Daf-16 (FoxO のホモログ) を活性化するものを選別し、生理作用と機能成分の同定およびその作用機序を明らかにすることを目的とした。

また、一部のファイトケミカルは、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化の抑制および脂肪細胞における脂肪分解の促進を誘導し、肥満抑制効果をもつことが知られている。そこで、線虫の系で選択された植物機能成分について、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて生理作用や作用機序の解析を行うことを目的とした。

【方法】

1. 線虫を用いた実験

(1) Daf-16 の活性化を指標とした 7つの植物粗抽出物の選別
同調処理後 72 時間培養した TJ356 (*daf-16::gfp* トランスジェニック線虫株) を 7 種類の各植物粗抽出液を含む S-basal 中で 5 時間培養した。Daf-16 転写因子の核への局在を観察することにより、Daf-16 の活性化の程度を調べた。

(2) マンゴスチン粗抽出物および α -mangostin を用いた生理作用の解析

(1) で選別された植物粗抽出物 (マンゴスチン粗抽出物) と、マンゴスチンの主成分である α -mangostin を用い、体長、成長速度、脂肪蓄積の測定を行った。同調処理した野生型 L1 幼虫を、マンゴスチン粗抽出物および α -mangostin を塗布した培地に播種し、一定時間後に固定して観察を行った。

2. マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた実験

(1) MTT assay

α -mangostin が細胞生存率に与える影響を調べるために、ミトコンドリア内脱水素酵素活性を指標にした MTT assay を行った。

(2) Oil-red-O 染色

α -mangostin 投与による脂肪蓄積量の変化を調べるために、Oil-red-O 染色を行った。DMI 法により分化誘導した細胞に α -mangostin を時期別 (分化誘導開始 0-2/2-4/4-6/0-7 日目)、

濃度別 (0, 6, 12, 18 μ M) に投与した。分化誘導開始 7 日目に脂肪滴を Oil-red-O で染色して観察・定量した。

(3) Cell count

3T3-L1 細胞において分化誘導開始 0-2 日目に起こる 2 度の細胞増殖 (clonal expansion) に対する α -mangostin の影響を調べるため、分化誘導開始 0, 24, 48 時間後に細胞数を計測した。

(4) qRT-PCR

α -mangostin の脂肪細胞分化に対する影響を調べるために、qRT-PCR 法により脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量の変化を調べた。

(5) Glucose uptake, Glycerol release assay

α -mangostin の成熟脂肪細胞に対する影響を調べるため、分化誘導開始 10 日目の脂肪細胞に α -mangostin を投与し、Glucose の取り込み、Glycerol の放出の変化を調べた。

【結果】

- (1) 用いた植物粗抽出液の中で、マンゴスチン粗抽出物が Daf-16 転写因子の核への局在を最も強く誘導した。
- (2) マンゴスチン粗抽出物と α -mangostin は、播種後 66 時間後の線虫の体長を減少させた。また、Nile-Red 染色法による脂肪蓄積の観察では、安定した結果が得られなかった。
- (1) 分化後の成熟脂肪細胞に対して、 α -mangostin は細胞生存率に影響を与えなかった。未分化の 3T3-L1 細胞においては、 α -mangostin は 12 μ M 以下の濃度では細胞生存率に影響を与えないが、18 μ M 以上の濃度では細胞傷害性を示した。
- (2) 0-2, 0-7 日目に α -mangostin を投与した細胞は、コントロールと比較して脂肪滴の大きさが小さく、脂肪蓄積量が減少した。一方、それ以外の時期に投与した細胞では脂肪滴の大きさや脂肪蓄積量に変化はなかった。
- (3) α -mangostin 12 μ M を投与した細胞では、コントロールと比較して分化誘導後の細胞増殖が抑制された。
- (4)・(5) の実験は、現在進行中である。

【考察と今後の予定】

マンゴスチン粗抽出物が Daf-16 の活性化を促進したことから、マンゴスチン粗抽出物が様々な生理活性機能をもつことが示唆された。また、Daf-16 の活性化は線虫の成長を遅延させることが知られていることから、マンゴスチン粗抽出物と α -mangostin を投与した線虫で見られた体長の減少は Daf-16 の活性化と関連しているかもしれない。

さらに、脂肪細胞に関して、 α -mangostin は特に分化誘導後初期に作用し脂肪蓄積を抑制することが分かった。また、 α -mangostin は分化誘導後初期の clonal expansion も抑制した。このことから、 α -mangostin は脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を抑制することが示唆される。今後は、複数の脂肪細胞分化関連遺伝子の発現の変化を調べることにより、脂肪細胞分化に対する α -mangostin の作用機序を明らかにする予定である。

赤ぶどう果皮抽出物による線虫の老化遅延効果の解析

永井 卓真 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

●背景・目的

「赤ぶどう」の果皮には trans-レスベラトロール(Rsv)が含まれていることが古くより知られていた。trans-レスベラトロールは、抗肥満作用や血糖値降下作用など多くの生理作用が知られているが、赤ぶどう果皮中には Rsv 以外にも多くの生理作用を持つ機能分子が含まれていると考えられている。Rsv は転写因子 FoxO を活性化し活性酸素除去酵素(SOD)などの発現を介して個体老化の遅延に働くことが知られている。線虫では FoxO のホモログとして Daf-16 が知られている。当研究室のこれまでの研究により、Rsv は DAF-16 タンパク質の核局在を促進し線虫のストレス耐性や寿命延伸作用に関わると考えられている。

本研究は、モデル生物である線虫 (*C. elegans*) とマウス前駆脂肪細胞(3T3-L1)に対する赤ぶどう抽出物(Red Grape Pericarp Extract:RGPE)の種々の生理・薬理作用の解析を目的とした。

●方法

・線虫

線虫野生株 (N2)に同調処理(成虫から卵を摘出し、幼虫の発生段階を揃える操作)を行い、L1 幼虫期に *E.coli*OP-50 株培養液と共に赤ブドウの果皮抽出物 (1 mg/ml) を個体培地 (Nematode Growth Medium:NGM) 上に添加し、20°Cで培養した。96h 培養後に線虫の体長、寿命(生存率)、運動性 (thrashing 運動)、およびストレス耐性に関わる遺伝子発現の解析を行った。

1. 体長の測定

線虫を同調処理後、NGM プレート上で各試薬 (dDW,Rsv,RGPE)とともに 72h 培養後 4 % PFA で固定し、顕微鏡で観察した。

それを撮影し、その後画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて線虫の体長を測定した。

2. 寿命の測定

線虫を同調処理後、NGM プレートで各試薬と 96h 培養後、1 日おきに培地を交換した。新しい培地に線虫を移す際に線虫を生理食塩水に浮かべ、動くかどうかを指標にした。

3. 経時的な運動性の変化

線虫を同調処理後、NGM プレート上で各試薬と 96h 培養後、線虫を生理食塩水に浮かべ実顕微鏡下で観察し 15sec あたりの thrashing 運動回数を計測した。同調処理 96h 後を Day0 として 72h おきに Day9 まで測定した。

4. 遺伝子発現解析

線虫を同調処理後、NGM プレートで各試薬と 96h 培養後 wash し、乾熱滅菌した乳鉢により凍結破碎した。

そこに、RNA 抽出 kit(iso-PLUS TAKARA)を用いて RNA を抽出した。抽出した total RNA から逆転写酵素によって cDNA を合成した。qRT-PCR を用いて、daf-16 の下流に存在する od-3、hsp-12.6 の遺伝子発現を解析した。また、飢餓シグナルにより活性化する代表的転写因子 FoxA の線虫ホモログである pha-4 の下流遺伝子 elt-2、myo-2 の 2 つについても発現量を解析した。

・3T3-L1

1. 脂肪定量

RGPE による脂肪蓄積量を調べるために Oil red O 染色を行った。3T3-L1 を 4 cm dish にコンフルエントまで培養後、RGPE(0.25、0.5、0.75、1.0 mg/mL)を添加し、96h 培養した。その後 oil red O を用いて脂肪滴を染色した。

2. MTT アッセイ

RGPE による細胞生存率の変化を調べるため、ミトコンドリア内脱水素酵素の働きを指標にした MTT assay を行った。3T3-L1 を 24well プレートにコンフルエントまで培養後 RGPE(0.25、0.5、0.75、1.0 mg/mL)を添加し、さらに 96h 培養しホルマザンを抽出し比色定量した。

●結果

・線虫

1. RGPE 濃度依存的に体長は小さくなった。
2. RGPE は対照に比べ寿命延伸傾向が認められた。
3. RGPE により経時的な運動性の低下が抑制された。
4. daf-16 の下流遺伝子である、sod-3、hsp-12.6 の発現低下が見られた。

・3T3-L1

1. 濃度依存的に染色量は低下した。
2. RGPE1.0 mg/mL では細胞生存率の低下が見られ、0.5 mg/mL 以下の濃度では対照と変化なかった。

●考察

線虫の実験より、寿命を延伸する効果と運動性低下抑制が見られたが、daf-16 は関与してない可能性が示唆された。一方、体長の短縮が見られる。したがって、単に発生段階の遅延も予想できる。また、線虫・細胞共に Rsv と RGPE を比較することにより、RGPE の作用分子として Rsv に加え別の機能分子が関与する可能性が示唆された。

放線菌におけるタンパク質新規生産系

齋藤 結希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

微生物の一種である放線菌は土壌中に生育し、様々な生理活性物質や2次代謝産物を生産することが知られている。1944年に結核治療薬としてストレプトマイシンが発見されて以来、今日までに放線菌から数多くの抗生物質、生理活性物質や有用な2次代謝産物が見つかっている。放線菌から発見された抗生物質・生理活性物質は医薬品だけでなく、農薬、動物用医薬品、酵素阻害剤など多方面で工業的に広く利用されている。このように放線菌はこれらの生理活性物質生産菌として今日の応用微生物学上最も重要な菌群となっているだけでなく、各種有用物質を大量に生産する能力を有していることから工業的に重要な物質の大量生産に適した宿主としても注目を浴びつつある。

当研究室では、放線菌での有用物質生産の重要性を鑑み、放線菌をさらに高機能化させる微生物育種の観点から、放線菌で利用可能な大量発現系の開発を進めている。先行研究では、ロドコッカス属放線菌由来の遺伝子プロモーターを利用し、放線菌を宿主としてタンパク質の高発現を可能とする発現ベクターが構築されている。本発現ベクターは、放線菌で汎用されるプラスミド複製領域を利用した高コピー型であり、チオストレプトンが選択マーカーとして利用可能である。グラム陽性菌由来の酵素・タンパク質のみならず、グラム陰性菌由来の酵素・タンパク質などの発現に成功している。

本研究では、この発現ベクターにさらなる改良を加えることにより、より効率的な新規タンパク質生産系を確立することを目的とした。

方法・結果

Streptomyces griseus のゲノム DNA を鋳型に用いて、レポータータンパク質をコードする DNA 断片を PCR により増幅した。このレポーター遺伝子を先行研究で構築された発現ベクターに導入し、(レポータータンパク質の活性を示さない) 放線菌を形質転換した。この形質転換体を培養し、酵素反応により基質から生じる産物の発色を吸光度計で測定することで酵素活性測定を行い、レポータータンパク質の発現を確認した。この形質転換体からレポーター遺伝子を導入した発現ベクターを抽出し、本プラスミドに対しいくつかの処理を行い、再度 (レポータータンパク質をもたない) 放線菌を形質転換した。この形質転換体を培養し、酵素活性を測定することで、レポータータンパク質の発現効率を調べた。

今後の予定

レポーター遺伝子の発現効率が上昇したプラスミドを選出することで、どの処理が発現効率上昇に寄与するかを明らかにする予定である。

新規酵素のスクリーニング研究

永久保 利紀 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

微生物から動物に至るまで、生物は様々な酵素を生産しており、それらによって生体内で起きる多種多様で複雑な化学反応が触媒されている。人類はこれまでにそれらの中から多くの有用な酵素を探索し、その諸性質を解明するとともに、幅広い分野で利用してきた歴史がある。例として、プロテアーゼの一種であるレンニンは、その凝乳作用からチーズの製造に用いられている。また、真正細菌の細胞壁を構成する多糖を加水分解するリゾチームは、殺菌・消炎作用を示すため、トローチや歯磨き粉に配合されている。

これまでに同定されてきた酵素は数千種にも及び、生化学の発展とともにその数は増加し続けている。しかし、既知の酵素以外にも、未だ性質が明らかでない酵素が数多く存在することは、ゲノムプロジェクトの結果から明らかである。そうした未知の酵素を探索し、特性を評価していくことで、新規の優れた酵素を獲得できる可能性がある。

このような背景の下、本研究では、動物由来の新規酵素をスクリーニングし、その機能を解析することを目的としている。

方法・結果

動物由来の数種類の臓器をポリトロンにより低温で破碎処理し、遠心後の上清を粗酵素液サンプルとした。この粗酵素液に化合物を添加し 37°C でインキュベートした。添加した種々の化合物のうち、粗酵素液との反応が検出されたものを基質の候補とした。現在、それらの化合物と粗酵素液の反応産物を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やマススペクトロメトリーなどを用いて、詳細に解析している。

今後の予定

粗酵素液から、反応を触媒している酵素を精製し、酵素学的諸性質を解析する。

微生物由来アミノ酸変換酵素に関する研究

山野 史織（筑波大学 生物学類） 指導教員：小林 達彦（筑波大学 生命環境系）

（背景・目的）

微生物は様々な酵素を作るが、我々人間は生活に役立つ多くの有用な酵素を探索し、これまで利用してきた歴史がある。例えば、*Bacillus licheniformis* の生産するアルカリプロテアーゼはタンパク質・脂質の汚れや黄ばみを取り除くために洗濯用洗剤に配合されている。また、*Actinoplanes missouriensis* の生産するグルコースイソメラーゼはグルコースを基質としてフルクトースに変換することができるため、食品加工に使われる安価な甘味料代替物生産に利用されている。

当研究室では、利用価値の高い酵素を生産する微生物が持つ酵素の機能を解析するために、これまでに、バクテリア・放線菌・酵母など研究室保有菌からもスクリーニングを行い、アミノ酸変換活性を示した微生物を選抜した。

（方法・結果）

選抜したアミノ酸変換活性を示した微生物を、酵母エキスなどを含み誘導剤を添加した最適培地で前培養した。500 ml の最適培地が入った2 L坂口フラスコに終濃度1%になるように植菌し、28°Cで24時間培養した。大量培養終了後、遠心分離により培養上清と菌体に分離し、菌体はさらに破碎処理を行い、遠心分離により上清を回収することで無細胞抽出液を調製した。本無細胞抽出液から、現在、各種クロマトグラフィーを用いて本酵素の精製を行っている。

（今後の予定）

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、単一バンドになるまで酵素の精製を行う予定である。

植物由来生理活性物質の微生物による代謝

藤木 恵津子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 橋本 義輝 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

植物には多種多様な構造を有する生理活性物質が存在する。そのような物質には抗菌作用、抗酸化作用、抗ガン作用など疾病予防・治療への効果が認められ、機能的食品や医薬品等に利用されているものがある。しかし、これらの物質の明確な作用機序はもとより、それらの代謝・分解機構は未だに明らかにされていない。

そこで、本研究では、植物由来の生理活性物質の代謝を担っている微生物を広く自然界よりスクリーニングし、生理活性物質の代謝産物や代謝経路を解明するとともに代謝に関わる酵素および遺伝子を同定することを目的とした。

方法・結果

植物由来の生理活性物質を単一炭素源とした液体培地に各所から採取した土壌サンプルを加え、振とう培養を行った。得られた菌体培養液を同一の新しい培地に植え継ぐことで集積培養を行った。さらに液体培地と同組成の寒天培地上に塗布し、生育してきたコロニーを新しい寒天培地に植え継ぐことで、菌株を単離し、植物由来の生理活性物質を代謝できる微生物のスクリーニングを行った。

次に単離した菌株毎に代謝活性を比較する実験を行った。単離した各菌株を培養し、超音波破砕して無細胞抽出液を調製した。それらの無細胞抽出液と植物由来生理活性物質を混合し、28℃でインキュベートした。インキュベート後、反応溶液を HPLC により分析し、基質の減少量を確認した。スクリーニングした菌株の中から特に植物由来の生理活性物質の代謝能力の高い菌を選択し、以後の実験に用いた。

本研究により、植物由来生理活性物質に対するこれまでに知られていなかった代謝酵素をもつ菌株を得ることができた。現在、決定した培養条件下で菌を大量に培養し、各種クロマトグラフィー操作により、植物由来生理活性物質の代謝に関わる酵素の精製を行っている。

今後の予定

植物由来の生理活性物質の代謝に関わる酵素を SDS-PAGE 上で単一になるまで精製し、詳細な酵素学的諸性質を調べる計画である。

タンパク質分解系による炎症応答の新たな制御機構

王 文琦 (筑波大学 生物学類)

指導教員：千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

オートファジーは、ユビキチン・プロテアソーム系とともに、細胞内における異常または古くなったタンパク質を分解し、細胞の恒常性を維持している。ユビキチン・プロテアソーム系においてプロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を認識して1分子ずつの選択的なタンパク質分解が行う。これに対して、オートファジーではリソソームがターゲットを囲い込んだオートファゴソームと膜融合し非選択的なバルク分解を行う。

オートファジーは、飢餓環境下において活性化しタンパク質を積極的に分解することでアミノ酸を供給している。また先行研究によって、中枢神経系に特異的にオートファジー機能を欠損したマウスでは異常なタンパク質の蓄積とともに小脳のプルキンエ細胞が脱落するなどの神経変性様の病理像が観察されたため、オートファジーは中枢神経系の恒常性維持にも重要であることが分かった。

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病で見られる脳内異常タンパク質の蓄積は慢性的な炎症反応と密接な関係にある。またこの炎症反応において NF- κ B 転写因子は中心的な役割をもつと言われている。NF- κ B シグナル伝達を活性化する経路は主に TNF- α 刺激に応答する Canonical Pathway と、LPS や Lymphotoxin などの刺激に応答する Non-canonical Pathway に分けられる。Canonical Pathway では TNF- α 刺激によって IKK が活性化し、次に活性化した IKK が I κ B- α をリン酸化することで I κ B- α はポリユビキチン化され、これを特異的に認識するプロテアソームによって分解される。その後 I κ B- α と結合し細胞質に留まっていた NF- κ B は核内へ移行し炎症性サイトカインなどの転写を促進する。このプロセスによって活性化する NF- κ B は p65 と p50 のヘテロダイマーである。Lymphotoxin や CD40L 刺激に応答する Non-canonical Pathway では刺激によって IKK α が活性化すると NF- κ B の一員である p100 をリン酸化する。リン酸化された p100 はユビキチン・プロテアソーム系による限定分解を受けて p52 となり、これと RelB で構成される NF- κ B が核内移行する。

本研究ではオートファジーが中枢神経系において炎症反応を制御している可能性を考え、まずオートファジーと転写因子 NF- κ B の関係をオートファジー機能を欠損した細胞を用いて解析した。

方法

- 細胞
実験には野生型マウス胎児繊維芽細胞(WT MEF)とオートファジー機能を欠損した ATG5 KO MEF を用いた。
- NF- κ B Reporter gene assay
Luciferase reporter plasmid と Renilla Luciferase plasmid をトランスフェクションした WT MEF と ATG5 KO MEF それぞれに TNF- α 処理を加えた後、ルシフェラーゼの活性を測定した。トランスフェクション効率の補

正のため、Renilla Luciferase の活性を内部コントロールとして用いた。

- TNF- α 刺激後の p65 の核内移行
TNF- α を処理した WT MEF と ATG5 KO MEF における NF- κ B p65 の細胞内局在を p65 抗体を用いた細胞免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。
- TNF- α 刺激後の細胞内の p65 の発現量
TNF- α を処理した後、WT MEF と ATG5 KO MEF における p65 の発現量を Western Blotting 法を用いて解析した。
- NF- κ B p52, I κ B- α の発現量
p100/p52 抗体と I κ B- α 抗体を用いた Western Blotting 法によって WT MEF と ATG5 KO MEF の細胞内における p52, I κ B- α の発現量を解析した。

結果・展望

NF- κ B Reporter gene assay の結果、オートファジーは NF- κ B の転写活性を制御している可能性が考えられた。詳しいデータは発表会にて発表する。また、今後は Cre-LoxP 系を用いた組織限定的なオートファジーのノックアウトマウスを用いて組織レベルでの解析を検討している。

酸化ストレスに対する細胞の新たな防御機構

福田 智美 (筑波大学 生物学類)

指導教員：千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

背景

酸化ストレスは、生活習慣病や神経変性疾患をはじめとする様々な疾患を引き起こすとされ、発生や細胞増殖、細胞死、老化などの生命現象にも関与している。この酸化ストレスに応答する代表的な経路が Nrf2-Keap1 システムである。

Nrf2 は抗酸化作用のある遺伝子群の転写発現を制御する転写因子であり Keap1 による制御を受けている。Keap1 は、プロテアソームによる分解シグナルとなるユビキチンを標的タンパク質に付加するユビキチンリガーゼであり、また酸化ストレスセンサーとしての役割も持つ。非ストレス下では、Keap1 は Nrf2 をユビキチン化し、プロテアソームによって分解させている。一方、細胞がストレスにさらされると Keap1 は不活性型となり、Nrf2 は安定化し、抗酸化物質の遺伝子発現を誘導する。細胞はこのようなメカニズムによって酸化ストレスから身を守っている。しかしながら、この Nrf2-Keap1 システムを制御する分子機構には完全には解明されていない。

当研究室では、新規に発見したタンパク質 Cul10 が酸化ストレスに関与することを見出した。そこで本研究では、Cul10 の Nrf2-Keap1 システムへの関与を解明することを目的とした。

方法

・ Transfection

目的遺伝子の発現プラスミドを OptiMEM と混合し、Polyethyleneimine によって Transfection した。

・ 免疫沈降

Transfection を行った HEK293T 細胞を、lysis buffer 300 μ l (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 1 mM DTT) に溶解し、溶解液を遠心しその上清を可溶性画分とした。その後、可溶性画分に抗体の結合したビーズを加え、低温室で 4 時間回転混合した。遠心して上清を除去し、沈殿物を Wash Buffer (20 mM Tris-HCl(pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40) で 3 回 wash し、免疫沈降物を得た。

・ Western blotting 法

細胞の可溶性画分または免疫沈降物に 4 \times sample buffer を加え 100 $^{\circ}$ C で 5 分間処理した。熱処理した sample を SDS-PAGE した後、membrane にゲル上のタンパク質を 2 時間転写した。タンパク質が転写された membrane を、3% スキムミルク/TBS-T で 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体の入った 3% BSA/TBS-T で一晩処理した。その後、membrane を TBS-T で 3 回 wash し、2 次抗体の入った 3% スキムミルク/TBS-T で 30 分間処理した。TBS-T で 3 回 wash した後、membrane に検出試薬を処理し、フィルム感光させ現像した。

・ 免疫染色

遺伝子発現プラスミドを Transfection した HeLa 細胞を 4% PFA/PBS で 10 分間固定した。固定後、5% BSA-0.4% Triton X/PBS で 30 分間処理し、ブロッキングと透過処理を行った。その後 PBS で wash し、1 次抗体の入った 5% BSA/PBS を 1 時間処理した。PBS で 3 回 wash した後、蛍光標識 2 次抗体の入った 5% BSA/PBS で 30 分間処理した。PBS で 3 回 wash した後、褪色防止液に浸け細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

結果、考察、展望

Cul10 によって Nrf2 の細胞内局在が変化するか解析するため、HeLa 細胞にプラスミドを Transfection した後、免疫染色を行った。その結果、Nrf2 の単独発現では核に局在していたが、Cul10 との共発現では Nrf2 は核と細胞質の両方に局在するようになった。このことから、Cul10 は Nrf2 の局在制御に関わっていると考えられる。また、Nrf2 と Cul10 が相互作用していると考えられるので、免疫沈降を行い相互作用について現在解析を進めている。

細胞内の局在変化がユビキチン活性に関わっているか解析するため、Cul10 が Nrf2 のユビキチン修飾に及ぼす影響を調べている。この結果の詳細は発表会で報告する。

Cul10 はストレス下で遺伝子発現の上昇がみられたことから、Nrf2 の標的因子である可能性が考えられた。現在、Cul10 が Nrf2 の標的因子であるかについて解析を進めている。

これまでに得られた結果から、Cul10 は酸化ストレス応答の新たな制御因子であることが示唆された。

ユビキチン様タンパク質 NEDD8 を制御する骨髄腫関連因子の解析

加藤 恵美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

NEDD8 (**N**eural Precursor Cell Expressed **D**evelopmentally **D**own-regulated **8**) は、ユビキチン様タンパク質であり、ユビキチンと同様に標的タンパク質に共有結合する。また、ユビキチンと 60%の同一性および 80%の相同性を持ち、他のユビキチン様タンパク質の中で、構造的にも最もユビキチンと似ている。これまでの研究で、NEDD8 は標的タンパク質に結合することで、そのタンパク質の活性化や安定化、または局在などを制御することが報告されているが、その詳細な修飾機構については解明されていない。

シロイヌナズナにおいて、タンパク質の NEDD8 化は正常なオーキシン応答に必須である。近年の報告で、SMAP (**S**mall **A**cidic **P**rotein) というタンパク質の変異により、植物が異常なオーキシン応答を示すことがわかった。そのため、SMAP の哺乳類ホモログである MYEOV2 (**M**yeloma **O**verexpressed **2**) が標的タンパク質の NEDD8 化に関わっているのではないかと考えた。MYEOV2 は、ヒトの骨髄腫で高発現していることはわかっているが、その機能については詳しくわかっていない。

そこで、本研究では、MYEOV2 が NEDD8 化活性や脱 NEDD8 化活性に及ぼす可能性を検証するために、MYEOV2 と NEDD8 化に関わるタンパク質の相互作用、および MYEOV2 がタンパク質の NEDD8 化に及ぼす影響を解析し、MYEOV2 によるタンパク質の NEDD8 化の制御がどのような機構で行われているのか解明することを目的とした。

方法

- ・共免疫沈降アッセイによる MYEOV2 と

NEDD8 化に関わるタンパク質の相互作用の解析

HEK293T 細胞に MYEOV2 および NEDD8 化に関わるタンパク質のタグ付き発現ベクターをそれぞれトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収した。得られた細胞粗抽出液中の目的タンパク質をタグ抗体融合ビーズで免疫沈降し、他方のタンパク質との相互作用をウエスタンブロットにより解析した。

- ・プルダウンアッセイによる MYEOV2 が

タンパク質の NEDD8 化に及ぼす影響の解析

HEK293T 細胞に His-NEDD8、MYEOV2 および NEDD8 化に関わるタンパク質のタグ付き発現ベクターをそれぞれトランスフェクションし、24 時間後にグアニジン塩酸変性条件下で細胞を回収した。得られた細胞粗抽出液中の NEDD8 化タンパク質を His タグ融合ビーズで沈降し、MYEOV2 がタンパク質の NEDD8 化に及ぼす影響をウエスタンブロットにより解析した。

結果

共免疫沈降アッセイにより、MYEOV2 と NEDD8 化に関わるタンパク質が相互作用することが判明した。また、プルダウンアッセイにより、MYEOV2 がタンパク質の NEDD8 化に影響を及ぼすことがわかった。詳細は発表会にて報告する。

酸化ストレス物質により生じるゾウリムシの行動反応とその制御機構の研究

池内 花穂子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 大網 一則 (筑波大学 生命環境系)

導入

ゾウリムシは体表に無数に存在する繊毛の運動により水中を活発に遊泳する単細胞生物である。生物としては単純な体制だが、細胞表面にはイオン濃度や機械的的刺激など外界の環境情報を受容する受容器を持つ。ゾウリムシはこれらの刺激に対して遊泳行動を変化させ、刺激に対して集合したり離散したりすることが知られている。様々な外的ストレスが考えられる自然界で生き抜く上で、ゾウリムシのこのような行動反応は重要である。

環境ストレスのなかでも、酸化ストレスによる影響は生物にとって無視できないものである。活性酸素は、酸素分子 O_2 が通常より反応性の高い状態になった化合物の総称で、強い酸化力をもつため細胞内では核酸、タンパク質、脂質、糖などを酸化変性させ、様々な細胞機能障害の原因となる。生体内ではミトコンドリアによるエネルギー生産過程で活性酸素の発生を免れることができないため、生物は活性酸素を処理する酵素による抗酸化反応機構を持つが、過剰な活性酸素が生じると、細胞の老化やがん化の原因になることが知られている。

私は、生体に障害を与えうる影響力を持つ酸化ストレス物質に対して、単純な体制のゾウリムシがどのような反応を示すのかに興味を持った。これまでに、酸化ストレス物質、過酸化水素 (H_2O_2) がゾウリムシに有害であること、更に、ゾウリムシは H_2O_2 溶液中で回避反応を示すことが明らかになっているが、その行動反応を制御するメカニズムは明らかでない。この実験では、 H_2O_2 がゾウリムシの行動にどのように作用するかをさらに詳しく調べ、また、 H_2O_2 が行動反応のどのプロセスに影響を与えているのかについて調べることを目的とした。

材料・方法

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦藁の抽出液を用いて培養した。培養したゾウリムシは標準溶液 (1 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM Tris-HCl ; pH7.4) で3回洗い、30分以上放置し順応させた後、実験に用いた。 H_2O_2 は標準溶液に溶いた。ゾウリムシの行動反応は実体顕微鏡で観察、もしくは暗視野照明下でビデオテープへ記録し、解析した。Triton モデルの作成は Nitoh と Kaneko (1972) の方法によった。

結果

はじめに、ゾウリムシを異なる濃度の H_2O_2 を含む溶液に入れ、行動反応と生存を調べた。ゾウリムシは 0.1 mM 以下の H_2O_2 溶液中では特別な行動反応を示さず、長時間生存可能であった。1 mM 以上の H_2O_2 溶液の中に入れると、ゾウリムシは回避反応を含む行動反応を示した。しかし、これらの濃度では、時間とともにゾウリムシの形が通常の草履型から丸く変形し、最終的に運動を停止して死んだ。生存可能な時間は H_2O_2 の濃度が低い程長かった。

次に、 H_2O_2 に対するゾウリムシの行動反応を詳細に観察した。標準溶液から素早く H_2O_2 溶液に移したゾウリムシは、はじめ、

通常の遊泳速度より若干速い速度で前進遊泳を続けた。この前進遊泳は溶液に入れてから 1-2 分ほどで終了し、通常の前進遊泳速度に戻った。その後、ゾウリムシは後退遊泳とそれに伴う方向転換、前進遊泳を繰り返すようになり、ジグザグした遊泳軌跡を描いた。このジグザグ遊泳は暫くすると終わり、次に、ゾウリムシは通常時より遅い速度で前進遊泳した後、遊泳を停止し、死亡した。この様な一連の行動反応は 1 mM 以上の H_2O_2 溶液中で生じたが、 H_2O_2 濃度が高い程、ジグザグ遊泳を繰り返す時間が短く、また、方向転換の頻度も高かった。溶液に入れた直後に見られる前進遊泳の持続時間は H_2O_2 濃度によりあまり変化しなかった。

ゾウリムシを 10 mM H_2O_2 溶液に入れてから 5 秒~30 秒間おき、その後標準溶液に戻したときの行動反応を調べた。いずれの場合も、ゾウリムシは標準溶液に移したあとに回避反応を含んだジグザグ遊泳を行った。

H_2O_2 溶液中でみられるジグザグ遊泳を制御するメカニズムを調べる目的で、界面活性剤で細胞膜を除去処理したモデル細胞 (Triton モデル) に H_2O_2 を作用させ、その効果を調べる実験を行った。現在、Triton モデルの再活性化率が充分でないため、 H_2O_2 の繊毛運動系に及ぼす効果は明らかでないが、引き続き、検証を続ける所存である。

考察

今回の実験から、 H_2O_2 がゾウリムシに対して有毒であることが確認された。また、ゾウリムシの H_2O_2 による行動反応の流れがおおよそ連続した 4 つの段階に分けられることが明らかになった。はじめの素早い前進遊泳とそれに続くジグザグ遊泳は有毒な H_2O_2 を避ける行動反応であると考えられる。それに続くゆっくりした前進遊泳と細胞の変形は H_2O_2 の毒性に起因した細胞のダメージを反映していると考えられる。

ゾウリムシを H_2O_2 溶液に入れて初めに生じる素早い前進遊泳は、 H_2O_2 が細胞表面の受容器で受容されて生じると考えられる。これに対して特徴的なのが、回避反応を含むジグザグ遊泳であり、この反応はかなりのタイムラグを経て生じる。細胞表面の受容器を仲介した行動反応は速やかに生じると考えられることから、このタイムラグは H_2O_2 が細胞内に透過し、何らかの作用を及ぼしている可能性を示唆する。現在、予想される H_2O_2 の作用部位として、繊毛の動きを制御する運動系を想定して、Triton モデルを用いた実験を行っている。また、ゾウリムシの遊泳行動や回避反応は細胞膜の電気現象で制御されていることが知られており、 H_2O_2 が膜上のチャネルに作用し膜電気現象に影響を及ぼしている可能性も考えられる。今後、Triton モデルの再活性化率を上昇させ H_2O_2 の運動系への影響を明らかにするとともに、微小電極を用いて膜電気系への影響の検証も進めていきたいと考えている。

ゾウリムシの pH に対する集合反応に及ぼす pH の効果

吉田 二千翔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大網 一則 (筑波大学 生命環境系)

導入

単細胞生物ゾウリムシは細胞表面を覆う多数の繊毛を動かして水中を遊泳する。この生き物は、外界からの様々な刺激に対して行動反応を起こし、自らの生存に適した環境を選ぶことができる。例えば、ゾウリムシは有害物質に対してはその濃度の低い領域に集合し、逆に、誘因物質に対しては濃度の高い領域を選ぶ。これらの集合反応は、化学物質の相対的濃度差の検出により生じると考えられる。一方、ゾウリムシは温度や pH に対しても行動反応を示すが、これらの刺激に対する反応は、相対的な温度や濃度差を検出して起きた行動反応の結果では説明できない。仮に、ゾウリムシが相対的な温度の高低や pH の値を判断しているとする、ゾウリムシは極端な高低温、pH など、生存に適さない環境にさらされることになる。従って、ゾウリムシは pH や温度に関しては絶対値を認識して集合すると考えることができる。

ゾウリムシの温度刺激に対する行動反応に関しては、集合する温度が培養温度付近になるという興味深い事実が示されている。即ち、ゾウリムシが集合する温度は培養温度を変えることにより変化する。この事実は、ゾウリムシが自らの集合する絶対的な温度を認識し、さらに、培養温度を記憶していることを意味している。

私は、温度と同じようにゾウリムシが絶対値を認識できると考えられる pH に対する行動反応に興味を持った。ゾウリムシが集合する pH の値を、順応させた pH を記憶して決定しているかどうかについて検討することを目的とした。この研究では、特定の pH の溶液に一定時間順応させたゾウリムシを異なる pH の溶液に移した際にどのような行動反応を示すのかを調べた。さらに、これらゾウリムシの pH に対する行動反応が、順応させた pH を変えることによりどのように変化するかを調べた。

材料・方法

ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)は麦藁の抽出液を用いて 20°C で培養した。実験には以下の組成の溶液を用いた; 5mM Tris-HCl, 1mM Maleic acid, 1mM KCl, 1mM CaCl₂。この溶液を HCl により滴定して四種類の pH 値 (5.5/6.5/7.5/8.5) をもつ実験溶液を作成した。培養したゾウリムシは、順応させる pH の溶液で四回洗浄し、30分もしくは24時間順応させた後、異なる pH の溶液に小さいピペットで移し、行動反応を調べた。

結果

始めにゾウリムシを4種類の pH の溶液にそれぞれ30分間順応させ、その後異なる pH の溶液に移し、ゾウリムシの行動反応を調べた。pH8.5 に順応させたゾウリムシを pH7.5 の溶液に移した時には行動反応を見せなかったが、pH6.5 及び 5.5 の溶液に移すと、素早い後退遊泳と前進遊泳を繰り返した。pH7.5 に順応させたゾウリムシを pH6.5 あるいは 5.5 に移すと、短い後退遊泳を繰り返した。pH8.5 の溶液中では行動反応は生じなかった。pH6.5 に順応させたゾウリムシは、pH5.5 の溶液に移すと数十秒間短い

後退遊泳を繰り返したが、pH8.5、7.5 の溶液に移した時には行動反応を示さなかった。pH5.5 に順応させたゾウリムシはいずれの pH の溶液に移しても行動反応を示さなかった。

同様にゾウリムシの順応時間を 24 時間とした時のゾウリムシの行動反応を調べた。ゾウリムシは pH8.5 から pH7.5 の溶液に移したときには行動反応は見られなかったが、pH6.5 及び 5.5 の溶液に移すと、後退遊泳や一時停止などの行動反応を示した。これらの行動反応は順応時間が 30 分の時と比べると穏やかだった。pH7.5 から pH6.5 や 5.5 に移すと、全体の 2~3 割のゾウリムシが一瞬後退した。pH6.5 の溶液に順応させたゾウリムシは異なる pH に移しても行動反応を示さなかった。pH5.5 に順応させたゾウリムシは、pH6.5 の溶液に移した直後に数秒間短い後退遊泳を繰り返したが、その他の pH に移した時には行動反応を示さなかった。

考察

今回の実験で見られた、ゾウリムシの後退遊泳や一時停止の行動は、回避反応と呼ばれ、ゾウリムシが異なる環境に遭遇したとき、その環境への進入を回避する反応である。今回四種類の pH に 30 分間順応させたゾウリムシは、順応させた pH より低い pH の溶液に移した時に回避反応を見せた。これはゾウリムシが順応させた pH の溶液から、より低い pH の溶液への侵入を回避することを示している。一方、順応させた pH よりも高い pH の溶液に移した時には回避反応が生じないことから、ゾウリムシは順応させた pH よりも高い pH の溶液への侵入は回避しないことを示している。これらの結果は、今回調べた範囲では、ゾウリムシが高い pH の溶液に集合することを示唆する。

ゾウリムシは順応させる時間を 30 分から 24 時間に伸ばすと、一部の pH で、より高い pH に移した際に回避反応を示すようになった。この行動反応の変化は、順応時間を長くしたため、ゾウリムシが pH に対する行動反応を変化させたことを示す。従って、ゾウリムシの行動反応は順応 pH により変化したと考えられる。順応が生じる時間経過に付いて明らかにするためには、さらに異なる順応時間について検討することが必要である。

今回の実験では、温度刺激に対する反応のように、ゾウリムシが順応した特定の pH を記憶し、そこに集合する直接的な証拠を得ることはできなかったが、今後、ゾウリムシの集合を調べる実験系等を用いて、さらに検討してゆくつもりである。

ウシガエル味細胞の電気的特性の解析

伊藤 奈都美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

導入

生物は生命維持のために様々な栄養素を外界から摂取している。摂食行動は外界から栄養とエネルギーを得る方法の一つである。多くの動物は口腔から食物を摂食し、味覚は摂食の可否を判断する感覚の一つである。味覚には甘み、塩味、うま味、酸味、苦味の5つの基本味があり、前三つ(甘み、塩味、うま味)は摂食行動を促進し、後ろ2つ(酸味、苦味)は摂食を忌避する方向に働くと考えられている。

本研究では実験動物としてウシガエル (*Rana catesbeiana*) を用いた。ウシガエルの舌は食物の捕獲に用いられていることから、身体部位としてなんらかの発達がなされていると予想されるためである。ウシガエルを用いた研究では、苦味と酸味に特化していることが示唆されている。しこれらの忌避性の味と接触行動の関係や、それ以外の味覚については不明な点が多い。そこで、動物の摂食行動と味覚の関係を明らかにする目的で、ウシガエル味細胞の電気的特性の解析を行った。

材料と方法

動物業者から購入した 300~600g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を雌雄区別することなく、使用した。はさみを使用してウシガエル頭部に切れ込みを入れ、脊椎を破壊すると、その切れ込みから体側、頭側の神経をピスして反射運動を防いだ。その後口を開けさせ舌のみを切除してくると、Ca²⁺ free solution で満たしたチャンバーに浸した。チャンバーには事前にシルガードコーティングをおこなっておき、ピンによってした表面を張りつめるように固定した。その後、実態顕微鏡下で、はさみを用いて舌表面に散在する味覚器を切り取った。約 300 の味覚器を集めると、2% collagenase をふくむ divalent free solution で置換し、36 度の恒温器内に 10 分間放置した。その後、divalent free solution で2回リンスし 10 mM L-cystein, 10 U/ml papain を含む divalent free solution で置換し、36 度の恒温器内に 6.5 分間放置した。最後に ringer solution で2回リンスし、パストールピペットで 15~20 回ほど優しくトリチュレーションし、ディッシュに単離した味細胞を分け入れた。

倒立顕微鏡下で単離した味細胞を発見すると、ホールセルパッチクランプ法の用意をする。ピペット抵抗が 5~15 Ω ほどのパッチ用ガラス電極を、micropipette puller(Sutter instrument, P-57)をもちいて作製し、電極内には K⁺ pipette solution を充填した。倒立顕微鏡をのぞきながら、電極を味細胞膜に接近させると、電極に陰圧を与えることで細胞と膜と電極をシールさせた。

(この状態は膜抵抗値がギガ値になったことで判断する)この状態からさらに陰圧をかけることで膜に穴をあけ、whole cell capacitance と series resistance でゼロ補正することでホールセルを形成した。

ホールセルを形成すると、味細胞内の電位を-80 mV に固定し、-80 mV から+60 mV まで 10 mV ごとの step 電位を与えて味細胞における電位依存性チャネルの存在について調べた。

結果と考察

単離した細胞を顕微鏡下で観察すると、細胞体から電とライトを伸ばす細長い細胞が見られた。これらの細胞はその形態的特徴から、味細胞であると同定できた。これらの細胞にパッチ電極を適用し、ギガシールおよびホールセルを形成することに成功した。電位固定法によって膜電位を変化させると、膜電位に応じて電流が観察された。本実験は現在進行中であり、結果の詳細および考察については卒業研究発表会にて報告する。

今後の展望

今後はホールセル状態の細胞に対し、甘味、塩味、うま味、酸味、苦味に対応する溶液を与えたさいの電気応答を観察し、それぞれの電気的特性を解析することが目標である。これによってウシガエルの味覚の発達が、ウシガエルの取り巻く環境下において有益に働いているのか、もしくは関係しているのか考察する。さらに、各味応答にたいする細胞内シグナル伝達機構についても研究を進める予定である。

イモリ肢再生における位置情報の攪乱

佐藤 雄太（筑波大学 生物学類） 指導教員：千葉 親文（筑波大学 生命環境系）

背景

映画やマンガでは、失われた体の一部が再生するといったことはよく目にする。これは映画やマンガの中だけの夢物語なのだろうか。実際に再生能力を持つ動物はこの世に存在している。トカゲのしっぽや、オタマジャクシの肢の再生はよく知られている。しかし、トカゲのしっぽは骨まで再生できないし、オタマジャクシ（幼生）はカエル（成体）になってしまうと再生できなくなってしまう。そんな中、カエルと同じ両生類であるイモリは成体になっても、完全な肢を再生することができるのである。さらには眼のレンズ、心臓、脳も再生でき、レンズに関しては、18回再生したとの報告さえある（Eguchi et al. , 2011）。こんな魅力的な動物であるイモリは、100年にわたり研究されてきたが、技術的な問題により多くのことが謎のままである。四肢再生に関しても謎が多い。しかし、Prod1（Kumar et al. , 2007）、nAG（Kumar et al. , 2007）、Meis（Shaikh et al. , 2011）といった分子が関わっていることがわかってきている。これらの分子はいずれも生体内で濃度勾配を形成しており、この濃度勾配が再生中の肢の位置認識に関わっているのではないかとされている。しかし、これまではイモリでの有効な遺伝子組換え技術がなかったため、これらの分子の機能解析は十分に行われてこなかった。私の所属する研究室ではすでにイモリでの有効な遺伝子組換え技術が確立している。そこで、今回はこの技術を用いて遺伝子組換えを行い、これらの分子をイモリの再生中の肢に強制発現させる条件を検討した。

結果

発表会にて報告します。

染色体の高次構造を形成するリンカーヒストン H1 バリエントの機能制御機構

阿部 真弓 (筑波大学 生物学類)

指導教員：奥脇 暢 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

細胞の分化・脱分化過程において、遺伝子の発現パターンは大きく変化する。この過程においてクロマチン構造が関与していることが示唆されているが、クロマチン構造の変換と、遺伝子発現の相関に関してはまだ明らかになっていない。クロマチン構造制御機構の解明は細胞の分化・脱分化のメカニズム解明や多能性幹細胞作製効率の向上などに貢献すると考えられる。DNA がヒストンに巻き付けられたクロマチン構造の中には遺伝子発現を制御する仕組みが隠されている。遺伝子発現の状態をオンにするにはクロマチンの高次構造を緩ませてヒストンを外す、もしくははずす必要がある。コアヒストンに関しては幅広い研究がなされているが、リンカーヒストン H1 に関してはまだ明らかになっていないことが多い。H1 には H1.1~H1.5, H1.0, H1X のバリエントが発現することが報告されているが、これらのバリエントの性質や細胞の分化・脱分化の過程でどのように制御されているかはわかっていない。そこで本研究では、リンカーヒストン H1 バリエントの細胞の分化・脱分化における発現の制御と意義を明らかにすることを目的として研究を進めている。

材料と方法

1. pEGFP-C1 H1 cell line in HeLa cell を用いた FRAP assay

GFP 融合タンパク質発現ベクターを作製するために pGEX-6P-1-H1.1~H1.5, H1.0, H1X からヒストン H1 の cDNA を切り出し pEGFP-C1 ベクターにのせかえた。作製したプラスミドを HeLa 細胞に導入し、G418 存在下で培養することで恒常的に GFP ヒストン H1 が発現する細胞株 (cell line) を作製した。これを用いて、FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) assay を行った。

2. 7 種類のリンカーヒストン H1 リコンビナントタンパク質の発現と結合実験

リンカーヒストン H1 (H1.1~H1.5, H1.0, H1X) の cDNA は、HeLa 細胞の cDNA よりクローニングし、pGEX-6P-1 ベクターに挿入した。作製したプラスミドを大腸菌 *RP* 株に導入して、タンパク質を発現させ、タンパク質は Glutathione sepharose を用いて affinity 精製した。コアヒストンシャペロンとして知られている TAF1B, B23.1, sNASP, NAPIL1, NAPIL4 は pET-14b ベクターにクローニングされたものを利用し、大腸菌 *BL21* 株を用いて発現させ、His タグ精製により精製した。Flag-tag 付き Nucleolin は、293T 細胞を用いて発現し、FLAG M2 affinity Gel を用いて精製した。精製したリンカーヒストン H1 リコンビナントタンパク質とシャペロンタンパク質を 300mM NaCl を含むバッファー中で 1 対 1 の割合で混ぜ、GST pull down を行った。

3. リンカーヒストンシャペロンとしての活性をみる実験

実験に用いた 196 bp の 5S rDNA は PCR により増幅し精製した。また、ヌクレオソームは精製した 5S rDNA とリコンビナント

のコアヒストンを用いて再構成した。リンカーヒストン H1 とシャペロンのリコンビナントタンパク質を試験管内で混ぜ 30°C で 30 分間反応させた後、5S rDNA あるいはヌクレオソームを添加し、さらに 30°C で 30 分間反応した。反応液を非変性ゲルで泳動し、Gel shift assay を行った。

4. NT2 細胞の培養

神経細胞へと分化するヒト胚性癌細胞株である NT2 細胞は、10% FBS と 2mM L-glutamine を含む DMEM 培地中、37°C の CO₂ インキュベーターで培養した。また、20 日間 10⁻⁶M のレチノイン酸を処理することにより分化を誘導した。

結果と考察

1. それぞれのバリエントの性質を明らかにするため、細胞内動態に着目し、FRAP assay を行った。その結果、H1 バリエントは、動きに関して大きく 3 つのパターンに分けられた。H1X がもっとも速く細胞内を移動しており、次に H1.1 と H1.2 が速かった。細胞内の移動が遅かったのは H1.3, H1.4, H1.5, H1.0 のバリエントであった。H1 の動きには C 末端領域 (CTD) の長さに関与するとの報告があるが、H1.0 は 7 種類の中で一番 CTD の長さが短く、報告と結果が矛盾する。このことから、H1 の動態は CTD の長さだけが影響するのではなく塩基性アミノ酸の個数が影響しているのではないかと考えた。また、H1.0 に特異的なリンカーヒストンシャペロンがあるとすれば、そのシャペロンの減少によって、H1.0 の動きが遅れた可能性が考えられる。

2. 細胞内動態の違いはヒストンシャペロンにより制御されている可能性がある。初めに GST-H1 バリエントと既知のコアヒストンシャペロンを用いて結合実験を行った。その結果、検討したすべての H1 バリエントとヒストンシャペロンが結合することがわかった。結合の強さや特異性についてより詳細に検討を進めている。これらのヒストンシャペロンが結合するだけではなく、リンカーヒストンシャペロンとしての活性を示すのかは材料と方法 3 の実験で検討中である。

4. 細胞分化過程における H1 バリエントや結合したヒストンシャペロンの発現量をみるために、NT2 細胞を用いた細胞分化系を用いて実験を進めている。H1 バリエントの分化段階における発現パターンを調べたい。

今後の展望

体細胞で発現するリンカーヒストンバリエントの機能的違いを明らかにする実験を行いつつ、これらが分化段階で、遺伝子発現制御における役割を明らかにする実験を進めていきたい。具体的には NT 細胞を用いて、H1 バリエントやそれらと特異的に相互作用するヒストンシャペロンの発現レベルを明らかにし、分化した細胞で発現する H1 やヒストンシャペロンのノックダウンを行い、細胞分化への影響をみたいと考えている。

視覚認識における視覚的ノイズの影響の実験系構築

久保木 亮介 (筑波大学 生物学類)

指導教員：設楽 宗孝 (筑波大学 医学医療系)

背景および目的

生物が外界から受け取る情報の多くはクリアなものではなく、むしろ多くのノイズを含んでいる。視覚を例に挙げれば、文字を読むとき紙面やディスプレイが汚れていても正しく情報を認識できるし、水滴の付着した窓越しに外の風景を把握できる。そして、ノイズ混じりの情報を処理する脳や神経系もまた、ニューロンの電位変化やシナプス間のやりとりで発生する電氣的・化学的ノイズの中で機能している。そのため、脳内情報処理を考える上でノイズの作用を無視することはできない。

ノイズが生体に与える影響の一つとして、確率共鳴現象がある。これは入力信号が微弱なとき、そこに適度なノイズが加わることで信号への非線形な応答が強化される現象である。確率共鳴現象そのものは自然界に広く見られるものだが、生物においては感覚ニューロンに閾値下の微弱な信号と適度なノイズを与えたときに生じることが知られている。通常、閾値下の信号に対してニューロンは発火を起こさない。しかし、そこにランダムなノイズが付加されると、入力信号の強度が底上げされ、膜電位が閾値を超える瞬間が生じる。さらに、ホワイトノイズ (すべての周波数で強度の等しいノイズ) を加えれば、閾値を超える確率は元の入力信号の強弱を反映したものになる。ただし、ノイズ強度が小さすぎれば信号は閾値を超えられず、逆に大きすぎれば元の信号と無関係に閾値を超えてしまう。そのため、微弱な入力信号と適度なノイズの2つの条件が揃っている時に生じる現象といえる。

上記のように、生物における確率共鳴現象はニューロン単位で生じる現象である。しかし、近年のヒトを対象とした研究によって、外的に与えられたノイズが知覚のような高次機能の行動成績を向上させたという結果が報告され、注目を集めた。ただし、この結果はあくまで行動レベルのものであり、詳細な神経メカニズムには未だ不明な点が多い。そこで、本研究では視覚的ノイズ存在下で視覚認識を行なっているサルニューロン活動で、確率共鳴現象が関わっているか否かを調べるための前段階として、実験課題の作成を始めとする実験系の構築を行った。

実験システム

実験動物 アカゲザル (*Macaca mulatta*) の成体オス 1 頭に訓練を行なっている。アカゲザルは訓練によって複雑な視覚認識課題を遂行でき、先行研究において類似の課題を行った報告がある。

実験装置 QNX を搭載した PC で課題制御用のプログラムを動かす、DIO ボードを介して連結した別の PC 上の Presentation

(Neurobehavioral Systems 社) で刺激の画面提示を制御する。サルはバーを握ったり離したりすることで課題を遂行するため、バーリリース検知用のアンプと報酬 (水) の量を調整するアンプを作成し、バーリリースの情報は DIO ボードでサンプリングした。また、サルが提示された視覚刺激を視野の中心で見ていることを確認するため、赤外線 CCD カメラを用いた眼球運動の測定を行い、AD ボードでサンプリングする。今後ニューロン活動記

録を行うことを考慮し、行動データ・眼球運動データ・ニューロン活動データ間での同期が出来るよう装置を構築した。

課題 逐次型遅延見本合わせ課題 (Sequential Delayed Match to Sample Task) を採用した。この課題では、まずサルに画像 (見本刺激) を提示し、その後で一定の待ち時間を与える (遅延期間)。その後、サルは次々と提示される様々な画像 (試験刺激) の中から見本刺激と同じ画像が提示された時に、それを選択する。もし正解を選べばサルは報酬を得ることが出来る (Fig.1)。

本研究では、見本刺激として異なる白黒パターン画像 (Walsh パターン) を 64 枚用意した。また、視覚ノイズの影響を調べるため、見本刺激に視覚ノイズとしてランダムドットノイズを加えた試験刺激を作成した。ノイズの強度については、刺激画像全体の 0, 5, 10, 15, 20, 25% にノイズがかかるよう 6 種類を用意した (Fig.2)。さらに、見本刺激から正解までの間に提示される試験刺激の枚数は、0~3 枚からランダムに選ばれるようにした。

今後の展望

サルの訓練が終わり次第、行動データを取って解析する予定である。視覚的ノイズの行動レベルでの効果を確認した後、課題遂行中の単一ニューロン活動記録を行いたい。逐次型遅延見本合わせ課題で要求される能力は、1. 提示された刺激 (およびノイズを除いた推測像) の把握、2. 以前提示された刺激についての記憶、の 2 つに大別される。そこで、測定部位としては前者に関わるとされる TE 野 (下側頭葉皮質前部) を検討している。



Figure 1: 逐次型遅延見本合わせ課題 (15%ノイズ)

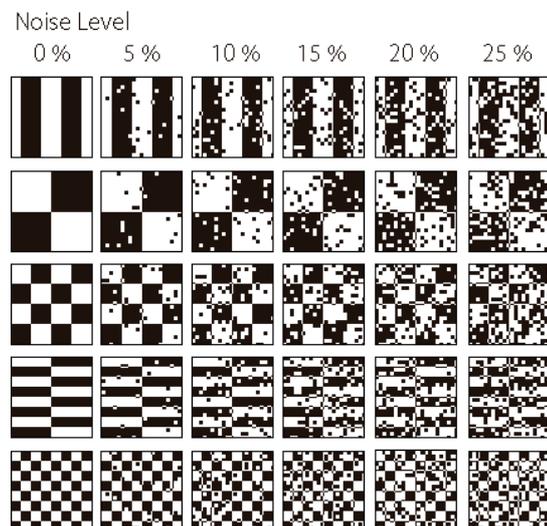


Figure 2: 視覚刺激の例

Staphylococcus aureus におけるカルジオリピン合成酵素のストレス応答メカニズム

小林 彰 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 斎藤 慎二 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトの鼻腔内や表皮に常在する日和見感染菌である。本菌のストレス適応において細胞膜成分の変化は重要な役割を果たしており、そのうちカルジオリピン (CL) は高浸透圧下での長期生存や(1)、酸ストレス耐性に必要な主要リン脂質成分の一つである(2)。

黄色ブドウ球菌が持つ2種類のカルジオリピン合成酵素 (Cls) のうち、Cls2 は通常機能するハウスキーピングタイプとして働き、Cls1 は酸や浸透圧といったストレスに応答して CL を合成する。興味深いことに Cls1 によるストレス応答性 CL 合成は転写・翻訳を介さない迅速な応答であることが見出されたが(2)、具体的な応答メカニズムは未解明である。

Cls1 は細胞膜に局在することが予想されており、また高浸透圧に応答することから、Cls1 のストレス応答性に細胞膜機能、例えば細胞膜を隔てた浸透圧差や各種イオン勾配が関わっている可能性があると考えた。そこで本研究では抗菌ペプチド、イオノフォア、脱共役剤等が Cls1 による酸応答性 CL 合成および浸透圧応答性 CL 合成に与える効果を調べることで、未知のストレス応答性メカニズムに関する手がかりを得ることを目的とした。

材料・方法

細菌株 *S. aureus* N315 (野生株)、*cls1* 欠損株 ($\Delta cls1$)、*cls2* 欠損株 ($\Delta cls2$)、*cls1/cls2* 欠損株 ($\Delta cls1/2$)

培養条件とストレス処理 細菌株を Luria Bertani (LB) 培地にて 37°C、180rpm で一晩 (12~16 時間) 振とう培養した。nisin、gramicidin は MIC (minimum inhibitory concentration) の 10 倍量、carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) は 25 倍量を培地に添加し、37°C、180rpm で 15 分間振とうした。nisin は細胞膜に細孔を開けてイオンの透過性を増大させる抗菌ペプチド、gramicidin は一価のカチオンを通すチャネルを形成するイオノフォアである。脱共役剤である CCCP はプロトン勾配を解消して ATP 合成の低下を招く。

処理後の細胞を回収して PBS で洗浄した。一部は蛍光色素 propidium iodide (PI) で染色して蛍光顕微鏡観察を行った。

PBS で洗浄した細胞を、クエン酸-リン酸緩衝液 (pH2.6) 及び高浸透圧溶液 (4 M NaCl) に懸濁し、37°C、180rpm で 15 分間振とうした。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 細胞を回収して PBS で洗浄し、文献(1)の方法に従って脂質の抽出と TLC 解析を行った。硫酸銅 (100 mg/mL)・8%リン酸をスプレーし、180°Cで加熱してリン脂質を検出した。

結果・考察

各処理による PI 透過性に対する影響 nisin、gramicidin、CCCP いずれの物質も MIC の 10 倍または 25 倍量加えると、50%以上の細胞が PI 染色陽性となった。PI は生細胞膜は透過せず損傷した細胞膜を透過して DNA に結合する蛍光色素である。

上記の量の各物質を作用させることで黄色ブドウ球菌の細胞膜が損傷したと考えられ、処理濃度は十分であると判断した。ただし、本菌の PI 染色陽性が具体的に膜のどのような異常を反映しているか(物理的損傷によらず膜ポテンシャルの消失のみでも陽性となるかなど) は不明である。

酸ストレス下における CL 合成 各物質による処理後、酸ストレス処理による CL の蓄積量の変化を調べた (図 1)。nisin、gramicidin または CCCP 処理のみによる CL 蓄積量への顕著な影響はいずれの株でも見られなかった。 $\Delta cls2$ では nisin または CCCP 処理の有無に関わらず、酸ストレスに応答して CL 蓄積量が増加した。すなわち、Cls1 の酸応答性は nisin または CCCP 処理によって阻害されないことが明らかとなった。ただし、本実験ではストレス処理時にはすでに nisin 等を除去しているため膜修復の影響を検討する余地が残る。gramicidin 処理では CL 増加量が抑制される傾向が見られたが、これについては今後詳細に検討する必要がある。

浸透圧ストレスに対する Cls1 の応答性については現在検討中である。今後は Cls1 の酸および浸透圧ストレス応答メカニズムを明らかにするために、Cls1 のストレス感知部位や至適 pH などの検討も必要である。

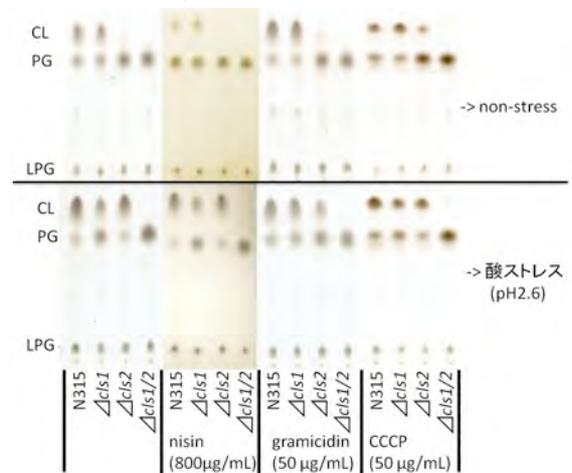


図 1 : 抗生物質存在下におけるリン脂質成分 (TLC)
CL : カルジオリピン、PG : ホスファチジルグリセロール、LPG : リシルホスファチジルグリセロール 展開液=クロロホルム:メタノール:酢酸 (65:25:10 v/v/v)

参考文献

- (1) Tsai M, Ohniwa RL, Kato Y, Takeshita SL, Ohta T, Saito S, Hayashi H, Morikawa K. *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. BMC Microbiol. 11, 13, 2011.
- (2) Ohniwa RL, Kitabayashi K, Morikawa K. Alternative cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress. FEMS Microbiol Lett. 338, 141-146, 2012.

iPS 細胞誘導初期の転写調節機構の解析

加藤 哲男 (筑波大学 生物学類)

指導教員：久武 幸司 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

近年、失われた臓器や組織の再生を目的とした再生医療が注目されている。再生医療の分野で特に注目されているのが iPS 細胞(induced Pluripotent Stem cell)である。iPS 細胞は、様々な細胞へと分化する(多分化能)のみならず、自らと同じ細胞を複製する能力(自己複製能)を持つ。同様の特徴を持つ細胞として、ES 細胞(Embryonic Stem cell)があるが、受精卵から細胞を得るという倫理的な問題に加え、移植の際に患者の体が ES 細胞に対して免疫拒絶を示す問題などが指摘されている。iPS 細胞は、ES 細胞などで発現の高い初期化遺伝子を患者自身の体細胞に導入し、脱分化誘導されることで得られたため、ES 細胞では臨床応用の障壁となっていた倫理的問題や拒絶反応の問題がほとんどない。これらのことから iPS 細胞を用いた再生医療は今まで治療が困難とされてきた病気の治療への応用が期待されている。

しかし現状ではまだ臨床的な利用には至っていない。これは、iPS 細胞において安全性の問題、特に細胞癌化の問題があるからである。癌化の原因の一つとして、iPS 細胞より誘導された分化細胞内に未分化な iPS 細胞が残存することが挙げられる。これは、iPS 細胞作製時に脱分化の不十分な iPS 細胞が混在すると、iPS 細胞を分化誘導した際に、未分化な iPS 細胞がそのまま残存し、癌化することによる。脱分化の不十分な iPS 細胞混在の問題は、iPS 細胞の誘導メカニズムについて、まだ不明な点が多いことによると思われる。よって、より安全で高品質の iPS 細胞を得るためには、iPS 細胞誘導過程のメカニズムを解析し、iPS 細胞誘導過程で重要な働きをする遺伝子を明らかにすることが必要となる。

本研究では、繊維芽細胞から iPS 細胞を誘導した際に、iPS 細胞誘導初期に発現量が低下する遺伝子で、Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc の 4 つの因子のいずれかに直接制御される転写因子に注目した。この転写因子を過剰発現させることで、この転写因子が iPS 細胞誘導に与える影響を解析し、iPS 細胞誘導メカニズムについて考察した。

【方法】

1. プラスミドの作製

MEF(Mouse Embryonic Fibroblast)より RNA 抽出試薬 Isogen(ニッポンジーン)を用いて、RNA を抽出し、RNA を鋳型として作製した cDNA library より、目的遺伝子を PCR で増幅した。得られた cDNA はレトロウィルス発現プラスミドベクターである pMXs(Addgene) もしくは pLNCX2(Clontech)に導入した。pLNCX2 については、CMV(Cytomegarovirus) promoter を TK(Tymidine kinase) promoter に置換したものを使用した(以下 pLNCX-Tkp)。また、目的遺伝子の N 末には、抗体染色に用いるための 3xFlag Tag を挿入した。

2. レトロウィルスベクターの産生

レトロウィルスの構造遺伝子(gag, pol, env)を持つパッケージング細胞として、Plat-E 細胞を用いた。この細胞に

Lipofectamine LTX(Invitrogen)を用いて、プラスミドを Transfection し、3 日培養後、上清を回収した。

3. レトロウィルスベクター感染と感染の確認

2 で産生したレトロウィルスベクターを 0.45 μm のフィルターでろ過し、8 ng/ml の polybrene(Wako)を含む培地に加えた。これにより、MEF もしくは 3T3 細胞に対してレトロウィルスベクターを感染させた。

また感染率の検証として、1 次抗体として Anti-Flag 抗体(Sigma Aldrich)を用いて抗体染色を行った。さらに mRNA の発現量を定量するためにリアルタイム PCR を行った。RNA 抽出試薬 Isogen で得た RNA を SuperScript III(Invitrogen)を用いて cDNA とし、Gotaq qPCR(Promega)を用いて、7500 リアルタイム PCR システム(Applied Biosystem)で定量した。データは GAPDH もしくは TBP(TATA-Binding Protein)を用いて標準化した。

4. iPS 細胞誘導

本研究室西村助教が作成したセンダイウィルスベクター(SeVdp[KOSM])を使用した。このベクターは初期化因子 Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc を持続的に発現する。そこで、まず、MEF に対して上記の方法で、レトロウィルスベクター感染させ、3 日間培養した。次にこの細胞にセンダイウィルスベクターを培地に加え、センダイウィルスベクターを感染させた。1 日後、フィーダー細胞の上にこの細胞を均一に撒き、37°C, 5% CO₂ 条件下で 2 週間培養した。その後多能性を持つ細胞を見分けるためにアルカリホスファターゼ染色をし、iPS 細胞誘導により形成されたコロニー数を数えた。

【結果・考察】

本研究室の先行研究として、MEF より iPS 細胞を誘導する初期段階で発現量が低下する 20 個の候補遺伝子が絞られていた。もしこれらの因子の発現量低下が iPS 細胞誘導に必須であれば、これらの因子を過剰発現すると、iPS 細胞誘導を阻害することが予想される。

20 個の候補遺伝子のうち、10 個の遺伝子についてクローニングに成功した。各 10 個の遺伝子をレトロウィルスベクターで MEF に過剰発現させた後、iPS 細胞誘導を行ったところ、Ebf1 を過剰発現させた細胞において、形成されたコロニー数の減少が確認された。また、このコロニーの細胞は、増殖が他の遺伝子を過剰発現させた細胞と比べると遅いことが確認された。細胞増殖は、分化細胞より未分化細胞の方が早いという事実から、Ebf1 を過剰発現させた細胞では、iPS 細胞誘導に見られる細胞増殖の促進が十分に起こらず、iPS 細胞誘導の効率が低下したのではないかと考えられる。

今後は、まだ未解析である 10 個の遺伝子について、プラスミドを作製するとともに、今回、結果が得られた Ebf1 について、Ebf1 が制御する遺伝子を明らかにし、iPS 細胞誘導メカニズムについて考察したいと思う。

ステロイド薬投与によるヒト間葉系幹細胞分化に対する影響

加藤 俊貴 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 大根田 修 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

近年、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)の研究が発展し、幹細胞を使用した再生医療が世界中で注目を集めている。しかし、倫理的な問題や、生体内で悪性腫瘍を形成する危険性があるなど、多くの問題を抱えており、実際の臨床応用には程遠いと言われている。それに対し、組織幹細胞、特に間葉系幹細胞(MSC)は倫理的問題や悪性腫瘍の危険性は比較的安くMSCを使用した再生医療が期待されている。

MSCは骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有する組織幹細胞の1つであり、骨髄や臍帯血、脂肪組織などの生体内の様々な組織に分布していることが明らかとなっている。特に脂肪組織由来MSCは高い増殖能を有することから、臨床応用時の細胞供給源として注目を集めている。また、MSCは、それ自身が持つ多分化能に加えて、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などのサイトカインを豊富に放出することが知られている。このような性質を利用し、心疾患や移植片対宿主病(GVHD)、骨関連疾患に対しMSCを使用した臨床研究が進んでいる。

代表的抗炎症薬であるステロイド薬は喘息やリウマチなど様々な疾患に対して用いられる。しかし、高用量、長期間での投薬には副作用が伴うことが知られており、代表的なものとして骨粗鬆症が挙げられる。また、骨関連疾患に対する症状緩和のため、ステロイド薬を使用するケースは非常に多く、骨関連疾患に対しMSCを用いた細胞治療を行うにあたってMSCに対するステロイド薬投与の影響を評価することは不可欠である。しかし、これまでの研究でステロイド薬投与がMSCに対してどのような影響を与えるのかについての評価は少ない。そこで本研究では、MSCを由来する患者のステロイド薬投与の有無によって分類し、高用量、長期間のステロイド薬投与がMSCの分化へどのような影響を与えるのか検証することを目的とした。

方法

ヒト脂肪組織からMSCの単離

ヒト脂肪組織はインフォームドコンセントを得た上で、筑波大学人間総合科学研究科整形外科、三島初先生より分与していただいた。脂肪組織は、細かく切り刻んだ後0.1%コラゲナーゼ溶液にて処理した。コラゲナーゼ処理後、組織を懸濁し遠心した。得られたペレットをIMDM / 10%FBS / 2 mg/mL L-glutamine / 0.1% P/S / 5 ng/mL ヒトb-FGF培地にて培養した。播種後観察された接着性細胞をフローサイトメトリーで解析し表面マーカーの特徴がMSCと一致していることを確認した。また、ステロイド薬投与の最大量が50 mg/day、期間が1年以上の患者由来MSCをステロイド薬投与群とした。

in vitroにおける分化能の解析

MSCがコンフルエントになった後、それぞれ骨分化培地、脂肪分化培地、軟骨分化培地へ切り替えた。一定期間経過後、Alizarin Red S染色、Oil Red O染色、Toluidine blue染色にてそれぞれの分化能を評価した。

RT-PCR法による発現解析

骨分化誘導前後7日後、14日後のMSCからcDNAを合成しRunx2、Alkaline phosphatase (ALP)、osteocalcinなどの骨分化関連遺伝子群をRT-PCR法により解析した。

in vivo 大腿骨骨折モデルマウス

術前にゼルフォームへAT-MSCを播種し1~2時間インキュベートした。マウス解析には8~12週齢のC57/BL6マウスを使用した。マウス大腿骨中央を切断し、2 mm程ギャップを作成した後、ギャップ固定のために骨髄内に針を通し、ギャップ周囲にMSCを播種したゼルフォームを移植した。移植28日後、切断部位の骨修復をレントゲン撮影によって評価した。また、骨折させた大腿骨サンプルを固定、脱灰処理し、HE染色にて組織学的評価を行った。

結果・考察

ステロイド薬投与群、及び非投与群のMSCを用いてin vitroにおける骨分化能、脂肪分化能、軟骨分化能を解析した。脂肪分化と軟骨分化に関しては群間の差は認められなかったものの、ステロイド薬投与群において骨分化能が有意に低下していることが分かった。そこで、骨分化関連遺伝子群をRT-PCR法にて解析したところ、骨分化初期マーカーの1つであるALPの発現が骨分化誘導前のステロイド薬投与群において有意に低下していることが明らかとなった。ALPは、骨分化における石灰化に重要な機能を持つことが知られており、分化開始時にALPの発現が低いことが骨分化の低下と関係している可能性が示唆された。そこで、ステロイド薬投与群MSCにALPを過剰発現させたところ、in vitroにおける骨分化能が回復することが明らかとなった。

また、in vivoにおける骨修復能を大腿骨骨折モデルマウスにより解析した。in vivoでは、組織学的評価による群間の差は認められなかった。

以上の結果より、高用量、長期間のステロイド薬投与はMSCのin vitroでの骨分化の低下を引き起こし、それは骨分化関連遺伝子発現の違いによる影響であることが示唆された。今後は他の骨分化関連遺伝子の発現解析と、大腿骨骨折モデルマウスを用いたin vivoにおける質的な骨形成能の解析を進めていく予定である。

出芽酵母細胞壁合成経路におけるポリ A 鎖分解酵素 Ccr4、Pop2 と

デキャッピング酵素活性化因子 Dhh1 の機能解析

大森 哲朗 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 入江 賢児 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

細胞における遺伝子発現は、DNA の転写から翻訳後制御に至るまで様々な段階で調節されており、そのなかで真核生物には複雑な mRNA の分解制御や翻訳制御が存在する。出芽酵母において、mRNA 分解制御や翻訳制御に機能する RNA 結合タンパク質 Khd1、ポリ A 鎖分解酵素 Ccr4 は、標的 mRNA の発現を制御することにより、細胞壁合成経路に関与している。Khd1 と Ccr4 は細胞壁合成経路で働く低分子量 G タンパク質 Rho1 の GDP/GTP 交換因子 (GDP/GTP exchange factor: GEF) をコードする *ROM2* mRNA の発現を正に制御し、Ccr4 は Rho1 の GTP アーゼ活性化因子 (GTPase activating protein: GAP) をコードする *LRG1* mRNA の発現を負に制御する。*khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株では、*ROM2* の発現が低下し、*LRG1* の発現が上昇する結果、Rho1 の活性が低下し細胞壁の合成異常を示す。

本研究では、Ccr4 と同じくポリ A 鎖分解酵素である Pop2 と、デキャッピング酵素活性化因子である Dhh1 についても、*ROM2* mRNA や *LRG1* mRNA の発現との関連を解析した。

方法

1. *pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株を作製し、*ROM2* mRNA および *LRG1* mRNA レベルをノザン解析により調べた。
2. *pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株、*pop2Δ rom2Δ lrg1Δ*、*dhh1Δ rom2Δ lrg1Δ* 三重変異株を作製し、その表現型を解析した。

結果と考察

1. Pop2 および Dhh1 は、*LRG1* mRNA の発現を負に制御する

Pop2 が *ROM2* mRNA 及び *LRG1* mRNA と関与しているかを調べることを目的として、野生型株、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株において *ROM2* mRNA と *LRG1* mRNA のノザン解析を行った。

その結果、*ROM2* mRNA レベルについては、野生型株、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株の間で差が見られなかった。よって、Pop2 および Dhh1 は *ROM2* mRNA の制御には関わらないことが示唆された。しかし、*ccr4Δ* 単独変異株で *LRG1* mRNA レベルが上昇していたのと同じように、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株においても、*LRG1* mRNA のレベルが野生型株に比べて上昇していた。このことから、Ccr4 と同様に、Pop2 および Dhh1 も *LRG1* mRNA の発現を負に制御していることがわかった。

2. *pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株は synthetic growth defect を示す

ccr4Δ rom2Δ 二重変異株の表現型は、*ccr4Δ* 単独変異株と比較して増殖が遅延することが分かっている。すなわち、*ccr4Δ* 単独変異株の増殖速度は野生型株と比較してやや低下し、*ccr4Δ rom2Δ* 二重変異株の増殖速度は *ccr4Δ* 単独変異株に比べて著しく低下する。これは、*ccr4Δ rom2Δ* 二重変異株で GEF である Rom2 の低下と GAP である Lrg1 の上昇が同時に生じることで Rho1 が不活性化するからであると考えられる。

そこで、Pop2 と Dhh1 についても、*LRG1* mRNA の発現を負に制御する効果が表現型に現れるかどうかを解析することを目的として、*pop2Δ* 変異と *rom2Δ* 変異をヘテロに持つ二倍体株、*dhh1Δ* 変異と *rom2Δ* 変異をヘテロに持つ二倍体株を作製し、四分子解析を行い、各変異株の増殖を比較した。

その結果、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株の増殖速度は野生型株と比較してやや低下し、*pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株の増殖速度はそれぞれ *pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株に比べて著しく低下した。以上の結果から、Pop2 と Dhh1 は、Ccr4 と同様に *LRG1* mRNA の発現を負に制御し、その効果が表現型に顕著に現れることがわかった。

3. Pop2 および Dhh1 は、*LRG1* mRNA 以外の因子も制御して細胞増殖に関与している

次に、*pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株が示す表現型が、*ROM2* mRNA 及び *LRG1* mRNA レベルに関係した Rho1 の不活性化が原因であるかどうかを明らかにする目的で、それぞれの株に対して *lrg1Δ* 変異を持たせた二倍体株を作製し、四分子解析を行い、各表現型の増殖を比較した。

その結果、*rom2Δ lrg1Δ* 二重変異株の増殖速度は野生型株と比較してやや低下するが、*pop2Δ rom2Δ lrg1Δ*、*dhh1Δ rom2Δ lrg1Δ* 三重変異株の増殖速度は *rom2Δ lrg1Δ* 二重変異株よりも低下した。このことから、Pop2 および Dhh1 は、*LRG1* mRNA 以外の mRNA も制御して細胞増殖に関与していることが示唆された。今後は、マルチコピーサプレッサーなどを行い、*LRG1* mRNA 以外の mRNA を同定していく予定である。

エンドスルファターゼ Sulf1 によるヘパラン硫酸修飾と成獣マウスの神経新生の関係

永田 邦彦 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 榎 正幸 (筑波大学 医学医療系)

・背景と目的

ヘパラン硫酸は、細胞の増殖、分化、移動に関わる分子の一つで、細胞の表面に存在し、細胞外のタンパク質と相互作用する。ヘパラン硫酸は、グルクロン酸またはイズロン酸と、グリコサミンの二糖単位が繰り返し並んだ多糖鎖であり、2位または6位の水酸基、及びN位がいろいろな組合せで硫酸化されるため、構造多様性に富む。Sulf1は、ヘパラン硫酸を修飾するエンドスルファターゼの一種で、ヘパラン硫酸の特定の硫酸基を脱硫酸化する機能をもつ。細胞外で働くため、糖鎖上の硫酸基の並び方を様々に変化させることができ、この特性により、ヘパラン硫酸と相互作用するタンパク質との結合性を制御している。

成獣マウスの脳において、Sulf1は、側脳室の脳室下帯に強く発現する。哺乳類の成体の場合、通常脳内で新しい神経細胞は作られないが、脳室下帯では神経幹細胞が分裂し、神経を新生する。脳室下帯で分裂した神経幹細胞は、嗅球へと移動する。嗅球は、鼻腔で空気中の臭い分子を認識した、嗅細胞からの情報が送られてくる一次中枢であり、内側から順に顆粒状細胞層、内網状層、僧帽細胞層、外網状層、糸球体層に分けられる(図1)。糸球体層は、嗅細胞の軸索と僧帽細胞の樹状突起が、シナプスを形成する糸球体の層である。

神経幹細胞が脳室下帯から嗅球へと移動する経路は Rostral migratory stream (RMS) と呼ばれる。分裂後、2日から6日ほどかけて嗅球にたどり着いた神経幹細胞は、分裂後5日から7日目に RMS から出て、顆粒状細胞層や糸球体層などに向かう。15日から30日目には顆粒状細胞層や、糸球体層を縁取るように存在する傍糸球体細胞となり、新しく神経回路に組み込まれ、成熟した神経細胞として活動し始める(図2)。神経幹細胞の分裂は、脳室下帯の尾側から吻側に向かって起きており、RMSの中で再度分裂するものもある。

Sulf1は、その発現する場所が神経新生の始まる場所と重なっているが、Sulf1が神経新生に影響を与えるか否か、また影響するとすれば、神経新生のどの段階で、どのような役割をはたすのかについては、判っていない。そこで、本研究では、脳室下帯で

発現する Sulf1 が、脳室下帯から嗅球にわたる神経新生に与える影響を明らかにすること

を目的とした。

・材料と方法

3ヶ月齢の Sulf1 ノックアウトマウスと野生型マウスに、ブロモデオキシウリジン (BrdU, 100 mg/kg) を1回腹腔内注射し、2時間後に4%パラホルムアルデヒド (PFA) で還流固定し、脳を取り出した。BrdUはチミジンの類似体であり、DNA合成期の細胞で新たに合成されるDNAに取り込まれる。取り出した脳を4%PFA中に、一晚4°Cで浸した後、30%スクロース/リン酸緩衝液 (PBS) 溶液に移し、一日4°Cで浸した。次にO.C.T.コンパウンドに包埋し、クリオスタットを用いて厚さ20µm、冠状断で嗅球の凍結切片を作製した。切片は0.3% H_2O_2 /5%ジメチルスルホキシド/TBST (0.1%Tween-20を含むTBS)の混合溶液で処理し、2Nの塩酸で37°C、30分処理した。続いて0.5%blocking reagent/0.1%TritonX-100/PBSで、1時間、室温でブロッキングした後、抗BrdUラットモノクローナル抗体(40倍希釈)と、一晚4°Cで反応させた。PBT (0.1%Tween-20を含むPBS)で、室温で30分ずつ3回洗浄した後、ビオチン化抗ラットIgG抗体(500倍希釈)と、室温で2時間反応させた。PBTで、室温で30分ずつ3回洗浄した後、avidin-biotin complex (ABC)法を利用して、反応を増幅した。続いてTBSTで5分ずつ3回洗浄した後、ジアミノベンジジンで発色反応させた。封入した後、顕微鏡で観察し、層ごとにBrdU陽性細胞の数を数えた。

・結果と考察

上記の条件で実験する以前に、BrdUを4時間毎に3回注射し、1日後にPFA固定した後、60µm、冠状断の凍結切片を作製してBrdUを染色する、別の実験を行った。脳室下帯を含む凍結切片と、嗅球の凍結切片をそれぞれ作製、顕微鏡で観察し、脳室下帯については背側、腹側などの場所ごとに、嗅球の場合は層ごとに、BrdU陽性細胞の数を数えた。

その結果、脳室下帯については、ノックアウトマウスと野生型マウスの間に、BrdU陽性細胞数の差は見られなかった。

嗅球については、嗅球吻側の先端部では、ノックアウトマウスの方が野生型マウスよりも、BrdU陽性細胞数が多いように思われた。しかしこの条件では、BrdUを取り込む細胞の数が多く、切片も厚過ぎたため、正確な数を数えられていない可能性があり、

上記の条件で実験しなおした。切片は、尾側から吻側まで切り出した順序がわかるように保存した上で、嗅球の細胞数を数えることとし、現在進行中である。

・今後

嗅球の吻側から尾側までの全ての切片について、ノックアウトマウスと野生型マウスの各層ごとのBrdU陽性細胞数を比較し、差の有無を調べる。

図1 嗅球の冠状断面図

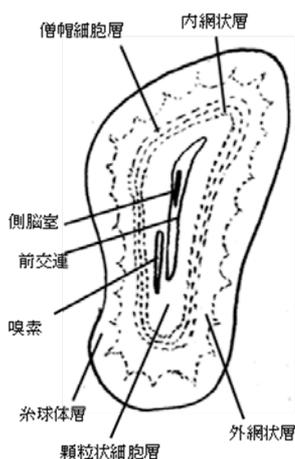
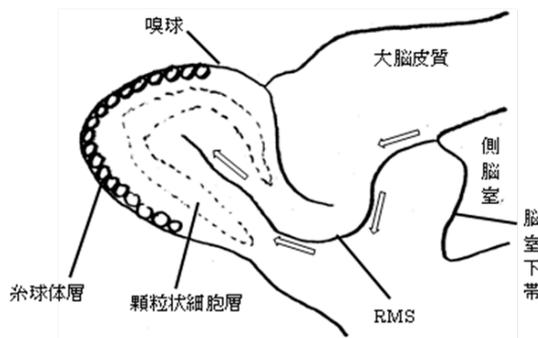


図2 側脳室と嗅球の位置関係



自己免疫疾患における MAIR-II の機能解明とヒト MAIR-II 相同分子の同定

新妻 耕太 (筑波大学 生物学類)

指導教員：渋谷 彰 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

自己免疫疾患は、自己抗原に対して通常働く自己寛容機構が正常に機能せず、自己反応性の免疫細胞が活性化して自身の組織が障害されることにより発症する。病態に密接に関連して検出されるのが、自己抗原に対する抗体である自己抗体であり、免疫複合体の組織への沈着が炎症、障害などの誘発に関わる。また、獲得免疫系の細胞である T 細胞、B 細胞のみならず、自然免疫応答に働く細胞が自己免疫疾患の病態に関わることも明らかになってきている。

自然免疫応答の制御に働く分子である、MAIR (myeloid-associated immunoglobulin-like receptor)-II は、当研究室が新たに同定した 228 のアミノ酸からなる膜型受容体で、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 配列を有するアダプター分子である DAP12 または FcR γ 鎖と会合して活性化シグナルを伝達する。

生体内においては盲腸結紮穿孔を施した腹膜炎による敗血症を誘導したマウスでは、施術の一週間後に野生型マウスの 90% が生き残る条件で、MAIR-II 遺伝子欠損マウスは全例死亡することから、細菌の排除に重要な役割を持つことを明らかにした。

一方で、B 細胞において、MAIR-II は DAP12 と会合して細胞増殖に対して抑制的に働く結果も得られており、DAP12 遺伝子欠損マウスでは自己抗体産生が亢進することから、MAIR-II が自己抗体の産生を抑制する機構に関わっていることが示唆された。以上のことから、MAIR-II の自己免疫疾患における機能の詳細を明らかにするため、MAIR-II 遺伝子欠損マウスを用いて全身エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) のモデルマウスを用いて解析を行うこととした。

さらに、マウス MAIR-II の生体内における役割の重要性から、これまでの知見をヒトの研究に応用するべく、ヒト相同分子の同定を行い、局在と、機能の解析を行うこととした。

方法

1. 自己免疫疾患における MAIR-II の機能解明

MRL/lpr マウスは免疫細胞のアポトーシス関連遺伝子である *Fas* 遺伝子に変異があるため、リンパ球の蓄積が生じることで自己抗体産生が亢進し、多臓器慢性炎症を引き起こす SLE のモデルマウスである。このマウスを C57BL/6 (B6) マウスに戻し交配して得られた *B6/lpr* マウスは自己抗体産生の亢進を認めるも、いずれの膠原病病態を発症しない。この *B6/lpr* マウスと MAIR-II 遺伝子欠損マウスを掛け合わせるにより、自己寛容の破壊した状況下での MAIR-II の機能解析を行った。

1-1. 尿中タンパク質の測定

28 週齢、雌の *Mair-II^{+/+, lpr/lpr}* (n=8), *Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* (n=6) から代謝ケージを用いて 24 時間の蓄尿を行い、尿量と尿中タンパク質を測定し、これを掛け合わせて尿中 1 日総タンパク量を算出した。尿中タンパク質はピロガールレッド法を用いて測定し、t 検定法により有意差検定を行った。

1-2. 抗二本鎖 DNA 抗体の測定

1-1 のマウスより血清を採取し、抗二本鎖 DNA 抗体を IgG, IgM の二つのサブクラスに関して抗体価を ELISA 法にて測定し、t 検定法により有意差検定を行った。

2. ヒト MAIR-II に対するモノクローナル抗体の作製

NCBI のデータベースでマウス MAIR-II との相同性が高い分子を検索したところ *LOC100130520* 遺伝子を発見し、この遺伝子がコードするタンパク質をヒト MAIR-II 候補分子とした。ヒト末梢血から CD14 陽性細胞を分離したのち、cDNA を作製し、この遺伝子に対して作製したプライマーを利用してクローニングを行った。得られた遺伝子配列から、ヒト MAIR-II の細胞外領域と、ヒトの IgG 抗体の Fc 部分をつなげたキメラタンパク質 (ヒト MAIR-II Fc タンパク質) とヒト MAIR-II を強制発現させたトランスフェクタントを作製した。

ヒト MAIR-II Fc タンパク質を Balb/c マウスに免疫することで抗ヒト MAIR-II Fc タンパク質抗体産生 B 細胞を含む膝窩リンパ節由来細胞を得た。これとミエローマ細胞である SP2/O を細胞融合し、HAT 培地選択によってハイブリドーマを作製した。一次スクリーニングとして、ヒト MAIR-II 細胞外領域のみを認識するクローンを ELISA 法で絞り込み、二次スクリーニングとしては、ヒト MAIR-II トランスフェクタントに特異的に結合する抗体を産生するクローンをフローサイトメトリー法を用いた。二次スクリーニングを経て得られたクローンをヒト MAIR-II を特異的に認識結合する抗体を産生する陽性クローンとした。

結果

1-1. 尿中 1 日総タンパク質は野生型 *Mair-II^{+/+, lpr/lpr}* に比べて、*Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* で有意に亢進が認められた。(p<0.05)

1-2 抗二本鎖 DNA 抗体は IgG、IgM とともに *Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* が高い傾向はあるが、有意な差は見られなかった。(p=0.2824, p=0.1812)

2 ヒト MAIR-II 候補分子のクローニングを行い、HAT 培地選択により 427 クローンのハイブリドーマを得た。

一次スクリーニング(ELISA 法)により 48 クローンを陽性クローンとした。二次スクリーニング(フローサイトメトリー法)により 1 クローンが陽性クローンとなり、ヒト MAIR-II 候補分子に特異的な結合する抗体を産生するクローン TX93 を樹立した。

考察と展望

1 *Mair-II^{+/+, lpr/lpr}* と比べて、*Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* で尿中一日総タンパク質に有意差を認めたが、自己抗体価に差が見られなかったのは、抗体価に差が生じるのは 28 週齢より若いポイントであり、28 週齢では差が見られないが、腎障害の蓄積に差があったためだと考えている。今後は免疫染色法による腎障害の評価を行う。

2 TX93 の樹立に成功したことから、今後はヒト末梢血中の発現局在と機能を解析し、マウス MAIR-II の相同分子であるかの判定を行う。

テトラヒメナの13種類の新奇ミオシン；RCC1ドメインを持つミオシン4種類の

口部装置への局在と機能解析

高見澤 広子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ミオシンはアクチンと相互作用するモータータンパク質で、筋収縮、細胞内物質輸送、細胞質分裂時の収縮環などで働くことが知られている。当研究室の先行研究で、繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* には13種類のミオシン、*MYO1*~*13*が存在し、それらがヒトや酵母・植物などのミオシンとは系統的に全く異なるグループに属することが明らかになった。これらはミオシン尾部に含まれる機能性ドメインの違いから、サブクラスI~IIIに分けられている。このなかのサブクラスIIはRCC1 (regulator of chromosome condensation 1) domainをもつことが特徴である。RCC1 domainはRan GEFとして機能するRCC1タンパクに存在する。RCC1 domainを含むミオシンはアルベオラータに属する数種類の生物でしか見つかっておらず、その機能解析は一切行われていない。私はRCC1 domainをもつ4種類のテトラヒメナミオシン、*MYO3*, *MYO10*, *MYO11*, *MYO12*の局在部位を調べ、その機能解析を行っている。*T. thermophila* におけるRCC1 domainをもつミオシンを調べることによって、新しいミオシンの機能が発見できるのではないかと考える。

方法

1) ミオシンの局在部位の決定

(a) ミオシンC末端へのマーカー遺伝子の導入

各ミオシンの局在部位を明らかにするために、ミオシンC末端側に蛍光タンパク質EGFP遺伝子とparomomycin耐性遺伝子を挿入した。遺伝子が導入されたか確認するため、CdCl₂を添加してparomomycin耐性遺伝子の発現を誘導し、セクションを行った。遺伝子の導入を確認後、paromomycinの量を少しずつ増やしながらか培養することで、大核で導入遺伝子を100%発現する株を作成した。

(b) 免疫染色による観察

3つのEGFP導入細胞株でEGFPの蛍光が観察された。内在性プロモータにより発現誘導されるEGFPの蛍光は弱かったので、抗GFP抗体で免疫染色した。微小管とミオシンの局在を調べるため、細胞にdibucaine (終濃度1.25 mM)を添加し、10分静置することで脱繊毛させた。その後固定し、抗チューブリン抗体との二重免疫染色を行った。

2) ミオシン遺伝子のノックアウト (KO)

T. thermophila には大核と小核があり、接合時には減数分裂した小核から大核が新生される。完全に遺伝子をKOするために、接合中の小核にマーカー遺伝子を挿入するGerm line KO法を用いた。各ミオシンのN末端1 kbpをKOするため、ターゲット配列をparomomycin耐性遺伝子に置きかえた。

結果

EGFPを導入した細胞を用いて、抗GFP抗体と抗チューブリン抗体による免疫染色を行い、Myo3, 10, 11の局在部位を明らかにした。Myo3, 11は細胞のdeep fiber全体に局在していた。deep fiberとは口部装置からのびる2本の微小管束のことで、細胞の内側にむかうにつれてそれらは1本の束にまとまっていく。一方、Myo10は口部装置とdeep fiberのなかの2本の微小管束が一つに束ねられるまでの部分に局在していることがわかった。細胞は分裂中に食胞形成を停止することが知られているが、Myo3, 11の局在は分裂細胞ではみられなくなった。また、Myo10の蛍光は分裂細胞では小さくなる。これらのKO細胞株は現在作成中である。

Myo12に関してはEGFPを導入しても、抗GFP抗体による免疫染色でも蛍光は観察されなかった。そこで現在、EGFPよりはるかに分子量が小さい3×HAタグを導入し発現させ、局在部位を調べている。

考察

テトラヒメナはバクテリアなどの餌を繊毛を使って口部装置内に集め、食胞を形成して、餌を体内に取り込んでいる。形成された食胞はdeep fiberに沿って細胞の内側へと運ばれ、微小管に依存して細胞内を移動すると考えられている。形成中の食胞と輸送初期の食胞の表層にはアクチンが局在することが知られているが、食胞の形成と輸送のメカニズムの詳細は明らかとなっていない。

今回明らかとなった局在部位から、Myo3, 11は食胞のアクチンと相互作用することによって、食胞の輸送過程で機能している可能性が考えられる。Myo10は細胞の口部装置に局在しているので、主に食胞の形成に関与することが予想される。分裂細胞で口部装置が退化して食胞形成が抑制されるが、Myo3, 10, 11の局在が分裂細胞で縮小、もしくは観察されなくなることも、これらのミオシンが食胞の形成と輸送に関与することを示唆している。今後、各ミオシンをKOした細胞株を作成することでその機能を調べていく予定である。さらにMyo12についても局在部位とその機能を明らかにし、RCC1 domainを持つミオシンのテトラヒメナ内での機能を明らかにしていきたい。

参考文献

(1) Sugita M, Iwataki Y, Nakano K, Numata O, Unique sequences and predicted functions of myosins in *Tetrahymena thermophila*., *Gene*. 2011 Jul 1;480(1-2):10-20.

(2) *Methods in cell biology* vol.109, Elsevier Inc

テトラヒメナの13種類の新奇ミオシン；MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つ

ミオシン 7 種類の GFP 結合タンパク質を用いた局在解析

弥益 聡志 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景及び目的

ミオシンは ATPase 活性を持つアクチン細胞骨格の分子モーターであり、筋収縮、細胞分裂、小胞輸送などの様々な細胞現象に関与している。繊毛虫の 1 種である *Tetrahymena thermophila* (Fig 1) はその全ゲノムが解読されており、培養・保存が簡単なうえ、遺伝子操作が可能な優れたモデル生物である。ミオシンはモータードメインによって分類されており、今までに約 30 のミオシンクラスが同定されているが、*T. thermophila* が持つ 13 種のミオシン(MYO1~MYO13)はどのミオシンクラスにも所属せず、その機能は未知である。

それらは尾部に存在するドメインより、RCC1 ドメインを持つ MYO3、MYO10、MYO11、MYO12、MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つ MYO1、MYO2、MYO4、MYO5、MYO6、MYO7、MYO8、MYO9、そして長い Coiled-coil ドメインを持つ MYO13 の 3 つのグループに分けられる。すでに MYO1 についてはその遺伝子破壊が試みられ、細胞増殖に必須な機能を待たないことが報告されている。私は MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つその他のミオシンについて局在解析に着手した。細胞内での局在を調べることが、その機能解明への足掛かりとなるだろう。

方法

・パーティクルガンを用いた GFP ミオシン遺伝子の導入

T. thermophila (B2086) を 30°C で前培養した。細胞を約 1.0×10^5 cells/ml まで培養し、10 mM Tris-HCl, pH 7.5 に置換し飢餓誘導をかけた。飢餓状態におくことで、細胞内の食胞などの構造が委縮し、大核内に遺伝子を導入する効率を高めるためである。その後、C 末に蛍光タンパク質 Enhanced GFP (以下 GFP と表記する) とパロモマイシン耐性の Neo4 カセットを結合させたミオシン遺伝子を、細胞にパーティクルガンで撃ち込んだ。細胞を液体培地内に入れ、カドミウム(終濃度 1 μ g/ml) を添加することで MTT1 プロモーターを発現誘導し、パロモマイシン(終濃度 100 μ g/ml) を添加して耐性を持つ細胞をセレクトした。

得られた遺伝子組み換え細胞株については、パロモマイシンの濃度を段階的に上げることによって、大核への導入率の高い細胞を選択した。*T. thermophila* の分裂において、大核の遺伝子はランダムに分配されるため、特定の遺伝子に偏りが生じる。この現象を利用して、パロモマイシン耐性遺伝子すなわち GFP を融合したミオシン遺伝子を大核内に多く持つ株を選択した。さらに、単一細胞選択(Single Cell Isolation)を行い、大核内のミオシン遺伝子を野生型から GFP 遺伝子融合型に全て置換するようにした。

・ミオシンの N 末にタグを結合させるためのベクター作製

カドミウムの添加により発現する MTT1 プロモーターの下流で、GFP または HA 結合ミオシンを強制的に発現する株を作製する目的で、pNeo4 ベクターに、T MTT1-EGFP、もしくは MTT1-HA を挿入したプラスミドを作製した。

結果と考察

7 つのミオシンのうち MYO2、MYO4、MYO5、MYO6、MYO7 は大核内の遺伝子を全て GFP 結合型に置換した株を作製することに成功した。残り 2 つに関しても同様な細胞株の作製を目指して実験中である。これらの内在性のプロモーターで GFP 結合ミオシンを発現する細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、はっきりとした局在性が観察出来なかった。これらのミオシンの発現量はあまり高くないか、あるいは C 末に GFP を導入したことで、正常な局在性が失われたのかもしれない。

そこで、GFP もしくは HA タグをミオシンの N 末に結合させ、カドミウム添加によって過剰発現する細胞の作製を計画した。そのための遺伝子導入用のベクターを作製し、観察を進める予定である。

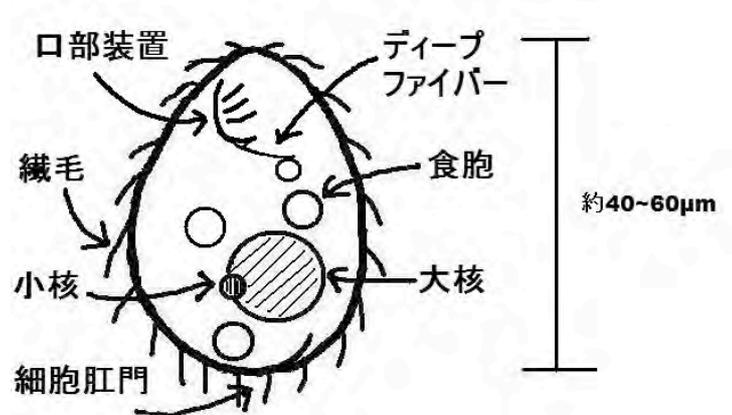


Figure 1: *T. thermophila* の模式図

T. thermophila は原生生物界、アルベオラータ門、繊毛虫亜門、貧膜口綱、膜口垂綱、ミズケムシ目に属する体長 40~60 μ m の単細胞真核生物で、細胞の表面に多数生えている繊毛を動かすことで水中を遊泳する。機能的にも構造的にも異なる二つの核、大核と小核を持つ。口部装置から物質を食胞へ取り込み、中身を消化しつつ細胞内を移動させ、最終的に細胞肛門から未消化物を排出する。ディープファイバーは食胞の形成に関わっていると考えられる。

核内を動く粒子の同定

三松 沙織 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

生物個体の設計図は、DNA の塩基配列として、核内のゲノムに蓄積されている。核における、遺伝情報の発現制御の仕組みは、*in vitro* の実験で解明された。近年、生きた細胞の核において、タンパク、DNA、RNA の動態を、直接探る研究が行われ、核は動的な構造だとわかり始めた。

核内構造は、クロマチン領域とクロマチン間領域の 2 つに分けられる。クロマチン領域では、遺伝子の発現状態に応じ、DNA が規則的構造をとる。クロマチン間領域では、タンパク質や RNA が、離合集散を繰り返して、様々な核内構造体を形成し、遺伝子発現を調節する。クロマチン間領域の核内構造体は、時間とともに変化するので、生きた細胞での研究が必要である。

産業技術総合研究所の加藤薫先生の研究室では、新しいタイプの位相差顕微鏡 (アポダイズド位相差顕微鏡) を用いて、核内を活発に動き回る未同定の核内粒子を発見し、解析してきた。先行研究により、この核内構造体は、細胞周期に依存して、数、運動活性が変化することがわかっていたが、構成タンパク質は不明で、未同定のままであった。

私は、細胞核の動態に興味を持ち、中野先生の研究室から、産総研に出向いて、未同定の核内粒子の同定を目指した。間接蛍光抗体法で蛍光染色し、同定に成功したので、報告する。

材料および方法

1. 細胞の培養

材料に、HeLa 細胞を用いた。細胞は DMEM 溶液で培養し、2-3 日おきに継代し、維持した。観察の際は、カバーガラス上に細胞を播種し、一晚培養後に、固定染色した。

2. 固定染色

高解像度観察のために、電子顕微鏡観察に近い条件で、固定した。ブロッキング処理し、一次抗体、二次抗体で染色した。染色後、退色防止剤が入った封入剤を用いて封入した。

3. 観察

共焦点顕微鏡とアポダイズド位相差顕微鏡で、同一細胞を観察した。共焦点顕微鏡は FV1000 (オリンパス社) を用いた。200 nm のステップで、z 軸方向にピント位置をずらし、3~12 枚の画像を、z 軸スタックとして取得した。アポダイズド位相差顕微鏡では、50 nm のステップでピント位置をずらし、40~50 枚の画像を、z 軸スタックとした。これらのスタック画像 (蛍光とアポダイズド位相差) を比較し、核内粒子の分子を同定した。撮影した画像は、コンピューター上で画像処理 (デコンボリューション処理) を施し、解像度を上げてから解析した。

結果

共焦点顕微鏡、アポダイズド位相差顕微鏡ともに、画像は光学的切片になった。光学的切片の厚さは、共焦点で約 1 μm 、アポダイズド位相差で 0.6-0.8 μm だった。共焦点で記録した、z 軸方向の核の中央部付近の断層像と、同じ z 軸位置のアポダイズド

位相差画像を、目視で探した。その上で、蛍光抗体法で染色された部位と、アポダイズド位相差の白い粒子が一致するか調べ、白い粒子の構成分子の同定を進めた。その結果、アポダイズド位相差顕微鏡で白く見える粒子の、構成分子を同定した (未発表のため、結果は口頭発表で述べる。核内粒子の蛍光染色画像も、口頭発表にて示す。)

この分子は、細胞の分裂増殖に、重要な役割を果たすことが知られている。その分子が核内で運動することは、想定されていたが、動きを直接とらえた人は、誰もいなかった。この研究は、初めて、この分子が核内で動くことを証明したものである。

考察

この研究では、核内での粒子の運動を直接観察し、粒子の構成成分のタンパク質を同定した。今まで、核内の粒子の運動は拡散による運動とされてきた。この結果は、核内の分子を蛍光ラベルし、FCS 等により、全体の蛍光強度を計測することにより、算出されたものである。ところが、今回同定した粒子は、方向性をもって運動している様に見えた。今後、この粒子の運動の仕組みについて解析を進めたい。

近年、光学顕微鏡による可視化技術は、長足の進歩を遂げ、低倍率の電子顕微鏡に近い 50 nm 以下の分解能が達成された (超解像)。このような新しい技術も学び、取り入れて、さらに解析を進めたいと考えている。

謝辞

顕微鏡観察は、産総研の加藤薫先生の研究室で行いました。指導してくださった、沼田治先生、中野賢太郎先生、加藤先生、研究室の方々にお礼申し上げます。

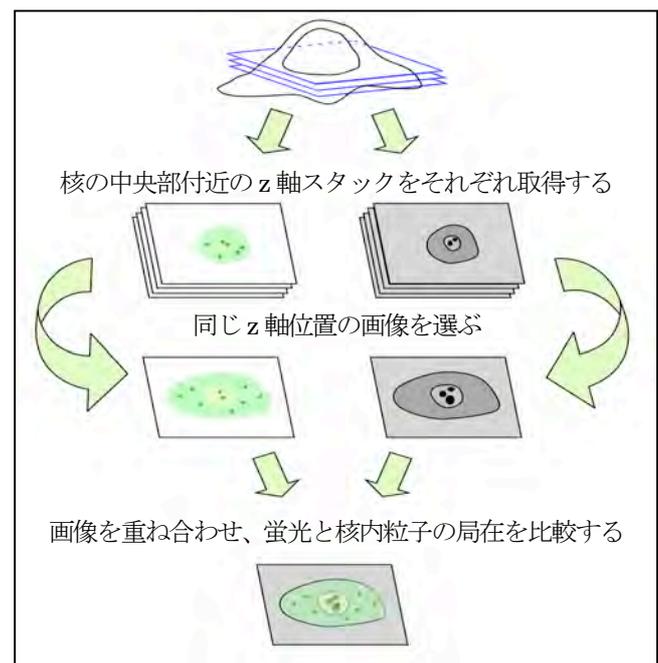


図: 共焦点像と位相差像の比較・同定の概要

ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析

新井 佑子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古久保・徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

統合失調症は人口の約1%に発症する精神疾患である。主な症状は妄想や幻覚などの陽性症状、意欲の減退や自発性の欠如などの陰性症状に分けられる。発症には環境的要因に加えて遺伝的要因が関与すると考えられるが、具体的メカニズムは未解明である。近年、患者家族の家系解析やヒトゲノムワイド遺伝子解析 (GWAS) の結果、リスク遺伝子が多数リストアップされている。なかでも、スコットランドの精神疾患を頻発する家系の調査から見つかった DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1) 遺伝子は卓越した影響力があるリスク遺伝子であり、*in vitro* の研究から多数のタンパク質と結合し、相互作用する事が示唆されている。

当研究室ではショウジョウバエをモデル生物として用い、DISC1 の機能を解析してきた。ショウジョウバエに DISC1 の相同遺伝子は存在しないが、DISC1 と相互作用して神経発生を調整する遺伝子はハエとヒトとで多くが保存されている。実際にショウジョウバエの中樞神経系に DISC1 を強制発現させると学習障害や睡眠異常といった、統合失調症陰性症状の基礎にある生物学的内在形質が誘起されるということが明らかにされてきた。

本研究では、神経回路シナプス形成における DISC1 遺伝子の機能を明らかにするために、ショウジョウバエの神経筋結合部 (NMJ) において DISC1 遺伝子を強制発現させ、様々な統合失調症リスク遺伝子との相互作用を探索した。ショウジョウバエの NMJ は脊椎動物中枢と同じグルタミン酸作動性であり、DISC1 の強制発現の結果シナプス面積が減少するということが明らかになっている。また、統合失調症リスク遺伝子の多くはショウジョウバエにも保存されていて、それらの変異体が利用可能である。そこで、ショウジョウバエ遺伝学を応用し、リスク候補遺伝子の変異体において DISC1 遺伝子を強制発現する幼虫を作成し、NMJ の形態変化を指標に DISC1 遺伝子と相互作用遺伝子をスクリーニングした。これにより、統合失調症の発症過程における多様なリスク遺伝子の作用メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。

材料および方法

NMJ での神経細胞画像解析

ショウジョウバエの幼虫の NMJ はシナプスの形態観察に最適である。リスク候補遺伝子の変異と DISC1 の発現の両方を持つ二重変異体を作成し、NMJ のシナプス面積を比較した。

1. 変異体のバランス化

- ♂(mutant)/(mutant) or (mutant)/(balancer)
- ♀w; Sp/CyO Act-GFP ; PrDr/TM6B Ubi-GFP
→♂w^h; +/CyO Act-GFP ; (mutant)/TM6B Ubi-GFP

2. 変異体と DISC1 の二重変異体の作成・採卵

- ♂w^h; +/CyO Act-GFP ; (mutant)/TM6B Ubi-GFP
- ♀w; UAS-DISC1(CS10)6-6(II) ; tubP-GAL4/TM6B ubi-GFP
→w/w or w^h; +/UAS-DISC1(CS10)6-6(II); (mutant)/tubP-GAL4

Control

- ♂w^h; +/CyO Act-GFP ; (mutant)/TM6B Ubi-GFP
- ♀w; +(CS10) ; tubP-GAL4/TM6B ubi-GFP
→w/w or w^h; +/(CS10) ; (mutant)/tubP-GAL4

3. 抗体染色

2 の採卵から 116-120 時間後の 3 齢幼虫を解剖し、NMJ をシナプス特異的な抗体で染色した。

4. NMJ の画像解析

3 のサンプルを共焦点顕微鏡で撮影した。画像解析には Image J を使用し、シナプス面積、シナプス数、軸索の分岐数を測定した。

結果および考察

2013 年 1 月の時点で、6 のリスク候補遺伝子についてのスクリーニングが終了した。

Table1; DISC1 effect against each mutant

Fly gene	Schizophrenia risk gene	Bouton area	No of boutons	Branch points	Category of modification
Wild type	-	Down	No change	No change	N.A.
Fmr1	FMR1	No change	Down	Down	Suppressor
CG9953	PRSS16	No change	No change	No change	Suppressor
Dorsocross	TBX6	No change	No change	No change	Suppressor
Ank2	ANK3	No change	No change	No change	Suppressor
CYFP	CYFP1	Up	No change	No change	Suppressor
5-HT2	HTR2A	Down	No change	No change	Neutral

今後の予定

さらに多くの遺伝子についてスクリーニングを重ねてリスク候補遺伝子のパターン分けをし、DISC1 と相互作用する因子を探す予定である。DISC1 と強力に相互作用するものが見つければさらに研究を進め、DISC1 の働きについて詳細に解析していく予定である。

ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析

池尻 光輔 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

統合失調症は、以前は精神分裂症と呼ばれていた精神疾患で、人口の約 1%が発症するといわれている。その症状として大きく陽性症状と陰性症状に分けられ、陽性症状には幻覚や妄想など、陰性症状には意欲低下や思考力の低下などがある。また、過去行われた一卵性双生児の研究によって、統合失調症の発病原因には遺伝的要因と環境要因の両方が関与していると考えられており、遺伝的要因について近年、患者を対象とした GWAS 等の調査により、多数のリスク遺伝子がリストアップされている。

有力な候補遺伝子の一つとして *DISC1*(*Disrupted in schizophrenia 1*)がある。*DISC1*はスコットランドの統合失調症を多発する家系の遺伝的解析により見つかった遺伝子であり、複数のタンパク質と結合し相互作用することが示唆されている。

当研究室ではヒト *DISC1*を強制発現させたショウジョウバエを用い、行動・形態の解析を行っている。ショウジョウバエはほぼ全てのゲノム塩基配列が解読されており、ヒトとの間にも多数の相同遺伝子を持つことが知られている。また過去の研究から、ショウジョウバエの脳で *DISC1*を発現させると記憶学習や行動の異常が現れるということが明らかにされてきた。ショウジョウバエの NMJ(Neuromuscular Junction)において *DISC1*を発現させると、シナプス面積が減少することが分かっている。本研究では、*DISC1*と相互作用するリスク遺伝子を特定することを目的とし、変異遺伝子と *DISC1*を同時に発現させたショウジョウバエにおいて、NMJの形態を観察・解析した。

材料・方法

1. ショウジョウバエの系統

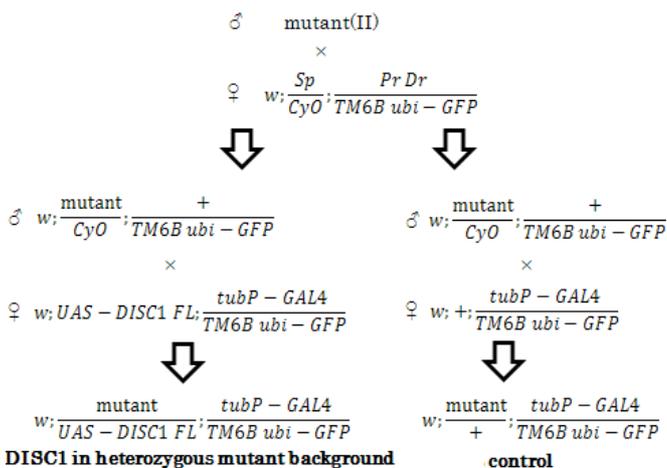


Figure 1: 候補遺伝子のヘテロ接合体において *DISC1* を発現させたショウジョウバエとそのコントロールを得るための掛け合わせ

CS10 バックグラウンドとなるように戻し交配した系統を用い、候補遺伝子のヘテロ接合体において *DISC1* を発現させたショウジョウバエを作成するための掛け合わせを行った (Fig.1)。

2. 抗体染色

採卵後 116-120 時間後の 3 齢幼虫から目的の genotype のものを選別し、PBS 中で解剖した。解剖したサンプルをパラホルムアルデヒド in PBS で固定し、以下の抗体を用い染色した。

1st antibody

Mouse anti-synaptotagmin	1:3
α-HRP FITC	1:50

2nd antibody

anti-mouse 633	1:50
----------------	------

3. 観察・解析

染色後のサンプルをスライドグラスにマウントし、共焦点レーザーสキャン顕微鏡で撮影した。撮影した写真を画像解析ソフトの Image J を使用し、シナプス領域の面積を計測した。

今後の展望

本研究ではリストアップされた候補遺伝子のうち、第二染色体上のものをいくつかスクリーニングした。第二染色体上の他の候補遺伝子だけでなく、第三染色体上の候補遺伝子についてもスクリーニングを進め、*DISC1* と相互作用する遺伝子を探す予定である。また、候補遺伝子と *DISC1* の相互作用について、シナプスの面積以外に影響がないか等を解析し、*DISC1* タンパク質の機能について探っていく予定である。

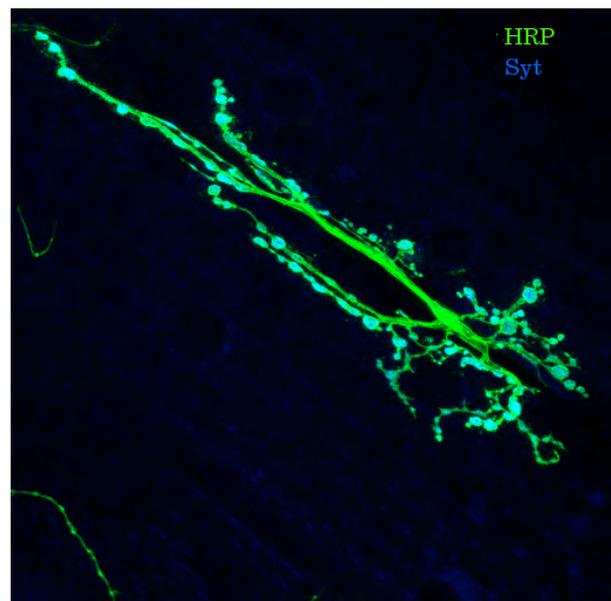


Figure 2: 共焦点レーザー스キャン顕微鏡によるショウジョウバエ幼虫 NMJ の撮影画像

光及び熱遺伝学によるショウジョウバエ幼虫学習パラダイムの開発

本多 隆利 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

目的・背景

学習・記憶といった高次行動がいかなる神経回路に基づき制御されているか解明することは、神経科学における重要な課題である。光遺伝学 (Optogenetics) は、分子遺伝学的手法により、光で特定のニューロンの活動を操作可能にした革新的技術である。光遺伝学では、青色光に反応するイオンチャネル (ChR2) を、熱遺伝学では、温度依存性イオンチャネル (dTrpA1) を特定のニューロンで発現させることで、可逆的に標的ニューロンを興奮させることができる。本研究では、上記の両技術を駆使した行動実験系の開発を行い、ショウジョウバエの学習に関わる神経回路基盤を明らかにすることを目的とする。ショウジョウバエ幼虫の脳における神経回路は、成虫のものに比べ、その数的規模の小ささと重複性の少なさから、学習・記憶行動を裏打ちする機能的神経回路を探るうえで有効である。嗅覚連合学習においては、報酬記憶の形成にはオクトパミン神経の出力が必要で、そのシグナルはキノコ体で嗅覚情報と統合されて記憶が定着する。また、嗅覚受容体 (Or) の全容が明らかとなり、各々がどの匂いに反応するか分かっている。従って、餌刺激の代わりにオクトパミン神経を興奮させ、匂い刺激の代わりに Or ニューロンを興奮させることで、光や熱といった物理的な刺激のみで記憶を定着させることができるかと期待される (図1)。上記2種類の神経を光及び熱刺激で操作可能にした幼虫を用い、新たな学習パラダイムの開発を行う。

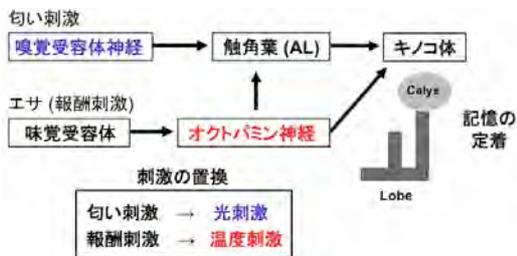


図1: 嗅覚連合学習の神経回路と新たな学習パラダイムの構築

材料・方法

匂い刺激を青色光の刺激に置換するために、Or 遺伝子のプロモーター下で ChR2 を発現させた系統 Or-ChR2 を作成した。Or の種類は、幼虫が学習できる匂いに反応するもの (Or82a, Or42b, Or47a, Or24a) と全ての Or ニューロンで発現するもの (Or83b) を用いた。一方、餌刺激を温度刺激に置換するべく、オクトパミン神経で特異的に発現する TDC2 遺伝子のプロモーター下で dTrpA1 を発現させた系統 TDC2-dTrpA1 を作成した。かけ合わせにより、TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 両方をもつ系統を作成した。3 齢前半 (産卵後 72-76 時間) の幼虫を用い、RI (Response Index) を反応の指標として以下の通り算出した。

$$RI = (N_x - N_y) / (N_x + N_y)$$

N_x : 刺激下 (白色光、青色光、高い温度) にいる幼虫数

N_y : 非刺激下 (無光、赤色光、低い温度) にいる幼虫数

I. 走光性試験

A. 白色光に対する走光性試験

作成した幼虫が光に対して正常な負の走性を示すか調べた。面積の半分に白色光を当てた実験プレートを用意し、中心に数十匹の幼虫を放ち、3分後にRIを測定し系統間で比較した。

B. 青色光に対する走光性試験

導入したChR2が機能しているか調べた。面積の半分に青色光を、もう半分に赤色光をあてた実験プレートを用意し、中心に数十匹の幼虫を放ち、1分後にRIを測定し系統間で比較した。

II. 温度走性試験

導入したdTrpA1が機能しているか調べた。実験プレートを部分的にホットプレートに乗せ、約22°C~28°Cの温度勾配をつくり、中心に数十匹の幼虫を放ち、3分後にRIを測定し系統間で比較した。

III. 連合学習テスト

TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 両方をもつ幼虫において学習が成立するか解析した。青色光及び熱刺激を同時に経験させ、条件付けをした場合 (trained 群) と、青色光や熱刺激のみを独立に経験させた場合で、経験後の青色光に対する RI を測定した。もし学習が成立すれば、trained 群の方がより青色光による傾向を示す。

結果・考察

I. A. コントロールを含めた全ての系統間で RI 値に有意差はなかった。作成した幼虫は白色光に対して正常な反応を示している。B. 全ての Or-ChR2 をもつ幼虫はコントロールに比べ、有意に青色光の方へよる傾向を示した。この結果から、導入した ChR2 は正常に機能していることが確かめられた (図2a)。

II. 全てのTDC2-dTrpA1をもつ幼虫はコントロールに比べ、有意に高温側へ寄る傾向を示した。この結果から、導入したdTrpA1は正常に機能していることが確かめられた (図2b)。

III. 発表時に示す。今後は、学習が成立した系統に対し、摘出した脳の神経回路をCa²⁺ imagingにより可視化し、顕微鏡下で温度と光で記憶を定着させ、学習に関わる機能的神経回路を解析する。

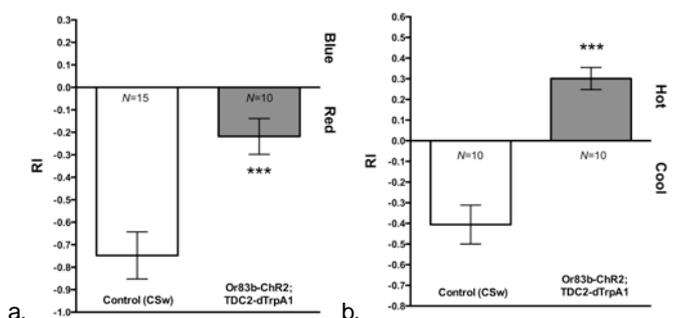


図2: Or-ChR2 と TDC2-dTrpA1 両方をもつ幼虫の RI 値 (N=10~15)

a. 光走性試験, b. 温度走性試験 (1 試行につき 50~70 匹, $P^{***} < 0.001$)

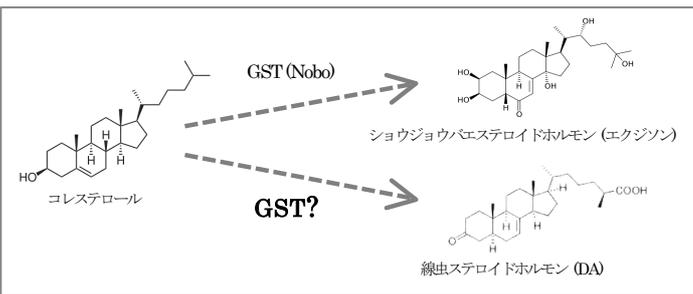
線虫 *C. elegans* の発生タイミングと寿命に関与する新規遺伝子の解析

恩田 美紀 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ステロイドホルモンは、我々ヒトを含む多くの生物にとって、恒常性の維持、代謝調節、発生や分化といった様々な局面で重要な役割を担う。ステロイドホルモンの産生や代謝の異常は、ヒトの疾患にも密接に関連し、その調節機構を理解することは、基礎生物学のみならず医学の面からも重要である。

所属研究室の塩谷・丹羽らは、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いた研究から、ステロイドホルモン合成に必須の役割を果たすグルタチオン S-転移酵素 (GST) *noppera-bo* (*nobo*) を同定した^[1]。 *nobo* は、昆虫ステロイドホルモンであるエクジソンの合成の原材料となるコレステロールを細胞内への取り込む、あるいは輸送する際に働く遺伝子として同定された。一方、過去10年間の研究から、ステロイドホルモン合成には動物界を通じて保存された酵素ファミリーが関与していることが明らかになってきている。ヒトにおいては、GST A3-3 が *Nobo* と同様にステロイドホルモン合成に関与することがわかっている^[2]。このことから、GST ファミリーに属する遺伝子は動物界を通じてステロイドホルモン合成に関わる可能性が考えられた。この可能性を検証する目的で私は、線虫 *Caenorhabditis elegans* を研究対象として、線虫ステロイドホルモンであるダファクロン酸 (Dafachronic acid, DA) の合成経路にも GST が機能するのかを追究した。線虫ゲノムには47種の GST 遺伝子が見つまっている。しかし、昆虫 *Nobo* や哺乳類 GSTA3-3 と真にオーソログな分子は予測されておらず、線虫のいずれかの GST が DA 合成経路で機能するかどうかは未だ確認されていない。そこで、追究の第1歩として私は、DA 依存的な線虫寿命の調節に影響を与える GST 遺伝子のスクリーニングを行い、DA 合成経路に関与する GST の同定を目指した。



スクリーニングに用いた線虫 *glp-1(ts)* は、温度感受性変異体であり、制限温度下で生殖腺が正常に発生できない系統である。生殖腺の発達しない *glp-1(ts)* 突然変異株の寿命は、野生型と比べて約60%長いことが知られている^[3]。つまり、線虫の寿命は生殖腺の発生と密接に関わっている。更に多くの先行研究から、DA 合成酵素をコードする *daf-9* 遺伝子や *daf-36* 遺伝子の機能を落とすと、生殖腺を失ったことによる寿命延伸の現象は打ち消されてしまうという結果も得られている^[4,5]。また、*glp-1(ts);daf-9* や *glp-1(ts);daf-36* の二重変異体に DA を与えると、寿命延伸の回復が見られる。以上の結果から、DA は生殖腺がない状況下で成虫の寿命延伸に必須である。

こうした事実から、GST が DA 合成経路に関与するならば、GST の機能を落とした際に *glp-1(ts)* の寿命延伸が抑制されることが予想される。この原理に従って、以下の方法で実験を行った。

材料・方法

(1) RNAi 処理

RNAi の誘導には、線虫実験で広く用いられているフィーディング RNAi 法を利用した^[6]。本研究では、RNAi のターゲット遺伝子として、*gst-5*, *gst-16*, *gst-28*, *gst-29*, *gst-37*, *gst-32*, *gst-41*, *gst-42*, *gst-43*, Y53G8B.1, F56A5.4 の11種に着目した。この11種の遺伝子は、BLAST 検索をした際に哺乳類 GSTA3-3 とタンパク質の1次配列の類似性が高かったものである。これらの GST 遺伝子をターゲットにするための二重鎖 RNA 発現用プラスミドは、本学 TARA センターの深水昭吉教授から分与いただいた。二重鎖 RNA を発現させるための大腸菌株として HT115 を用いた。

(2) 寿命測定

glp-1(ts) は本学 TARA センター深水研究室より分与いただいた。線虫を同調処理した後、大腸菌 OP-50 をまいた寒天培地 (NGM) プレート上で、制限温度である 25°C で 36 時間飼育し、生殖腺発達を抑制した4齢幼虫 (L4) を得た。その後、20°C で 15 時間飼育し、成虫にした。HT115 をまいたプレートに成虫を移し、20°C で飼育、2 日おきに生存数をカウントした。この際、陰門から内臓が飛び出してしまう個体や、プレートの側面に上り乾燥して死亡した線虫はカウントに含めないこととした。実験のコントロールとして、空ベクター (L4440) 発現大腸菌および *daf-9* RNAi 発現大腸菌を与えた際の寿命を測定した。

結果と考察

まず私は、*glp-1(ts)* 突然変異株を用いた網羅的 RNAi のための実験系を確立した。すなわち、*daf-9* 遺伝子に対する RNAi をポジティブコントロールとして、種々の飼育条件を最適化することに成功した。この見出した条件を元に、11種の GST 遺伝子 (上述) それぞれに対する RNAi を誘導した *glp-1(ts)* 突然変異株の寿命を検討中である。

ステロイドホルモンは、多くの生物に共通して存在する必須分子である。本研究を通じて、ステロイドホルモンの合成経路に関わる遺伝子の進化的共通性を明らかにすることができれば、生物発生の根本原理への理解につながるものと期待できる。

参考文献

- [1] 塩谷 (2011) 修士論文
- [2] Johansson et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 33061-33065
- [3] Arantes-Oliveira et al. (2002) *Science* 295: 502-505
- [4] Gerisch et al. (2001) *Dev. Cell* 1: 841-851
- [5] Rottiers et al. (2006) *Dev. Cell* 10: 473-482
- [6] Kamath et al. (2003) *Nature* 421: 231-237

昆虫ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の発現に関わる

新規 Zinc フィンガータンパク質の機能解析

小村 達也 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

多細胞生物の発生や成長は、受精卵として始まり、生殖能力を持つ成体へと発育を遂げる。そうした時間軸に沿った成長過程には幾つものステップが設けられている。例として完全変態を行う昆虫に着目すると、幼虫は成長過程の中で特定時期に特定回数の脱皮を行い、特定時期に蛹になり、特定時期に羽化をすることで成虫となる。本研究ではキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*; 以下、ショウジョウバエ) を用いて、時間軸における発生制御機構の解明を目的とした。昆虫の脱皮や変態は、ステロイドホルモンの一つである「エクジステロイド」によって厳密に制御されている。幼虫期において、エクジステロイドは「前胸腺」という内分泌器官において、食物中のコレステロールから特異的な中間基質を経て合成される (図 1)。しかし、前胸腺内でどのような分子がエクジステロイド合成を調節するのかについては、未解明な点が多く残されている。

(独) 農業生物資源研究所の篠田氏らが行ったマイクロアレイ解析により、他の組織に対して前胸腺での発現量が高い遺伝子が取り上げられた。さらに、所属研究室の丹羽が、篠田氏の解析で見出された遺伝子群を対象とした RNAi スクリーニングを実施し、脱皮と変態の制御に関わる複数の候補遺伝子を見出した。本研究では、丹羽の RNAi スクリーニングで得られた遺伝子の 1 つであり、一部の昆虫のみに存在する新規 Zinc フィンガータンパク質 (以下、本文中では「Zfptk」とする) に着目した。そして、Zfptk がエクジステロイド合成に関与することを検証するため、zfpk の前胸腺での発現、前胸腺で zfpk を RNAi 誘導した個体における発生タイミングに関する表現型、そして RNAi 誘導個体でのエクジステロイド合成遺伝子の発現量を解析した。

方法

・発現解析: 野生型の 3 齢幼虫を用い、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学法により zfpk の前胸腺での発現を検証した。また定量逆転写 PCR により、他の組織に対する前胸腺での発現比を検討した。

・RNAi 解析: RNAi 法は、標的遺伝子に対応する二本鎖 RNA (dsRNA) を用いて標的遺伝子の mRNA を分解し、機能低下を引き起こす技術である。本研究では、zfpk に対応する dsRNA をコードする系統と dsRNA の発現を誘導する系統とを交配することで、zfpk の RNAi を誘導した個体を作製した。

結果

in situ ハイブリダイゼーション法および定量逆転写 PCR 法を用いた発現解析の結果より、幼虫期において、zfpk は前胸腺で特異的に発現していることを明らかにした。

zfpk を RNAi 誘導した個体は、2 齢幼虫で致死となる表現型を示した。2 齢の RNAi 個体から RNA を抽出し、定量逆転写 PCR によってエクジステロイド合成酵素遺伝子の発現量を検

証したところ、エクジステロイド合成中間体の 7-デヒドロコレステロール (7-dC) から 5β-ケトジオール (5β-kd) への変換ステップで機能する spookier (spok) (Ono et al., 2006) の発現量だけが低下していた。同様に、免疫組織化学法を用いた実験から、RNAi 個体の前胸腺では Spok タンパク質の量が大きく低下していた。zfpk の RNAi による致死性は、活性型エクジステロイド (20-デヒドロエクジソン) もしくは 5β-kd を摂取させた場合に回復したが、7-dC を摂取させた場合は回復しなかった。

考察

一連の実験より、zfpk がエクジステロイド合成酵素遺伝子の 1 つである spok に特異的な発現制御を担うことが示唆された (図 1)。一般的に、Zinc フィンガーモチーフを持つタンパク質は、特異的な配列の DNA あるいは RNA に結合し、転写制御因子や転写後調節因子として機能する。従って、zfpk は Zinc フィンガーを介して spok の上流配列に結合して転写制御、あるいは spok の mRNA に結合して mRNA の安定性に寄与すると予想される。一方、spok の発現調節に関わるタンパク質としては既に Molting defective (Mld) の存在が知られている (Neubueser et al., 2005)。よって、Zfptk が Mld と相互作用して spok の発現を制御している可能性も考えられる。

zfpk は、前胸腺のみで発現し、かつ発現制御に関わることが予想される遺伝子として初めての事例であり、前胸腺をエクジステロイド合成器官として特徴づける機能をもつと期待される。さらに、エクジステロイド合成酵素が昆虫種で広く保存されている一方で、zfpk は一部の昆虫種にのみ存在する。このことから、昆虫の様々な種が環境などに応じて、発生を制御するメカニズムを独自に進化させてきた可能性が考えられる。

引用文献

Ono et.al (2006), Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera, *Dev. Biol.* **298**, 555-570

Neubueser et al. (2005), molting defective is required for ecdysone biosynthesis, *Dev. Biol.* **280**, 362-372

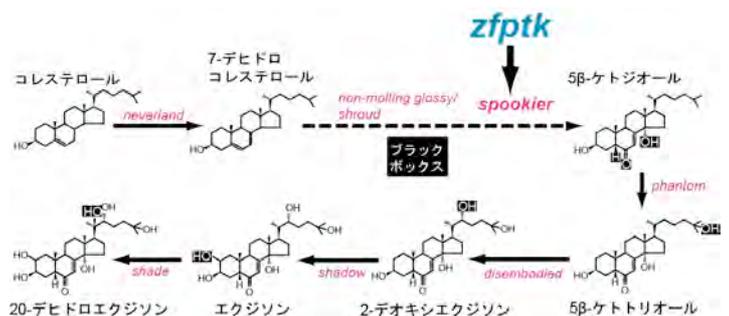


図 1. エクジステロイド合成経路と zfpk

ショウジョウバエ成虫におけるステロイドホルモンの役割の解明

天久 朝恒 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

ステロイドホルモンは、哺乳類を含む幅広い生物の生理機能を調節する生理活性物質であり、ヒトの性成熟や、昆虫の脱皮変態、植物体の伸長などの制御において重要な役割をもっている。よって、ステロイドホルモンの生体内での機能的意義の詳細を明らかにすることは、個体の発生や生理機能を分子レベルで理解する上で重要な課題であると古くから考えられてきた。

私の所属する研究室では、個体レベルで遺伝子の機能の解析に極めて優れたモデル生物であるキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ)を用いたステロイドホルモン研究を行っている。昆虫における主要なステロイドホルモンであるエクジステロイドは、発生過程における脱皮と変態の誘導に必須の役割を持つ [1]。その一方で、エクジステロイドは変態後の成虫においても生合成され、卵形成や学習記憶の制御、さらには睡眠の制御などの様々な生理機能の制御を担う [2,3]。この10年間に、エクジステロイド生合成に関わる主要な酵素が多く同定され、その発生過程における意義が詳しく解明された [4]。しかし、成虫においては未だにエクジステロイド生合成の部位すら包括的には把握されておらず、またエクジステロイド生合成酵素の成虫における機能解析も未だほとんど進んでいない。

そこで私は、ショウジョウバエ成虫を研究対象として、エクジステロイド生合成酵素群の発現および機能の解析を目的として研究を行った。

材料と方法

・発現解析

エクジステロイド生合成遺伝子群の時空間的発現パターンを調べるために、成虫の卵巣を用いて逆転写定量PCRおよび *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

・遺伝子発現阻害および中間基質による致死性のレスキュー

エクジステロイド生合成酵素の1つ *neverland* の機能 (図1) をトランスジェニック RNAi 法を用いて低下させた。*neverland* 機能低下個体の幼虫期における致死性を避けるために、幼虫期においてエクジステロイド生合成の中間基質である7-デヒドロコレステロールを摂取させることにより成虫まで生育させた [5]。

・ *neverland* 機能低下成虫の表現型解析

上述の *neverland* 機能低下成虫を用いて、成虫雌の産卵数および寿命の測定を行った。

結果

定量的逆転写PCRおよび *in situ* ハイブリダイゼーションによって、成虫卵巣におけるエクジステロイド生合成遺伝子群の時空間的発現の変化を明らかにした。多くのエクジステロイド生

合成遺伝子は、卵巣の濾胞細胞において発現し、羽化後初期に発現のピークを迎えていた。さらに、成虫におけるエクジステロイド生合成の役割を調べるために、エクジステロイド生合成酵素の1つである *neverland* の機能を低下させた成虫個体を作成する方法を確立した。この *neverland* 機能低下成虫を用いて解析を行なったところ、雌個体において、産卵数 (図2) および寿命の減少が観測された。産卵数については、機能低下成虫への7-デヒドロコレステロールの投与により表現型の回復がした。

考察

発現解析の結果から、成虫卵巣において、羽化後初期の濾胞細胞においてエクジステロイドが生合成されていることが示唆された。卵巣において合成されたエクジステロイドが、どの組織に働きかけ機能しているかは、今後調べていく必要がある。

neverland 機能低下個体の機能解析から、成虫のエクジステロイドの生合成が産卵数および寿命を制御していることが示唆された。さらに、エクジステロイド生合成不全の成虫の寿命および産卵数の低下が、どのような分子メカニズムでおこっているかを調べるために、細胞レベルの詳細な表現型解析に移行していく。このような解析によりショウジョウバエ成虫におけるエクジステロイド生合成の役割を明らかにしていくことができれば、昆虫のみならず、幅広い生物に進化的に保存されてきたステロイドホルモンによる生理機能の制御機構の解明につながるであろう。

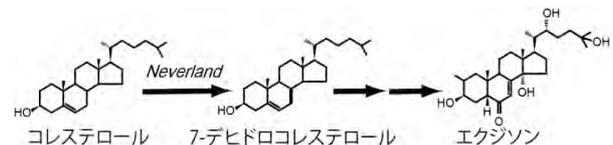


図1. *Neverland* の機能: *Neverland* は、コレステロールから7-デヒドロコレステロールへの変換に機能している。

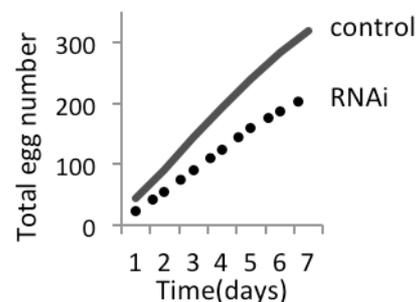


図2. *neverland* 機能低下成虫における産卵数: *neverland* の機能を低下させた雌の成虫では、産卵数の減少がみられた。

文献

1. Spindler *et al.* (2009) *Cell Mol Life Sci* 66: 3837-3850.
2. Morris and Spradling (2012) *PLoS One* 7: e46109
3. Ishimoto and Kitamoto (2011) *Fly* 5: 1-6
4. Huang and Gilbert (2008) *J. Genet. Genomics* 35: 1-10
5. Yoshiyama *et al.* (2006) *Development* 133: 2565-2574

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における増殖期特異的走化性関連遺伝子候補の逆遺伝学的解析

住友 洋平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 桑山 秀一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壤中に生息する真核単細胞生物であり、バクテリアを捕食しながら単純分裂して無性生殖的に増殖する。粘菌細胞はバクテリアを食べ尽くし飢餓状態に陥ると細胞外へcAMPを分泌し始める。このcAMPは粘菌細胞の細胞膜表面に存在するGタンパク質共役受容体と結合することにより、ヘテロ三量体GタンパクであるGαβγ三量体がGαとGβγへ分離し細胞内へシグナルが伝達される。このシグナルによって、仮足前末端におけるアクチン繊維の重合による仮足の伸展や細胞後部におけるミオシンの活性化による細胞後部の収縮などが促され、細胞はcAMP分泌細胞へと走化性運動し集合する。その後集合した細胞は子実体を形成する。増殖期の粘菌細胞では、バクテリアから分泌される葉酸に走化性応答する。この時細胞内ではGα4が必要であることがわかっているが長年の研究にもかかわらず葉酸受容体を含むその全容は明らかにされていない。

所属研究室の先行研究において、酵母ツーハイブリッド法によりGα4と直接相互作用するタンパク質の候補が選別されていた。今回卒業研究として、その候補の中からGタンパク質共役受容体であると予想される遺伝子の*grlP* (metabotropic Glutamate Receptor Like protein)、およびRasGEFであると予想される*gefX* (Guanine nucleotide Exchange Factor)を選抜し、それらの遺伝子破壊株を作製して表現型の変化を観察した。

方法・結果

1. *grlP*および*gefX*遺伝子破壊株の作製

まず*D. discoideum*の標準株であるAX2株から調整されたゲノムDNAから目的遺伝子を含む領域をPCRにより増幅した。得られたDNA断片の5'末端と3'末端の約1.5 kbpの配列をPCRで増幅し、別にPCRで増幅したブラストサイジン耐性(BSR)カセットをFusion PCR法によってDNA断片の5'末端配列と3'末端配列に結合させ遺伝子破壊コンストラクトを作製した。このコンストラクトを電気穿孔法によってAX2株に導入し形質転換体を得た。遺伝子破壊株の選抜をPCR法によって行い*gefX*株を1クローン、*grlP*株を3クローン取得した。

2. 葉酸走化性アッセイ

遺伝子破壊株の葉酸への応答性を調べるため葉酸走化性アッセイを行った。リン酸バッファーに懸濁した粘菌細胞と葉酸水溶液を無栄養疎水寒天平板上に隣接し、一定時間後に粘菌細胞ドロップのうち葉酸ドロップ側に細胞が局在するものの割合を定量化した。粘菌細胞ドロップと葉酸水溶液の間隔は0.5 mm以下になるように調整した。その結果*grlP*株ではAX2株と同様の応答を示したが、*gefX*株では高濃度(1*10⁻²M)の葉酸に曝露された場合にAX2株に比べて走化性が低下した(Fig. 1)。

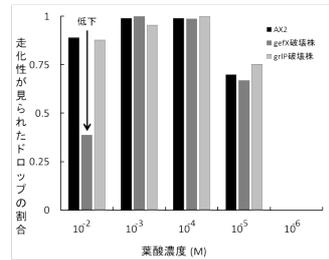


Fig. 1 葉酸に対する走化性アッセイの結果

3. 遺伝子破壊株細胞の増殖期における運動性の確認
遺伝子破壊株細胞が増殖期にAX2株と異なる運動性を示していないかどうか2時間のタイムラプス動画を録って確認したが、AX2株との違いは認められなかった。
4. 遺伝子破壊株の発生の確認
遺伝子破壊が飢餓状態後の多細胞体形成に影響する可能性があるため子実体形成を観察したが、どちらの遺伝子破壊株においてもAX2株との違いは観察されなかった。さらに細胞密度の変化による影響も調べた。*grlP*株ではAX2株に比べて発生開始後28時間での子実体の柄が長く、また子実体が柄の根本から倒れているものも多く見られた。またAX2株では細胞の集合が完了しマウンドを形成するまでに12時間必要であるのに対し、*gefX*株では17時間ほど必要であり、その結果子実体形成に必要な時間がAX2株よりも8時間ほど長かった。

考察・今後の展望

*grlP*株では葉酸に対する走化性能が低下していなかった。つまり、葉酸に対する受容体ではないことが示唆された。その理由として、酵母ツーハイブリッド法で用いたGα4は増殖期だけでなく発生期においても機能するタンパク質であるため、発生期で働く受容体を選んでしまったことが挙げられる。また*gefX*株では高濃度の葉酸に対する走化性が弱くなっていたが、これはRasに結合したGDPをGTPに交換できないため一度不活性化されたRasを再活性化できず、粘菌細胞ドロップ内の細胞が葉酸ドロップ側へ局在する前に方向性を持った運動が止まる可能性、または細胞外葉酸分解酵素の活性が下がっている可能性などが考えられる。

Gα5株でも葉酸に対する走化性に異常が見られることが知られているため、今後はGα5を用いた酵母ツーハイブリッド法により候補遺伝子をスクリーニングすると共に、粘菌細胞で発現する7回膜貫通タンパク質の中で増殖期に発現しているものを選び出し、葉酸受容体の候補になるものが無いか検討したい。また、*gefX*株では詳細なタイムラプス動画の撮影による葉酸刺激後の運動性の観察および細胞外葉酸分解酵素の活性の測定により上記の仮説が正しいかを確認したい。