



生物学類

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.14 No.1 January 2015
www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

平成 26 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 27 年 2 月 14 日

筑波大学
生物学類

第一会場 2C410 教室

8:55 – 9:10	秋本 享大	緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の交配型プラス配偶子における受精管の空間配置に関する研究	2
9:10 – 9:25	渡辺 ありさ	クロララクニオン藻におけるオルガネラ DNA 複製酵素の起源と輸送シグナル解析	3
9:25 – 9:40	南波 紀昭	キセルガイの殻上に着生する藻類の分類学的研究	4
9:40 – 9:55	有藤 惇	外来種ムラサキツメクサに訪花する在来マルハナバチ類の採餌行動	5
10:10 – 10:25	高谷 優那	セスジアカムカデ <i>Scolopocryptops rubiginosus</i> における歩脚の自切構造と強度	6
10:25 – 10:40	柴田 愛実	日本未記録動物門 顎口動物 Gnathostomulida の発見	7
10:40 – 10:55	千頭 康彦	ヤマトタマヤスデ <i>Hyleoglomeris japonica</i> における濾胞上皮の形態学的研究	8
10:55 – 11:10	赤坂 萌美	生き方は、変えられる！～ヒトデにおける非採餌型幼生の進化～	9
11:10 – 11:25	三木 智博	アコヤガイ <i>Pinctada fucata</i> 初期発生における Wnt シグナルの役割	10
12:15 – 12:30	小嶋 一輝	始原亜目甲虫ナガヒラタムシ <i>Tenomerga mucida</i> (Chevrolat, 1829) の発生学的研究	11
12:30 – 12:45	武藤 将道	カワゲラ目 (昆虫綱) の比較発生学的研究	12
12:45 – 13:00	小黒 和也	土壌攪乱と刈取りが半自然草原の低茎草本多様性に与える影響	13
13:00 – 13:15	長澤 亮	斜面土砂移動地における地中生節足動物相の解明	14
13:15 – 13:30	南條 智美	森林と草原における埋土種子相評価方法の検討	15
13:45 – 14:00	藤巻 素直	自動開閉システムを用いた森林における土壌呼吸速度の時間的変動と変動要因の解析	16
14:00 – 14:15	島田 佑允	長野県ブナ成熟林における更新の手がかり ―ブナ実生と光環境に着目して―	17
14:15 – 14:30	沖 隆宏	静岡県下田市鍋田湾に来遊する死滅回遊魚の生息地選択	18
14:30 – 14:45	小玉 将史	造巣性ヨコエビ <i>Cephaloecetes</i> 属の未記載種についての報告	19
14:45 – 15:00	徳重 江美	砂に潜れば碧くなる？―スガイの潜行とカイゴロモの着生―	20
15:15 – 15:30	大野 真由美	PARAFAC による外洋表層における蛍光性溶存態有機物の動態評価	21
15:30 – 15:45	岡崎 拓未	静岡県下田沖における植物プランクトン群集の季節変動とその物質循環への影響の評価	22
15:45 – 16:00	古川 萌実	海洋酸性化に対する植物プランクトンの応答とその生物ポンプへの影響	23
16:00 – 16:15	木村 浩之	海洋酸性化に対するバクテリアの応答に関する実験的研究	24

第二会場 2C404 教室

8:55 – 9:10	平井 智浩	細胞内輸送を制御するマラリア原虫特異的 Rab5b 結合タンパク質の探索	25
9:10 – 9:25	井上 貴史	微好気性鞭毛虫 (<i>Dysnectes brevis</i>) と単一のバクテリアとの二者培養系の確立	26
9:25 – 9:40	川野 哲郎	赤痢アメーバの病原性に関与する Rab11B エフェクタータンパク質の同定	27
9:40 – 9:55	勝俣 花菜	細胞集団運動におけるソリトン波関連遺伝子の探索	28
10:10 – 10:25	青木 祐樹	マウスにおける紅茶高分子ポリフェノールの筋萎縮抑制効果の検討	29
10:25 – 10:40	赤澤 大樹	繊毛虫 <i>Tetrahymena thermophila</i> の新奇アクチン Act2 の機能解析	30
10:40 – 10:55	牛島 倫太郎	繊毛虫 <i>Tetrahymena thermophila</i> のアクチン結合タンパク質 p85 と fimbrin の機能解析	31
10:55 – 11:10	薄 啓子	繊毛虫テトラヒメナ <i>Tetrahymena thermophila</i> のアクチン細胞骨格制御因子 <i>Tt</i> CRN1 の機能解析	32
11:10 – 11:25	藤戸 洸太	繊毛虫テトラヒメナの新奇アクチンアイソフォームの細胞機能の解析	33
12:15 – 12:30	森田 陸離	分裂酵母の細胞質分裂におけるアクチン束化タンパク質の機能	34
12:30 – 12:45	湯本 天嗣	出芽酵母を用いたアクチン変異体のサプレッサー解析	35
12:45 – 13:00	鈴木 啓介	ゾウリムシの遊泳行動に対する外部電場の効果	36
13:00 – 13:15	福井 大智	ゾウリムシの化学刺激応答性に対する温度と光条件の効果	37
13:15 – 13:30	山田 理瑛	ゾウリムシの生理活性に対する外液の化学環境の効果	38
13:45 – 14:00	石上 佳奈	ニトリル前駆体アナログの微生物分解	39
14:00 – 14:15	小澤 剛史	植物由来生理活性物質の微生物による代謝	40
14:15 – 14:30	李 冬瑤	微生物による多環化合物の分解に関する研究	41
14:30 – 14:45	勝山 真帆	新規酵素のスクリーニング研究	42
14:45 – 15:00	寺下 柚子	微生物による芳香環化合物の分解に関する研究	43
15:15 – 15:30	室本 亮介	生理活性物質代謝微生物の探索	44
15:30 – 15:45	加藤 吉祥	ATP とグルコースは線虫の寿命を制御する	45
15:45 – 16:00	川木 純平	線虫のストレス耐性に対するウバ茶抽出物の生理機能解析	46
16:00 – 16:15	佐々木 寛瑛	線虫のストレス耐性に対する納豆抽出物の生理作用解析	47

第三会場 2C102 教室

8:55 – 9:10	古野 晴香	スギ花粉症治療に向けたアレルゲンの生産	48
9:10 – 9:25	本田 光明	アサガオの光周性花成及び形態形成に関わる遺伝子の研究	49
9:25 – 9:40	Sakkrapong Wannawattana	VLP 形質転換トマトを用いた経口インフルエンザワクチンの開発	50
9:40 – 9:55	中村 匠汰	<i>SeFLA</i> 遺伝子を導入した耐塩性ジャガイモの開発	51
10:10 – 10:25	清永 郁香	イネの発達過程におけるペクチンアラビノース側鎖合成酵素 OsARAD1 に関する研究	52
10:25 – 10:40	宮地 桃子	トマト果実軟化過程におけるカルシウム欠乏の細胞壁再編成への影響	53
10:40 – 10:55	渡辺 朝美	イネの発達過程における細胞壁構造タンパク質 THRGP に関する研究	54
10:55 – 11:10	小山 初音	シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程におけるマトリクスメタロプロテアーゼの作用機構に関する研究	55
11:10 – 11:25	鈴木 陽佳	環境要因がポプラの根の成長や糖関連遺伝子の発現に与える影響	56
12:15 – 12:30	Niti Wattanasiri- chaigoon	Dawn of Migrants: Heat Requirements of the Flight Forms in <i>Callosobruchus maculatus</i>	57
12:30 – 12:45	戸嶋 知春	だめよ～、壁、壁！：ヨツモンマメゾウムシの幼虫は方言をしゃべるか？	58
12:45 – 13:00	進藤 雅史	塩化物イオンが <i>Aurantiochytrium</i> 18W-13a 株の生育に及ぼす影響の解析	59
13:00 – 13:15	藤原 直倫	オーランチオキトリウムのメバロン酸経路を律速する HMG-CoA 還元酵素の解析	60
13:15 – 13:30	戸来 駿介	シアノバクテリアのグリコーゲン合成酵素の欠失が炭素代謝におよぼす影響	61
13:45 – 14:00	田村 拓海	真核生物誕生仮説としての3菌栄養共生モデル	62
14:00 – 14:15	瀧 ゆきな	ミモシンによる植物の細胞周期進行停止作用の解析	63
14:15 – 14:30	小田切 美穂	アレロケミカル L-DOPA による植物生育抑制作用と耐性機構の解析	64
14:30 – 14:45	荘 苑	カロテノイド生合成系に作用する除草剤の標的酵素の推定	65
14:45 – 15:00	大西 薫	植物成育促進活性を有する植物由来の揮発性物質の探索と β -カリオフィレンによる根部の成育促進効果の検討	66
15:15 – 15:30	三井 梢	筑波実験植物園内における内生性 <i>Phyllosticta</i> 属菌の生息調査— <i>Phyllosticta capitalensis</i> の宿主嗜好性を探る—	67

第四会場 2C107 教室

8:55 – 9:10	高橋 宗一郎	糖尿病の病態形成におけるミトコンドリアゲノム変異の関与	68
9:10 – 9:25	田村 真	ミトコンドリア分裂の生物学的意義：ミトコンドリアゲノム変異の病原性制御	69
9:25 – 9:40	藤井 佑衣	RNA 結合タンパク質 HNRNPK の相互作用因子の探索	70
9:40 – 9:55	菊地 啓太	乳酸菌殺菌菌体による抗老化関連生理作用の解析	71
10:10 – 10:25	高田 麻里奈	牛パラインフルエンザウイルス 3 型の増殖機構の解析	72
10:25 – 10:40	松浦 遼介	牛パラインフルエンザウイルス 3 型を用いたウイルスベクターの開発	73
10:40 – 10:55	阿保 賢二	三次元培養造血系細胞の培養密度が増幅度におよぼす影響	74
10:55 – 11:10	浅野 圭吾	体内のアポトーシス細胞を除去するために転写因子 MafB がすること	75
11:10 – 11:25	今村 優希	MafB はマクロファージを介してがんを抑制する；腫瘍悪性化メカニズムの探究	76
12:15 – 12:30	斉藤 美佳	イモリ嗅上皮における揮発性匂い物質に対する応答の電気生理学的解析	77
12:30 – 12:45	角田 圭輔	イモリ嗅細胞の電気的特性の解析	78
12:45 – 13:00	小柳 堯廣	アカハライモリ松果体に存在する光受容器の生理的役割の検証	79
13:00 – 13:15	杉原 堯歩	カタユレイボヤ光受容細胞の生理学的解析	80
13:15 – 13:30	高津 光平	変異錐体オプシンを発現するトランスジェニックイモリ作製の試み	81
13:45 – 14:00	山本 慧	癌か再生か？-イモリに対する c-Myc 強制発現の試み-	82
14:00 – 14:15	中畑 あずさ	動物の変態の共通性を理解するためのホヤ RXR 関連遺伝子のノックアウトの試み	83
14:15 – 14:30	山本 茜	ウニ胚神経外胚葉特異的因子 foxQ2 の転写を調節するメカニズムの解析	84
14:30 – 14:45	林 貴朗	ショウジョウバエ雑種雌の生存力に対する欠失染色体の効果	85
14:45 – 15:00	三浦 康平	ショウジョウバエ雑種雌の生存力を回復する遺伝子のマッピング	86
15:15 – 15:30	井村 英輔	ショウジョウバエのステロイドホルモン生合成を調節する新規神経細胞の同定と機能解析	87
15:30 – 15:45	高尾 悠	ショウジョウバエのステロイドホルモン生合成器官で発現する新規遺伝子の機能解析	88
15:45 – 16:00	竹股 ひとみ	ショウジョウバエの栄養状態に応答したモノアミン生合成酵素遺伝子の発現変化	89
16:00 – 16:15	山本 知奏	内在性ステロイドホルモンは個体の寿命に影響を与えるか？～ショウジョウバエを用いた分子遺伝学的追究～	90

平成 26 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

阿保 賢二

井口 彰

岡島 智美

奥成 潤

倉持 大地

竹内 春樹

竹内 優奈

谷 春菜

納谷 典明

三田 堂人

柳 芙弓

表紙画

柴田 愛実

表紙画の解説：

「皆さんがここへ来るときに『あ、海だ』と思って見てきた海と、この実習を終えた後に『海』を見て思うことは違っているかもしれない。違っていたら、嬉しい。」

動物分類学臨海実習で八畑先生が仰っていた言葉を思い出しながら描きました。目に見えるものがあり、見えないものがあり、見ようとしていないものがあり、見えていることに気付いていないものがあること。「知っている」ことが物事の見え方をがらりと変えてくれること。大学に入る前に見ていた「生物学」と、いま見えている「生物学」……。この絵を見て、十人十色の感想を持って頂ければ幸いです。

表紙画を描く機会を与えてくださった斉藤美佳さん、制作にあたって助言して下さった皆さん、ありがとうございました。

平成 26 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあたって

阿保 賢二（筑波大学 生物学類 4 年）

寒さも増してくるこの時期、秋学期の試験が終わると、ついに卒業研究発表会の時期になったと実感します。

毎年この時期に開催される生物学類卒業研究発表会は4年生が1年間かけて行ってきた研究の成果を発表する場であり、この1年間の集大成、もっと言えば学類生としての4年間の集大成であるとも言えるでしょう。12分、質疑応答を合わせても計15分という短い時間に込めた思いとして、一人一人の発表に耳を傾けていただけたら幸いです。

去年は運営する側、2年生、1年生のときは発表を聞く側としてこの発表会に関わってきましたが今年はついに発表する側での参加となり、いよいよ自分たちの番だ、と気合いが入る一方で、先輩たちのような発表が自分にできるのだろうか、という不安な気持ちもあります。実際、実験で良い結果が出ないこともあり、なかなか上手くいかない、というのが現状でした。それでも自分たちが先輩の発表を見て感じたようなことを後輩たちに残したい、そして何より自分たちにとって次のステップへと繋がるような発表にしたい、そういう思いを胸に発表に臨みます。

1、2年生の皆さんには難しい内容かもしれませんが、いろいろな分野の発表を見たり、もしくは興味のある分野に絞って見たり

していただき、今回の発表会を来年もしくは再来年の研究室選択の際に役立てて欲しいと思います。また、発表を聞くだけでなく、先生方も皆さんと一緒に聞き、質問するという普段の講義とは違う発表の場の空気というものも味わって下さい。

3年生の皆さんにはこの卒業研究発表会を準備・運営していただき、心から感謝しています。自分たちの姿を見て来年の発表の参考にしていただければと思います。また、このように1年間卒業研究ができたのは、自分たちを指導し面倒を見てくださった指導教官のおかげであることはいまでもありません。改めて感謝の意を表するとともに、発表会本番ではどうか温かく見守って下さい。

最後になりますが、自分たちは4年間、多くの人と関わってきました。それは同じクラスの学生、学類の先輩や後輩、受講した講義の先生、研究室の先生や先輩等挙げればきりがありません。研究室に所属し卒業研究をして発表し卒業するという、今まで当たり前前にはやってきた、やろうとしている状況はこの関わりがあった初めて成立します。この人との関わりを大切に、また感謝の気持ちも忘れず、これからの人生に繋げていく所存です。

Communicated by Kenji Miura, Received January 8, 2015.

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の交配型プラス配偶子における受精管の空間配置に関する研究

秋本 享大 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 宮村 新一 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

真核生物においてオスとメス、2つの性は同形配偶子の交配型プラスとマイナスから進化したと考えられている。しかし、同形配偶子の交配型プラスとマイナスそれぞれが、オスとメスのどちらに対応する性であるのか不明なことが多い。もしも同形配偶子の2つの性と、オスとメスとを結びつける共通の性質があれば、オスとメスの進化を明らかに出来ると考えられる。そのような性質のひとつが緑藻植物の2つの配偶子間にみられる接合装置 (配偶子の原形質膜が特殊化した細胞融合装置) の空間配置の違いである。すなわち、多くの緑藻植物においては、同形、異形配偶子に関わらず、細胞前端から伸びた2本の鞭毛によって遊泳運動を行う配偶子において、片方の性では接合装置は鞭毛運動面に対して光受容装置である眼点と同じ側の細胞前端部にあり、もう一方の性では反対側にある。その結果、受精後の動接合子においては2つの配偶子から由来した2つの眼点が細胞の同じ方向に並び正常な走光性を示すと考えられている。従って、配偶子の受精と動接合子形成にとって接合装置の性特異的な空間配置が重要と考えられる。これまでの透過型電子顕微鏡(TEM)などを用いた先行研究によって接合装置は眼点と同様に配偶子の基底小体から細胞後方に伸びた微小管性の鞭毛根の側に配置していることが明らかになっているが、接合装置がどのようにして細胞の特定部位に配置するのか、その詳細は不明である。そこで、本研究では、接合装置の性特異的な空間配置の仕組みを明らかにするために、配偶子形成が容易でさまざまな突然変異株が知られている緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて、接合装置の空間配置の仕組みについて調べた。とくに交配型プラス株では、受精時に配偶子が活性化することで接合装置からアクチンが重合することによって突起状の受精管が伸長することが知られている。受精管の位置は接合装置の位置に対応するので、本研究では受精管に注目して電界放射型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)および蛍光顕微鏡を用いて解析を行った。

材料と方法

C. reinhardtii 野生株 CC125 (交配型プラス) CC124 (交配型マイナス) 変異株 CC4301 (交配型プラス) は TAP 培地で 25°C、約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の連続照明下で培養した。配偶子誘導は TAP1/2N で明期 12 時間、暗期 12 時間、25°C、約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で 5 日間培養した後、窒素欠乏培地で 3~5 時間震盪培養を連続照明下で行った。配偶子活性化は 10 mM dbcAMP と 1 mM IBMX を添加し震盪培養を同条件で 1 時間行った。

活性化後、受精管と微小管性鞭毛根の観察のため 4% パラフォルムアルデヒド、メタノールで固定し、微小管性鞭毛根と鞭毛を抗アセチル化チューブリン抗体、受精管を抗アクチン抗体、核を DAPI で染色して蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、3% Triton X100 と 5% パラフォルムアルデヒドの混合溶液による固定を行い微小管性鞭毛根と受精管の配置を観察した。

FE-SEM を用いた受精管の観察のため、配偶子を 2% グルタルアルデヒドによる固定、タンニン・オスミウム法による導電染色、脱水後に凍結乾燥して観察した。

コルヒチン処理の実験では配偶子に 0、1、2、4 mg/ml のコルヒチンをそれぞれ加え 100 分間震盪培養をした後、30 分間の活性化処理を行い、同様の蛍光抗体染色を行った。

結果と考察

受精管の配置を調べるために、FE-SEM 蛍光顕微鏡による観察を行った。CC125 の FE-SEM の観察から、受精管は細胞先端部の s 鞭毛根に対応する lateral ridge 上に確認された。さらに受精管と鞭毛根の位置関係を明らかにするため、Triton X100 処理により細胞骨格抽出試料を作成し抗アセチル化チューブリン抗体と抗アクチン抗体で染色して蛍光顕微鏡で観察したところ、受精管が 1s 鞭毛根上で確認された。これらの結果は TEM による先行研究の結果を支持する。このことから、眼点と同様に微小管性鞭毛根が受精管の配置に関与している可能性が示唆された。そこで、受精管の位置決定に対する微小管性鞭毛根の関与を調べるために、細胞骨格変異株である CC4301 を使って観察をした。その結果、CC4301 では細胞あたりの鞭毛の数が 0 本から 5 本の間で変化していたが、受精管は常に微小管性鞭毛根に見られた。さらに、配偶子に対してコルヒチン処理 (1、2、4 mg/ml) を行ったがどの濃度でもコルヒチン未処理の配偶子と受精管の数や配置に大きな違いは見られなかった。

今後の予定

同調培養系を用いて細胞分裂時に微小管性鞭毛根形成されるタイミングで阻害剤の処理をし、受精管の配置への影響を観察したい。

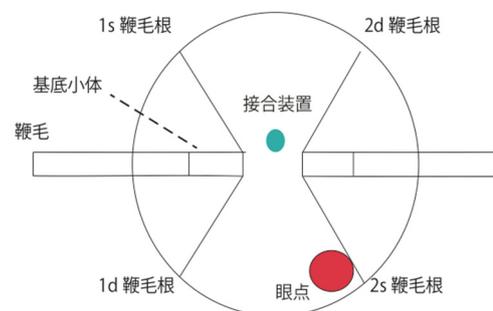


Figure 1: *Chlamydomonas reinhardtii* の交配型プラス配偶子の細胞骨格を鞭毛側から見た模式図

クローラクニオン藻におけるオルガネラ DNA 複製酵素の起源と輸送シグナル解析

渡辺 ありさ (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

葉緑体とミトコンドリアは、それぞれシアノバクテリアと α プロテオバクテリアが従属栄養性真核生物に細胞内共生することで生じたオルガネラであり、現在も共生バクテリア由来のオルガネラ DNA を保持している。しかしこれらのオルガネラには DNA 複製に関わる遺伝子がほとんどなく、オルガネラ DNA の複製は宿主核にコードされたタンパク質に依存していると考えられる。細胞内共生の過程で、共生者から宿主核へのゲノムの移行や宿主核からオルガネラへのタンパク質輸送機構が確立したことは共生者がオルガネラ化するための重要なイベントである。したがって、核によるオルガネラ DNA の複製制御機構の進化を知ることは、細胞内共生によるオルガネラ化を理解するうえで重要なカギとなると思われる。

本研究で用いるクローラクニオン藻は、シアノバクテリア起源の葉緑体を持つ緑藻をケルコゾアに属する原生生物が再度細胞内共生(二次共生)することで葉緑体を獲得した藻類(二次植物)である。クローラクニオン藻は共生緑藻の核の名残であるヌクレオモルフを持ち、そのため本藻は3つの異なるオルガネラ DNA (葉緑体 DNA、ミトコンドリア DNA、ヌクレオモルフ DNA) を保持していることから、オルガネラ DNA 複製機構を研究するうえで非常に興味深い生物である。

これまで、オルガネラ DNA 複製酵素に関しては、モデル紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* や陸上植物 *Arabidopsis thaliana* で研究が進められてきたが、二次植物ではほとんど報告がない。本研究では、クローラクニオン藻のオルガネラ DNA 複製酵素のひとつである DNA ポリメラーゼについて、クローラクニオン藻 *Bigeloviella natans* の全ゲノム配列を用いた相同性検索、緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた細胞内局在解析、細胞周期を通じた遺伝子発現解析を行った。また分子系統解析の結果から、DNA ポリメラーゼ遺伝子の進化についても考察を行った。

手法

先行研究で報告されている *C. merolae* と *A. thaliana* のオルガネラ DNA ポリメラーゼ (POP) の配列に相同性のある遺伝子配列を *B. natans* の核ゲノムから BLASTp 相同性検索により取得した。得られた配列 (BnPOP) のタンパク質 N 末端を推定するために 5' RACE を行った。BnPOP タンパク質の細胞内局在を知るため、N 末端シグナル配列の *in silico* での予測解析と、GFP 融合タンパク質の遺伝子導入系を用いた *in vivo* での蛍光局在解析を行った。遺伝子導入には、クローラクニオン藻 *Amorphochlora amoebiformis* の細胞とパーティクルガン法を用いた。

BnPOP 遺伝子の起源の推定には、データベースより集めた他の生物の DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列を用いて、DNA ポリメラーゼドメインを基に最尤法とベイズ法により分子系統解析を行った。

BnPOP 遺伝子の発現時期とオルガネラ DNA の複製時期の関係を調べる実験では、12 時間明期: 12 時間暗期で同調培養させた *B. natans* の細胞よりインターバル抽出した RNA と DNA を用いて定量的 PCR を行った。

結果と考察

既知の POP の配列を用いて *B. natans* のゲノムに相同性検索した結果、POP と推定される2つのアミノ酸配列 (BnPOP1 と BnPOP2) が見つかった。この2つの BnPOP 配列は系統的に明らかに区別され、BnPOP1 は、ストラメノパイルの POP と近縁であり、BnPOP2 に関しては系統的なサポートは得られなかった。N 末端シグナル予測プログラムを用いて BnPOP の細胞内局在を予想した結果、BnPOP1 はクローラクニオン藻において葉緑体輸送シグナルの一部であるシグナルペプチドを含んでおり、BnPOP2 については、ミトコンドリア輸送シグナルを持っていた。GFP 融合タンパク質を用いて生体内における細胞内局在を観察した結果、BnPOP1 は葉緑体に局在し、BnPOP2 はミトコンドリアに局在することが明らかになった。以上のことから、BnPOP1 は宿主起源であり、二次共生前は従属栄養性真核生物に存在していたことからミトコンドリアで機能していたと考えられるが、現在は葉緑体のみで機能していることが示唆される。代わりに、ミトコンドリアには起源不明の BnPOP2 が輸送されているようだ。

C. merolae と *A. thaliana* では POP 遺伝子はゲノム中に1種類しか存在せず、葉緑体とミトコンドリアの両方で機能している。細胞内共生による葉緑体の獲得後に、ミトコンドリアで機能していた POP が葉緑体とミトコンドリアへ共輸送されるようになったと考えられている。このことから、クローラクニオン藻と他の光合成生物では、異なる POP 遺伝子の進化が起きたと推察される。

BnPOP の RNA 発現時期とオルガネラ DNA 複製時期の関係を調べる実験では、葉緑体に局在する BnPOP1 は細胞分裂する暗期より前に発現し、ミトコンドリアに局在する BnPOP2 は常に発現していることが分かった。それに対して、葉緑体とミトコンドリアの DNA は両方とも暗期に複製されていることが分かった。葉緑体に関しては BnPOP1 の発現時期と DNA 複製時期に相関性が見られたが、ミトコンドリアに関しては、BnPOP2 が常に発現するのにも関わらず暗期に DNA 複製が限定されていたので、BnPOP2 以外にミトコンドリアの DNA 複製を制御する因子があることが示唆された。

キセルガイの殻上に着生する藻類の分類学的研究

南波 紀昭 (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

藻類は、系統的に極めて多様な生物群であるが、生息環境の多様性にも富んでいる。大部分は水生であるが、陸上や極限環境、他生物の内部、表面などの環境にも生育していることが知られている。特に他生物との関わりは、共生や寄生などの観点からいくつかの研究が行なわれている。

貝類の殻に生育する藻類はいくつか知られており、スガイに着生するカイゴロモ *Pseudocladophora conchophera* (アオサ藻綱シオグサ目) などがある。このように水生の貝の貝殻への藻類の付着は多く報告されているが、陸貝の付着藻に関する報告は非常に少ない。唯一、Geitler (1935) によりキセルガイの殻上から *Trypanochloris clausiliae* (黄緑色藻綱) が報告されている。そのような中、新潟県の森林において、ツムガタギセル *Pinguiphaedusa platydera* の殻上に藻類が付着・生育しているのを発見した。日本においては陸貝の殻上に生育する藻類は報告がないため、本研究では、形態観察および分子系統解析により、この藻類の同定を行うことを目的とした。

方法

本藻類は新潟県 (柏崎市米山) の森林内に生息していたツムガタギセルの殻上から採取された。殻上より分離した藻類は、倒立顕微鏡下でマイクロピペット法により単離し、BBM 液体培地および 1.5% 寒天培地上で培養した。本藻類の形態観察は光学顕微鏡を用いて、殻上より分離した直後のものと、単離培養したものの両方で行った。さらに詳細な微細構造や、殻上への付着様式の確認のために、走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察を行った。SEM 観察に用いた試料は 2.5% グルタルアルデヒドおよび 1% 四酸化オスmiumによる二重固定をし、凍結乾燥させた。また本藻類の系統学的位置を明らかにするために、殻付着サンプルおよび培養株より抽出した DNA から 18S rDNA の配列決定をし、RAxML による最尤法系統樹の作成および、ブートストラップ法による検定を行った。

結果と考察

殻上に着生している本藻類は、緑色で可視サイズのコロニーを形成していた (Fig. 1)。光学顕微鏡を用いて観察したところ、殻から分離した直後の藻類は、個々の細胞がいびつな球状をしており、直径 5-15 μm 、透明のゲル状物質やバクテリアなどと群塊を形成していた。数週間の培養を経ると、コロニーの外縁部分の細胞が、糸状に伸びて長さは 20 μm ほどにまでなり、不規則に枝分かれしていた。コロニー中央部分は多数の球状細胞からなる細胞塊で構成されていた。各細胞は一つの板状葉緑体を持ち、ピレノイドが存在していた。また、培養の長期経過段階の細胞には、油滴状物質の存在も確認された。しかしながら今回は最適な培養条件を確立することができなかったため、重要な分類形質となる、コロニー形成までの過程や、遊走子の有無などについては十分な



Fig. 1. ツムガタギセルの殻上に形成された藻類コロニー (白矢印)

観察が行えなかった。今後は pH や温度、照度を変えるなど様々な条件で培養を行う必要がある。

SEM での観察を行った結果、コロニーはマット状構造を形成しており、そのマット状構造に埋め込まれるようにバクテリアと本藻類が存在した。比較的外側にバクテリアが多く集まっていることから地衣類などのように層状構造を形成している可能性がある。またカイゴロモとは異なり、本藻類がキセルガイの殻へ穿孔している様子はみられず、マット状構造の粘着により、殻上に付着していることが確認できた。さらに、付着がみられる殻の表面では炭酸カルシウムの層が露出していることも確認できた。

本研究によって得られた 18S rDNA 配列を BLAST 検索した結果、*Dilabifilum* 属に高い値で類似性を示した。これらの結果に基づき、系統樹を作製してみたところ、本藻類はアオサ藻綱アオサ目モツキヒトエ科に含まれ、中でも *Dilabifilum* 属に極めて近縁であった。これらの形態的特徴と分子データから、本藻類は *Dilabifilum* 属の一種であると考えられる。しかしながら、*Dilabifilum* 属の分類については、類似した分枝糸状性緑藻である *Pseudendoclonium* 属との関係も含めて議論が続いており、より詳細な検討が必要である。

今後の展望

本研究により、*Dilabifilum* 属の藻類がキセルガイの殻上という特殊環境に生育していることが初めて明らかになった。しかしながら、今回の培養条件では、種同定に必要な形質である生活環の詳細を明らかにすることができなかった。今後、培養条件の改善を行い、これらを明らかにする必要がある。また *Dilabifilum* 属を含めて分枝糸状性の緑藻については分類学的に未解明な部分が多く、類似属を含めて分類学的検討を行う必要がある。さらに本藻類が含まれるアオサ目には海水、淡水、陸上と、さまざまな環境に生育する種が知られており、これらの系統関係を明らかにすることで、藻類の陸上進出への新たな知見が見つかる可能性がある。また最も興味深い課題は、本藻類とキセルガイとの関係を明らかにすることである。緑色の藻類が付着したキセルガイはしばしば見られるが、これらが全て今回明らかにした *Dilabifilum* 属藻類によるものなのか否か、つまり両生物間の特異性の程度など、本藻類とキセルガイとの生態学的関係を明らかにすることができれば、と考えている。

外来種ムラサキツメクサに訪花する在来マルハナバチ類の採餌行動

有藤 惇 (筑波大学 生物学類)

指導教員：横井智之 (筑波大学 生命環境系)

序論

ムラサキツメクサは種子散布により日本で分布を拡大している外来種であり、在来の訪花昆虫と密接な送粉関係を築いていると思われる。長野県白馬村でもスキーゲレンデの斜面や周辺の田畑に広く繁茂し、在来種のおオマルハナバチとトラマルハナバチが主に訪花している。おオマルハナバチは口吻長が短く、自身の口吻よりも長い花筒の花で盗蜜を行なう傾向が強いと言われていた。盗蜜とは花冠の側面に穴を開けて蜜を得る行動で、一般的に送粉を伴わないとされてきた。しかし、盗蜜者の体表付着花粉数を計測した例はほとんど無い。そこで本研究では、ムラサキツメクサに訪花し、採餌様式が異なると考えられるマルハナバチ2種の採餌行動や形態、体表付着花粉数を調査した。

方法

調査は2014年7月7日から31日までの約一ヶ月間に長野県の白馬村で行なった。

実験Ⅰ マルハナバチの訪花個体数調査

両種が訪花を行なう時間帯を調査するため、ムラサキツメクサのみが開花している場所を2m×2mのコードラートで2カ所区切り、30分間に訪花した個体数を記録した。調査日数は4日間、調査時間帯は5時、8時、11時、14時、17時の計5回とした。

実験Ⅱ 採餌行動の調査

ムラサキツメクサの花序に訪花した個体の採餌行動をビデオカメラで撮影し、訪花した個体の採餌様式を盗蜜と正当訪花(花蜜・花粉採餌、花蜜採餌)にわけて記録した。調査したムラサキツメクサの花序は全ての小花が開花し満開となった状態のものに限った。次に、両種の1花序あたりの滞在時間および1小花あたりの採餌時間、1花序あたりで訪れた小花数を採餌様式ごとに調べた。

実験Ⅲ 形態計測と体表付着花粉数の調査

ムラサキツメクサを訪花した直後の個体を採集し、各個体の口吻長とムラサキツメクサの小花の合着長をノギスで計測した。合着長とは小花の筒状になった部分の長さを指す。次に各個体の体表付着花粉数を計測した。後脚を除いた採集個体の体表を1000 μ lのスクロース溶液で洗い流し、その溶液中から10 μ lをスライドガラス上に取り、2.5 μ lに相当する面積を検鏡して花粉数をカウントした。この一連の手順を2回繰り返して平均し、さらに400倍にした値を1個体あたりの推定付着花粉数とした。

結果

実験Ⅰ

ムラサキツメクサにおいて8時から17時までの時間帯に両種のムラサキツメクサへの訪花が確認された(図1)。おオマルハナバチは3から4個体、トラマルハナバチは1個体が随時訪花していた。

実験Ⅱ

おオマルハナバチは主に盗蜜を、トラマルハナバチは主に正当

訪花(花蜜・花粉採餌)を行なっていた。またおオマルハナバチとトラマルハナバチにおける1花序あたりの平均滞在時間は10.66秒と10.55秒、1小花あたりの平均採餌時間は1.08秒と1.06秒、1花序あたりで訪れた平均小花数は3.17花と5.00花となり、両種間に差はなかった。

実験Ⅲ

ムラサキツメクサの合着長に比べおオマルハナバチの口吻長は短く、トラマルハナバチの口吻長は長かった(図1)。また、体表に付着したムラサキツメクサの花粉数はトラマルハナバチの方が圧倒的に多かった。一方でおオマルハナバチにも約200粒付着していた(図2)。

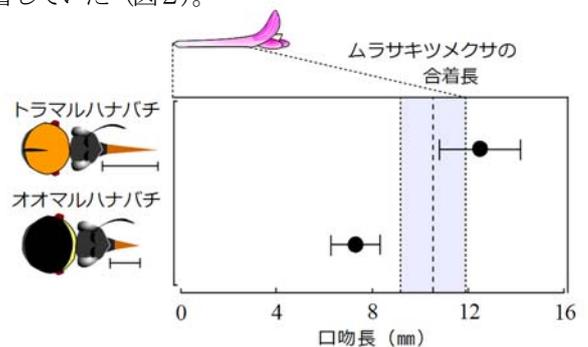


図1. 各マルハナバチの口吻長とムラサキツメクサの合着長の比較
口吻長と合着長は平均±SDで表している。

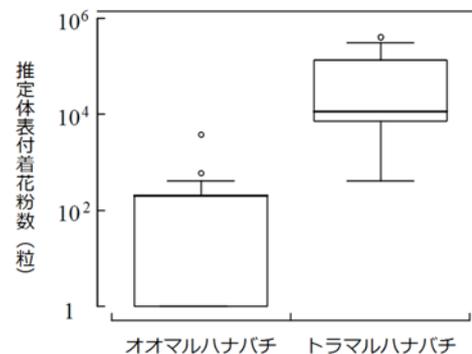


図2. 各マルハナバチの体表に付着していたムラサキツメクサの花粉数

考察

種間で1花序あたりの滞在時間および1小花あたりの採餌時間、1花序あたりで訪れた小花数に種間で差は見られなかったにもかかわらず、トラマルハナバチの推定体表付着花粉数はおオマルハナバチよりも多くなっていた。これは両者の採餌様式が異なるためと考えられ、推定体表付着花粉数が多かった正当訪花者のトラマルハナバチは、ムラサキツメクサにとって主要な送粉者になっていると考えられる。一方の盗蜜者であるおオマルハナバチにも少量の花粉が付着していた。これはムラサキツメクサが多く的小花から形成される集合花序であり、おオマルハナバチが盗蜜する際に花序上を歩き回ったためだと考えられる。今回の調査で確認されたように、送粉を伴わないと言われてきた盗蜜者でも集合花序を形成する植物に訪花する際には、その植物の送粉に貢献している可能性がある。

セスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus* における歩脚の自切構造と強度
 高谷 優那 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 八畑 謙介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

自切は動物が危険から逃れるときに体の一部を犠牲にする行動で、トカゲの尻尾切りなどがよく知られた例である。自切をする動物は、特定の位置に特定の自切構造を備えていることが知られている (Frédéricq, 1883)。

本研究の対象とした唇脚類は歩脚を自切する。これまでに先行研究によって、唇脚類では歩脚関節のクチクラに不連続な構造が存在することが明らかにされ、この自切構造の大きさが分類群ごとの自切の頻度と対応していることが指摘されている (Matsui and Yahata, 2012)。また、別の先行研究では、イシムカデ類とオオムカデ類では前後の歩脚で自切構造の大きさに違いのあることが示されている (飯尾, 2013 年度卒業研究)。イシムカデ類では、体の後方ほど歩脚の自切構造が大きく、またオオムカデ類では体の後端部の 2 対の歩脚の自切構造が他より大きいことが明らかにされている。

体の後端部の歩脚の自切構造が大きいうことは、体後端部の歩脚の方がそれ以外の歩脚より切れやすいのだろうか。実際に野外では体後端部の歩脚を失った個体がしばしば見られる。このことから、自切構造の大きさと自切の頻度には相関があると予想される。そこで、本研究ではオオムカデ類の 1 種を用いて、自切構造の大きな歩脚は他より小さな力で自切されるとの仮説を立て、これを検証した。

材料と方法

本研究では、セスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus* (図 1) を研究対象に用いた。採集時にすでに自切していた歩脚を記録し、歩脚ごとの自切の頻度を調査した。

自切の強度の測定では、酢酸エチルで麻酔をした生体標本を展翅針で固定し、フォースゲージ (DS2-2N; IMADA) を用いて歩脚の自切時の張力を測定した。本研究では、自切構造が歩脚関節の 1/2 周ある第 10, 21 歩脚と、1 周ある第 22, 23 歩脚の左側を自切させた。これらの歩脚をすでに自切していた場合や操作に失敗した場合には、右側の歩脚を測定に用いた。

解析には、統計ソフトウェア R (3.1.1.) を用いた。



図 1. セスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus*.

結果と考察

野外から得られたセスジアカムカデの歩脚ごとの自切数は、1 周の自切構造のある最後端の第 23 歩脚が他の歩脚に比べて明らかに多かった (図 2)。

各歩脚の自切強度について、ウィルコクソンの符号付順位和検定をおこない、ボンフェローニ法にて補正し比較したところ、第 23 歩脚にのみ他の全ての歩脚との間に有意な差がみられた (図 3)。このことから、自切構造が大きければ自切強度は低いとは必ずしも言えないことが示された。

以上の結果から、自然状態で後端部の歩脚に欠損が多いのは、自切構造が他の歩脚より大きいためではなく、外敵に狙われやすいなど、外的な要因によると考えられる。クモ類の 1 種では、歩脚の自切すべき位置とは異なる部位に損傷を負った場合、生存率や歩脚の再生率が低下することが明らかにされている (Randall, 1981)。セスジアカムカデにおいても、体後端部の 2 対の歩脚でのみ自切構造が他より大きいのは、自切することの多い後端の歩脚が再生しにくい形で切れることや、体液が大量に流出することを防ぐためかもしれない。

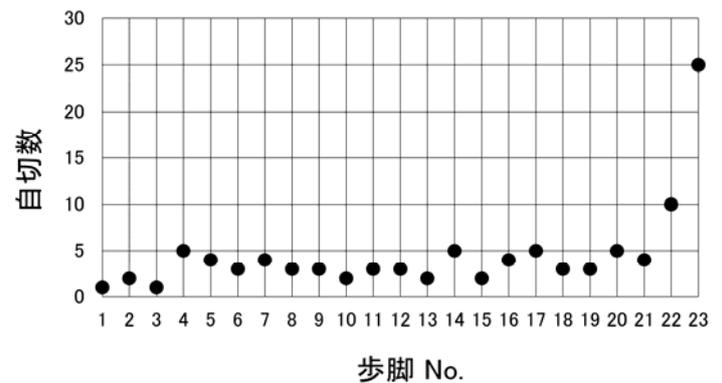


図 2. セスジアカムカデの歩脚ごとの自切数 (n=120).

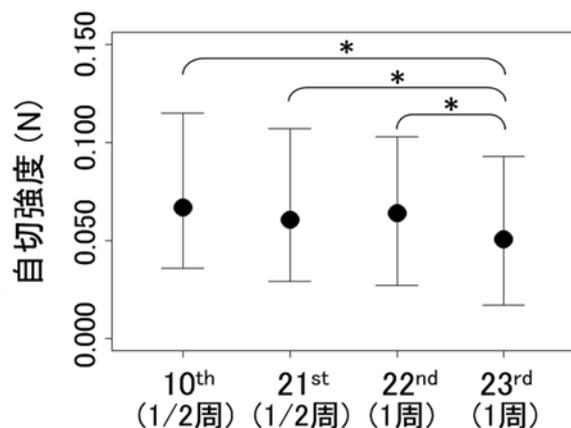


図 3. 第 10, 21, 22, 23 歩脚の自切強度 (n=60). 歩脚番号の下のカッコ内は自切構造の大きさを表す。* は有意差の認められた組み合わせ。

日本未記録動物門 顎口動物 Gnathostomulida の発見

柴田 愛実 (筑波大学 生物学類)

指導教員：八畑 謙介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

顎口動物門 (Phylum Gnathostomulida) は、海産無脊椎動物の 1 分類群である。左右相称の蠕虫状で自由生活性、体長 0.3 ~ 3 mm、口は頭部腹面に開口しており、それに続く咽頭のクチャクラ性の顎と基板、単繊毛性の表皮細胞などがこの分類群の主な特徴である。1956 年に扁形動物門の 1 綱として Ax によって初めて記載されたが、その後 1969 年に Riedl によって独立の動物門とされた。現在までに 2 目 12 科 27 属 98 種が記載されている。

主に海浜の砂間に生息する間隙性の微小動物であること、発見当初には嫌気的環境に特異的に生息すると考えられていたことから、世界的に研究が遅れてきた。その後の研究によって顎口動物の生息地は嫌気的環境に限らないことが明らかになり、これまでにヨーロッパやアメリカ西海岸を中心として世界各地から生息が報告されている。しかしながらアジアからは、インド洋のモルディブ諸島と南太平洋のパプアニューギニア島、ロシアの日本海沿岸の 1 地点から、合計数種が報告されているのみである。日本国内における研究は依然として進んでおらず、日本産顎口動物の記録は現在までに全く無いのが現状である。

そのような状況の中で、2012 年に静岡県下田市の筑波大学下田臨海実験センターで行われた動物分類臨海実習において、顎口動物と推測される動物が複数観察された。これを予備的な知見として、本研究では日本における顎口動物の生息状況を明らかにし、日本産の顎口動物を記録することを目的とした。

方法

合計 8 地点を調査地とし、海浜の砂を採集した (表 1)。潮間帯の深さ 10~15 cm 程度の湿った砂を採集し、海水氷法で間隙動物の抽出を行い、肉眼または実体顕微鏡下で顎口動物をソーティングした。

海水氷法は、採集した砂をふるいに入れ、その上に海水の氷を乗せることで、砂中の動物がふるいの目を通してシャーレ内に抽出される方法で、海産間隙性微小動物の採集に広く利用される方法である。本研究では、直径 15 cm、目の開き 250 μm 、線形 160 μm の精密ふるいを用いた。静岡県下田市での調査では調査地の海水を、それ以外の調査地のサンプルは人工海水 (富田製薬株式会社「マリンアート ハイ」) を抽出に用いた。

ソーティングした個体は L-メントール飽和水溶液の滴下または MgCl_2 海水溶液で麻酔し、生物顕微鏡および位相差顕微鏡で観察を行った。固定液には 4% 海水ホルマリンまたは 70% エタノールを用いた。

結果と考察

調査の結果、静岡県下田市の鍋田浜から顎口動物 2 種を発見した。本研究調査地のうち、顎口動物が採集できたのはこの鍋田浜のみであった。

頭部の形状や咽頭の位置などの特徴からこれら 2 種の顎口動物の検討を行った結果、1 種は頭部に繊毛窩があることや、長い感覚毛を持つなどの特徴から Bursovaginoidea 目 Austrognathiidae 科の *Austrognathia* sp. と同定した。もう 1 種は頭部が尖り細長くて境目の無い形状で、長い体と比較的前方に咽頭球が位置するなどの特徴から Filospermoidea 目 Haplognathiidae 科の *Haplognathia* sp. と同定した。どちらの属もヨーロッパおよび中南米大西洋沿岸の他、南太平洋からも報告されており、これらの属が日本の太平洋沿岸から新たに発見されたことによって、これらの属が汎世界的に分布することが示された。

本研究では鍋田浜以外の調査地から顎口動物は発見できなかったが、これは砂の採集量が少なかったことや、潮が十分に引かない時間帯に採集を行ったことなどに関係がある可能性もあり、生息地の微環境などについては今後さらに調査が必要である。

また、今後は走査型電子顕微鏡などを利用して顎の形態を精査して種レベルの同定を行い、日本における顎口動物相を明らかにしていくことが求められる。

表 1. 調査地。

調査地	年月日
新潟県新潟市小針	2014 年 5 月 4 日
茨城県ひたちなか市阿字ヶ浦	2014 年 4 月 24 日
静岡県下田市鍋田	2013 年 7 月 9~12 日
同上	2014 年 7 月 8~12 日
同上	2014 年 12 月 14~18 日
静岡県下田市白浜	2014 年 7 月 9 日 (譲渡による)
静岡県下田市外浦	2014 年 7 月 9 日 (譲渡による)
静岡下田市田牛	2014 年 7 月 9 日 (譲渡による)
広島県廿日市市宮島	2014 年 6 月 8 日
山口県下関市角島	2014 年 5 月 15 日 (譲渡による)

ヤマトタマヤスデ *Hyleoglomeris japonica* における濾胞上皮の形態学的研究

千頭 康彦 (筑波大学 生物学類) 指導教員：八畑 謙介 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

昆虫類や多足類などの節足動物では、卵母細胞が体細胞の上皮に囲まれている。この上皮組織は両分類群で形成過程や構造が異なるが、どちらも共通して濾胞上皮と呼ばれている。昆虫類では比較形態学的研究から、濾胞上皮の構造や機能は上位分類群間で異なっており (Jedrzejowska et al., 2014)、濾胞上皮の構造および機能を解明することは昆虫の進化に関するテーマの 1 つになっている。

一方で、多足類の濾胞上皮については、唇脚綱 (e.g., Miyachi & Yahata, 2012) や 倍脚綱 (e.g., Kubrakiewicz, 1991) に組織学的研究および微細構造学的研究があり、濾胞の構造に共通した特徴が見出されている。しかしながら、これまでに知見のある分類群は限られており、また、機能面については推測の域を脱していない。すなわち、多足類の濾胞上皮に関する知見は、その構造および機能の多様性や共通性の議論を進めるには未だ不十分である。このような状況の中で、本研究で用いたヤマトタマヤスデはこれまでに卵巣構造に関する組織学的研究が行われており (Yahata & Makioka, 1997)、その過程で濾胞上皮の一部に他の領域とは異なる特徴を持つ特殊な領域が発見されている (Yahata unpublished data)。このような濾胞上皮の特殊な領域の存在は、他の多足類では知られていないが、多足類における濾胞上皮の機能を探るうえでの足掛かりの 1 つになると期待される。

そこで、本研究ではヤマトタマヤスデの濾胞上皮およびその一部の特殊な領域における形態学的特徴および機能の解明を目的とした。

材料および方法

ヤマトタマヤスデ *Hyleoglomeris japonica* Verhoeff, 1936 (倍脚綱タマヤスデ目) (図 1) を 2014 年 5 月から 11 月にかけて茨城県と宮城県で採集した。生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で成体雌から背板と消化管を取り除き、卵巣を摘出して、以下の方法により観察した。

1. パラフィン連続切片法および樹脂切片法

試料をブアン氏液または 4% パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で固定し、パラフィンまたは親水性樹脂 (Technovit 7100) に包埋後、切片を作製した。切片はヘマトキシリン-エオシン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

2. 蛍光染色法

試料を 4% PFA 溶液で固定後、核を YOYO-1 で、アクチン繊維を Phalloidin でそれぞれ染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

3. 免疫抗体染色法

試料を 4% PFA 溶液で固定後、5% Skimmilk 溶液でブロッキングを行なった。その後、*Drosophila* の Vasa タンパク質の一次抗体を用いた一次抗体反応および二次抗体反応を順次行ない、DAPI を用いて核を染色して、蛍光顕微鏡で観察した。

結果および考察

ヤマトタマヤスデの濾胞細胞は核周辺部以外が薄く伸ばされた状態であるが、濾胞が血体腔へ開口する濾胞孔の反対側の濾胞上皮に、他の領域と比べて厚くなった特殊な領域が観察された (図 2)。この特殊な領域は通常の領域と比べて、エオシンで強く染まることから、タンパク質が豊富に存在することが示唆された。また、特殊な領域は他の領域よりも Phalloidin で強く染まることから、アクチン繊維が豊富にあることが示唆された。また、これらの結果および核染色から、特殊な領域は複数の細胞からなる細胞塊であることも明らかになった。

特殊な領域は長径が 70 μm 以上の卵母細胞 (前卵黄形成期前期の中頃) を囲む濾胞上皮において他の領域と明瞭に区別でき、卵形成の進んだ卵黄形成期後期の濾胞上皮でも確認することができた。このことから、この特殊な領域は卵形成過程のごく初期を除く、ほとんどの段階で卵母細胞の近傍に存在していることが明らかになった。

濾胞上皮の特殊な領域が常に濾胞孔の反対側という特定の位置に存在する点やタンパク質を豊富に有しているという示唆から、この特殊な領域は卵母細胞に対して卵形成に関わる物質を供給する機能を担っている可能性が考えられる。そこで、Vasa タンパク質に着目して免疫抗体染色を行なった。Vasa タンパク質は、ショウジョウバエなどの昆虫では哺育細胞で作られた後に卵母細胞へ輸送され、生殖細胞分化に関わる。また、その変異体では卵形成に障害が生じることが知られている。ヤマトタマヤスデの観察の結果、濾胞上皮では特殊な領域にのみ Vasa タンパク質の分布が認められた。この特殊な領域に Vasa タンパク質が分布していることから、この特殊な領域が卵形成に関する重要な機能を果たしている可能性がさらに高くなった。

今後は透過型電子顕微鏡や *in situ* hybridization などの手法を用い、ヤマトタマヤスデの濾胞上皮における形態学的特徴および機能の解明をさらに進めてゆく予定である。

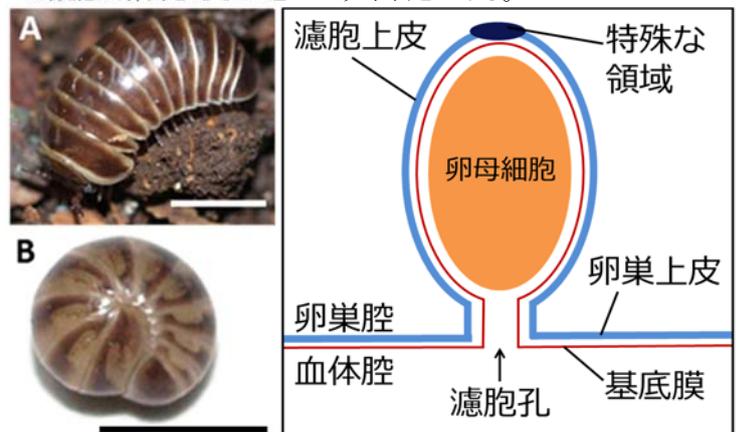


図 1. ヤマトタマヤスデ *Hyleoglomeris japonica*. A 通常時. B 防御姿勢. Scales: 10 mm.

図 2. ヤマトタマヤスデの卵母細胞と濾胞上皮の概略図.

生き方は、変えられる！～ヒトデにおける非採餌型幼生の進化～

赤坂 萌美（筑波大学 生物学類） 指導教員：和田 洋（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

海産無脊椎動物の多くは、幼生が変態して成体になるという生活史を持つ。幼生期には、変態するための採餌を必要とするものがほとんどだが、採餌を行わず変態する非採餌型の幼生もいる。非採餌型幼生は採餌型幼生から進化したと考えられており、その進化は様々な系統で複数回、独立して生じている。採餌型から非採餌型への進化の中で最も重要なステップは、採餌せずに成体原基形成を開始させるという変化である。本研究の目的は、この変化を引き起こす、言わば「生き方を変える因子」を探し、非採餌型幼生の進化のステップの一つを明らかにすることである。

このような因子を探索する手法として、採餌型と非採餌型の種間で遺伝子発現を比較していく方法が考えられる。しかし、採餌型と非採餌型の種は発生様式が大きく違うため、探したい因子を絞り込むのは難しい。そこで本研究では、交雑が可能な、ヒトデ綱モミジガイ属のモミジガイ (*Astropecten scoparius*) とヒラモミジガイ (*Astropecten latespinosus*) を用い、2種を交雑して発生する Hybrid 幼生を使うことで問題の解決を図る。

採餌型種であるモミジガイの卵を非採餌型種であるヒラモミジガイの精子で受精させると、生じる Hybrid 幼生は餌を与えなくても成体原基形成を開始して変態する、非採餌型になる[1]。この非採餌型 Hybrid 幼生を採餌型モミジガイ幼生との比較に用いることで、採餌型と非採餌型の間の違いをほぼ、精子から持ち込まれる遺伝子情報の違いに限定することができ、単純な種間比較よりも候補因子の範囲を大幅に絞り込むことが可能になる。

非採餌型の Hybrid 幼生では、ヒラモミジガイ精子に由来する「成体原基形成を開始させる遺伝子」が発現しており、それによって採餌せずに成体原基形成を始めるようになると考えられる。一方、モミジガイ卵に由来するその遺伝子は、採餌が行われないため発現レベルが非常に低いと推測される。卒業研究では、トランスクリプトーム解析を用いて成体原基形成開始時期の Hybrid 幼生における遺伝子の発現状態を網羅的に解析し、ヒラモミジガイに由来するものだけが発現しているような遺伝子の探索を試みた。

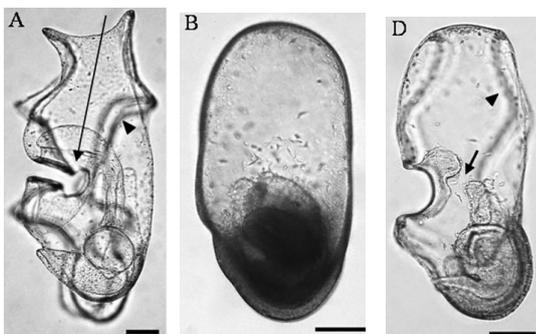


図 1：左から、モミジガイ幼生、ヒラモミジガイ幼生、モミジガイ卵×ヒラモミジガイ精子で生じた Hybrid 幼生[1]

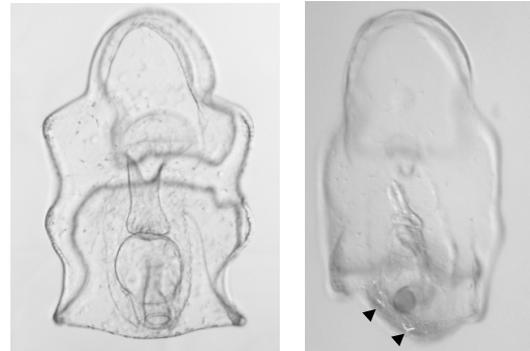


図 2：採餌無しのモミジガイ幼生(左)では成体原基形成が起きないが、Hybrid 幼生(右)では同時期にすでに形成が開始し、成体骨片がみえる(矢頭)

材料・方法

1. 採集と交雑

モミジガイ(石川県能登、福岡県津屋崎、静岡県下田)、ヒラモミジガイ(石川県能登)をそれぞれドレッジまたはシュノーケリングによって採集した。実験室内で同種および異種間での人工授精を行い、モミジガイ幼生、ヒラモミジガイ幼生、Hybrid 幼生(モミジガイ卵×ヒラモミジガイ精子)を得た。

2. トランスクリプトーム解析

成体原基形成が始まる時期の Hybrid 幼生から RNA を抽出して解析を行った。Hybrid 幼生で発現する遺伝子がどちらの親由来か知るためにモミジガイとヒラモミジガイの遺伝子の配列が必要となるので、複数の発生ステージに渡ってモミジガイ・ヒラモミジガイの幼生から RNA を抽出し、同様に解析を行った。

結果

予備調査としていくつかの遺伝子について解析したところ、モミジガイとヒラモミジガイの遺伝子の塩基配列の違いは約 5～6%であった。実際の配列を比較すると 3 塩基程度のギャップや、特徴的な違いがある領域が存在し、塩基配列からモミジガイとヒラモミジガイの遺伝子型を判別することが可能であることが分かった。また、遺伝子型判別のマーカーになるような領域を用いて、Hybrid 幼生における 2 種の遺伝子型の発現量を調べたところ、片方の遺伝子型だけが発現量が多いような遺伝子が存在していた。

現在、ヒラモミジガイの遺伝子型だけが発現しているような遺伝子を網羅的に同定するための作業を進めている。

参考文献

[1]Wakabayashi et al., Biol. Bull. 215: 89-97, 2008

アコヤガイ *Pinctada fucata* 初期発生における Wnt シグナルの役割

三木 智博 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

アコヤガイ *Pinctada fucata* のような二枚貝の祖先はかつて単板綱のような一枚の殻を持つ軟体動物であったと言われている。このような一枚の殻のみの二枚貝の祖先が、どのようにして二枚の殻を持つようになったのか。この疑問を解決する手がかりを得るために、軟体動物において機能を解明されていない遺伝子に着目した。中でも *wnt* 遺伝子は軟体動物における機能に対する知見が無く、不明である。*Wnt* 遺伝子は様々な動物の初期発生において重要な役割を持っている。例えば、*wnt* はショウジョウバエにおいて広く研究されており、この遺伝子が破壊されると翅がない表現型を持ったショウジョウバエが生まれる。*Wnt* には様々な種類があるが、そのうちの *wntA*, *wnt4* が二枚貝であるアコヤガイの初期発生のうちの殻形成に近い時期に発現することが分かっている。つまり、*wntA,4* が二枚貝の殻形成に関わっている可能性がある。

そこで、本研究では *wntA,4* が二枚貝の殻形成に関わっていることを調べるために、アコヤガイ *Pinctada fucata* の初期発生胚を用いて *wntA,4* の発現パターンを解析する。

材料・方法

1. 実験材料

・アコヤガイ *Pinctada fucata* 初期発生胚 (受精後 3, 4, 5, 8, 10, 14, 15, 22, 24 時間)

・*wntA, 4* のプライマー

2. 実験方法

・*in-situ* ハイブリダイゼーション

メタノールにつけていたアコヤガイ *Pinctada fucata* の初期発生胚 (受精後 3, 4, 5, 8, 10, 14, 15, 22, 24 時間) を PBT で洗い、20 分間 ProK で処理した後一晩 4% パラホルムアルデヒドで処理した。その後 PBT で洗浄し、ハイブリダイゼーションバッファーとともに *wntA, 4* のプローブを反応させ一晩置いた。その後 SSC を含む溶液でサンプルを洗浄し、抗体を反応させ、サンプルの発色を行なった。*in-situ* ハイブリダイゼーションは 4 回行なった。

結果・考察

1. *wntA* の発現パターン

アコヤガイの初期発生胚における *wntA* の発現パターンを以下の図に示す。



図 1. 16 細胞期の *Pinctada fucata* における *wntA* の発現の様子

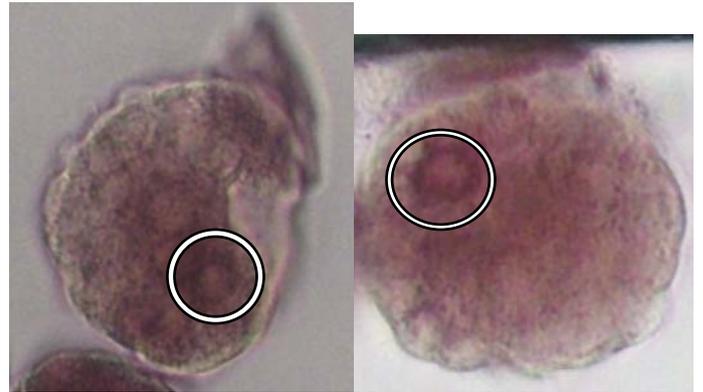


図 2 (左), 3 (右) . *Pinctada fucata* のトロコフォア幼生における *wntA* の発現の様子 (写真の上が頭部)

図 1 より、16 細胞期には A 割球由来の一細胞において発現している。図 2 より、陥入した貝殻腺の後方内部に発現しているのが分かる。図 3 より、原口の陥入の外側に発現しているのが分かる。以上のことより、*wntA* は A 割球の系統において発現し、貝殻腺と原口の形成に関して何らかの関係があると考えることができる。

2. *wnt4* の発現パターン

アコヤガイ *Pinctada fucata* における *wnt4* の発現パターンは発表会にて紹介する。

始原亜目甲虫ナガヒラタムシ *Tenomerga mucida* (Chevrolat, 1829) の発生学的研究

小嶋 一輝 (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

完全変態類の一群である鞘翅目は、一般に甲虫と呼ばれる前翅が鞘状に硬化したグループであり、昆虫綱の約 30% を占める、最も多様性に富む昆虫群である。したがって、地球上で最も繁栄してきた動物群である昆虫類を理解するうえで、鞘翅目は極めて重要なグループである。しかしながら、本目を構成する始原亜目、粘食亜目、食肉亜目、多食亜目の 4 亜目の類縁関係について未だ議論の余地があるなど、鞘翅目の系統進化、グラウンドプランの理解は極めて不十分である。

化石記録が鞘翅目中最古である始原亜目は比較形態、分子系統解析からも本目の最原始系統としばしば示唆されるグループであり (Beutel & Haas, 2000; Misof et al., 2014)、鞘翅目の本質的理解において重要である。系統進化、グラウンドプランの再構築においては、比較発生学のアプローチはたいへん有効であるが、鞘翅目の発生学的研究はこれまで食肉亜目と多食亜目に限られ、始原亜目に関する知見はない。

このような背景から、鞘翅目の系統進化、グラウンドプランの再構築を目的としてナガヒラタムシ *Tenomerga mucida* (Chevrolat, 1829) を材料に、始原亜目の研究を開始した。本卒業研究では、始原亜目の発生学的研究法の確立と胚発生過程の概略の把握を目指した。

材料・方法

ナガヒラタムシ成虫 (図 1) は灯火採集やスーピングで偶発的に得られるが、十分な数を確保することは困難であった。このため、内部に多数の幼虫が生息している朽木を探すことにした。結果、昆虫写真家鈴木知之氏のご協力により、2014 年 4 月 22 日埼玉県吉川市の江戸川河川敷に本種幼虫を含んだアカメヤナギの朽木を多数発見し、朽木を持ち帰った。内部の幼虫を飼育し、72 個体 (♂ 43 個体、♀ 29 個体) の成虫を得た。成虫は水で希釈したハチミツを餌として飼育し、約 300 卵 (図 2) を得た。得られた卵はブアン液にて一昼夜固定、70% エタノールで保存した。胚発生過程の観察のためには、卵殻を除去した卵を DAPI で一昼夜染色した。また、1% 四酸化オスミウムで後固定した卵を臨界点乾燥、金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡で観察した。

結果・考察

(1) 成虫の交尾・産卵行動

交尾は夜間に行われ、雌雄が反対方向を向く tail to tail 型であった。交尾後のメスは朽木表面に数十卵をまとめて産み付け、産卵は数回に分けて行われた。メス 1 個体当たりの総産卵数は最大 130 卵であった。

(2) 卵構造

卵殻は褐色で長径約 1.5 mm、短径約 0.4 mm の長回転楕円形で前極に顕著な瘤状の突起がある (図 2)。卵前極の瘤状突起としては痕跡的なものが食肉亜目のオキナワオオミズスマシで知られている (Komatsu & Kobayashi, 2012)。今回観察され

たナガヒラタムシの瘤状突起は、鞘翅目と姉妹群関係にあるとされている脈翅目 (Misof et al., 2014)、特にラクダムシ亜目のもの (Tsutsumi & Machida, 2006) に極めて酷似する、よく発達したものであった。

(3) 胚発生

DAPI 染色による蛍光観察で、胚発生過程の概略を把握することができた (図 3)。発生中期 (St. 4) の胚は卵黄内に沈み込むことが明らかになった。このような胚の卵黄内への完全な沈み込みは、他の鞘翅目の発生過程では報告されていないものである。

卵期は室温で約 10 日であり、幼虫は前極付近より孵化する。

(4) 後胚発生

卵から一齢幼虫を得た。孵化直後の一齢幼虫は直ちに朽木へ穿孔することはなく、飼育容器内を広く徘徊した。飼育を継続し、後胚発生の解明にも努めたい。

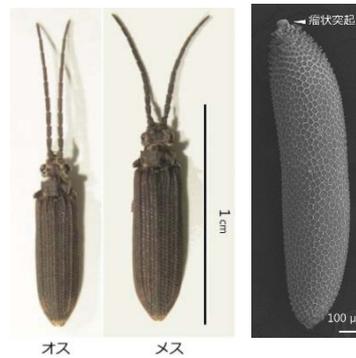


図 1. 成虫 図 2. 卵 (SEM)

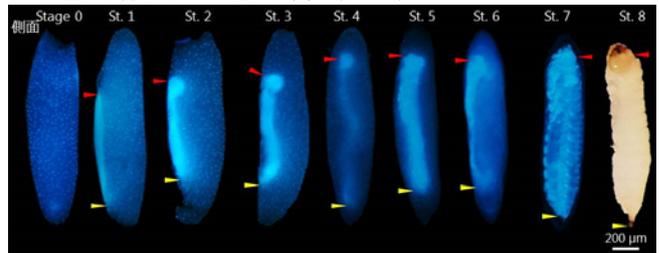


図 3. 胚発生概略 (DAPI 染色)

参考文献

- Beutel, R. G. & F. Haas (2000) Phylogenetic relationships of the suborders of Coleoptera (Insecta). *Cladistics*, **16** (1): 103-141.
- Komatsu, S. & Y. Kobayashi (2012) Embryonic development of a whirling beetle, *Dineutus mellyi*, with special reference to external morphology (Insecta: Coleoptera, Gyrinidae). *J. Morphol.*, **273** (5): 541-560.
- Misof, B. et al. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, **346** (6210): 763-767.
- Tsutsumi, K. & R. Machida (2006) Embryonic development of a snakefly, *Inocellia japonica* Okamoto: an outline (Insecta: Neuroptera, Paphidiodea). *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **41**: 37-45.

カワゲラ目（昆虫綱）の比較発生学的研究

武藤 将道（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）

1. 背景および目的

カワゲラ目は 2 亜目 16 科約 3,500 種からなる昆虫の一群であり、南半球に棲息するミナミカワゲラ亜目（4 科）と北半球に棲息するキタカワゲラ亜目（12 科）に大別される¹。日本ではキタカワゲラ亜目の 9 科が河川の源流～中流域に棲息している。

昆虫の 99% は有翅昆虫類であり、有翅昆虫類は旧翅類と新翅類に分けられる。カワゲラ目は新翅類の中でも祖先的な多新翅類の一群とされているが、その中での系統的位は不確かでコンセンサスが得られていない。このような状況で、胚発生過程の比較により形態や構造の本質（グラウンドプラン）を把握・理解し系統を推定する比較発生学的アプローチは有効な手段となる。しかしながら、発生学的な先行研究はキタカワゲラ亜目 2 科（日本に棲息しないオオカワゲラ科を含む）における詳細な研究^{2,3}と、日本に産する 5 科における断片的な研究が行われているのみで、カワゲラ目全体を網羅した研究はなされていない。

以上の背景を踏まえ、カワゲラ目のグラウンドプランの再構築および高次系統の推定を目指し、比較発生学的研究に着手した。本研究では第一段階として、日本に産するキタカワゲラ亜目 9 科の胚発生過程を追跡し、その概略を記載・比較した。

2. 材料および方法

2014 年 2 月から 12 月にかけて長野県上田市菅平高原および周辺地域でキタカワゲラ亜目 9 科のカワゲラの成虫および幼虫を採集し、飼育により採卵した。卵は種群および発生段階に応じてブアン、アルコールブアン、F. A. A.、カール、カルノアの各固定液で数分から一昼夜固定し、80% エタノールで保存した。

胚発生は、主として固定卵を DAPI（核特異的蛍光色素）により染色後、蛍光実体顕微鏡で観察し検討した。卵殻が薄く生卵の観察が容易な種群では固定前の生卵を用いた生物顕微鏡による観察も行った。また、オナシカワゲラ科とヒロムネカワゲラ科においては微速度撮影により胚の挙動（胚反転）を記録し観察した。

3. 結果

キタカワゲラ亜目 9 科の胚発生の概略の把握に成功した。おおよその基本型は以下のとおりである。まず卵の後極で胚が形成され、顎部および胸部体節が形成されるまで卵表で伸長する。その後尾部の伸長に伴い胚の大部分が卵黄へ沈み込むが、頭端および尾端は卵表にとどまる。胚は卵黄内で S 字状に屈曲し伸長を続け、最大長に達した後、尾部が卵表から離れ卵黄内に沈み込み、胚反転が起こる。胚反転後に背閉鎖が進行し、孵化に至る。

胚反転の様子はトワダカワゲラ科を除く 8 科のカワゲラで観察に成功し、ヒロムネカワゲラ科の一種 *Yoraperla uenoi* においてはローテーションを伴う胚反転が、その他 7 科では胚軸逆転型の胚反転がそれぞれ観察された。

4. 考察

先行研究^{2,3,4}では、1) 胚が顎部および胸部体節形成まで卵後半の卵表で伸長を行う、2) 伸長した胚が尾部の伸長に伴い卵黄へ沈み込む、3) 胚の頭端および尾端は胚が最大長に達するまで卵表に

とどまる、という 3 つの特徴（図 1. 上段）が報告されている。本研究によって、今まで知見のないキタカワゲラ亜目 4 科の胚発生が明らかとなり、3 つの特徴が日本に産する 9 科を含めた 10 科に共通することが分かった。これらの発生形質はキタカワゲラ亜目のグラウンドプランと考えられる。また上記の、卵表での胚伸長は多新翅類の固有派生形質の一つであることから、カワゲラ目が多新翅類の一群であることが強く示唆される。

ヒロムネカワゲラ科の一種 *Y. uenoi* において観察されたローテーションを伴う胚反転（図 1. 下段）は、オオカワゲラ科の一種における研究³でも報告されている。両科は形態¹・分子⁶双方から近縁性が支持されており、この特異な胚反転は両者の共有派生形質であると考えられる。また、両者の卵は背腹方向に扁平である点で共通しており、ローテーションを伴う胚反転と扁平な卵形態の関連が示唆される。さて、背腹方向に扁平な卵形態が胚軸の逆転に影響することでローテーションが起こるとすれば、この胚反転様式は胚軸逆転型の胚反転の変形とみなせる。したがって、この 2 科を含むキタカワゲラ亜目における胚反転様式の基本形は、胚軸逆転型であることが示唆される。

本研究ではキタカワゲラ亜目 12 科のうち 10 科の胚発生過程に共通する 3 つの特徴を見出した。これらがカワゲラ目のグラウンドプランであるか検証するためには知見が全くないミナミカワゲラ亜目の研究が不可欠である。また、外部形態の観察に加えて切片作成による組織学的検討や電子顕微鏡による微細構造の観察といった多角的なアプローチにより、カワゲラ目のグラウンドプランの再構築に向けた検討を行っていきたい。

参考文献

- Zwick, P. (2000) Annu. Rev. Entomol. 45: 709-746.
- Kishimoto, T. & Ando, H. (1985) J. Morphol. 183: 311-326.
- Miller, A. (1939) J. Morphol. 64: 555-609.
- Kishimoto, T. (1997) In: Landolt, P. & Sartori, M. (Eds). Ephemeroptera and Plecoptera: Biology-Ecology-Systematics. 21-25. Switzerland.
- Mashimo, Y. *et al.* (2014) J. Morphol. 275: 295-312.
- Thomas, M. A. *et al.* (2000) PNAS. 97: 13178-13183.

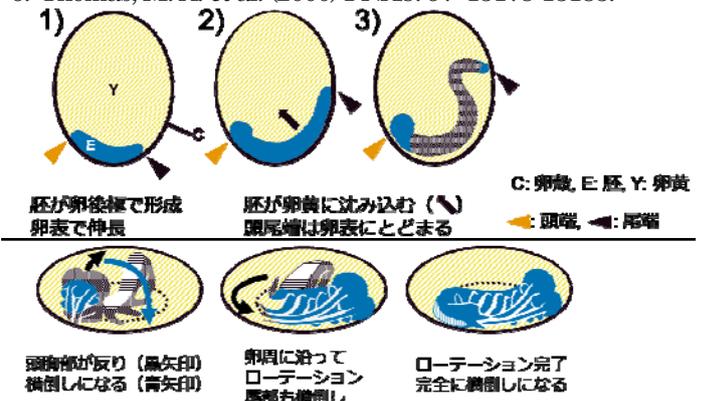


図 1. キタカワゲラ亜目 10 科に共通する発生形質（上段）およびローテーションを伴う胚反転（下段）の模式図

土壌攪乱と刈取りが半自然草原の低茎草本多様性に与える効果

小黒 和也 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 田中 健太 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

日本の気候下では、ほとんどの草原は放置すれば遷移が進んで森林となる。しかし、自然攪乱や人為攪乱によって草原が生成・維持されるため、縄文時代以降の日本列島の約1~3割を草原が占めてきたと考えられている。それが現在、人為的に自然攪乱を抑え、草原管理も放棄されているため、草原面積は1%未満にまで急速に減少している。現存する草原の中で、大規模な地形改変や外来牧草種子吹きつけを伴わない比較的古いスキー場は、多数の絶滅危惧植物が生息する半自然草原となっている。しかし通常の年一回の刈取りだけでは、しだいに高茎草本の優占度が増えて低茎草本が減り、それに依存している動物等も減ると考えられる。本研究は、低茎草本を含む多様性の高い半自然草原を低労力で保全することを最終的な目標とし、人為的な土壌攪乱と刈取りが植物の多様性に与える効果を操作実験によって検証した。また、野生のイノシシが行っている土壌攪乱も植物の多様性を維持する効果があるのか、あわせて調べた。

【方法】

長野県須坂市峰の原高原スキー場に 2×2m コドラートを 1m 間隔に 15 個設置し、次の3つの処理を各5コドラートに施した。

1) 対照区: 通常管理通り、2013年10月に地際高で刈取りした。2) 二回刈取り区: 2013年10月の地際刈取りに加えて2014年7月に高さ20cmで刈取りした。3) 耕起区: 2013年10月に20cmの深さまで耕耘機で耕起した。各コドラートを4つのサブコドラートに分割し、計60個のサブコドラートで、2014年6・8・9月に維管束植物各種の存在と繁殖の有無を調べた。二回刈取り区の二回目の刈取りの際、刈取った各種の乾重を量った。さらに9月の調査の後、全サブコドラートの各0.1×1mを地際から刈取り、各植物種の乾重を量った。また、イノシシによる土壌攪乱跡を7カ所探索し、攪乱地の中と外に1×1mコドラートを各攪乱地に2~4、計40設置した。全コドラートで、維管束植物各種の存在と繁殖の有無を2014年9月に調べた。

植物種数・繁殖植物種数・各低茎草本種の個体数・各低茎草本種の乾重に対する操作実験の各処理またはイノシシ攪乱の効果をも、一般化線形モデルによって解析した。種数・繁殖種数・各種個体数はポアソン分布、各種存在・繁殖有無は二項分布、乾重は正規分布を仮定した。

【結果・考察】

秋の刈取りでは、優占種のススキの乾重と総乾重が、操作実験の二回刈取り区・耕起区で大きく低下した(図1)。また、アキノキリンソウの乾重が二回刈取り区・耕起区で減少し、ミツバツチグリ・ヤマハギ・ニガナの乾重が耕起区で増加した。出現率は、二回刈取り区でヨツバヒヨドリが増加し、耕起区でスミレ属 sp.が増加してアキノキリンソウが減少した。イノシシ攪乱区では出現率が有意に変化する種はなかった。繁殖種数は、二回刈取り区・耕起区で低下し、イノシシ攪乱区では変化がなかった。個別の種の繁殖を見ると、ススキ・オオバキボウシ・スズラン・アザミ・ヤマハギ・オオヤマフスマ・アキノキリンソウの繁殖が二回

刈取り区・耕起区で減少し、ミヤマニガイチゴが二回刈取り区、ワレモコウが耕起区で増加した。またイノシシ攪乱区ではエゾリンドウ・タチコメグサの繁殖が増加した。

このように、攪乱処理によって最も優占するススキや比較的優先度の高いアキノキリンソウの存在量や繁殖が抑えられた。各処理区に対する反応は植物によって異なり、ミツバツチグリのように根茎から再生する種は耕起区で強かった。希少種であるキキョウの個体数も耕起区で増加した。今回は攪乱処理によって繁殖には総じて悪影響があったが、二回刈取り区については刈取り時期を早めることで、耕起区については二年目以降の個体成長を待つことで、繁殖種数が増える可能性がある。一方でイノシシ攪乱区では希少種の繁殖増加が見られた。人為的な攪乱とイノシシ攪乱では植物の反応が同じではなかったが、これはイノシシの攪乱には根茎の食害が伴うことが関係しているかもしれない。

サブコドラート数の増加によって種数がどのように増加するかを検討したところ、7サブコドラート以上では耕起区の種数が対照区よりも多かった(図2)。耕起区と他の処理区を混合した場合も対照区に比べて種数の増加が著しかったが、耕起区単独の場合とは大きく違わなかった。耕起処理は多くの植物種に生息場所を提供する効果が大きいと言える。耕起後の植物の繁殖開始に時間がかかることを考慮すると、耕起処理と他の処理を混合させる管理によって多様性の高い草原を保全できると考えられる。

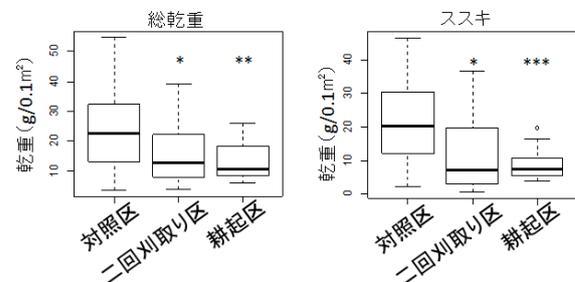


図1 各処理区の総乾重(左)とススキの乾重(右)。対照区と有意な差がある処理区を*で示す。(***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

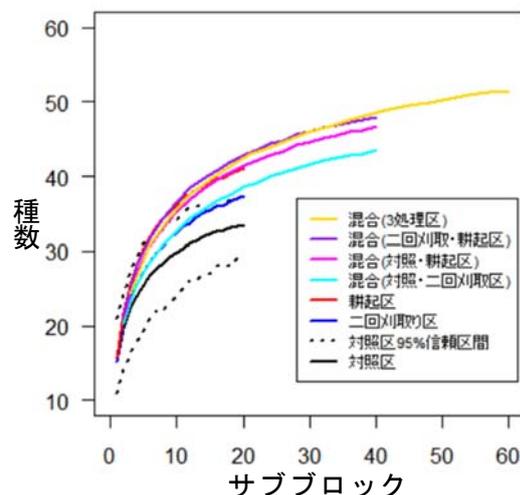


図2 サブコドラート数と累積種数の関係。サブコドラートを1000回リサンプリングして平均(実線)と信頼区間(点線)を求めた。

斜面土砂移動地における地中生節足動物相の解明

長澤 亮 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 田中 健太 (筑波大学 生命環境系)

【目的】

これまで行われてきた自然撓乱と生物に関わる多くの研究で、生物群集や生物多様性を維持・形成する原動力として撓乱の役割が注目されてきた。本研究では、防災の観点から近年関心を集めている土砂移動が、自然撓乱として生物多様性に与える影響に着目した。土砂移動が植物群集に与える影響は調べられてきたが、動物群集への影響はよく分かっていない。そもそも地中に生息する動物の採集が困難であることが研究の発展を妨げていたが、近年開発された地中トラップ (吉田 2012) によって地中生節足動物を簡便に採集することができるようになった。土砂移動地の地中で未発見のまま眠っている可能性が高い節足動物相を明らかにし、それらがどんな所に特に多いのかを解明することは、生物多様性の理解のためにも、生物多様性を考慮した生態系管理のためにも重要である。そこで本研究は、1) 斜面土砂移動地における地中生節足動物相、2) 地中生節足動物の地理的分布、3) 地中生節足動物の生息環境選好性、の解明を目的とした。

【方法】

菅平周辺・八ヶ岳・南アルプス・奥秩父の4山域で夏期と秋期の2度調査を行った。夏期調査では、地中生節足動物が生息する斜面土砂移動地を探索するため、各山域の4~8斜面土砂移動地を調査地とし(計28調査地)、各調査地に深度50cmの穴を2m以上の間隔を空けて8つ掘り、各穴に1個の地中トラップ(図1)を設置した(計224トラップ)。トラップには誘引物質として蚕のサナギ粉を入れた。これらのトラップは2014年6~8月に設置し、約1か月後に捕獲物を回収した。秋期調査では、節足動物の生息地選好性を明らかにするため、夏期調査で節足動物の捕獲数が多かった斜面土砂移動地を、1山域あたり2~3選んで調査地とした(計11調査地)。各調査地において、土砂移動地内に3~6穴、対照区として土砂移動地外に3穴を2m以上の間隔を空けて設け、各穴の深度0・25・50cmに1個ずつの地中トラップを設置した(計258トラップ)。これらのトラップは2014年8~10月に設置し、約1か月後に捕獲物を回収した。夏期・秋期とも節足動物門全個体を綱まで、ヤスデ綱・ムカデ綱以外を目まで、コウチュウ目を科まで同定した。近縁種と比べ、眼の退化か体色の退化の少なくともどちらかの特徴を示す個体を「形態的地中生節足動物」(以下、地中生)と判定した。

トラップあたりの個体数・分類群数に対する、山域・斜面土砂移動地内外・土壌深度・礫粒径の効果を一般化線型モデル(個体数は負の二項分布、分類群数はポアソン分布を仮定)で解析し、AICに基づくモデル選択を行った。

【結果・考察】

節足動物門5綱16目30303個体を採集し、うち7科359個体が地中生だった。地中生の14種以上が未記載種の可能性があった。このうちタマキノコムシ科・エンムムシ科・オサムシ科の5種(図2)は、共同研究者とともに記載論文を準備中である。

地中生コウチュウ目の個体数・科数は南アルプスで多く、地中生以外のコウチュウ目の個体数・科数は奥秩父で多かった。

節足動物門の個体数・分類群数は、礫粒径が大きいほど多かった。一方、地中生タマキノコムシ科の個体数は礫粒径が小さくなるほど多く、分類群間で礫粒径の選好性が違うことが分かった。また、深い土壌ほど地中生コウチュウ目の個体数が多く、地中生以外のコウチュウ目の個体数・科数が少なかった。斜面土砂移動地内の方が外よりも節足動物の個体数・分類群数が多かった。

以上のように、斜面土砂移動地の特に地中に、未解明で膨大な節足動物の多様性が存在することを明らかにした。砂防や流域保全などの生態系管理の上でも、これらの生物多様性を考慮することが望まれる。

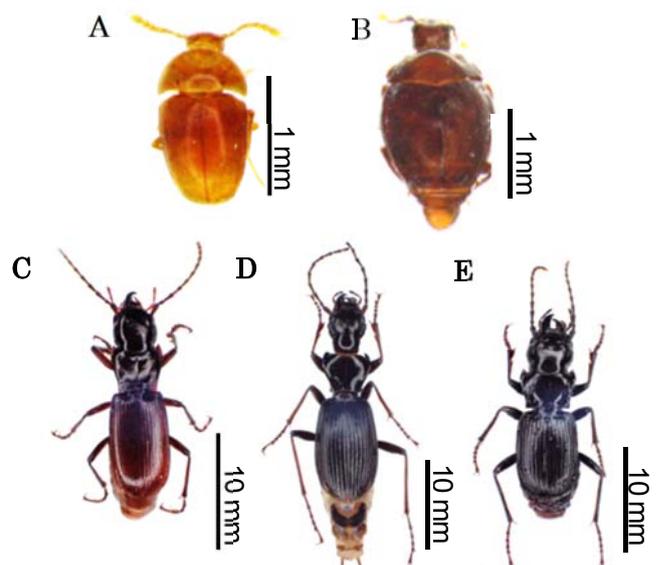


図2 形態的地中生節足動物の、A タマキノコムシ科 (*Sciaphyes* sp.)、B エンムムシ科 (*Anapleus* sp.)、C オサムシ科 (*Pterostichus* sp. 1)、D オサムシ科 (*P.* sp. 2)、E オサムシ科 (*P.* sp. 3)

【参考文献】

吉田 (2012) 地中トラップによる地下浅層性昆虫の採集法, 昆虫と自然 47:6-13



図1 地中トラップ

森林と草原における埋土種子相評価方法の検討

南條 智美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 田中 健太 (筑波大学 生命環境系)

<背景>

埋土種子とは地上の環境が発芽に適したものになるまで土壤中に休眠している種子のことであり、地上部の光・温度条件等の合図によって発芽して次世代に寄与する。埋土種子には季節的なものと永続的なものがあり、永続的なものは長いもので数十年も土壤中で生存していることが知られている。埋土種子の種組成は過去の植生を反映しているため、過去の植生復元や絶滅危惧種の個体群回復のための種子源になり得る。

そのため埋土種子を利用した緑化事業が各地で行われているが、埋土種子からどんな植生が成立するのか事前に予想する必要がある。埋土種子相の評価法として先行研究では、(1)発芽させて実生の種同定を行う発芽法、(2)種子を土壤から取り出して形態的に分類する直接分離法、が用いられてきた。しかし、全ての種子の休眠解除、小さい種子の発見、種子・実生の種同定、等の難しい点があった(表1)。本研究では、多数の絶滅危惧植物が分布しその保全が課題となっている菅平高原の森林と草原において、複数条件を用いて欠点をできる限り解消した発芽法による埋土種子評価を行い、発芽法の手法の検討を行うとともに、各植生で明らかになった埋土種子相の特徴を比較した。

表1 発芽法と直接分離法の特徴。

	発芽法	直接分離法
小さい種子	○	×
休眠種子	×	○
かかる時間	半年～1年	数日
同定しやすさ	難	難
評価	過小	過小

<方法>

調査地は、長野県の筑波大学菅平高原実験センター内の林齢約45年のアカマツ林と、峰の原スキー場の半自然草原とした。2014年5月に、各調査地に80mのトランセクトを敷き、10m間隔の各9地点においてリター層を含まない30×60×深さ3cmの土壤を採取した。二つの調査地ごとに採取土壤全てをよく混ぜ合わせ、3処理×18反復の発芽実験に供した。(1)温室処理: 気温の日較差を大きく出すため、窓を開放したガラスハウスの中で5月～11月に行った。(2)圃場処理: 野外と類似した環境にするため、センター内の圃場で5月～11月に行った。(3)インキュベーター処理: 冬を模した冷湿処理を2ヶ月施した後、8月～11月にインキュベーター内で5℃から35℃まで1週間ごとに5℃上昇させた後、35℃から5℃まで1週間ごとに5℃降下させた。いずれの処理でも、1反復あたり30×10×厚さ1cmで採取土壤をトレーに撒き出し、発芽個体数を2週間に一度記録し、種同定ができた時点で実生を引き抜いた。(1)と(2)では外部からの種子侵入を防ぐために0.1mmメッシュのネットをかぶせ、(1)と(3)では水やりを行った。また調査地に2×2mの方形区を森林に9箇所、草原に10箇所設け、地上の現存植生を調査した。

<結果と考察>

実生の同定は難しく、イネ科の4種とそれ以外の7種を不明種として扱い出現種数に含めた。3条件を合わせると、森林で670個体(34種)、草原で2941個体(46種)が発芽した。温室処理の発芽率は高く、出現種のほとんどが含まれていたが、インキュベーター処理にしか出現しなかった種も2種あった。反復が増えると種数はどのように増加するのかシミュレーションした結果、どの処理でも18反復では種数は飽和せず、もっとたくさんの量の土壤が発芽法には必要であることが分かった(図1)。

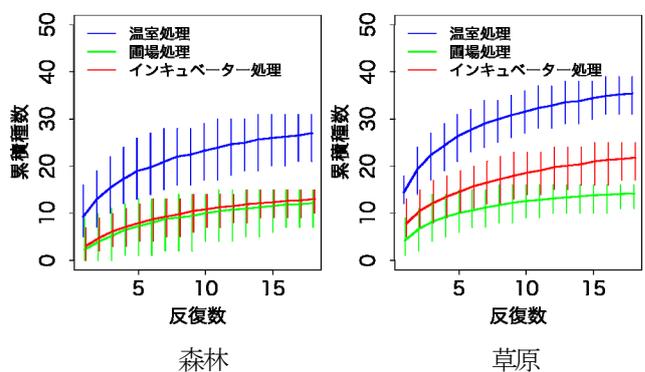


図1 森林と草原における反復数と累積種数の関係。重複を許してリサンプリングするシミュレーションを1000回行って平均値(太線)と95%信頼区間(細線)を求めた。見やすいように処理ごとに横軸をややずらして表記している。

いずれの植生でも埋土種子相は現存植生と大きく異なった。現存植生と比べ、埋土種子相は森林では木本より草本の割合が有意に大きく、草原ではカバノキ属・ヤナギ属など木本の割合が比較的大きかった。また埋土種子相は森林でも草原でも、種子サイズが小さい種(2mm未満)が有意に多かった。一般に、遷移初期に出現するパイオニア種ほど種子サイズが小さく種子散布範囲が広く明条件下で発芽しやすいため、これらの埋土種子が森林でも草原でも土壤中に多く含まれ、かつ今回の発芽条件下で発芽率が高かったのだろう。また、森林の埋土種子相には液果を生産する種が有意に少なく、草原には現存植生にも埋土種子相にも液果を生産する種がほとんど存在しなかった。一般に液果種子の発芽には、種子散布する動物の体内を通過することが必要である場合が多い。そのように特殊な休眠性を持っているために、今回の発芽実験では液果種子の休眠を解除できなかったのかもしれない。

以上のように、今回の研究により発芽法の各条件の有効性と必要土壤サンプル量、また森林と草原における埋土種子相の特徴についての理解を進めることができた。発芽法には大量の土壤が必要であること、一部の種の休眠打破が難しいこと、実生同定が困難であることも分かり、DNAメタバーコーディングなどの新しい手法を併用することが有効だろう。

自動開閉システムを用いた森林における土壌呼吸速度の時間的変動と変動要因の解析

藤巻 素直 (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】

森林の炭素吸収能力は高く、陸域の炭素貯留において重要な役割を果たしている (Panet et al, 2011)。森林生態系では植物体と土壌が主な二酸化炭素の貯留場所である。特に森林土壌の炭素貯留量は、大気中の二酸化炭素量に匹敵するとされている

(Watson et al, 2000)。また土壌は有機物分解の場でもあり、植物の根の呼吸と合わせた森林の土壌から放出される二酸化炭素 (以下、土壌呼吸とする) 量は、森林生態系全体から放出される二酸化炭素量の半分を占めるとの報告もある (Valentini et al, 2000)。そのため、土壌から放出される二酸化炭素量の正確な推定は、森林生態系全体の炭素収支予測に不可欠である。土壌呼吸は、気候帯や植生といった地域による空間的な違いに加えて、温度や水分の影響を受けて、時間的に変化することが知られている。しかしながら、それらの環境要因から土壌呼吸量を高精度に予測するには至っていない。その主な理由として、未だに土壌呼吸と環境要因の観測データが不足していることがあげられる。先行研究のなかには、土壌呼吸を1日に1, 2回測定し、それを季節ごとに行うことで、土壌呼吸量の年間値を推定しているものも少なくない。しかし、近年の研究によって土壌呼吸と環境要因の関係は、測定時期によって変化することも報告されている (Curiel et al, 2004)。これらを踏まえると、土壌呼吸は環境要因とともにより細かい時間スケールで変化している可能性もあり、それを明らかにしたうえで環境要因との関係を検証していくことが不可欠である。

そこで私は、より細かい時間スケールで土壌呼吸速度を連続的に測定することが可能な自動開閉式システムを用いることによって土壌呼吸の時間変化特性の把握とそれらに影響を及ぼす環境要因を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】

筑波大学菅平高原実験センター内のアカマツ林とアカマツ-ミズナラ混交林 (以下、混交林とする) で調査を行った。両林分は、人為的な管理によって維持されてきた草原において、人為的管理を停止することによって形成された二次林であり、それぞれ4 ha程度の広さを有する。前者はアカマツが優占する最大樹齢約47歳、後者はアカマツに加えてミズナラやシラカンバも優先する最大樹齢約67歳の林分である。両林分は同一平地上に隣接している。

土壌呼吸の自動連続測定は、これら二つの林分を含む形で設置されている固定調査区 (50×200 m) で行った。測定には自動で開閉し、かつ測定チャンバーを変更する測定装置 (AOCC: 右上写真) と赤外線ガスアナライザ (IRGA) を用いて行った。期間は2014年4月から11月までの間、装置の問題によってデータが得られなかった場合を除き可能な限り連続して行った。同時に同期間、表面下5 cmの土壌温度、高さ2.5 mにおける光量子密度を測定した。



調査地マップ (左) と自動開閉式測定装置 (右)

【結果・考察】

土壌呼吸は各林分においてそれぞれアカマツ林で約 54 日分、混交林で約 80 日分測定することができた。

土壌呼吸速度は先行研究で示されていたように土壌温度と正の相関がみられた。しかし両林分で土壌呼吸速度の温度感受性が異なっていることが分かった。土壌温度が低い時ではアカマツ林、土壌温度が高い時では混交林のほうが土壌呼吸速度は大きかった (図1)。また混交林は非常に大きなバラつきがみられた。

一方、土壌呼吸と環境要因の日変動を見ると、土壌呼吸速度と土壌温度は明確な日変動パターンを示すが約 4 時間両者のピークがずれていることがわかった。また土壌呼吸速度のピークは光量子密度のピークに近いことがわかった (図2)。

また融雪時期付近において両林分で土壌呼吸速度が大きく異なっていた。これは常緑樹であるアカマツが優占するアカマツ林では混交林に比べ林床に届く光の量が少なく融雪時期が遅かったためであると考えられる。

以上の結果より土壌呼吸速度は長期的には土壌温度と正の相関がみられるが日変動のような短期間の土壌呼吸速度の変動を説明するには土壌温度だけでなく光などその他の環境要因との関係をさらに検討していく必要がある。

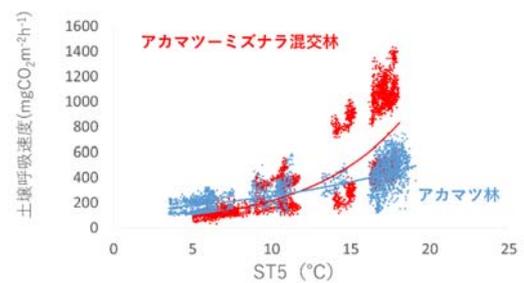
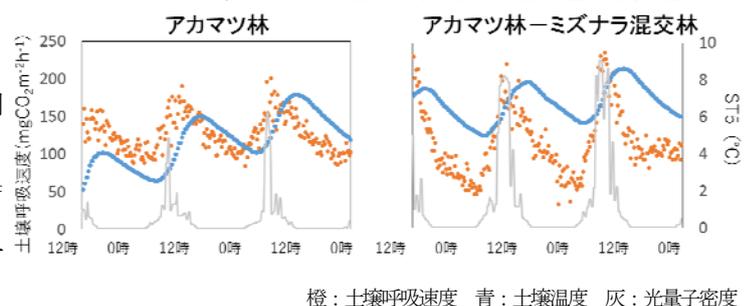


図1 両林分における土壌呼吸速度の土壌温度感受性



橙: 土壌呼吸速度 青: 土壌温度 灰: 光量子密度

図2 両林分における土壌呼吸速度の日変動 (4月25日～)

長野県ブナ成熟林における更新の手がかり

—ブナ実生と光環境に着目して—

島田 佑允 (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】

冷温帯では、森林は遷移が進行するとブナなどが優占する落葉広葉樹の成熟林へと移り変わっていく。一般的に成熟林では、雪害、風害、さらに落雷などの攪乱によって形成されるギャップによって次世代が更新するとされる。これをギャップダイナミクスといい、古くから研究がなされてきた (山本, 1984)。しかし、次世代を担う種子が育つ林床が、植物に覆われていることがある。特に、冷温帯のブナ成熟林では林床がササに覆われており、ギャップが形成されたとしても、ブナ実生がササに成長が阻害され更新が起りにくいという報告がなされている (中静, 1985)。その主因の一つとして、ササが林床で優占することによって、ブナ実生の生残に必要な光環境の悪化が挙げられる。したがって、ギャップダイナミクスにとって重要な実生の生残や成長を考えるうえで、ササ等の林床植生による光環境を把握することは重要である。今回研究の対象地とした長野県のカヤノ平は、林床がササに覆われているブナ成熟林である。しかし同一林内でもササがほとんど生育していない場所もあり、ササの有無によって光環境も異なるはずである。そこで、ブナ実生と光環境との関係を明らかにするために(1)まず林内全体のブナ実生の生存状況を調査し、カヤノ平ブナ成熟林の更新が現状でどのように進んでいるのかを考察した。そして(2)ササの有無による林床の光環境の違いを測定し、ブナ実生の生存状況に対する林床の光環境の影響を考察した。(3)また、光環境に加えて調査区プロットから一定範囲内に位置するブナの成木の分布とブナ実生数の関係も検討した。

【方法】

調査は長野県高井郡木島平村の東南に位置する、カヤノ平のブナ成熟林 (標高 1500 m) で行った。この林内に設置されている固定調査区 (100 m x 100 m, 環境省モニタリングサイト 1000 登録サイト) において、5m 四方の調査プロットを 25 箇所、20 m 間隔で設定した。さらに、各プロットを 4 分割し、合計 100 箇所のサブプロットを用意し、以下の調査を行った。

○ブナ実生の現状調査とササ調査 (2014 年 8 月中旬)

ブナの現状を調査するためにブナ実生の個体数と個体情報 (年齢、高さ、食害の有無) を記録した。またササに関しては被度 (6 段階で評価) と稈密度の測定を行った。

○光環境 (2014 年 8 月下旬)

ブナ実生の高さを想定した地上 10 cm と、ササの高さを想定した地上 130 cm の積算光量子量の測定を行った。またササ以外の木本などによる庇陰を評価するために全天写真の撮影 (1.3 m と 6 m の高さで撮影) を行った。

○光環境以外の環境要因 (10 月中旬)

母樹からの実生数を推定するためにサブプロットの中心から半径 5 m 以内のブナ成木の距離と胸高直径 (DBH) と結実の有

無を調べた。

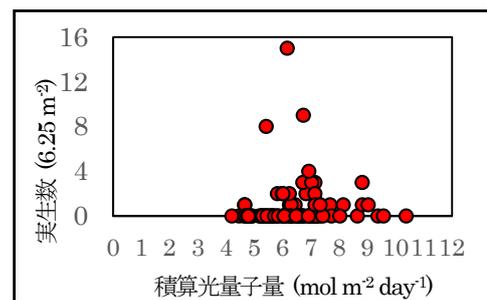
【結果・考察】

設定したプロット 25 ヶ所で合計 76 個体のブナ実生が確認された。年齢別でみると 3 年生のブナ実生が多く、当年実生は非常に少なかった。

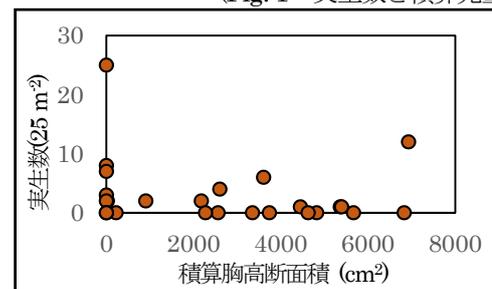
サブプロット 100 箇所のブナ実生の密度と高さ 10 cm で計測した積算光量子量の関係をみたところ、調査区内において積算光量子量のばらつきは小さかった。ブナ実生数と積算光量子量に有意な相関はみられなかった (Fig. 1)。この結果よりササによる林床の光環境の違いはブナ実生数に影響を与えないことが示唆された。

ブナの成木の分布と実生数の関係については、DBH より算出した胸高断面積 (BA) を積算した値を用いて調べた。その結果、ブナ実生とブナの成木の分布に有意な相関はみられなかった。ブナ実生は周囲にブナの成木が分布していなくとも数多く定着する可能性があることが明らかになった (Fig. 2)。

以上の結果より、この時期のブナ実生の定着は、光環境の影響を受けているとは考えられなかった。しかし今回調査した時期は展葉が完了した夏季の林内であったので、積算光量子量のばらつきが小さかった可能性が高い。ブナ実生は展葉前の春季の光によって葉の葉緑素量を増やすことで、展葉後の夏季の弱い光環境下で生長しているという報告もあり (西本, 2012) このことを踏まえると、ブナの実生の定着・生育と光環境に関して、ササの有無の影響が大きい夏以前の光環境のほうがより影響を与えている可能性がある。



(Fig. 1: 実生数と積算光量子量)



(Fig. 2: 実生数と積算断面積)

静岡県下田市鍋田湾内に来遊する死滅回遊魚の生息地選択

沖 隆宏 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 今 孝悦 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

日本列島の太平洋岸を北上する黒潮は、種々の海洋生物を北方へと輸送する。温帯域の沿岸では、黒潮に運ばれた熱帯性魚類が夏季に来遊し、着底、成長を経て、冬季の低水温で死滅する事が報告されている(桑村 1980)。このような魚種は海流に乗って本来の分布域とは異なる場所で生活し、生息の条件の悪化に伴って死滅する事から死滅回遊魚と呼ばれる。

近年の海水温上昇に伴い、そうした熱帯性魚類が死滅することなく、分布域を北上させつつあることが報告されている(西田ら 2005)。

本来、熱帯性魚類の多くは、熱帯サンゴを餌場や住処として利用し、それを嗅覚や視覚を用いて生息地選択している。しかし、熱帯サンゴが分布していない温帯域では、異なる要素を生息地として選択していることが予見され、その詳細な生息地選択機構の解明は、生物分布の北上を理解する一助となるであろう。

本研究では、静岡県下田市鍋田湾内に来遊する死滅回遊魚の生息地選択様式を明らかにするため、1) 潜水調査にて死滅回遊魚の種や来遊時期、海底環境を把握し、2) 水槽実験にて生息地選択に用いられる要素を特定した。

【方法】

①潜水調査

○調査地: 伊豆半島南部の下田市鍋田湾内 2 か所 (船着き場および志田ヶ浦)

○期間: 2014年6月~11月

○方法: ライトランセクト (幅1m×長さ20m)をランダムに3ヶ所設置し、ライン上を泳いで区画内に現れた魚種ごとの個体数および全長を目視にて記録した。野外で判別不可能なものは写真撮影し、研究室にて同定した。個体数の調査地間、季節間の相違を二元配置分散分析にて求め、種組成の類似度をクラスター分析で求めた。

また、区画内に1m²のコドラートをランダムに5か所設置し、海底の構成要素(岩、礫、砂、サンゴ、カジメ、ホンダワラおよびその他海藻)の割合を算出した。地点間の海底構成要素の組成類似度をクラスター分析で求めた。

②選択実験

○材料:

ソラスズメダイ *Pomacentrus coelestis* (全長 4±1 cm、n=30)

○期間: 2014年11月~12月

○方法: 屋外水槽に180×60×45 cmの区画を設け、両端に海底の構成要素(同種魚、異種魚、転石、温帯サンゴ、カジメ)を透明の穴あきケースに入れて配置した。中央に対象魚を放ち、5分後に定位していた場所を記録した。これを全要素の組み合わせで試行し、対象魚が選択する要素を調べた。検定には χ^2 検定を用いた。

【結果】

①潜水調査

調査期間を通して合計56種1919個体が観察された(船着き場: 45種765個体、志田ヶ浦: 44種1154個体)。総個体数は調査地間で有意に志田ヶ浦の方が多く($p=0.0002$)、季節間においても有意な差($p=0.008$)が認められた。このうち死滅回遊魚は11種269個体(船着き場: 7種80個体、志田ヶ浦: 8種189個体)が含まれ、その92.57%がソラスズメダイで占められていた。死滅回遊魚の総個体数は、有意に志田ヶ浦の方が多く($p=0.01$)、季節間においても有意な差($p=0.0002$)が見られた。これらは7月末より出現して9月まで増加し、10月末以降に激減した。クラスター分析の結果、種組成が船着き場と志田ヶ浦で明瞭に区別された。

海底構成要素は岩、転石、砂、カジメ、ホンダワラ、その他海藻、温帯サンゴに大別され、志田ヶ浦にのみ温帯サンゴ、カジメが見られた。クラスター分析の結果、海底環境は船着き場と志田ヶ浦で明瞭に分かれた。

②選択実験

海底構成要素の内、有意に選択されたのは同種魚($p=0.02$)と温帯サンゴ($p=0.01$)であり、異種魚と転石、カジメには選択が見られなかった($p>0.05$)。同種と温帯サンゴでは温帯サンゴが有意に選択された($p=0.02$)。

【考察】

潜水調査の結果、死滅回遊魚の殆どがソラスズメダイで占められており、他の死滅回遊魚の種数と個体数は、これまでの下田湾内で報告されている数量(松岡 1972)に比べ少なかった。これは、2014年の黒潮が伊豆半島を逸れるように蛇行し、来遊するソラスズメダイ以外の死滅回遊魚の個体数が少なかった事、さらに、夏季海水温が例年よりも低く、台風の影響(平田ら 2011)により死滅回遊魚が定着しにくかった事の2つの原因があったものと推測される。

また、死滅回遊魚の個体数は志田ヶ浦の方が有意に多かった。温帯サンゴとカジメは志田ヶ浦のみで確認され、こうした海底構成要素の相違が、個体数の差異の要因となっていることが推察される。

水槽実験の結果もこれを支持しており、死滅回遊魚は温帯サンゴを最も好んで選択することが明らかになった。一方、同種魚も選択されており、このことは、温帯サンゴに定着した個体がさらに他個体を誘引し、群れ形成が促進される事を示唆するであろう。

以上から、温帯域において、死滅回遊魚は温帯サンゴという新たな生息地を選択することで生存し、こうした生息地を足掛かりとして、分布域を拡大(北上)させていくことが示唆される。

【謝辞】

調査、実験に当たって技術職員の土屋泰孝氏、佐藤壽彦氏、品川秀夫氏、山田雄太郎氏、及び下田臨海実験センターの皆さんに協力していただきました。ここに感謝の意を表します。

造巢性ヨコエビ *Cephaloecetes* 属の未記載種についての報告

小玉将史 (筑波大学 生物学類)

指導教員：今孝悦 (筑波大学 生命環境系)

<背景>

ヨコエビとは、節足動物門軟甲綱端脚目に属する生物の総称であり、淡水・海水を問わず多様な環境に棲息している。それらは他の大部分の軟甲綱とは異なって浮遊幼生期を持たないため、分散能力に乏しく、地域的な隔離および種分化が生じやすい。したがって、ヨコエビの地域特異性は非常に高く、その分類学的研究を困難なものとしている。

Bubocorophiid group は端脚目カマキリヨコエビ科 Siphonocetini 族の下位分類群であり、*Bubocorophium* 属や *Rhinoecetes* 属等の 7 属 21 種が含まれる。それらは体長 3-10 mm 程度の小型種からなり、砂粒や小さな貝殻を固めて携行可能な巣を作り、ヤドカリのように巣を背負って生活する事が知られている。これら造巢性ヨコエビ類は、とりわけ分類学的知見の乏しい分類群であり、日本国内においては田辺湾や相模湾等で *Bubocorophium tanabensis* と *Bubocorophium macropalpus* の 2 種が報告されるのみである。我が国における Bubocorophiid group の分類学的研究は急務といえよう。

静岡県下田市鍋田湾では、以前より Bubocorophiid group が分布することが報告されていたものの、未だそれらの種同定には至っていない。本研究では、鍋田湾における Bubocorophiid group の採集・調査を行い、当グループの詳細な種同定を行ったものである。さらに、得られたサンプルの中に *Cephaloecetes* 属の未記載種と思われる個体が確認されたため、外部形態を精査し、新種記載を試みた。

<方法>

2014 年 5 月から 9 月にかけて、静岡県下田市鍋田湾内の水深約 3 m の砂底にて、エクマンバージ採泥器を用いてそこに生息するヨコエビを底砂ごと採取した。1 mm 目合いの篩を用いて、採取した底砂をふるい、篩上に残った Bubocorophiid group のヨコエビを選別した。得られたヨコエビを 70% エタノールで固定し、液浸標本とした。これを双眼実体顕微鏡下で解剖および観察し、顕微鏡カメラを用いて各部位ごとの写真を撮影し、種の同定を行った。

同定を行う中で、未記載種の可能性が高い 1 種が得られたため、解剖した各部位ごとにホイヤー氏液に封入し、新種記載に際して必要となるプレパラート標本を作成した。これを、デジタルカメラを取り付けた生物顕微鏡を用いて撮影、観察し、外部形態の特徴を記録した。その際、Bubocorophiid group の同定形質として重要な頭部や尾節の形態、各部の棘や刺毛などの形質について特に詳細に観察した。

<結果>

本調査で、鍋田湾において Bubocorophiid group のヨコエビが 2 種記録された。一方は日本での報告がある既知種 *Bubocorophium tanabensis* であり、他方は日本での報告が無い

種であった。本種は伸長した偽額角を有し、第二尾肢を有するという形質から、*Cephaloecetes* 属の 1 種である事が確認されたため、暫定的に *Cephaloecetes* sp. と名付けた。

Cephaloecetes 属は *Cephaloecetes enigmaticus* ただ 1 種からなり、オーストラリア南東海岸でのみ報告がされている。*C. enigmaticus* と比較して、*Cephaloecetes* sp. は、(1)眼点下部に長刺毛束を欠くこと、(2)第一胸脚前節掌縁部に備える棘が 2 本であること、(3)第一尾肢内肢外縁部に小棘列を備えること、等といった外部形態的な差異が認められ、*C. enigmaticus* と *Cephaloecetes* sp. を判別することが可能であった。

<考察>

現在ヨコエビ類の分類学的研究は、ほぼ全てが外部形態に基づいて行われている。特に、棘や刺毛、付属肢等の形質が重要な同定形質として用いられており、*Cephaloecetes* sp. は未記載種である可能性が高い。

本研究では *Cephaloecetes* sp. のプレパラート標本をいくつか作成したもの記載には至らなかった。今後は、本研究で作成した標本に加え、引き続き作成する予定の標本からホロタイプ及びパラタイプを指定し、その詳細なスケッチの作成や外部形態の記録を行った上で *Cephaloecetes* sp. を新種として記載する予定である。

前述した通り、日本における Bubocorophiid group のヨコエビは *Bubocorophium* 属の 2 種しか報告されておらず、本調査が国内における *Cephaloecetes* 属の初報告となる。これまで *Cephaloecetes* 属はオーストラリアでの報告しか知られていなかったが、本研究で日本にも分布していることが明らかになった。この事から、日本からオーストラリアまでの東南アジア海域にも *Cephaloecetes* 属が分布していることが予見される。日本を含め東南アジア全体において Bubocorophiid group の分類学的研究は不十分である。これらの地域には未だに多くの未記載種が存在していることが期待され、今後更なる研究が必要であろう。

図 1 *Cephaloecetes* sp.

砂に潜れば碧くなる？ —スガイの潜行とカイゴロモの着生—

徳重 江美 (筑波大学 生物学類)

指導教員：今 孝悦 (筑波大学 生命環境系)

【研究背景・目的】

地球上に暮らす生物は、捕食 - 被食、競争、共生などの様々な種間相互作用によって他の生物と結びついている。なかでも、共生や寄生などの種特異的な相互作用は、生物種間の共生系の起源や共進化の動態を理解する上で有益な知見を供するため、生態学的に重要な事象であると考えられている。

カイゴロモ *Pseudocladophora conchophera* (Sakai 1964) は、岩礁潮間帯に産する緑藻の一種であり、リュウテンサザエ科のスガイ *Lunella coreensis* (Recluz 1853) の生きた個体の殻表面にしか着生しないことが古くから知られている。しかし、その特異性が生じる機構、生態的な意義などの知見は極めて乏しく、2 種間にどのような相互作用が生じているのかも未明である。

本研究では、カイゴロモの特異的な着生の機序を解明するため、①着生基質となるスガイ殻表面の物理的な構造を観察し、②スガイの生態的な特徴を把握し、③その特徴がカイゴロモの着生及び繁茂に寄与しているかを検証することを目的とした。

【材料・方法】

実験には、スガイの他に、同所的に優占する巻貝としてニシキウズガイ科のイシダタミ *Monodonta confusa* と、近縁種として同属のカンギク *Lunella granulata* を使用した。

実験に使用した種は、カンギクを除き全て静岡県下田市鍋田湾の岩礁潮間帯で採集し、カンギクについては、沖縄県石垣島の潮間帯で採集されたものを使用した。

1. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による殻の表面比較

スガイの殻表面の 3 次元的な物理構造がカイゴロモの着生の基質特異性に寄与している可能性を検証するため、電子顕微鏡による観察を行った。

スガイ (カイゴロモの着生した個体、着生の無い個体、ヤドカリが使用していた個体)、イシダタミ及びカンギクについて、軟体部を除去した殻を水道水及び蒸留水でよく洗浄し、乾燥させた後に 1 cm³ 以下の大きさに破碎したものを試料とした。殻の最も外側にある殻皮層とその直下にある殻質層の表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察・撮影し、5 種類の殻表面の物理的な構造を比較した。

2. コドラートによる環境選好性調査

スガイの生息環境がカイゴロモの着生に寄与する可能性を検証するため、スガイの環境選好性を探った。その際、砂中に潜行するスガイ個体を発見したため、この潜砂行動がスガイに特異的なものか否かを判断するべく、調査項目に加えた。

2014 年 6 月～12 月の日中に、鍋田湾の岩礁潮間帯において、10 cm² の小区画 9 つに区切った 30 cm² コドラートをランダムに配置し、小区画ごとに、基質表面の乾燥度、直射光の有無、基質表面の性状、巻貝の種別個体数、各個体の潜砂の有無、という 5 項目について調査した。

3. 室内での潜砂実験

上記 2. の調査で見られたスガイの潜砂行動が、①スガイ固有の行動なのか、②カイゴロモの着生へ影響を与えているのかについて検証するため、室内での潜砂実験を行った。

採集時に潜砂していたスガイ、潜砂していなかったスガイ、イシダタミの 3 つの実験群を 10 個体ずつのグループに分けた。貝が十分に潜ることができる深さ 4～5 cm の砂を敷いた水槽に 1 グループずつ入れ、光条件 (平均照度 0、400、3300 ルクス)、水位条件 (高、低) を変えた 6 パターンで、合計 90 分間、10 分毎に各個体の行動について記録した。

また、スガイについては、各個体の殻長、殻径、カイゴロモの被度 (4 段階に分類)、殻皮層剥離の有無、カイゴロモ以外の生物の着生についても計測した。

【結果】

1. の観察では、どの種の殻皮層にも凹凸に富んだ立体的な構造が確認され、スガイにのみ特異的な特徴は確認されなかった。ヤドカリが使用していたスガイ殻では、殻皮層の他に殻質層でも数 μm の穴が散見されたが、それがカイゴロモによって穿孔されたものなのかまでは判別できなかった。

2. の調査では、他の環境条件に関わらず、砂中への潜行が確認されたのはスガイのみであり、他の巻貝では潜砂行動は見られなかった。また、スガイの潜砂は毎月観察され、季節的な変化は認められなかった。

3. の実験でも潜砂が見られたのはスガイのみであり、イシダタミではどの条件でも砂への潜行は見られなかった。スガイにおいては、野外での潜砂の有無に関わらず、最も明るい条件の場合に有意に潜行個体が多くなった一方で、水位条件の相違では潜行個体数に有意差は見られなかった。また、野外での潜砂個体と非潜砂個体間のカイゴロモの被度には有意差は認められなかった。

【考察・今後の展望】

1. の結果より、スガイの殻皮層の構造がカイゴロモの基質特異性に寄与している可能性は低く、今回の観察結果と先行研究 (松山ら 1999) を合わせて考慮すると、基質特異性の解明には殻皮層及び殻質層の硬度や構成成分などの比較解析が有効であると思われる。

2. の調査により、砂に潜行するという行動は、岩礁潮間帯に生息する巻貝の中でもスガイだけに見られる極めて特徴的なものであることが示唆された。3. の実験結果により、このような潜砂行動は、夜行性であるスガイの日光に対する忌避行動である可能性が高いと考えられた。今回の実験では潜砂によるカイゴロモの被度への影響は確認されなかったが、砂による遮光効果はカイゴロモの光合成にも影響を及ぼしている可能性がある。より詳細な相互作用の解明には、繁茂しているカイゴロモ現存量の測定精度向上や、潜砂行動によるカイゴロモの光合成量の変化を見積もる比較実験が有効であると考えられる。

PARAFAC による外洋表層における蛍光性溶存態有機物の動態評価

大野 真由美 (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

海洋の溶存態有機物(DOM)は、地球表層の巨大炭素リザーバのひとつであり、DOM が有する炭素(DOC)は地球表層の炭素循環の理解に重要である。この DOM のうち 5~25% を占める蛍光溶存態有機物 (FDOM) は、太陽光照射によって、蛍光強度が減少する、「光退色」という特徴を持つ。DOM は主に植物プランクトンによって生産され、バクテリアによって分解されるが、FDOM に関しては、海洋中深層における主な生産者はバクテリアだと報告されている。しかし、海洋表層では光退色のために、FDOM 生産を蛍光強度の変化で評価することが困難であり、表層におけるバクテリアの生産者としての側面は調査されてこなかった。

そこで本実験は、バクテリアの現存量が FDOM の生成率に与える影響を調査することにより、海洋表層でのバクテリアの FDOM 生産を実験的に確かめることを目的とした。

材料・方法

1. 試料採取 と培養実験

外洋域における実験は、研究船「白鳳丸」KH-14-3 の航海において、2014 年 7 月に実施した (気象庁気象研究所・笹野大輔氏の協力を得た)。採水は北太平洋の西経 170 度上の 3 測点 (Stn. 3: 北緯 10 度)、Stn.11 (北緯 50 度) および Stn.12 (北緯 55 度) で行った。表面水を 20L ポリカーボネート製容器に採取し、容量 250 mL の石英瓶 (12 本) とガラス瓶 (12 本) に分注し、全瓶ともアルミ箔と黒色ビニールで遮光した。これらを甲板水槽に移し、試料採取日の 18:00 に培養を開始した。翌日 6:00 に、石英瓶、ガラス瓶、各 6 本を回収した。この時、未回収の瓶のうち、石英瓶、ガラス瓶、各 3 本の遮光を止め、明瓶とした。一方、残りの培養瓶は遮光状態のまま、暗瓶とした。培養開始から 24 時間後の 18:00 に培養を終了した。

2. 試料回収

培養開始日 18:00 に培養に用いた試料の残りをガラス繊維製ろ紙でろ過した。翌日 6:00、18:00 にはそれぞれ、石英明瓶、ガラス明瓶、石英暗瓶、ガラス暗瓶、各 3 本を回収し、同様にろ過した。各ろ液をザルステッドチューブ 2 本に 4.8 mL ずつ、PC 容器 3 本に約 120 mL ずつ分注した。ザルステッドチューブにはグルタルアルデヒドを 0.2 mL 添加してバクテリアを固定し、-80°C で保存した。これをバクテリア計数用試料とした。PC 容器は 20°C で保存し、DOC 濃度分析、FDOM 蛍光強度分析用試料とした。

3. 分析

バクテリア計数用試料は、37°C で解凍後 DAPI 染色を行い、蛍光顕微鏡で細胞数を計数した。また PC 容器に保存したろ液については流水解凍後、TOC-V により DOC 濃度を、三次元蛍光分光光度計により FDOM 蛍光強度の分析を行った。蛍光分析の結果については PARAFAC (多変量解析) 解析を行った。

結果

1. 各測点海水の特徴

Table.1 に培養開始時の海水の各分析値を示す。植物プランクトンの現存量は Stn.3 で低く、Stn.12 で高いことが、クロロフィル *a* の値から推定できる。バクテリアは基本的に、植物プランクトンの生成する有機物を使って代謝を行うため、バクテリアと植物プランクトンとの間には相関が認められることが多い。

Table 1 培養開始時の海水成分データ

	クロロフィル <i>a</i> ($\mu\text{g/L}$)	バクテリア ($\times 10^6$ cells/mL)	DOC 濃度 (mgC/L)
Stn.3	0.06	1.00	0.87
Stn.11	1.05	1.20	0.88
Stn.12	1.08	2.90	1.14

2. 蛍光成分と蛍光動態

PARAFAC によって、3 つの Component が検出された。Component 1 および 2 は腐植様物質とされるピークに相当し (Coble et al., 2014)、Component 3 はタンパク質に相当する (Fig.1)。全ピークの傾向として、夜間(18:00 ~ 翌 6:00)の蛍光強度増大と、昼間(6:00 ~ 18:00)の蛍光強度減少が見られた (Fig.2)。

蛍光強度の変動幅は、バクテリア量の一番少ない Stn.3 で一番小さく、バクテリア量の一番多い Stn.12 で一番大きかった。これにより、バクテリアの活性が高いほど、FDOM 生成が盛んに行われることが示唆された。同時に、バクテリアの、海洋表層における FDOM 生産を、初めて実験的に裏付けることができた。

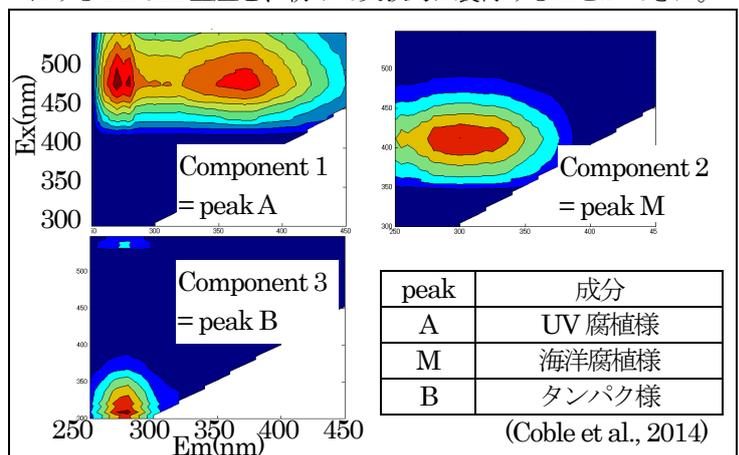


Fig.1 PARAFAC によって確認された FDOM の構成成分

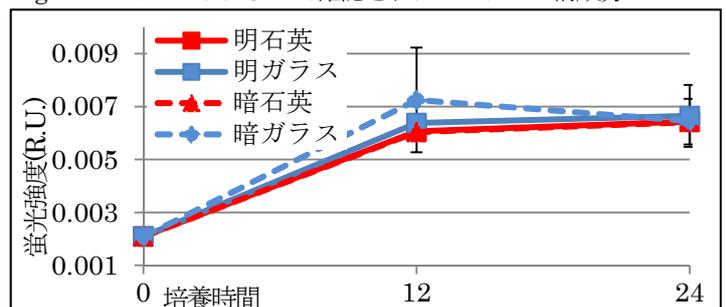


Fig.2 Stn.12 培養実験中の Component 1 の蛍光強度変化

静岡県下田沖における植物プランクトン群集の季節変動とその物質循環への影響の評価

岡崎 拓未 (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

一次生産者である植物プランクトンの群集組成、サイズ組成は光合成による有機物生産だけではなく、生産物の種類、食物連鎖の構造、更には海底方向への炭素の輸送など、海洋の物質循環と深く関わりがある。このため、海洋物質循環システムの解明には植物プランクトン群集の動態に関する情報を蓄積する必要がある。本研究では静岡県下田沖の定点において、フローサイトメトリー (以下FCM) 及び高速液体クロマトグラフィー (以下HPLC) を用いて、植物プランクトンの群集組成の周年変動を明らかにし、環境要因との関係について検討することを目的とした。

○材料・方法

2013年10月から2014年の10月にかけて、筑波大学下田臨海実験センター沖定点 (E138°57.010, N34°38.951) にて月1回の頻度で定点観測を行った。採水は水中光量子の量を基準に導き出された6層からニスキンボトルを用いて行われた。採水と同時にCTDセンサーを用い水温、塩分、電気伝導度、クロロフィルa濃度の情報を得た。

FCMにより、海水試料中の細胞の濃度、サイズ及び蛍光特性の情報を得た。FCMに使用する試料は採水後冷蔵で保存され、24時間以内に解析を行った。FCMのサンプリングノズルの詰まり防止の為、海水は解析前に59µmのメッシュでろ過した。測定時には2µm、6µmのビーズを海水試料と同時に測定し、サンプル中の細胞のサイズの目安とした。

海水をGF/Fフィルターで濾過し、得られた濾紙をHPLCによる色素解析に用いた。濾紙は分析まで-80℃で保存した。分析はVan Heukelmen and Thomas (2001) の手法に基づき、リテンションタイムの違いによりクロロフィルa及び各色素の同定、定量を行った。Obayashi *et al.* (2001)、Everitt *et al.* (1990)、Ondrusek *et al.* (1991) らの計算式を参考にし、植物プランクトンが分類群毎に固有に持つ指標色素を利用して、各分類群由来のクロロフィルa濃度の推定を行った。

尚、定点観測および試料採取については、環境科学専攻松下幼奈氏、下田臨海実験センターの和田茂樹助教、同センター技術職員により行われた。

○結果・考察

1. 細胞濃度は10月から1月にかけて減少し、最小でおよそ10000 Cells mL⁻¹となった。その後8月に向けて濃度は上昇し、最大でおよそ95000 Cells mL⁻¹となった。その後は10月にかけて減少した。更に詳細に群集組成を解析する為、細胞を蛍光やサイズ特性により *Synechococcus*, *Prochlorococcus* 及び真核藻類に分類した。真核藻類については細胞サイズにより2µm以下、2から6µm、6µm以上に分類した。その結果、*Synechococcus*や*Prochlorococcus*,

2µm以下の真核藻類といった小型藻類の変動が全体の細胞数に大きく寄与していることが分かった (図1)。

2. 表面水におけるクロロフィルa濃度は、10月に0.5µg L⁻¹の低い値を示した。4月以降夏にかけて濃度が高くなり、6月には最大2.5µg L⁻¹の高い値を示した。(図2:折れ線グラフ)。植物プランクトンの分類群毎に推定したクロロフィルaの濃度から、クロロフィルa濃度の変動のほとんどは珪藻の増加によるものであることがわかった (図2:積算棒グラフ)。一般に大型の真核藻類である珪藻類は、その細胞数は少ないがクロロフィル量への寄与が大きいためという対照的な結果が得られた。
3. 水温は秋季から冬季にかけて低下し、春季から夏季にかけて上昇した。これより、秋季から冬季にかけての *Synechococcus* などの小型藻類の減少 (図1) 及び春季から夏季にかけての珪藻の増加 (図2) はそれぞれ水温の変動と関係していることが推測される。細胞濃度とクロロフィルa濃度でピークの時期が異なることは、栄養塩等の要素が関係していることが予想される。

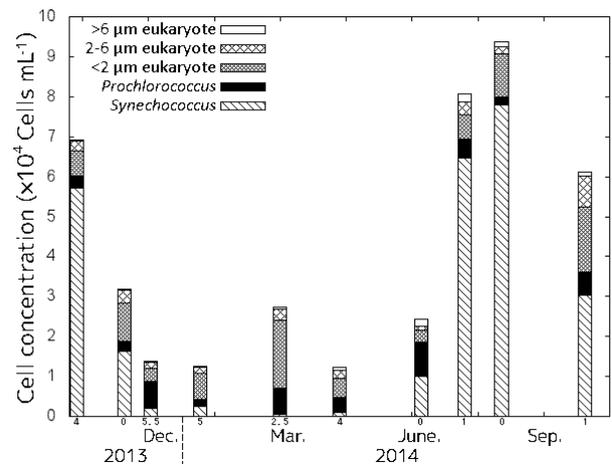


図1 細胞濃度 (各データの深度はグラフ下に併記)

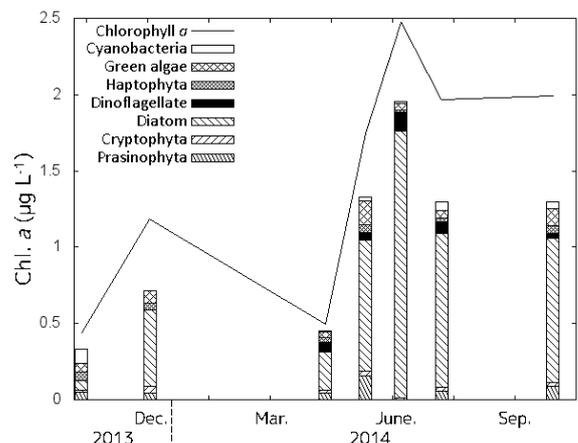


図2クロロフィルa濃度 (深度0 m)

海洋酸性化に対する植物プランクトンの応答とその生物ポンプへの影響

古川 萌実 (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

近年の大気 CO₂ 濃度の上昇に伴い、海洋に溶け込む CO₂ が増加し、海洋表層の pH 低下を引き起こしている。これが海洋酸性化である。酸性化により海洋の生態系や物質循環には石灰化阻害や酵素活性の変化など様々な影響が及ぶと予想され、研究が進められている。

植物プランクトンは海洋の一次生産の大半を占め、海洋生態系を支える主要な生産者である。したがってその酸性化に対する応答は海洋生態系全体に影響を及ぼしうる。そのため酸性化に対する植物プランクトンの応答を調べることは重要である。

先行研究において、酸性化に伴い小型(2 μm 以下)藻類 (*Micromonas* sp.) の優占度が増すことが示唆されている。小型種の優占は将来の地球環境に大きな影響を及ぼす可能性がある。これは小型の植物プランクトン細胞が海中を沈降する速度が小さいことに関連する。植物プランクトン細胞の沈降は光合成で固定した炭素を深層へ輸送し、海洋表層の CO₂ を減少させる役割 (生物ポンプ) をもつ。生物ポンプが酸性化の緩和機能を有することを考慮すると、生物ポンプの効率の低下は酸性化のさらなる加速を引き起こすことに繋がる。ここで本研究では①海洋酸性化に対する植物プランクトン群集の応答を調べるとともに、②沈降粒子生成量に対する酸性化の影響を評価することを目的とし、自然海水を用いた野外での培養実験を実施した。

方法

培養実験

2014年7月21日~8月7日までの18日間、筑波大学下田臨海実験センターにおいて、野外に138Lの下部が円錐型のタンクを6基設置し、100 μm メッシュを用いて大型動物プランクトンを除去した沿岸海水を導入した。海水は pH 約 8.1 (現在)、7.6 (2100年) の2条件に設定し、各条件につき3タンクずつで実験を行った。pH の調節は飽和 CO₂ ろ過海水の添加によって行い、培養期間中に pH が変動した際は、飽和 CO₂ ろ過海水を再度添加することによって pH を維持した。実験初日に pH 調整を行った後、栄養塩を添加した。サンプリングは11回行った。

分析

フローサイトメーターを用いて、植物プランクトンの細胞数、分類群、サイズ組成等を調べた。また採水したタンク内の海水をガラス繊維ろ紙(GF/F)でろ過し、海水サンプルの懸濁態有機炭素(POC)、懸濁態有機窒素(PON)を元素分析計(EA1108, FISIONS)を用いて定量した。さらに培養タンク下部から回収した沈降粒子をガラス繊維ろ紙でろ過し、炭素および窒素量を同様に定量し、沈降粒子量を推定した。

結果・考察

①酸性化に対する植物プランクトンの応答

フローサイトによる種組成の分析によって、条件ごとに違いが見られた。シアノバクテリアを中心としたグループ(G1)は Day2 に pH8.1 の条件下で、有意により大きいブルームを形成した(図)。珪藻やハプト藻を中心としたグループ(G3)は Day3 に pH7.6 の条件下で、有意により大きいブルームを形成した。酸性化によって増加すると示唆されている *Micromonas* sp. を中心としたグループ(G2)は Day2 のブルーム時の存在数に違いは見られなかったものの、Day3 において pH7.6 の条件下で数が多かった。

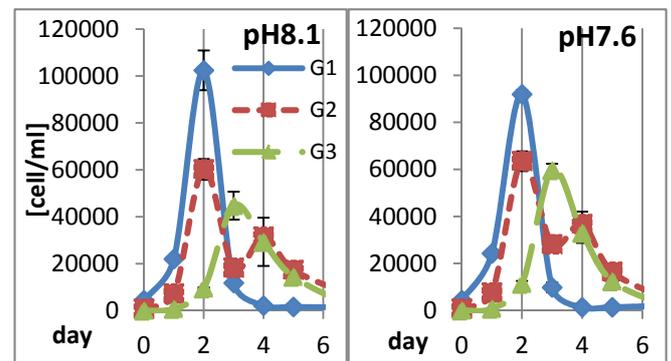


図 pH8.1、7.6における植物プランクトンのグループごと細胞数の経時変動

またフローサイトによるサイズ組成の分析によって 2 μm 以下の小型藻類の細胞数を条件ごとに比較してみたところ、Day3、4において pH7.6 条件で 2 μm 以下の細胞が多いことが観察されたものの、有意に差が見られなかった。したがって酸性化によって小型藻類のみが増加するとは考えにくい。

以上から群集は酸性化によって影響を受け、小型藻類である *Micromonas* sp. の増加に加えて、珪藻やハプト藻が増加し、またシアノバクテリアが減少することが示唆された。

②沈降粒子生成量に対する酸性化の影響

ブルーム時の沈降粒子量を中心に解析したところ、両条件ともに Day3、5 において沈降量のピークが存在した。Day3 におけるピークに条件ごとの差異は見られなかったが、Day5 では pH7.6 の条件下で沈降量が多かった。したがって酸性化によって沈降粒子量が減少するという仮説は証明されなかった。以上の結果をふまえ、酸性化によって植物プランクトンは影響を受ける時期が存在するが、それによる沈降粒子への影響はあまり大きいものではなく、酸性化による生物ポンプの停滞は考えにくいことが示された。

今後の展望

沈降粒子の生成には植物プランクトンだけでなく、動物プランクトンも関わるため、今後は動物プランクトンも含めた実験系での考察が必要だと考えられる。

海洋酸性化に対するバクテリアの応答に関する実験的研究

木村 浩之 (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

産業革命以降、人類活動による CO₂ 排出量は年々増加し続けている。海水中に溶け込む CO₂ が増加した結果、海水の pH が低下している。この現象は海洋酸性化と呼ばれ、産業革命以前と現代で pH は約 0.1 低下しており、今世紀末までにさらに 0.3~0.4 低下すると予測されている。海洋酸性化は主に光合成生物や炭酸カルシウム殻を持つ生物への影響が懸念されており、地球温暖化に対して「もう一つの CO₂ 問題」とも呼ばれている。近年微生物の海洋物質循環における役割が知られるようになり、同時にバクテリアが海洋酸性化の影響を受けた場合栄養塩サイクルにも影響が及ぶ可能性が考えられるようになった。海洋酸性化に対するバクテリアの応答は研究によって矛盾した結果が出ており、実験手法も確立されていない。また外洋における実験は報告されているが、沿岸における研究はあまり知られていない。

そこで本研究では沿岸に生息するバクテリア群集の海洋酸性化に対する応答を調査することを目的とし、沿岸海水を用いた大型タンクによる酸性化実験を行った。

方法

培養実験

2014年7月21日から8月7日までの18日間、筑波大学下田臨海実験センターにおいて、培養実験を行った。プラスチック製の培養器を6基準備し、あらかじめ大型動物プランクトンを除いた沿岸海水を満たした。現在海洋表層の pH (約 8.1)、および 0.4 程度低下させた pH (7.6) の2条件を、培養器3基ずつ設定した。植物プランクトンのブルームを生じさせるため、実験初日 (Day0) に栄養塩 (N, P, Si) を添加し、以降、随時各培養器から試料を採取した。

本実験は和田茂樹助教と水圏生態学研究室の古川により実施されたもので、実験の際に本研究で用いた試料のサンプリングを依頼した。

バクテリア細胞数の測定

サンプリングした海水を孔径 0.7 μm ガラス繊維ろ紙 (GF/F) でろ過し、ろ液をグルタルアルデヒドで固定したものを試料とした。DAPI で蛍光染色した後、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターでさらにろ過を行い、フィルター上に捕集されたバクテリアの細胞数を蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX53) を用いて測定した。測定は試料1つにつきランダムで20視野を計数し、その平均値を細胞数の計算に用いた。

結果・考察

1) 古川 (卒業研究) によると、植物プランクトンのブルームは Day2-4 にかけて生じていた。バクテリアの細胞数は Day5 まで大きな変動は認められなかったが、ブルームが終わる Day7 から増加を示した。

2) 両条件の間にはバクテリア細胞数に、顕著な差は認められなかった。バクテリア現存量に対する酸性化の影響に関する研究例は少ないが、これらの研究によると、バクテリアの種組成や現存量に対する酸性化の影響は、それほど大きくないと報告されている。今回得られたバクテリア細胞数の変動は、バクテリアに対する酸性化の影響は限定的であり、むしろ植物プランクトンの変動と密接な関係にあるという仮説に矛盾しない結果となった。

3) バクテリアの存在状態としては、GF/F を通過した粒子に付着する付着性バクテリアよりも、浮遊性バクテリアが多く認められた。バクテリア数の増加が、植物プランクトンのブルームの終了時から少し遅れて認められたことを含めて、バクテリア細胞数の増加には、浮遊性バクテリアが利用する溶存態有機物 (DOM) が重要な役割を果たしていることが示唆される。

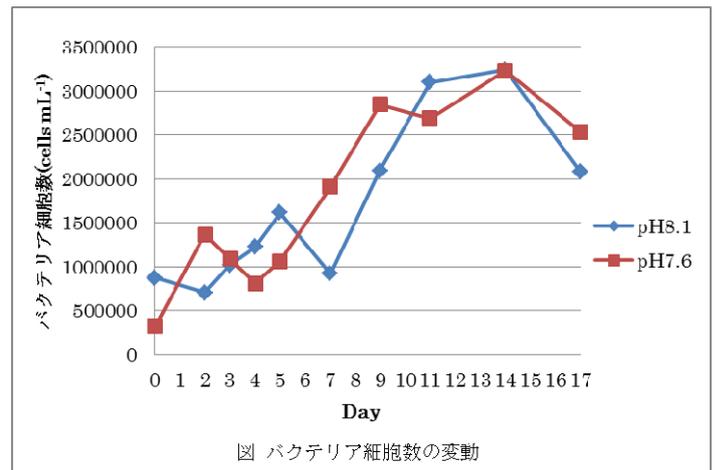


図 バクテリア細胞数の変動

細胞内輸送を制御するマラリア原虫特異的 Rab5b 結合タンパク質の探索

平井 智浩 (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)

背景・目的

マラリアは2億人が罹患し、年間60万人の死亡者を出す重篤な感染症である。この疾患は寄生性の原虫であるマラリア原虫がハマダラカの刺咬を介して体内に侵入することが原因である。マラリア原虫はヒトの体内に侵入すると肝細胞を経て赤血球へと侵入し、寄生胞膜やマウレル裂という膜構造を多数作ることで自らの生育に快適な環境を構築する。さらに、寄生胞膜を介して感染赤血球表面へのタンパク提示や栄養源の取り込みを行なっている。

真核生物で保存された、膜を介する小胞輸送を分子スイッチとして制御するのが低分子量 GTPase の Rab である。まず、guanine-nucleotide exchange factor (GEF) が、不活性型 (GDP 結合型) の Rab を、活性化型 (GTP 結合型) へ変換する。次に、GTP 結合型の Rab はエフェクタータンパク質と結合し、活性調節を行なう。その後、GTP の加水分解がおり、Rab は GDP 型に戻る。このうち、初期エンドソームに局在し、初期エンドソームの膜融合を調節する Rab として Rab5 が報告されている。Rab5 は C 末端側のシステインがイソプレニル化の脂質修飾を受けることで膜に結合し、膜融合を調節する (以下、保存型 Rab5)。しかし、陸上植物とマラリア原虫は保存型 Rab5 の他に C 末端側の脂質修飾部位を持たず、N 末端側のグリシンとシステインがそれぞれミリストイル化とパルミトイル化の修飾を受ける特殊な Rab5 (Rab5b) を有する。また、マラリア原虫の Rab5b は原虫細胞質だけでなく感染赤血球細胞質にも局在が観察されているため、細胞外への輸送にも関与すると考えられているが、その機構は明らかになっていない。さらに、これまで Rab5b を有するトキソプラズマ原虫や高等植物でも Rab5b のエフェクタータンパク質は未だに同定されていない。

本研究では熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) を用いて、熱帯熱マラリア Rab5b (PfRab5b) の活性化因子である GEF やエフェクタータンパク質の探索を行なった。

材料・方法

(1) 酵母ソーハイブリッド (Y2H) 法による PfRab5 と GEF の結合の確認

他種生物において Vps9 は Rab5 GEF として報告されている。熱帯熱マラリア原虫ゲノム中にも Vps9 がアノテートされており、Rab5b と結合する可能性があった。そこで出芽酵母を用いた Y2H 法により熱帯熱マラリア原虫の Rab5b と Vps9 間の相互作用の確認を行なった。*Saccharomyces cerevisiae* Y187 株に、転写活性化因子である GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインと PfRab5 融合タンパク質を発現するプラスミドを導入した。同様に、AH109 株に、転写を促進するアクティベータードメインと PfVps9 融合プラスミドを導入した。それぞれの形質転換株を接合させ、Vps9 と Rab5b が結合した場合、レポーター遺伝子の発現が確認されることを指標とした。

(2) 共免疫沈降法による PfRab5b エフェクターの質量分析

PfRab5b と相互作用するタンパク質を広く探索するため、*P. falciparum* MS822 株を用いて、PfRab5b と GFP との融合タンパク (PfRab5b-GFP) あるいは PfRab5b-GFP に FLAG タグを融合させたタンパク質 (PfRab5b-GFP-FLAG) を発現させた株を作製した。それぞれの融合タンパク質を可溶化させる最適条件を検討した。また、blue native-poly acrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) により PfRab5b-エフェクター複合体の分子量を推定した。結合タンパク質を得るため、クロスリンカーによるタンパク質間架橋処理を行った後に、抗 FLAG 抗体を用いた共免疫沈降を行なった。共沈したタンパクの質量分析を行い、BN-PAGE の結果と照らし合わせて PfRab5b 結合タンパクの同定を試みた。

結果・考察

(1) 熱帯熱マラリア原虫ゲノムには1種類の Vps9 (PfVps9a) がアノテートされていた。また、そのホモログも1つ存在していた。そのホモログのアミノ酸配列は他種生物の Vps9 と同源性が非常に低く、アミノ酸配列から Rab5 GEF と判断するのは困難であった。しかし、そのホモログの二次構造予測を行なったところ、Vps9 の GEF 活性に必要な二次構造と活性残基が保存されていたため、これを PfVps9b とした。Y2H 法によって PfRab5 と PfVps9a および PfVps9b との結合を検証したが、酵母の中での相互作用は確認できなかった。

(2) 可溶性条件検討の結果、凍結融解でなく、1.0% Triton X-100 により融合タンパクが可溶化されることが分かった。BN-PAGE の結果から見積もる PfRab5b へ結合するタンパク質の分子量は、35・90 kDa であった。抗 FLAG 抗体によって共沈したタンパク質を質量分析によって解析した。得られたペプチドデータを BN-PAGE の結果と照らし合わせて、結合候補タンパクを22種類得た。その中にはゴルジ体周辺で機能するタンパク質と、寄生胞膜に輸送されるタンパク質が含まれていた。

今後、質量解析から得た結合候補タンパク質が、実際に Rab5b と相互作用があるのかの確認を行う必要がある。まず、熱帯熱マラリアで Rab5b の GDP 型および GTP 型変異株を作製し、共免疫沈降によって回収されるエフェクタータンパク質が GTP 型特異的に同定されるかを確認する。また、遺伝子操作が簡便なネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) を用いて、候補タンパク質の細胞内局在を確認し、Rab5b 結合タンパク質および Rab5b カスケードを明らかにして行く予定である。

今回得られた候補タンパク質は、高等植物には存在しない遺伝子も含まれているため、マラリア特異的な輸送経路が同定できると期待している。また、PfRab5b 結合タンパク質の同定は、アピコンプレクサ独特の輸送システムの解明につながり、将来的には抗マラリア薬の創薬の基盤を提供できると期待している。

微好気性鞭毛虫(*Dysnectes brevis*)と単一のバクテリアとの二者培養系の確立

井上貴史 (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

真核生物の分類群のひとつであるフォルニカータ生物群は、嫌気性・微好気性の単細胞生物から構成されており、ミトコンドリアが縮退したと考えられるミトコンドリア関連オルガネラ (MRO) を共通した細胞小器官として保持している。このフォルニカータ生物群に属している生物には、人の腸管に寄生する *Giardia intestinalis* などが知られている。*G. intestinalis* は非常に縮退した MRO の一種であるマイトソームと呼ばれるオルガネラを保持しており、寄生性・嫌気性環境に適応していく中で、TCA 回路や酸化リン酸化による ATP 合成に代表される代謝機能や独自のゲノムなどを失ってきたと考えられている。しかしミトコンドリア縮退進化の過程はいまだ解明されておらず、その解明にはミトコンドリアとマイトソームの中間段階にある MRO の解析が必要である。そこで当研究室では、フォルニカータに属している *Dysnectes brevis* という微好気性の従属栄養性鞭毛虫に注目し、研究を行っている。*D. brevis* は、フォルニカータの系統樹上で *G. intestinalis* よりも早期に分岐しており、形態的にもマイトソームとミトコンドリアの中間程度の大きさである MRO を保持している。以上のことから、*D. brevis* が保持する MRO がミトコンドリアからマイトソームへの縮退的進化の中間段階にあることが予想される。当研究室ではその MRO についてのデータを、既存の *G. intestinalis* のもつマイトソームについてのデータと比較し、ミトコンドリアの縮退的進化解明の足掛かりとすることを目的としている。

しかし、現在 *D. brevis* は複数種の餌バクテリアが混在する培地で培養されている。そのため、それらのバクテリアの存在が、ゲノムやプロテオームを始めとするオミックス解析の妨げとなっている。そこで餌バクテリアの解析に及ぼす影響を最小限に抑えるために、本研究ではバクテリア一種と *D. brevis* との二者培養系を確立させることを目的として実験を行った。

材料と方法

D. brevis を 75 ml フラスコにて 16–17°C で培養し、細胞を 800 g、20°C、15 分の遠心分離により回収した。回収した細胞を密度勾配形成用試薬の Optiprep (Axis-shield 社) を用いて懸濁した。Optiprep の濃度は 0%、10%、20% となるように調整し、50 ml ファルコンチューブ内に重層することによって濃度勾配を形成した。遠心分離によって回収した細胞は、Optiprep の終濃度が 40% になるように調整し、ファルコンチューブの最下層に注入した。800 g、20°C、20 分で遠心分離し、Optiprep の濃度が 10% と 20% の境界面で *D. brevis* の細胞を回収した。回収できた細胞を、同様の方法で再度密度勾配遠心にかけて、同じように細胞を回収し、培地中に存在するバクテリアの一種 *Pseudoalteromonas* sp. (γ -proteobacteria) のみをあらかじめ

培養しておいた培養液に継代した。以上、*D. brevis* の濃縮・継代の操作を数回繰り返した後、75 ml のフラスコ 3 本にて大量培養し同様の遠心条件にて *D. brevis* の精製を試みた。

結果

遠心前には、*D. brevis* が 2.5×10^8 cells/ml、バクテリアが 1.8×10^{11} cells/ml 存在していた。一回目の密度勾配遠心を行った後では、*D. brevis* が 1.6×10^7 cells/ml、バクテリアが 4.0×10^7 cells/ml となり、二回目の密度勾配遠心後は *D. brevis* が 4.0×10^6 cells/ml、バクテリアが 4.8×10^5 cells/ml となった。最終的に *D. brevis* は最初の 4%、バクテリアは最初の 0.0004% となり、バクテリアの細胞数を *D. brevis* の細胞数以下にまで減らすことに成功した (図 1)。

現在、濃縮・継代の操作 9 回目を終えたところである。今後は二者培養系が確立されているのかどうか、培養液から DNA を抽出し、バクテリアの 16S rRNA の部分配列を PCR にて増幅し、増幅産物を大腸菌にクローニングして、約 300 サンプルをシーケンスする。そこで得られた配列を、BLAST 検索することによって、培地中のバクテリアの種類とその比率を調べ、二者培養系が確立できたかどうかを確認する予定である。

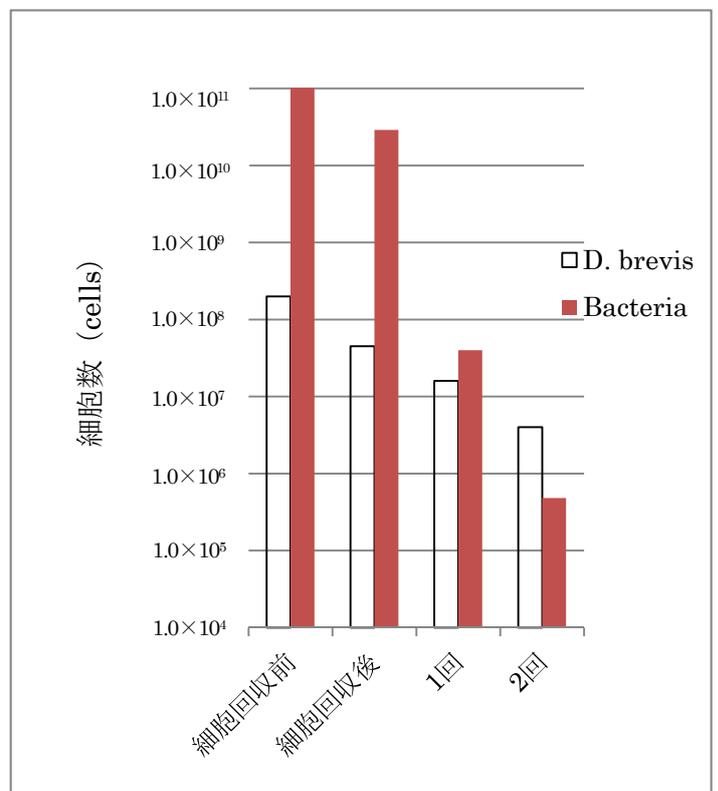


図 1 遠心による細胞数の変化

赤痢アメーバの病原性に関与する Rab11B エフェクタータンパク質の同定

川野 哲郎 (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

寄生原虫赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は宿主であるヒトの腸管に寄生し、アメーバ赤痢の原因となる (1)。WHO の推定によれば、世界人口のおよそ 1% が *E. histolytica* に感染しており、毎年 10 万人がアメーバ赤痢に因って死亡している。このため *E. histolytica* の医学的・公衆衛生的重要性は高く、その感染機構や病原性に関する知見の充実が望まれている。

E. histolytica はヒトの大腸粘膜面に潰瘍を形成し、赤血球や細菌を食食することで増殖する。組織の障害と食食胞内での分解に係る病原因子の 1 つとして cysteine protease (CP) が報告されている。なかでも CP-A5 の発現抑制株は培養細胞への障害性及び動物感染実験での肝膿瘍形成能が低下することから、CP-A5 は病原性に重要である (2)。

一般に CP などの加水分解酵素の分泌は真核生物に保存された小胞輸送が担っている。細胞内の小胞輸送において、小胞の受容膜への融合は低分子量 GTPase である Rab により調節されている。*E. histolytica* においては、これまでに 102 種類の Rab が発見されており (3)、Rab による細胞内輸送の制御が複雑化していることが推測される。そのうちの Rab11B を大量発現する形質転換株では CP の分泌が上昇することから、Rab11B は CP の輸送に関与することが報告されている (4)。

先行研究により、質量解析を用いて活性化型 Rab11B に特異的に結合するタンパク質が網羅的に解析されている。本研究では同定された Rab11B エフェクター候補タンパク質が細胞内で実際に Rab11B と結合するかどうかを確認を試みた。

方法

質量解析によって得られた Rab11B エフェクタータンパク質の候補 94 種のうち、多くのペプチドが得られた遺伝子として、クラスリン被覆小胞の形成に必要な adaptor protein (AP) 複合体の adaptin large subunit (EHI_013040, EHI_196890) と輸送小胞が細胞膜へ繫留されるのに必要なエキソシスト複合体の因子 (Sec6: EHI_081420) のホモログが含まれていた。分子系統解析により、候補の adaptin がトランスゴルジネットワーク (TGN) からの輸送に必要な AP-1 複合体の因子であるかどうか検討を行った。次に *E. histolytica* HM-1:IMSS Cl-6 株を用い、候補タンパク質に HA または GFP タグを付加した融合遺伝子を発現する形質転換株を作製した。抗タグ抗体を用いた間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence assay: IFA) により、候補タンパク質と Rab11B の細胞内での共局在を観察した。また、市販の抗タグ抗体結合アガロースを用いた共免疫沈降法 (co-immunoprecipitation: Co-IP) により、候補タンパク質とともに Rab11B が共沈するかどうかを確認した。

結果

活性化型 Rab11B に特異的に結合するタンパク質の候補であるものを含め、adaptin large subunit は *E. histolytica* 標準株

(HM-1:IMSS) のゲノムには 13 種類存在していた。他種生物では TGN からの小胞の形成に $\beta 1$ と γ -adaptin から構成される AP-1 複合体が、細胞膜からの輸送には $\beta 2$ と α -adaptin から構成される AP-2 複合体が機能する。分子系統解析により他種生物のホモログと比較した結果、候補タンパク質 EHI_196890 は γ -adaptin であることが支持された。もう一つの EHI_013040 は $\beta 1$ か $\beta 2$ -adaptin であり、subfamily の判別は困難であった。両者の結果を考慮すると、Rab11B エフェクターの候補に TGN からの輸送に必要な AP-1 複合体が含まれていたと考えられる。

γ -adaptin の N 末端に HA タグを融合させた形質転換株を作成し、細胞分画を行ったところ、HA- γ -adaptin は膜画分と可溶性画分に分画された。抗 HA 抗体と抗 Rab11B 抗体を用いて IFA を行ったところ、HA- γ -adaptin と Rab11B の共局在が部分的に確認された。しかし、HA- γ -adaptin を bait とした Co-IP では、Rab11B の共沈は検出されなかった。

N 末端に GFP 融合遺伝子を付加した β -adaptin もしくは Sec6 の形質転換株を作成し細胞内局在を観察したが、Rab11B との共局在は IFA では観察されなかった。これらを bait とした Co-IP では、Rab11B の共沈は検出されなかった。

考察

IFA により γ -adaptin と Rab11B との部分的な共局在が確認された一方で、 γ -adaptin を bait とした Co-IP では Rab11B は検出できなかったが、このことは必ずしも γ -adaptin が Rab11B エフェクターの可能性を否定するものではない。細胞内での活性化型 Rab11B の量が少ないために、Rab11B と結合している γ -adaptin の量が検出限界を下回っている可能性がある。今後、定常活性化型の Rab11B を発現する大量発現株を作製し、再度 Co-IP を試みる予定である。

他種生物では、TGN から細胞膜へ向けての輸送に Rab11、その下流に Rab8 とエキソシスト複合体が機能することが報告されている。さらに、一部の輸送経路では Rab11 とエキソシスト複合体の別の因子 Sec15 との結合も報告されている。赤痢アメーバでは、Rab8 は TGN には存在しないことが分かっているため、本研究によって Rab11B と Sec6 との相互作用が明らかになれば、赤痢アメーバ特異的な輸送経路が解明できると考えている。

参考文献

- (1) Ralston KS and Petri WA Jr., Trends Parasitol. 2011 (6):254-63.
- (2) Irmer H *et al.*, Mol. Microbiol. 2009 (3):658-67.
- (3) Nakada-Tsukui K *et al.*, Experi. Parasitol. 2010 (126): 334-47.
- (4) Mitra BN *et al.*, Cell. Microbiol. 2007 (9): 2112-25.

細胞集団運動におけるソリトン波関連遺伝子の探索

勝俣 花菜 (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)

背景と目的

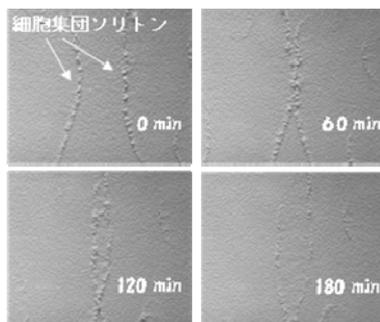
ソリトンとはぶつかってもすり抜けるパルス状の波動のことを言い、自然界では水たまりにできる波紋や津波等広く観察される普遍的物理現象です。ソリトンに関する研究は、物理や数学の分野で非常に進んでおり、ソリトンは次の条件を満たす孤立波であるということが定義されています。

- 1) 形状、速度などが不変
- 2) 波同士が衝突した後でも、お互い安定に存在 (消滅しない)

これまで細胞レベルの生物現象において、ソリトン現象が存在することは報告されていませんでしたが、昨年度、所属研究室の研究で細胞性粘菌の変異体の一つが細胞集団でソリトン運動を行うことが発見されました。(Kuwayama and Ishida, Scientific Reports, 2013)

細胞性粘菌は土壌に生息する真核アメーバ細胞であり、単細胞として増殖しながら多細胞の生活環を有します。実験室での培養や保存が簡便であり、遺伝子操作が容易であることから、発生や細胞運動のモデル生物として研究材料として利用されています。また、全遺伝子情報の解読が終わりゲノム配列も公開されている利点もあります。細胞性粘菌は、栄養が存在する状態ではアメーバ状の単細胞として増殖しますが、飢餓状態に置かれると一部の細胞が cAMP を分泌し始めます。その後、ナメクジ状の多細胞体を形成し、最終的に胞子と柄からなる子実体を形成します。

ソリトン変異株である KI-5 株、および KI-10 株は走化性を示さない株として分離されましたが、飢餓状態に陥った時に細胞が波状の集団を形成し、一定速度で移動し、ぶつかっても消滅しないですり抜けてしまうソリトンの性質を示すことが分かりました。(上図)。



この KI-5 株と KI-10 株は親株である XP55 株を DNA のメチル剤で処理することによりゲノムにランダムに変異が導入された株であり、ソリトン現象に関わる遺伝子の同定がなされていません。そこで、私は次世代シーケンサーを利用した全ゲノム配列解読データから得られた KI-5 株の変異箇所を解読し、変異遺伝子の欠損株作製によりソリトン関連遺伝子の検索を行うことにしました。

材料と方法

(1) ゲノム DNA の抽出

大量培養した KI-5 株と KI-10 株と親株である XP55 株の細胞からゲノム DNA を phenol/chloroform 方法により抽出した。

(2) 変異遺伝子の決定

次世代シーケンサー(MiSeq)を利用したゲノム DNA の配列決定は宮崎大学の林先生の研究室にて行った。変異箇所のマッピングは bowtie2 と bwa の 2 のプログラムにより千葉大学の高橋先生の研究室により行われた。

(3) PCR 法による遺伝子破壊コンストラクトの作製

遺伝子破壊 DNA コンストラクトの作製は PCR 法を利用した桑山の方法(Kuwayama et al, Nuc. Acids, Res., 2002)に従った。簡単に説明すると、マーカー遺伝子の両脇に標的遺伝子領域の 5' 側断片と 3' 側断片とマーカー遺伝子発現カセット断片を独立に PCR 法により増幅し、それぞれ精製後 Fusion PCR 法により連結された。これにより、標的遺伝子領域の 5' 側断片、マーカー遺伝子発現カセット断片、3' 側断片がこの順に連結された遺伝子破壊コンストラクトを作製できる。

結果と考察

変異遺伝子の決定

次世代シーケンシングによる配列解読と bowtie2 と bwa による変異箇所の同定解析により、KI-5 株および KI-10 株と親株である XP55 と異なるタンパク質コーディング遺伝子内における変異塩基の箇所の数は以下の通りであった。

	KI-5	KI-10
bowtie2	75	75
bwa	99	98

そのうち KI-5 と KI-10 の共通または特異的な変異の数は以下の通りである

	共通の変異	KI-5 株に特異的な変異	KI-10 株に特異的な変異
bowtie2	69	6	6
bwa	94	5	4

このうち KI-5 株における変異を有する遺伝子の内以下の 4 つについて遺伝子破壊コンストラクトを作製した。

- function unknown
- human L antigen family member 3 homologue
- rpl4 = Ribosomal Protein Large subunit
- ubiquitin homologue

現在、これらの遺伝子破壊 DNA コンストラクトを細胞性粘菌 AX2 株に導入し、形質転換体、さらに遺伝子破壊体の選別を行っている。

今後の展望

遺伝子破壊体が得られたら、それらの表現型観察を行い、ソリトン様の細胞集団運動に関連するかを解析する。また、KI-10 株についても同様な手法で解析を行う計画である。

マウスにおける紅茶高分子ポリフェノールの筋萎縮抑制効果の検討

青木 祐樹 (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

高齢者の人口増加に伴う医療費、介護費などの社会保障費の増大は現代日本における大きな課題の一つである。その大きな要因の一つとなっているのが、運動能力の低下による転倒からの寝たきりの増加である。サルコペニアと呼ばれる加齢に伴って生じる骨格筋量と骨格筋力の低下が転倒を引き起こす原因となっている。

一般的に骨格筋量は40代から減少し始め、60代でその減少率は大きくなる。一般的にレジスタンス運動を中心とした運動療法により、骨格筋量の維持は可能である。しかし、高齢者の運動療法は、現実的に難しい。つまり、サプリメント等の手軽かつ副作用の少ない処方が期待される。

近年、お茶等に含まれる高分子ポリフェノールが生体において有益な効果を示すことが次々と見出され、注目を浴びている。紅茶に含まれる高分子ポリフェノールの1種であるMAF (Mitochondria Activation Factor) がマウスの運動能力を高めることが示唆されている (Eguchi et al, 2013)。MAFは紅茶抽出物であることから、副作用が少ないことが予想され、サプリメントとして応用性が高いと考えられる。

骨格筋の萎縮モデルとして、げっ歯類の坐骨神経を一部切除することで、下腿の運動機能を麻痺させ、下腿骨格筋の萎縮を引き起こさせる除神経 (Denervation) が広く知られている。

本研究では、MAFを含む紅茶抽出分画であるE80を用いて、除神経時におこる骨格筋の萎縮が抑制できないか検討した。

方法

1. 実験動物

C57BL/6 マウス 雄8週齢

2. 実験群

神経切除なし : Nontreat 群 (n = 8)

神経切除 : Den 群 (n = 8)

神経切除 + E80 : Den + E80 群 (n = 8)

3. 実験方法

1週間の順化後、2週間E80を事前投与し、除神経を行い0日後、4日後、7日後にサンプリングを行った。

	1weeks	2weeks	0day	4day	7day
Nontreat	順化	粉末餌	擬手術	サンプリング	サンプリング
Den	順化	粉末餌	除神経 サンプリング	サンプリング	サンプリング
Den +0.5% E80	順化	粉末餌 +0.5% E80投与	除神経オペ サンプリング	サンプリング	サンプリング

解析

・組織切片染色

凍結切片を作成し、切片をHE染色後、筋繊維横断面積を測定した。

・定量RT-PCR

定量RT-PCRにより、萎縮の指標として、骨格筋特異的ユビキチンリガーゼであるMAFbx, Murf1等の発現量を測定した。

・Western Blot

Western Blot法により、骨格筋萎縮のMajor PathwayであるSmad, Foxo等のリン酸化を測定した。

結果と考察

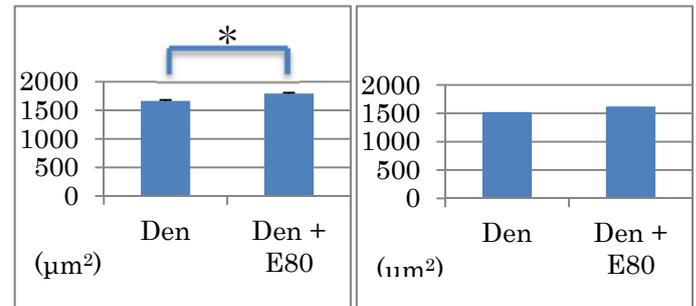


図1. 除神経4日(左)、7日(右)後に置ける腓腹筋の筋線維面積

* = P < 0.05 Den vs Den + E80

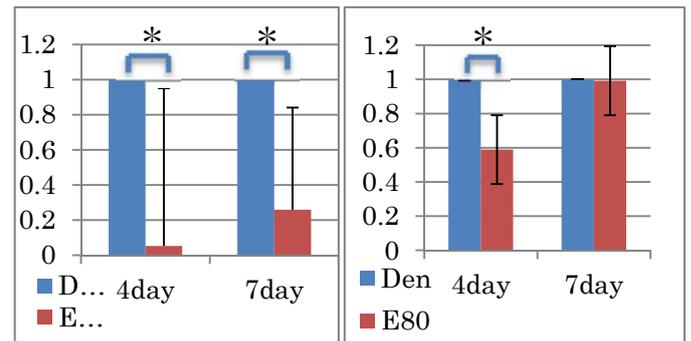


図2. 除神経4, 7日後に置ける腓腹筋のMAFbx(左), Murf1(右)mRNA発現量

* = P < 0.05 Den vs Den + E80

2週間のE80の予備投与で、除神経によるマウスの下腿骨格筋における筋萎縮が抑制されることが示唆された(図1)。除神経4日後の群においては大きく筋萎縮が抑制されたが、7日後においてはその度合いは低くなった。骨格筋において萎縮を引き起こす遺伝子(MAFbx, Murf1)の発現量も、4日後では双方とも大きく抑えられていたが、7日後ではMurf1の発現量に変化がなかった(図2)。これについては、除神経において初期段階(〜3日)と後期段階(4日〜)で、萎縮時に働く遺伝子に変化することが先行研究で示唆されている(Tang H et al, 2014)。したがって、E80の筋萎縮抑制効果が主に初期段階の筋萎縮シグナルカスケードに影響を及ぼしていると考えられる。しかし、除神経時の初期段階に発現量が大きく上昇するMyogeninの発現量は4日後と7日後の群で大きな変化はなかった。除神経のシグナルカスケードは未解明な部分が多く、完全なメカニズムは明らかにされていないが、現在、このシグナルカスケードに関連することが判明しているタンパク質を解析中である。

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* の新奇アクチン Act2 の機能解析

赤澤 大樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* は遺伝子導入が可能、培養も容易、そして全ゲノム解析が完了しているなどといったモデル生物である。そのため、細胞生物学の研究において、盛んに利用されている。

T. thermophila は 4 つのアクチンアイソフォーム(Act1p, Act2p, Act3p, Act4p)を持っている。ラトランキュリン A 等のアクチン重合阻害剤で *T. thermophila* を処理すると、食胞形成が阻害され、2~3 時間後に Act2p の発現量が著しく増加する。この発現量増加に伴い、阻害されていた食胞形成能が回復する。また、*ACT2* 遺伝子破壊株にラトランキュリン A を処理すると、食胞形成能の回復がみられない。したがって、Act2p はラトランキュリン A などのアクチン重合阻害剤に対して耐性を持つアクチンである可能性が高い。

本研究目的は、*ACT2* 過剰発現株を作成し、その株が最初からラトランキュリン A 耐性能を持つかを調べ、Act2p がアクチン重合阻害剤耐性能を持つことを証明することである。また、*Paramecium tetraurelia* (ヨツヒメゾウリムシ)に、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を処理し、アクチン重合阻害耐性能があるかどうかを調べることである。

実験方法

1. 遺伝子導入

薬剤耐性カセットとカドミウム誘導性プロモーターを含むコンストラクトを作成し、*ACT2* の N 末側に導入して、カドミウム処理で *ACT2* を過剰に発現する株を作成した。コンストラクトには蛍光タンパク質(EGFP, あるいは mCherry)遺伝子を載せたものも作成し、導入した。導入にはパーティクルガンを使用し、金粒子に遺伝子を付着させて、細胞にショットした。導入後、パロモマイシンを添加することにより薬剤セレクションをかけ、遺伝子の導入率を上げた。

2. Act2p の局在観察

EGFP あるいは mCherry を融合した *ACT2* を導入した *T. thermophila* の株に、塩化カドミウムを $1.0 \mu\text{g/mL}$ 添加し、数時間遺伝子の発現を誘導した。その後、蛍光顕微鏡で細胞内における Act2p の局在を観察した。

3. 食胞形成の確認実験

対数増殖期の *T. thermophila* (B2086 野生型株と *ACT2* 過剰発現株)に塩化カドミウムを $1.0 \mu\text{g/mL}$ 添加し、1 時間以上 30°C で培養した。その後、 $10 \mu\text{M}$ のラトランキュリン A, あるいは溶媒である DMSO(ジメチルスルホキシド)を等量加えて 30°C で培養した。培養中、一定の時間ごとに細胞を採取し、墨汁を与えて 20 分間静置して、墨汁を取り込んだ食

胞を形成させた。その後、細胞を固定して 1 細胞当たりの食胞形成数を数えた。

4. ウェスタンブロッティング

T. thermophila からタンパク質を抽出し、抽出物を SDS-PAGE で泳動し、PVDF 膜に転写した。転写後、一次抗体処理、二次抗体処理を施し、タンパク質の産生量を確認した。一次抗体にはマウス抗 α -チューブリン抗体、あるいはモルモット抗 α -アクチン抗体を使用した。二次抗体は抗マウス IgG 抗体あるいは抗モルモット IgG 抗体をそれぞれ用いた。

5. RT-PCR

T. thermophila を 10^6 cells/ml になるよう濃縮し、ISOGENE(日本ジーン)を用いて細胞の全 RNA を抽出した。抽出した RNA は、電気泳動にかけて純度を確認後、逆転写 PCR にかけて、cDNA を合成した。合成した cDNA と Taq, 対応プライマー (*ACT1*, *ACT2*) を混ぜてから、RT-PCR にかけることで、*ACT2* の発現量を調べた。

結果・考察

導入した過剰発現コンストラクトを確認するため、チェック PCR を行ったところ、*ACT2* 過剰発現株の作成に成功したことが確認できた。その後、パロモマイシンによるアソートメントにかけて、導入領域の置換率を上げた。導入効率の良い株にラトランキュリン A を処理し、食胞数を測定した。当初は、Act2p が細胞内で大量に産生されれば、ラトランキュリン A を添加した時点から耐性能を示すと予想していた。しかし、蛍光タンパク質(EGFP, あるいは mCherry)を融合した Act2p を産生する過剰発現株にラトランキュリン A を処理したところ、数時間経過しても食胞形成能は回復しなかった。この結果から、Act2p に融合させた蛍光タンパク質が本来の機能を阻害していると考えた。そこで、蛍光タンパク質無しの Act2p 過剰発現株を作成し、再び食胞の形成数を測定することを目指している。現在、新たに作成した蛍光タンパク質無しの過剰発現株をアソートメントにかけている途中である。

また *P. tetraurelia* にサイトカラシン D を処理し、*T. thermophila* と同様に食胞数を測定した。その結果、阻害された食胞形成能が 2~3 時間後に回復することが確認された。この結果から *T. thermophila* 以外の種にもアクチン重合阻害耐性能が備わったアクチンが存在する可能性が高いことがわかった。

T. thermophila を用いたウェスタンブロッティングと RT-PCR の分析は、現在実験中であるため、研究発表会にてデータを提示する予定である。

織毛虫 *Tetrahymena thermophila* のアクチン結合タンパク質 p85 と fimbrin の機能解析

牛島 倫太郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田治 (筑波大学 生命環境系)

○背景と目的

アクチンは収縮環や細胞骨格の形成、筋収縮などに関わる重要なタンパク質である。アクチンには様々な結合タンパク質が存在し、アクチンと協同的に働くことで細胞の多様なふるまいが生じる。織毛虫の1種 *Tetrahymena thermophila* は全ゲノムが解読され遺伝子操作が可能なモデル生物であり、温度感受性変異株も多く取られているため細胞分裂の研究モデルとしても非常に優れた生物である。温度感受性変異株とは、培養の適当な温度よりも低温や高温におくと細胞機能に支障をきたす株のことである。当研究室ではこの生物を使って収縮環形成やアクチンについての研究をしている。今回私が注目したものは p85 と fimbrin というアクチン結合タンパク質である。当研究室において、1986年に p85 と呼ばれるタンパク質が発見されており、細胞表層における収縮環形成予定位置に点状に局在することや Ca^{2+}/CaM 依存的に G-アクチンと結合することが先行研究により示されていた。また、p85 は野生株と温度感受性変異株 *cdaA1* において分子量が異なっていたため温度感受性に関与する因子であることも示唆されている。これらのことからテトラヒメナの細胞分裂において重要な役割を果たすと考えられる。次に fimbrin はテトラヒメナの分裂溝に局在すると言われているアクチン束化タンパク質のひとつである。アクチン結合ドメイン(ABD)と Ca^{2+} 結合モチーフを2つずつ持つが、テトラヒメナでは Ca^{2+} 非依存的にアクチンと結合することが分かっている。本研究ではアクチン結合タンパク質である p85 及び fimbrin の機能解析を行い、収縮環形成やアクチンの働きに関わる知見を深めることを目的としている。

○方法

・p85 遺伝子及び fimbrin 遺伝子の Knock Out(KO)
30℃、SPP 培地で培養した約 2.0×10^6 cells/mL の *T. thermophila* (野生株及び *cdaA1*) を 10mM Tris-HCl (pH 7.4) に置換して一晚飢餓誘導を行った。その後 p85 及び fimbrin 遺伝子の遺伝子全長を置き換えるコンストラクトをパーティクルガンで導入し、相同組換えにより遺伝子の置換を引き起こした。コンストラクトには Cd^{2+} 感受性プロモーターとパロモマイシン耐性遺伝子(薬剤マーカー遺伝子)が入っており、 $CdCl_2$ を加える事で薬剤耐性遺伝子の発現を誘導することが出来る。これを用いて、薬剤の濃度と $CdCl_2$ の濃度を段階的に設定して培養した。そして遺伝子の置換率が高いものを選出することでセレクションを行った。セレクションを複数回繰り返し遺伝子の破壊を PCR 法により確認した。野生型の遺伝子が検出されず、野生型の遺伝子と比較して異なるバンドが出た株を薬剤がない培地で数回植え継いだ。再度 PCR 法で同様の結果が出たものを KO 株として細胞形態や細胞増殖能、食胞形成能などについて解析を行った。

・p85 遺伝子及び fimbrin 遺伝子の局在解析
KO 株作製と同様に、細胞に飢餓誘導を行ったあと、C 末端側に EGFP を付加した p85 及び fimbrin 遺伝子を発現させるコンス

トラクトを導入した。薬剤によるセレクションを行い遺伝子の組換え率を、PCR 法を用いて確認した。PCR 法で検出限界以下になった株を9割以上置き換わった株とした。まず、蛍光顕微鏡を用いて GFP の蛍光の局在を観察した。次に免疫染色法により抗-GFP 抗体や抗-アクチン抗体で細胞を標識し共焦点レーザー顕微鏡でタンパク質の局在性を調べた。

○結果

・p85 について

p85 を KO した株では細胞増殖能は野生型と変わらず、また細胞の形態も正常であった。p85 の C 末端側に EGFP をつけた株では、先行研究に見られるような分裂溝における局在や特定の部位への局在は見られなかった。このことから EGFP がタンパク質の機能を阻害していることが考えられるため、p85 の C 末端側に HA タグを付加した株を作製して免疫染色により観察をする予定である。HA タグは分子量が EGFP と比較するとかなり小さいためタンパク質の機能阻害をする可能性が低い。

・fimbrin について

fimbrin はアクチン束化タンパク質の一つであり、テトラヒメナにおいて分裂溝に局在するとされていた。fimbrin の C 末端側に EGFP を付加した株を、免疫染色法を利用し観察するとアクチンとともにある時期の食胞の周囲と細胞肛門、deep fiber と思われる部位に沿って局在することがわかった。また、先行研究に見られるような分裂溝への局在は観察できなかった。

○考察

・p85 について

p85 は収縮環形成予定部位に局在し、分裂面の決定に関与するタンパク質とされていたが KO 株において増殖能の異常や形態の異常が見られなかったことから、分裂面決定に関与する可能性は低いと考えられる。また、温度感受性変異株 *cdaA1* の p85-KO 株においても温度感受性が回復しなかった。p85-EGFP 株では p85 が特定の局在を示さなかったことから、局在性がないか、EGFP が立体障害となって機能を阻害している可能性がある。そのため、HA タグを付加した株の詳細は研究発表当日に公開する予定である。

・fimbrin について

テトラヒメナは口部装置から外部の栄養となるものを取り込み、食胞を形成して体内に取り込む。口部装置から細胞内に、微小管からなる deep fiber が伸びており、これにそってアクチンが繊維状に局在している。取り込まれた食胞には一時的にドット状のアクチンが取り囲む。今回の局在観察では、fimbrin がドット状のアクチンと共局在すること、また、deep fiber に沿ったアクチンの繊維とも共局在したことから食胞形成に関与していることが考えられる。細胞肛門への局在も観察されたため、食胞の排泄にも関与していることが示唆された。KO 株に関して詳細は発表当日に公開する予定である。

織毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* のアクチン細胞骨格制御因子 *Tt*CRN1 の機能解析

薄 啓子 (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)

研究の背景と目的

ヒトに骨格があるように、真核細胞には細胞骨格とよばれる骨組のはたらきをする構造がある。細胞骨格はアクチンや微小管、中間径フィラメント、そしてそれらの結合タンパク質から構成される。本研究の対象であるアクチン繊維は、細胞内では ATP 型の G-アクチンが F-アクチンの+端に付加し、一端では加水分解により ADP 型となったアクチンサブユニットが繊維から脱重合する。このターンオーバー状態が保たれ、そして架橋タンパク質やミオシンが作用して、細胞骨格が機能する。

真核生物には百種類以上ものアクチン結合タンパク質 (ABP) が存在し、それらは様々な方法でアクチン再編成を調節する。ABP には、真核生物界全体に広くみられ、アクチン細胞骨格の機能の根幹にはたらくものから、限定された系統群にのみ発現し、固有な細胞現象に寄与するものまで多様性がみられる。本研究で着目した「コロニン coronin」は、細胞性粘菌から最初に発見された ABP であり、酵母やヒト白血球などでもそのホモログの機能解析が進められてきた。そして最近、原生生物のゲノム解析の目覚ましい進展により、コロニンは真核生物において根源性の高い ABP の一つであることが認識されつつある。

基本的にコロニンは、そのタンパク質の N 末端側半分程に細胞膜との結合性を示す WD40 反復配列領域を、C 末端側には自己会合を可能にするコイル領域を有する。さらにそのコイル領域の N 末端側にはアイソフォーム特有の機能を司る特異的なアミノ酸配列をもつのが指摘されている。コロニンのアクチンへの作用は、架橋構造の形成に留まらず、Arp2/3 複合体やコフィリンなどの他の ABP のアクチンへの作用の制御など多岐におよぶ。しかし、これらの知見は酵母などの一部のモデル生物から得られた知見に過ぎない。そのため、全く別の系統群のコロニンについて解析することは、真核生物のアクチン細胞骨格の制御の普遍性と多様化を理解する上で、大変に興味深いことである。

そこで、本研究では、アルベオラータ生物群に属する織毛虫テトラヒメナの *Tt*CRN1 の細胞機能について解析を行った。

方法

*Tt*CRN1 の細胞内局在性を調べるために CRN1-eGFP 株を (①)、そして遺伝子破壊により細胞に生じる影響を評価するために CRN1-KD 株を (②)、次の要領で作製した。

PCR 法にて、{ ① eGFP-Neo4 カセット^{*}、または ② Neo4 カセット } の 5' 側と 3' 側に、これらを挿入する染色体上の目的部位 { ① CRN1 遺伝子の stop codon、② CRN1 遺伝子の ORF 全体 } に近接する約 1 kb の DNA 配列を付加したコンストラクトを作製した。これらを、バイオリスティックガンを用いてテトラヒメナ B2086 株 (野生型株) の大核に導入した。

形質転換した細胞を、タンパク質合成阻害剤 Paromomycin と CdCl₂ を適切な濃度で添加して培養した。その後、大核内の約 45 コピー存在する染色体上の *Tt*CRN1 の遺伝子座が、導入した Neo4 遺伝子が挿入されたものより多く置換した細胞

を選抜した。さらにその細胞株から細胞をひとつずつ単離培養し、置換率の高い細胞株を樹立した。最終的に、CRN1-eGFP 株ではほぼ全て置換型の細胞株を得ることに成功した。CRN1-KD 株については、大核内の 9 割以上の CRN1 遺伝子をノックダウンするのに成功した。

※Neo4 カセット：Cd²⁺ 誘導性 promoter の下流に

Paromomycin 耐性遺伝子 (Neo4) が連なったマーカー遺伝子断片。形質転換体の選抜に用いた。

結果

まず、CRN1-eGFP 株の蛍光シグナルを顕微鏡下で観察した。その結果、テトラヒメナの CRN1 は、主に形成直後の若い食胞の周囲にドット状に局在するのがわかった。このドット状の局在は、アクチンと共局在性が示された。また、テトラヒメナを飢餓状態にさせると、肛門付近に位置する排出直前と推測される小胞の周囲でも、CRN1 はドット状に局在した。次に、アクチン重合阻害剤で処理した細胞において CRN1-eGFP の局在性を調べると、一部の蛍光シグナルが食胞膜周辺に残存するのが認められた。そのため、テトラヒメナのコロニンはアクチン繊維とは独立に食胞膜に結合する活性があることが伺えた。

一方、CRN1 をノックダウンすると、食胞形成効率の低下が認められた。しかし、形質転換体を維持するために培地に添加した Paromomycin による 2 次的な影響を考慮する必要があり、結論には慎重な検証を待たねばならない。

考察

テトラヒメナのコロニン CRN1 は、アクチン細胞骨格の再編成にはたらく、食胞形成に寄与している可能性がある。これは、公開されているテトラヒメナ遺伝子発現データ (TGED; <http://tged.ihb.ac.cn/>) の情報より *Tt*CRN1 の発現量が飢餓状態で ~25% 程度まで減少することと合致する。細胞性粘菌や白血球でもコロニンがファゴサイトーシスに寄与する知見と併せると、コロニンが食胞膜のアクチン細胞骨格を介した形成過程にはたらくことは、真核生物にとって普遍性が高い分子機構だと推察できる。一方、遺伝子のコピー数を 10% まで下げても、細胞増殖は正常に起こることが分かった。そのため、*Tt*CRN1 は細胞分裂には重要なはたらきをしていない可能性が考えられた。今後、野生型株と CRN1-KD 株のアクチン細胞骨格の性状を比較すること、さらに完全に *Tt*CRN1 を遺伝子破壊した細胞株を作成してより詳細に解析することで、不明な点が多いアルベオラータ生物群のアクチン細胞骨格の制御機構についての理解が進むと期待される。

謝辞

本研究におきましては、沼田治教授と中野賢太郎准教授、同研究室の研究者の方々や、高見澤広子さんをはじめとする諸先輩方に大変多くのご指導を賜り、また、同輩の皆にも沢山のご協力を頂きました。ここに、心から深く御礼申し上げます。

繊毛虫テトラヒメナの新奇アクチンアイソフォームの細胞機能の解析

藤戸 洸太 (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・目的

テトラヒメナは繊毛虫門に属する単細胞真核生物であり、体細胞核としての性質をもつ大核 (~45C) と、生殖核としての性質をもつ小核 (2C) の 2 核性の特徴を有する。そのうち、*Tetrahymena thermophila* は全ゲノムが解読され、遺伝子操作が可能であることから、繊毛虫のユニークな生命現象を解明するためのモデル生物として活躍している。

アクチンは、細胞運動や細胞質分裂など生命現象の根幹を支える主要なタンパク質の 1 つである。その重要性から、真核生物の間では、アクチンのアミノ酸配列は高度に保存されている。一般には、細胞の形や運動様式が異なる分子基盤は、何十種類ものアクチン調節タンパク質の作用の組合せの違いに立脚する考えが流布している。ところが、テトラヒメナは 4 種のアクチンアイソフォーム (*Tt* ACT1~4) を有し、最も発現量が高い *Tt* ACT1 は一般的なアクチンと最も相同性が高いが、それでも約 25% ものアミノ酸が保存されていない。これは、真核生物全般のアクチンから見ると、極めて異質である。これらのアクチンアイソフォームは細胞内で共重合してはたらくのか、あるいは独立な細胞骨格を形成するのか、皆目見当がつかない。

今回、私は機能未知な *Tt* ACT3、及び *Tt* ACT4 の細胞機能の解析を目的として、それらの遺伝子破壊と局在解析を行った。本研究により、アクチンの新奇機能の発見が期待される。

方法

1) 遺伝子破壊について

標的遺伝子の ORF を薬剤耐性マーカーである *Neo4* カセットと相同組換えすることで、遺伝子破壊した。遺伝子破壊の手法には、大核および小核に遺伝子導入する 2 通りの方法がある。それらを、Somatic KO 法および Germ line KO 法という。遺伝子導入の確認には PCR 法を用いた。

(a) Somatic KO 法 (図 1 参照)

大核への遺伝子導入効率を高めるため、飢餓状態にして食胞を退化させた細胞を用意した。この細胞に、形質転換する遺伝子をパーティクルガンによりショットした。その後、薬剤存在下で生育した細胞を選別・培養した。細胞分裂時に、大核の染色体はランダムに分配されるため、娘細胞間で導入された遺伝子の配分には偏りが生じる。そこで、薬剤による生育の選別を段階的に厳しくし、大核内の標的遺伝子がより多く *Neo4* カセットと置換した細胞を得ることが可能である。この操作を繰返し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットと置換した株を樹立する。

(b) Germ line KO 法 (図 2 参照)

接合細胞は、第 1 減数分裂前期に小核が細胞長の 2 倍にも伸長する。小核への遺伝子導入効率を高めるために、この時期の細胞にパーティクルガンを用いて *Neo4* カセットをショットした。薬

剤選別で拾った次世代の細胞 (G1) から、小核ゲノムに導入した薬剤耐性マーカー遺伝子をヘテロにもつ細胞株を樹立した。その株を小核がない star 株と交雑し、小核に *Neo4* カセットがホモな G2 を得た。テトラヒメナは交雑時に旧大核を退化させ、小核から大核を新生する。そこで、G2 同士を交雑し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットと置換した株を得る。

2) 局在解析について

Somatic KO 法と同様に、標的遺伝子の ORF の翻訳開始コードの N 末側に、*Neo4* カセットと Cd^{2+} 誘導性プロモーター下に EGFP 遺伝子を連結したコンストラクトを導入した。形質転換株は、薬剤耐性性能の確認と PCR 法で導入遺伝子の有無を確認した。樹立した N 末 EGFP 発現株を Cd^{2+} で処理し、目的遺伝子産物の細胞内局在性を調べた。

結果

1) *Tt* ACT3 について

Somatic KO によっては、完全に *Neo4* カセットと *Tt* ACT3 遺伝子が置換した株を作成できなかった。そこで *Tt* ACT3 が細胞増殖に必須あるいは極めて重要な遺伝子である可能性を考え、Germ line KO で遺伝子破壊を試みた。その結果、目的の遺伝子破壊株の樹立に成功した。現在、*Tt* ACT3 KO 細胞の表現型について検討を進めている。N 末 EGFP 発現株の観察結果と共に、研究発表会にて詳細を報告したい。

2) *Tt* ACT4 について

Tt ACT3 と同様に、Somatic KO ではなく、Germ line KO で遺伝子破壊を試みた結果、遺伝子破壊株の樹立に成功した。N 末 EGFP 発現株の観察結果と共に、*Tt* ACT4 KO 細胞の表現型について研究発表会で紹介できるよう研究中である。

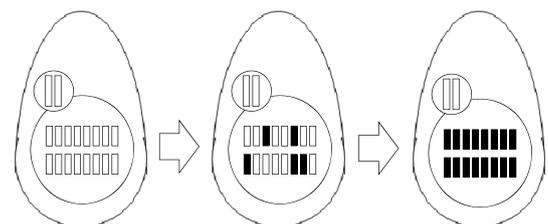


図 1 : Somatic KO 法の概要

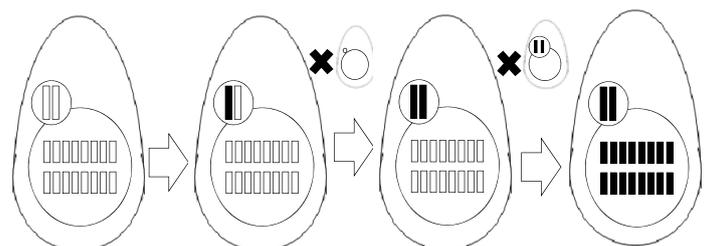


図 2 : Germ line KO 法の概要

分裂酵母の細胞質分裂におけるアクチン束化タンパク質の機能

森田 陸離 (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)

【研究背景・目的】

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はモデル真核生物として研究が進み、細胞分裂の分子機構の知見が豊富に蓄積している。分裂酵母は動物細胞のように、アクチンからなる収縮環によって分裂する。収縮環の形成と動態を時空間的に制御する過程では、一連のアクチン結合タンパク質の秩序だったはたらきが必要である。その中でも、アクチン繊維を収縮環にまとめ上げるアクチン束化タンパク質は、特に重要な役割を担うと考えられる。

本研究では、分裂酵母の収縮環を構成するアクチン束化タンパク質のうち、IQGAP 様タンパク質と α -アクチニンに注目した。これらは、アクチンとの結合にカルポニン様ドメイン (CHD) を用いる点で共通している。しかし、IQGAP 様タンパク質の CHD は 1 つだけだが、 α -アクチニンは 2 つの CHD が直列したアクチン結合ドメイン (ABD) をもつ。そのため、収縮環内で両タンパク質はアクチンへ異なる生理作用をもつと推察される。ところが、 α -アクチニンの遺伝子破壊、または IQGAP 様タンパク質の CHD を欠損しても、分裂酵母は細胞分裂が可能である。そこで、アクチンに対する両タンパク質の機能重複性を検討し、さらに各々に固有な生理機能を調べることを思い至った。単に一方の遺伝子のバックアップのために、もう一方の遺伝子を利用するだけであれば、機能ドメインの多様化の説明には不十分である。多くの真核生物は、同一細胞内に複数種類の CHD を有するアクチン調節タンパク質を発現する。本研究は、それらの細胞内アクチンに対する生理作用の協同性を知る第一歩であり、多彩な CHD ファミリーの分子進化の理解に大切である。

【アプローチおよびその結果】

(1) - 遺伝学的相互作用の解析

α -アクチニンの遺伝子破壊株と IQGAP 様タンパク質の温度感受性変異株のダブルミュータントを作成した。この温度感受性変異株は 30°C より高温下ではタンパク質の機能が生存に必要な活性を保てない。興味深いことに、30°C ではダブルミュータントのみがコロニーを形成できなかった。つまり、両タンパク質の機能が同時に減弱することで、細胞は増殖できないことが判明した。本実験の結果、これら 2 種類のアクチン束化タンパク質は、重複した機能を担うことが判明した。

(2) - α -アクチニンの生化学的性質の検証

IQGAP 様タンパク質の CHD はアクチンを束化することが生化学的に調べられている (高稲ら, 2009)。そこで、 α -アクチニンのアクチンに対する活性を調べ、先の報告と比較することを目指した。GST 融合型 α -アクチニンを大腸菌で発現し、その抽出液をグルタチオンビーズとインキュベートし、目的のタンパク質を精製した。その後、GST と α -アクチニンの間の連結配列を特異的なプロテアーゼで切断し、 α -アクチニンのみを得た。

この α -アクチニンを用いて、アクチン繊維との共沈実験を行った。超遠心によりアクチン繊維とともに沈降した α -アクチニンの量から、アクチン繊維との結合の解離定数を求めた。さらに低速遠心により、 α -アクチニンが濃度依存的にアクチン繊維を束化する活性を調べた。また、蛍光標識したアクチン繊維を用いて、 α -アクチニンの束化構造を蛍光顕微鏡で記録した。現在、IQGAP 様タンパク質の CHD の活性との比較を進めるため、データを整理している。

(3) - リン酸化による IQGAP 様タンパク質の制御機構の解析
高稲ら (2009) の先行研究では、IQGAP 様タンパク質の CHD (1~189 a. a.) に続く領域 (200~300 a. a.) が収縮環への特異的な局在性に関わることが示唆されている。この領域には、CDK (Cyclin-dependent kinase) の推定リン酸化部位が複数ある。そこで、該当するセリン及びスレオニンをアラニンに置換して非リン酸化型変異体に、またアスパラギン酸に置換して疑似リン酸化型変異体を用意した。これらの CHD を含む IQGAP 様タンパク質の 1~300 a. a. に蛍光タンパク質を付加して局在性を調べた。その結果、野生型および非リン酸化型分子が収縮環に局在するのに対し、疑似リン酸化型分子は収縮環に局在しなかった。今後、細胞内でこれらの部位が実際に CDK によりリン酸化されるか、そして、その生理的意義について検討を深める計画である。

【考察と展望】

本研究結果から、分裂酵母 α -アクチニンの収縮環アクチンへの細胞内作用と *in vitro* 活性が確かめられた。興味深いことに、IQGAP 様タンパク質の CHD は単独で束化活性を発揮する (高稲ら, 2009) のに対し、 α -アクチニンは ABD に連結したスペクトリンリピートドメインでホモダイマーを形成し、ABD を 2 つもつことでアクチンを束化すると思われる。両方とも、CHD を基盤としたアクチン結合タンパク質であるにもかかわらず、異なる束化様式をもつ理由は不明である。これらのタンパク質における僅かなアミノ酸残基の変異が、アクチンに対する活性を質的に変化させた可能性がある。今後、両タンパク質の生理機能や束化作用を分子レベルで究明することで、将来的に、CHD ファミリーの分子進化や、アクチン細胞骨格への機能の多様化の理解につながる、興味深い研究に発展すると期待できる。

また、CHD のアクチン結合性がリン酸化制御されるなら、細胞周期特異的に収縮環が形成され、収縮するメカニズムを解き明かすための重要な知見となる可能性が高い。酵母や動物細胞では、分裂中期にかけて CDK の活性が高く、分裂後期に Cdc14 ホスファターゼ活性が上がることで、細胞分裂に伴うダイナミックな染色体分離や細胞質分裂が秩序だつて進行する。今回、見いだした IQGAP 様タンパク質の CHD の収縮環への局在性のリン酸化制御の可能性が、収縮環の動態にどのような役割を担うのか、今後の研究の展開が多いに期待される。

出芽酵母を用いたアクチン変異体のサブレッサー解析

湯本 天嗣 (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)

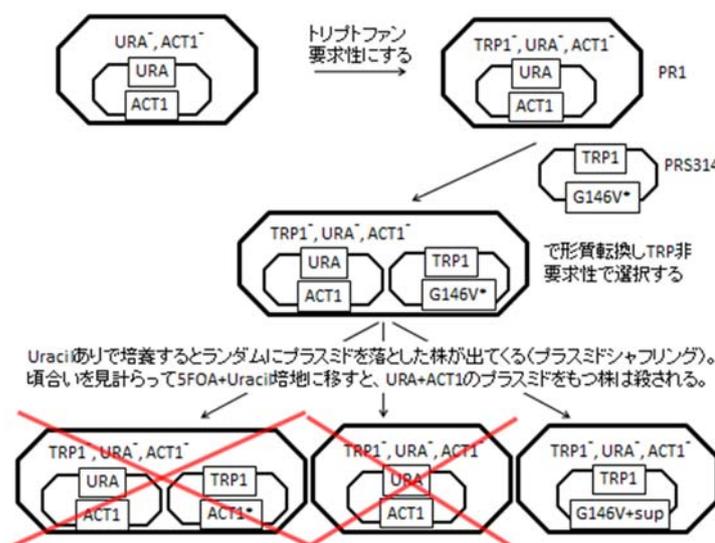
背景・目的

アクチンは非常に多機能なタンパク質で、アクチン単量体同士が重合してアクチンフィラメントを形成し、筋収縮や細胞骨格系の構築など生命活動に重要な様々な運動に関与している。アクチンの多機能性は、それぞれ特異的なアクチン結合タンパク質 (ABP) との相互作用に依存することがわかっているが、同一細胞中に存在するアクチンフィラメントが異なる ABP と相互作用するメカニズムのひとつとして、アクチンフィラメントの構造多型性が重要であることが近年分かってきた。ABP との相互作用でアクチンフィラメントの構造が協同的に変化することで ABP とのアフィニティーが変化し、その状況に適した機能を選択できることが示唆されている (e.g., Uyeda et al., 2011)。

粘菌アクチン ACT15 の N 末端 4 アミノ酸を酵母アクチン ACT1 のものに換えた Y-AR での G146V 変異アクチンは野生型酵母アクチンに対して優性阻害を示し、野生型アクチンと共重合したアクチンフィラメントは協同的な構造変化ができなくなることが分かっている (Noguchi et al., 2010)。これはアクチン分子のサブドメイン間のヒンジ部分の変異により分子内での構造変化の自由度が下がったためにアクチンフィラメント全体で構造を変化しづらくなったのだと考えられる。

本研究では、このようなアクチンフィラメントの構造変化に影響を与える変異アクチンに対してサブレッサー変異を見つけ出すことを目的とし、そのスクリーニング系を構築した。サブレッサー変異とは、ある変異が原因で生じた表現形の変化を打ち消すような変異のことで、G146V 変異に対する分子内サブレッサー変異はヒンジ部分の分子内構造との相互作用を示唆し、またサブレッサー変異アクチン単体でのアクチンの表現型が変化する可能性がある。このようなサブレッサー変異を解析することによってアクチンフィラメントの構造変化について新たな知見の手がかりになることを期待する。

材料と方法



サブレッサーのスクリーニングには 5FOA セレクションを用いる。

前提として、酵母の増殖においてアクチンは必須であることと、5-fluoroorotic acid (5FOA) という薬剤は *URA3* 存在下で毒性のある物質に変わることを利用する。ゲノムの *URA3* と *ACT1* を破壊しこれらをプラスミドで保持するトリプトファン要求性の出芽酵母株 PR1 を *TRP1* とランダムに変異を加えた G146V-*YAR* が乗ったプラスミドで形質転換する。これを TRP-URA⁺ の培地でしばらく培養し、5FOA を添加した TRP-URA⁺ の寒天培地に播種すると、*TRP1* と変異アクチン遺伝子を持つプラスミドを保持し、かつ G146V の阻害作用が打ち消されアクチンの機能が回復した株のみがコロニーを形成する。

：サブレッサー変異ライブラリの作成

G146V 変異アクチンへのランダムな変異の導入は Error Prone PCR (EPPCR) で行った。この PCR 産物を megaprimer とし、pRS314 を鋳型とした megaprimer 法の改変法を用いて 5' 末端と 3' 末端に相同部位も持った線状の DNA を作成した。この DNA で酵母を形質転換した際に両端の相同部位で相同組換えを起こして環状プラスミドになる。

：形質転換と 5FOA セレクション

酢酸リチウム法を用いて線状ライブラリ DNA を酵母へ導入し、ウラシルを加えた SD 培地で 2 日間培養後 5FOA プレートに播種し、生じたコロニーからサブレッサー候補を得た。

結果

：EPPCR の最適化

サブレッサー解析を行うに当たってアクチンコード領域 1133bp 当たり 1,2 個程度のエラー率に調整する必要があった。EPPCR の反応液中のエラー率に影響する MnCl₂ の最適な濃度を実際に EPPCR を行って配列を解析することにより求めた。その結果、MnCl₂ 終濃度 0.1 mM において 1133bp 当たり平均 1.85 個のエラー数となったのでこの MnCl₂ 濃度を採用した。

：5FOA セレクション

5FOA セレクションによって多数のコロニーが生じ、ここから得られたサブレッサー候補を解析した結果、G146V の Valine が Glycine に戻ったリバータントが得られたが、他には pRS314 上の *YAR* が PR1 の *ACT1* で組換わったプラスミドがバックグラウンドとして多数現れたため、サブレッサー変異を得ることができなかった。これは PR1 上の *ACT1* と pRS314 上の *YAR* が共通のプロモーター・ターミネーターをもつため線状ライブラリ DNA を導入した際に両者の間で相同組換えが起き、pRS314 に *ACT1* が混入してしまったためだと考えた。そこでこのバックグラウンドを除去するために、pRS314 の *YAR* のターミネーター領域を酵母 *TDH3* のターミネーター領域に置換したプラスミドを作成し、再度 5FOA セレクションを行った。

この 5FOA セレクションで多数のコロニーが生じ、現在これらのサブレッサー候補について解析している。

ゾウリムシの遊泳行動に対する外部電場の効果

鈴木 啓介 (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

動物は外界の物理的、化学的環境を刺激として受け取り、生存にとって意味のある動き、即ち、行動反応をしめす。

ゾウリムシは多数の繊毛を使い水中を活発に遊泳する単細胞生物である。単純な体制をもつが、他の動物と同様、外界の様々な刺激に対して行動反応を示す。例えば、ある種の化学物質を含む溶液に遭遇したゾウリムシはその中に入るか、あるいは、そこを避ける行動をとる。これらは、正または負の化学集合と呼ばれる。化学集合は、ゾウリムシが有益な化学環境に集まり、有害な化学環境を避ける生理的な反応である。一方、ゾウリムシは外部に与えた電場に対しても行動反応を示し、陰極に向かい遊泳することが知られている。電気走性と呼ばれるこの反応は、外部電場による、ゾウリムシの膜電位に対する物理的影響が原因である。

私は、外部電場による物理的影響下で、ゾウリムシの生理的な集合反応がどのような影響を受けるのかに興味を持った。この実験では、はじめに、ゾウリムシの電気走性の性質について詳細に調べ、次に、外部電場の存在下で、生理的な化学集合がどのようなものかを調べることを目的とした。

材料・方法

実験に用いたゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)は麦藁の抽出液によって培養した。1週間培養して、早期定常期に入ったゾウリムシを標準溶液(1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Tris-HCl pH7.4)で洗浄した後に実験に用いた。

ゾウリムシの電気走性は以下の方法により調べた。ゾウリムシを含んだ標準溶液を実験槽内(長さ20 mm、幅5 mm、厚さ1 mm)に満たし、その両端に塩橋を介して銀—塩化銀電極を置いた。これらの電極を通して電気刺激装置(日本光電 SEN-3301)から電圧をかけて実験槽に電場をかけた。実験は暗視野照明、実体顕微鏡下で行った。ゾウリムシの行動反応はビデオカメラで30秒間記録して解析した。

ゾウリムシの化学集合を調べる実験槽は電気走性を調べるものと同じものを用いた。化学集合を調べる時には、この実験槽の中央で2種類の組成の異なる溶液が接するようにした。今後この実験槽でゾウリムシの分布や行動反応を調べる予定である。

結果

(1) 初めに外部電場によって実験槽内におけるゾウリムシの分布がどのように変化するかを観察した。実験槽中に均一に分布していたゾウリムシは、電場を与えると速やかに陰極方向に遊泳方向を変え、陰極側に向かって移動した。その結果、ゾウリムシは時間とともに、陰極側に集まった。

電気走性時のゾウリムシの分布を定量的に調べるために、実験槽の観察区域を電場の向きに沿って8つに分割し(陽極側から①～⑧とする)ゾウリムシの分布を時間を追って観察した。陽極側半分区域では、ゾウリムシの個体数は時間経過とともに顕著に減少していった。逆に、最も陰極側(⑧)ではゾウリムシの個体

数が顕著に増加し、そのとなりの区画(⑦)でも個体数の増加が見られた。中間の⑤と⑥では若干、個体数が減少した。

次に、ゾウリムシの電気走性に対する、外部電場の強さの効果について調べた。今回与えた電圧範囲(0V～100V)では、ゾウリムシはいずれの強さでも、陰極側に集まる行動反応を示した。ゾウリムシの陰極側への集中は与えた電場が強くなるに従い短時間で生じるようになったが、更に電場が強くなると(10V以上)一定になった。

次に外部電場の強さとゾウリムシの遊泳速度の関係について調べた。ゾウリムシの遊泳速度は与えた電場の強さの変化に対してほとんど変化しなかった。

同様に、外部電場の強さと遊泳方向が変化するまでの時間の関係を調べた。ゾウリムシは電圧が強いほど短時間で陰極を向いた。

考察

この実験から、与えた外部電場によりゾウリムシの分布が陰極側に集中する(電気走性)ことが確認された。電気走性の原因は、通常ランダムであるゾウリムシの遊泳方向が、陰極方向に偏ることにある。このゾウリムシの遊泳方向の定位はゾウリムシの膜の、陰極側の脱分極と陽極側の過分極により生じる。ゾウリムシの陽極側の繊毛は過分極により繊毛打強化を示し、陰極側の繊毛は逆に脱分極により繊毛逆転を示す。これら、部分的に異なる繊毛の反応により、ゾウリムシはどの方向に遊泳していても、最終的に陰極側を向くことになる。方向が決まり、電場中で陰極に向かっているゾウリムシにおいても、陽極側(後方)の繊毛では繊毛打強化反応が、陰極側(前方)では繊毛逆転が生じている。これらの繊毛により生じる力は全く逆方向に作用するが、前進を促す陽極側の繊毛運動が勝るためにゾウリムシは陰極方向に向かう。部分的にせよ、このような細胞の進行方向に逆らった繊毛打は生理的な反応ではほとんど見られない。これが、ゾウリムシの電気走性が物理的な側面に依存しているとされる所以である。

単純な生物の分布を決定する遊泳行動には走性と集合という、異なるメカニズムの存在が知られる。走性とは、刺激(あるいは刺激の強さ)の方向に依存した行動反応であり、一方、集合は二種類の異なる環境の境界での行動反応が主な原因で生じる。ゾウリムシの分布の偏りをもたらすメカニズムとしては、これまで、物理的な電気走性の他には方向性をもった走性行動は知られておらず、生理的な分布の偏りは集合反応によるとされている。ゾウリムシが化学集合を示す際には、化学環境の異なる境界部に到達したゾウリムシが、その先端部分が局所的に異なる環境に置かれるため、細胞の部域により異なる環境が生じ、部分的に不均一な繊毛運動が生じる可能性がある。このような、ゾウリムシの生理的な集合反応に対して、繊毛運動に物理的な影響を与える外部電場がどのように作用するかは大変興味を持たれる。今後、これらの疑問を解明するために、化学刺激と外部電場の関係をより詳細に調べてゆく所存である。

ゾウリムシの化学刺激応答性に対する温度と光条件の効果

福井 大智 (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

生物は外界の様々な環境情報を刺激として受容し、それに適切に反応して、生存に有利な環境を選択している。単細胞生物であるゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)は、1つの細胞が1つの個体を形成しており、個体としての体制は多細胞動物と比べて単純だが、様々な刺激に対して複雑で整合性のある行動を示す事が知られている。

これまでに、ゾウリムシの化学刺激や温度刺激、光刺激などに対する行動反応とその制御機構はある程度解明されている。しかし、自然界では様々な外部要因が同時に存在しており、生物は複数の環境要因の中で生きている。私は、単細胞生物の刺激応答反応に対して、別種の刺激の存在が影響を与えるのではないかと興味を持った。

本研究では、単細胞生物であるゾウリムシを用いて、光条件と化学刺激反応性の関係、また、温度条件と化学刺激反応性の関係を調べ、異なる刺激に対する反応性に相互作用があるかどうかを明らかにすることを目的とした。

材料・方法

化学刺激を与えた時のゾウリムシの行動反応に対する光条件の効果を実験では、培養したゾウリムシを標準溶液(1mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM Tris-HCl, pH7.4)で4回洗った後、インキュベーター内(20°C)で光条件を変えて1~3日間培養した。温度変化による影響を最小限に抑えるため、ゾウリムシを入れた試験管は水を満たした水槽に入れた。培養中は光源として試験管から30cmの距離に蛍光灯を設置し、常に点灯させた。ゾウリムシを入れた試験管は2群に分け、片方をアルミホイルで覆い光を遮断することで、暗条件とした。もう片方は試験管を覆わずに、明条件とした。実験前に再び標準溶液で4回洗い、30分間室温で放置した後、化学刺激を与えた。

今回、化学刺激として標準溶液中のKCl濃度を、それぞれ、5mM、10mM、20mM、40mMに上げた溶液を用いた。標準溶液中に順応させたゾウリムシを、小さいピペットを用いて刺激液に緩やかに吹き出し、そのときに生じる行動反応を観察、計測した。

温度条件を変える実験では、ゾウリムシを標準溶液で4回洗った後、10°Cと20°Cのインキュベーターに入れ、3日間飼育した。実験前に再び標準溶液で4回洗い、30分間室温で放置した後、光条件の実験の際と同じくKCl濃度の異なる溶液に移し、化学刺激を与えた。

結果

ゾウリムシを標準溶液からKイオン濃度の高い刺激液に移すと、速やかに後退遊泳を始め、次に、一カ所に留まって細胞の先端部分を旋回させた後、ゆっくりと前進遊泳に戻っていった。これら一連の行動反応は、刺激液のKイオン濃度が高い程顕著であり、後退遊泳の持続時間や旋回運動の持続時間は長くなった。

光条件を制御した条件下で同様の化学刺激を与えると、ゾウリムシは明条件、暗条件共に、通常と同様の行動反応を示した。しかしながら、明条件下では後退遊泳も旋回も持続時間が顕著に長かった。暗条件下では通常の培養条件下と同様であった。

光条件制御下での後退遊泳の持続時間を光条件に移してから時間経過に対して調べた。明条件では、ゾウリムシの後退遊泳持続時間は、時間とともに長くなった。一方、暗条件下では、時間に対して変化しなかった。

異なる温度条件下で同様の化学刺激を与えると、ゾウリムシは自然条件(20°C)、低温条件(10°C)共に、通常と同様の行動反応を示した。しかしながら、低温条件下では各化学刺激における後退遊泳も旋回も、自然条件下と比べて持続時間が短かった。

考察

今回の実験から、ゾウリムシを明条件下で培養した場合、化学刺激に対する反応が顕著になることが明らかとなった。暗条件と通常の培養条件下では、反応性に差が見られなかったことから、反応性の増強には比較的強い光が必要であると考えられる。今後、光条件をより精密に制御し、その強度を変える実験が必要である。明条件下で生じる化学刺激応答性の増強は、培養期間が長くなるにつれ次第に顕著になっていった。ゾウリムシの後退遊泳には、細胞の膜興奮とそれに伴う外液から細胞内へのCa²⁺イオンの流入が必要なので、明条件に置かれたゾウリムシは、光条件により、化学刺激受容系もしくは細胞の興奮性を変化させていることが示唆される。

ゾウリムシが明条件で他種刺激に対する応答性を増強する事実は、明るい場所でゾウリムシが刺激に対してより顕著な回避行動を示すことを示唆する。従って、光により生じる反応性の増強は、ゾウリムシが視覚などの光情報に依存した捕食者から逃れるために有効であると考えられる。

ゾウリムシを低温条件下で育成した場合、後退遊泳及び旋回の持続時間は短くなった。これは単純に温度低下によって細胞の代謝活性が下がった結果であると解釈できるが、刺激応答性の変化の可能性について更に実験が必要である。

今回の実験から、ゾウリムシに於いて異なる種類の刺激間に相互作用が存在することが強く示唆された。今後、更に別種の刺激間の相互作用について検討することが必要である。

ゾウリムシの生理活性に対する外液の化学環境の効果

山田 理瑛 (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

生物は水なしには存在し得ない。水の物理的、化学的性質は生物に対して大変大きな影響を持つ。特に、細胞一つが一個体を形成する単細胞生物は、細胞が直接外界の水環境にさらされるため、体液をコントロールして恒常性を維持している多細胞生物の細胞と比べると、大きな環境変化の影響を受ける。そのため、単細胞生物はそれら大きな環境変化に適応して生きてゆく必要がある。

地球上の主要な水環境は、イオン濃度の低い淡水と、それに比べイオン濃度や浸透圧の高い海水に大別される。両者はイオン濃度にしておよそ 1000 倍もの開きがあり、その化学的環境は大きく異なる。

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は、全身に生えた繊毛を使って水中を遊泳する原生動物である。ゾウリムシの生息域は、水田、湖沼等、淡水の止水域が中心である。しかし、何らかの原因で流水中に入ったゾウリムシはより低い場所に流され、最終的に海に到達すると考えられる。淡水産ゾウリムシが海水に遭遇した時にどのように対応するかは非常に興味深い。私はゾウリムシが海水等の化学的性質の異なる環境に到達した時の反応に興味を持ち、実験条件下で生存や行動反応を調べてみたいと思った。この研究は、海水と淡水、また、異なる浸透圧や有害物質の存在等の水中の化学的環境がゾウリムシに及ぼす影響について調べることを目的とした。

材料及び方法

本実験では、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) を麦わら抽出液で継代培養したものを実験開始 30 分以上前に標準溶液 (1mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM Tris-HCl, pH7.4 前後) で洗浄して用いた。また、この標準溶液を淡水として扱う事とした。海水は化学的組成の明確な人工海水 (500mM NaCl, 30mM MgSO₄, 10mM KCl, 20mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, 5mM Tris-HCl, pH8.0) を用いた。外液の浸透圧を変化させる時にはショ糖を用いた。有害物質としては、キニーネを使用した。

結果

(1) 淡水産ゾウリムシの海水中での生存率

はじめに、ゾウリムシが海に流れ着いたことを想定して、海水中でのゾウリムシの生存を調べた。標準溶液に順応させたゾウリムシを希釈していない海水 (1/1 海水とする) に移すと、速やか (1 分以内) に死亡した。ゾウリムシを希釈した海水 (1/10 から 1/100) に移すと、すぐには死ななくなったが、時間とともに生存率が落ちていった。更に海水を希釈すると (1/1000)、時間が経過してもゾウリムシは殆ど死ななくなった。ゾウリムシの生存率が半分に落ちる半致死時間は海水の希釈に伴って延長した。

(2) 段階的にイオン環境を変化させた時のゾウリムシの生存
ゾウリムシの海水に対する抵抗性が汽水域に一定時間滞在した時にどのように変わるかを調べるため、標準溶液に順応させたゾウリムシを希釈海水 (1/30 から 1/1000) に 30 分程度晒した後、そこよりも高濃度の希釈海水 (1/10) に移した。ゾウリムシの生存率は、直接 1/10 希釈海水に移した時よりも上昇する傾向にあった。

(3) ゾウリムシに対する高浸透圧の影響

淡水と比べ海水中ではイオン濃度が高まると同時に浸透価も高くなる。どちらの要因がゾウリムシの海水中での死亡原因であるか調べるため、海水中の浸透価を一定に保った条件でイオン濃度を低下させた。1/10 希釈海水中では、ゾウリムシは 24 時間中にすべて死亡したが、これと等張のショ糖溶液中では殆ど死亡しなかった。

(4) 海水に移した直後のゾウリムシの行動反応

標準溶液から海水に移したゾウリムシは、速やかに繊毛逆転を示し、後退遊泳した。1/1 海水から 1/4 希釈海水中では、ゾウリムシは死亡に至るまで後退遊泳を続けた。1/8 希釈海水から 1/30 希釈海水中では、ゾウリムシは後退遊泳の後、旋回運動を経て前進遊泳に戻った。更に海水を希釈すると、ゾウリムシは後退遊泳を示さなかった。

(5) キニーネ溶液中でのゾウリムシの生存率

マラリア原虫に対する薬剤として知られるキニーネを含む溶液中でのゾウリムシの生存率を調べた。0.1mM 以上のキニーネ存在下でゾウリムシは死亡した。キニーネ濃度依存性の詳細に関しては現在実験中である。

考察

今回の実験から、ゾウリムシは淡水から直接海水中に入るとごく短時間で死に至ることが明らかとなった。淡水産ゾウリムシは大きく化学的組成の異なる海水に即座には対応することができないものと考えられる。ゾウリムシは海水中のイオンの代わりに等張のショ糖を入れた溶液中では死亡しなかったため、海水の毒性はイオンに由来すると考えられる。

一方、汽水域を想定した希釈海水を用いた実験から、化学組成の変化が緩やかであると、海水がゾウリムシに与える毒性は若干軽減されたので、ゾウリムシは海水に対してある程度順応することが可能であると考えられる。

今回の実験でゾウリムシを海水に移すと後退遊泳が生じることが明らかとなった。これは、野外で海水に遭遇したゾウリムシが回避反応を行うことを示す。従って、ゾウリムシは生存が困難な海水に遭遇した時に回避反応を示し、その中に入ることを避けていると言える。現在、汽水域に分布するゾウリムシの存在も確認されているが、このゾウリムシの生態については明らかになっていない。ゾウリムシがいかにして汽水域に進出しえたのか、興味を惹かれるところである。

ニトリル前駆体アナログの微生物分解

石上佳奈（筑波大学 生物学類）

指導教員：熊野匠人（筑波大学 生命環境系）

<背景・目的>

ニトリル化合物は、化学工業における重要な中間原料であり、溶媒、アクリル繊維の前駆物質ナイロン6, 6の製造原料、ニトリル系除草剤等と、その用途は極めて多岐にわたっている。これらのニトリル化合物はシアノ基を含んでおり一般的に猛毒性を呈する化合物であるが、自然界にはこれらのニトリルを分解解毒できる生物が存在する。微生物におけるニトリルの代謝系としては、ニトリラーゼによりニトリルを直接カルボン酸とアンモニアに加水分解する系と、一方、ニトリルヒドラターゼによりニトリルを水和してアミドにし、さらにアミダーゼによりカルボン酸とアンモニアに加水分解する系が知られている。ニトリルヒドラターゼは、アクリロニトリルからのアクリルアミドの工業生産に用いられており、これは酵素法による大量生産型化成品生産の初めての例として注目を集めた。また、ニコチンアミドの工業生産にもこの酵素が利用されているように、産業生産に関する重要な酵素として利用されているものも多い。

自然界では、ニトリル前駆体であるアルドキシムを基質として、アルドキシムデヒドラターゼの脱水反応によりニトリルが合成されている報告もある。この酵素は水溶液中での反応にも関わらず脱水反応を触媒し、かつ、炭素-窒素三重結合を形成する類い稀なる酵素であり、また、ヘムタンパク質でありながら従来のヘムタンパク質には見られない珍しい現象も有していることが分かっている。

当研究室でも本酵素に関して研究を行っており、この酵素の基質特異性を調べる過程で、基質となり得ないニトリル前駆体アナログ化合物を発見した。この物質の代謝に関してはこれまでほとんど知られていないことから、本研究では、このニトリル前駆体アナログ化合物の代謝経路の発見及び代謝に関わる酵素の研究を行うことを目的とした。

<方法・結果>

まずニトリル前駆体アナログ化合物を単一窒素源とする培地に筑波近郊の土壌を加え、集積培養を3回繰り返した。得られた菌体培養液を液体培地と同組成の寒天培地上に塗布し、生育し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、ニトリル前駆体アナログ化合物を代謝し得る微生物を数株スクリーニングした。

さらに、培養した菌体で細胞懸濁液を調製して基質と混合し休止菌体反応を行い、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーによって基質の減少と新たな生成物と考えられる未知のピークの増加を確認した。この未知のピークは、使用したニトリル前駆体アナログ化合物に対応するニトリル化合物とは異なることから、アルドキシムデヒドラターゼとは異なる新規代謝経路を持つことを確認した。また、その中でも特にニトリル前駆

体アナログ物質の代謝能力の高い菌を選択した。

次に選択した菌株において、様々な培養条件を検討し、ニトリル前駆体アナログ化合物の代謝能が高く、その菌体が大量に取得出来る培養条件を決定した。現在、菌を大量に培養し、目的のニトリル前駆体アナログ化合物の代謝に関わる酵素の精製を行っている。

<今後の予定>

目的の酵素を完全精製し、酵素の詳細な特徴を調べる。また、本酵素の部分アミノ酸配列を基に構造遺伝子を単離し解析する予定である。

植物由来生理活性物質の微生物による代謝

小澤 剛史 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 熊野 匠人 (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、抗癌作用などの疾病予防・治療への効果が認められ、機能性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を同定し代謝経路を解明するとともに、代謝に関わる酵素及び遺伝子を明らかにすることを目的とした。

具体的には、当研究室で既に取得している植物由来生理活性物質代謝微生物の代謝経路の初発の酵素の単離に成功しているが、本研究ではさらなる代謝経路の解明と新規酵素の取得を目的とした。

方法・結果

植物由来生理活性物質のさらなる代謝経路を明らかにするための、前任者が同定した初発の酵素の産物、すなわち 2 番目の酵素の基質と考えられる化合物の合成を以下のように行った。

まず初発の酵素を大腸菌 BL21 (DE3) で異種発現し、菌体をバッファーで懸濁後基質を加え休止菌体反応を行った。

次に反応溶液をアセトン抽出、酢酸エチル抽出したのち高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。

続いてこの化合物を変換する酵素の同定を目指した。本研究室での先行研究により単離された微生物を、植物由来生理活性物質を単一炭素源とする液体培地で培養を行った。培養した微生物を集菌し、インソネーターで菌体を破碎し、遠心分離してその上清を無細胞抽出液として調製した。この無細胞抽出液と初発の酵素による産物を混合し、28°C でインキュベートした。インキュベート後、反応溶液を HPLC により分析したところ、基質の減少が確認された。

本研究により、植物由来生理活性物質の最初の代謝産物の合成に成功し、更にその物質が代謝されることを確認した。

今後の予定

植物由来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。

微生物による多環化合物の分解に関する研究

李 冬瑶 (筑波大学 生物学類)

指導教員：熊野 匠人 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物由来の生理活性物質は多種多様な構造を有しており、その中には多環構造を有するものも存在する。これらの化合物には抗菌作用、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、機能性食品や医薬品等に利用されているものもある。しかし、これらの化合物の中には、明確な作用機序はもとより、それらの代謝・分解機構が未だに明らかにされていないものも少なくない。

そこで、本研究では、植物由来の生理活性を持つ多環化合物の代謝産物や代謝経路を解明すること、および代謝に関わる酵素・遺伝子を同定することを目的とした。

【方法】

植物由来の多環構造を持つ化合物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、培養を行った。得られた菌体培養液を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、多環化合物を代謝できる微生物のスクリーニングを行った。

次に、単離した各菌株を用いて休止菌体反応や無細胞抽出液による反応を行い、反応溶液を高速液体クロマトグラフィーに供することで、基質として用いた多環化合物の減少量を定量した。その中から特に多環化合物の代謝能力の高い菌株を選抜した。

さらに、本菌株において様々な条件で培養し、多環化合物変換能が最も高くなる培養条件を決定した。

現在、本菌を大量に培養し、本化合物の代謝に関わる酵素の精製条件を検討している。

【今後の予定】

多環化合物の代謝に関わる酵素の精製を行い、諸性質を調べる。また、本酵素のアミノ酸配列を基に構造遺伝子を単離し解析する予定である。

新規酵素のスクリーニング研究

勝山 真帆（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成しており、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、衣類のセルロース繊維を部分的に分解して汚れが拡散しやすいようにするために、セルラーゼを添加している洗剤が使われたり、化粧品への酵素の応用例としては、脱毛剤にケラチンを分解するプロテアーゼの一種である酵素パペインを添加することで、皮膚から突出したむだ毛を分解切断する例などがある。

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

ブタ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) や液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 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。

微生物による芳香環化合物の分解に関する研究

寺下 柚子（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

芳香環化合物は、天然もしくは非天然で広く見られる化合物である。例えば、天然ではアントシアニン、カテキン、セサミンなど、非天然ではダイオキシンやPCBなどである。それらの多くは難分解性であり、発がん性や環境汚染の原因になるなど、有毒なものについては微生物による分解方法が研究されているが、それらは一部にすぎない。

そこで、本研究では広く私たちの生活に関わる芳香環化合物を選び、それらの代謝を担っている微生物を自然界よりスクリーニングし、代謝経路・代謝産物を同定するとともに、代謝に関わる酵素・遺伝子を単離することを目的とした。

方法・結果

芳香環化合物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、振盪培養を行った。得られた菌体培養液を同組成の寒天培地に塗布し、生育したコロニー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、芳香環化合物を代謝できる微生物のスクリーニングを行った。

次に単離した菌株ごと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、超音波破碎して無細胞抽出液を調製した。それらの無細胞抽出液と芳香環化合物を混合し、28°C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芳香環化合物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、芳香環化合物を代謝する菌株を得ることができた。しかし、栄養リッチな培地では芳香環化合物の代謝活性が失われてしまったことから、現在、芳香環化合物の分解活性を維持したまま本菌体を大量に取得できる培養条件（培地組成、培養時間、誘導剤）の検討を行っている。

今後の予定

芳香環化合物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。

生理活性物質代謝微生物の探索

室本 亮介（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

生理活性物質はわずかな量で生体に作用し様々な生体反応を引き起こす物質の総称である。自然界にはビタミンや植物由来の低分子化合物など様々な生理活性物質が存在する。しかし、それらの物質の明確な作用機序や代謝・分解機構は未だに明らかにされていないものが多い。

そこで、本研究では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

生理活性物質を単一炭素源及び単一窒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、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、超音波破碎して無細胞抽出液を調製した。それらの無細胞抽出液と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、基質の減少量と産物の有無を確認した。その後、LC/MSにより分子量を特定した。スクリーニングした菌株の中から特に代謝能力の高い菌を選択し、以後の実験に用いた。

本研究により見つかった菌の生理活性物質の代謝経路は先行研究で予測されている代謝経路と一致したが、その代謝酵素に関しては一部のみしか明らかになっていないため、その代謝に関わる酵素及び遺伝子について本菌株を対象として研究を進めることで同定していくことにする。

今後の予定

生理活性物質の代謝に関わる菌を大量に培養し各種クロマトグラフィー操作により酵素を精製し、詳細な酵素学的諸性質を調べる計画である。

ATP とグルコースは線虫の寿命を制御する

加藤 吉祥 (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

グルコースは、生物にとって重要なエネルギー源である。その一方で過剰なグルコースの摂取は肥満や糖尿病などの生活習慣病の原因である。

線虫 *C.elegans* においてはグルコース投与によってその寿命が短くなることが知られている。線虫では、エネルギー摂取量を抑えることで寿命が延びることが知られており、この経路がグルコースにより負の方向に働くことで寿命が短くなると考えられている¹⁾²⁾。本研究の先行研究により、グルコースの最終産物である ATP の投与によって線虫の寿命は短くなることが示されている。したがって、グルコース投与により ATP 産生量が増加し、過剰 ATP により寿命が短くなると考えられる。

哺乳類において、グルコースは、インスリンやグルカゴンを制御している。線虫 *C.elegans* においてはインスリン様ペプチドが 40 種類知られており、詳細な機能は不明ではあるものの、その中の Ins-7 と Daf-28 は Daf-16 の発現を抑制する (図 1)。Daf-16 は転写因子 FoxO のホモログであり、いわゆる長寿遺伝子として DNA 修復や細胞周期、ストレス応答などに関わっていることが知られている。したがって、これらのインスリン様ペプチドもグルコースの制御を受けると考えられる。

私は、グルコースと ATP に係る寿命制御の分子メカニズムを明らかにするために本研究を行った。

材料・方法

・モデル生物

本実験では線虫 *C.elegans* var. Bristol(N2 株)を用いた。線虫は大腸菌 OP50 株を餌として飼育した。飼育温度は 20°C で行った。

・寿命測定

同調処理から 18 時間後の線虫を、OP50 を塗布した NGM プレートに移し、96 時間飼育し成虫とした。その後、OP50 と試料または dDW の混合物を塗布した NGM プレートに線虫を移し、2 日毎に生存個体数を計測した。生死判定は、ピッカーで触ることによって行った。

・熱ストレス下での生存率

同調処理から 18 時間後の線虫を、OP50 と試料または dDW の混合物を塗布した NGM プレートに移した。その後、OP50 を塗布した NGM プレートに線虫を移し、熱ストレス環境下においた。移したときを 0 時間目とする。移した温度によって、以下の 2 つに分けられる。

- (1) 37°C に線虫を移し、2 時間毎に生存個体数を計測した。
- (2) 35°C に線虫を移し、8 または 10 時間後から 2 時間毎に生存個体数を計測した。

結果

グルコースの投与により線虫の寿命が短くなった。また、ATP の投与でも寿命は短くなった。しかし、ATP とグルコースの同時投与によっては寿命の短縮が起きなかった。

また、37°C での熱ストレス耐性は、ATP によって増加、グルコースによって減少した。

その一方で 35°C での熱ストレス耐性は、ATP では減少、グルコースでは増加した。

考察

グルコースと ATP はどちらも単独では線虫の寿命を短縮する。その一方で両者の同時投与によって寿命の短縮が起きなかったことから、グルコースの生理作用は、先の仮説とは異なる、より複雑な分子機序に基づいていると考えられる。

また、35°C と 37°C の熱ストレス耐性がグルコースと ATP で逆の結果を示したことから、それぞれの温度刺激は、ATP やグルコースによって支配される異なるシグナル回路を介して線虫に影響を与えると考えられる。線虫に対する熱ストレスの作用機序はまだ不明な点が多い。本研究から、ATP やグルコースの生理作用を解析することによって、熱ストレス応答の実態に迫ることができるかと期待できる。

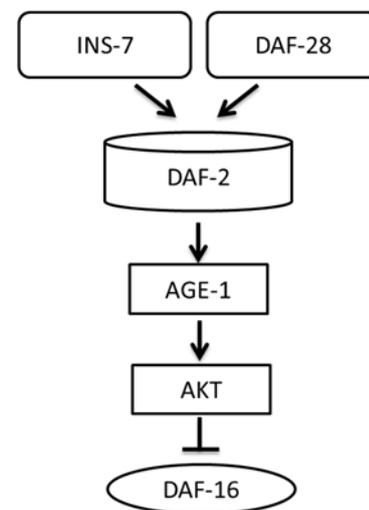


図 1 Daf-16 制御の概要

参考文献

1. Seung-Jae Lee, Coleen T. Murphy, and Cynthia Kenyon
Glucose Shortens the Life Span of *C. elegans* by Downregulating DAF-16/FOXO Activity and Aquaporin Gene Expression. *Cell Metabolism* 10, 379-391(2009)
2. Tim J. Schulz, Kim Zarse, Anja Voigt, Nadine Urban, Marc Birringer, and Michael Ristow
Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metabolism* 6, 280-293(2007)

線虫のストレス耐性に対するウバ茶抽出物の生理機能解析

川木 純平 (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

近年、植物由来の生理活性物質であるファイトケミカルが抗老化や生活習慣病の予防、改善に効果があるとして注目されている。これらの効果があるとされているファイトケミカルの多くは抗酸化作用を持ち、その一部のファイトケミカルが長寿遺伝子を活性化することが知られている。

ウバ茶はスリランカのウバ州の高地で生産されている紅茶であり、生化学的解析により強い抗酸化作用があることが示唆されている。また発酵が進むにつれてウバ茶に含まれるファイトケミカルの構造が変化し、それが生理機能に違いをもたらすことが示唆されている。しかしウバ茶が生体においてどのような生理機能を持つかは明らかではない。本研究では発酵期間が短いヤングウバ茶とウバ茶を線虫に投与し、生理機能の解析を行った。

○材料、方法

・ウバ茶の抽出方法

本研究では水抽出物と DMSO 抽出物を用いた。水中抽出物では茶葉 5 g を 90°C まで温めた 30 ml の ddW にそれぞれ 3 分間、30 分間入れて抽出した。DMSO 抽出物では粉末状の茶葉のエタノール抽出物を DMSO に溶かした。

・モデル生物

本研究において線虫は N2 株を用いた。線虫は大腸菌 OP50 株を播種した NGM 培地上で飼育した。飼育温度は 20°C である。

・同調処理

成虫となった線虫の表皮を次亜塩素酸処理によって破砕し、得られた卵を 18 時間 S-basal で培養し、発生段階のそろった個体を得た。

(1) 熱ストレスからの回復

同調処理によって得た線虫を OP50 とウバ茶/ヤングウバ茶の抽出物を添加した培地に移し、4 日間 20°C で培養した。4 日後、線虫を NGM 培地に移し 35°C で 4 時間培養した。その後 0, 12, 24 時間毎に線虫の thrashing 運動の回数を測定した。この実験は水抽出物および DMSO 抽出物で行った。

(2) 熱ストレス耐性

方法 1

同調処理によって得た線虫を OP50 とウバ茶/ヤングウバ茶の抽出物を添加した培地に移し、4 日間 20°C で培養した。4 日後、線虫を OP プレートに移してから 37°C で 3.5 時間培養し、その後 20°C に戻した。その後 2 日毎に生存している個体を計測した。幼虫の混入を防ぐために FUDr を使用した。この実験は水抽出物のみ行った。

方法 2

同調処理によって得た線虫を OP50 とウバ茶/ヤングウバ茶の抽出物を添加した培地に移し、4 日間 20°C で培養した。その後、線虫を OP プレートに移し 35°C で培養したまま 10 時間後から生存している個体を計測した。この実験は DMSO 抽出物のみ行った。

(3) 酸化ストレス耐性

同調処理によって得た線虫を OP50 とウバ茶/ヤングウバ茶の抽出物を添加した培地に移し、4 日間 20°C で培養した。その後、0.1 M パラコートと OP を播いた培地で線虫を培養し、2 日毎に生存している個体を計測した。また、幼虫の混入を防ぐために FUDr を使用した。この実験は水抽出物のみ行った。

(4) 抗老化

同調処理によって得た線虫を OP50 とウバ茶/ヤングウバ茶の抽出物を添加した培地に移し、4 日間 20°C で培養した。その後 3 日おきに線虫の thrashing 運動の回数を測定した。また幼虫の混入を防ぐために FUDr を使用した。この実験は水抽出物および DMSO 抽出物で行った。

(5) 寿命測定

同調処理によって得た線虫を OP50 を播いた培地で 4 日間 20°C で培養した。その後、線虫を OP50 とウバ茶/ヤングウバ茶の抽出物を添加した培地に移し、2 日毎に生存個体を計測した。また、幼虫の混入を防ぐために FUDr を使用した。この実験は水抽出物のみ行った。

結果

(1) 水抽出物ではウバ茶、ヤングウバ茶ともに熱ストレスからの回復を促進した。一方で DMSO 抽出物ではウバ茶、ヤングウバ茶ともに熱ストレスからの回復を促進したが、ウバ茶ではヤングウバ茶ほどの顕著な回復はみられなかった。

(2) 水抽出物ではウバ茶、ヤングウバ茶ともに熱ストレス耐性が上がった。一方 DMSO 抽出物ではヤングウバ茶のみ熱ストレス耐性を高めた。

(3) 水抽出のウバ茶、ヤングウバ茶による酸化ストレス耐性の変化はみられなかった。

(4) 水抽出物、DMSO 抽出物ともに老化に伴う運動性の低下を抑制した。

(5) 水抽出のウバ茶、ヤングウバ茶による寿命の変化はみられなかった。

考察

水抽出のウバ茶、ヤングウバ茶ともに熱ストレスからの回復や熱ストレス耐性の向上に老化に伴う運動性の低下の抑制に効果があると考えられる。DMSO 抽出物ではヤングウバ茶は熱ストレスからの回復、熱ストレス耐性の向上、老化に伴う運動性の低下に効果があると考えられる。一方でウバ茶は老化に伴う運動性の低下の抑制のみに効果がありそうである。

また水抽出物ではウバ茶、ヤングウバ茶の生理機能の違いはみられないが、一方で DMSO 抽出物ではウバ茶、ヤングウバ茶の生理機能が異なると考えられる。

今後は遺伝子発現を解析し、変異体を用いてシグナル経路を明らかにする予定である。また有効成分の同定も行う予定である。

線虫のストレス耐性に対する納豆抽出物の生理作用解析

佐々木 寛瑛 (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】

納豆にはビタミン類、リノール酸、イソフラボン、グルタミン酸ポリペプチド、ナットウキナーゼ等が含まれており、中性脂肪の抑制や抗酸化作用、抗菌殺菌作用などがあるとされている。実際、*in vitro*における抗酸化作用は古くから知られている。また、ラットを用いた *in vivo*の実験により血圧上昇抑制作用や血栓予防効果が報告されている。しかし生体内における納豆の生理作用についてはまだほとんど知られていない。

線虫はその成長の速さと寿命の短さから老化研究やストレス耐性の研究によく用いられている。また全ゲノム解読の結果からヒトとの遺伝的相同性が明らかになっている。

そこで本研究ではモデル生物である線虫を用いてどのような生理作用が認められるかを検証した。

【材料・方法】

モデル生物

本研究では *C. elegans* var. Bristol (N2 株) を使用した。線虫は大腸菌 OP50 株を播種した NGM(Nematod Growth Medium)プレートで飼育した。

方法

線虫の表皮を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破壊して虫卵のみを回収する同調処理を行った。その後 18 時間培養し、孵化した線虫を OP50 と試料の混合液を塗布した NGM プレート上に移した。そして成虫になるまで 96 時間培養し、これを実験に用いた。培養するときは 20 °C で培養した。

(1) 熱ストレス耐性 (運動性)

96 時間培養した線虫に 35 °C の熱ストレスを 3.5 時間与え、3.5 時間後を 0 時間として、0、12、24 時間後の運動性を測定した。

(2) 体長測定

同調処理後 72 時間培養した線虫を固定し、その体長を測定した。

(3) 酸化ストレス耐性

96 時間培養した線虫を酸化ストレスとして 0.3 % の過酸化水素水に入れ、0、180、280 分経過後の生存率を測定した。

(4) 熱ストレス耐性 (生存率)

96 時間培養した線虫を 35 °C の熱ストレス下で飼育した。10 時間後、2 時間毎に生存率を測定した。

【結果】

(1) 0 時間後には変化がみられなかったが、12 時間後では納豆抽出物、大豆抽出物ともに熱ストレス後の運動性の回復増進効果がみられた。また 24 時間後ではほとんど変化はなかった。

(2) 納豆抽出物、大豆抽出物により線虫の体長は短くなった。

(3) どちらの抽出物でも酸化ストレス耐性の向上はみられなかった。

(4) 熱ストレス耐性 (生存率) において、どちらの抽出物も効果はみられなかった。

【考察】

効果のあった体長、熱ストレス後の運動性において納豆抽出物、大豆抽出物での大きな効果の差は見られなかった。また体長が短くなった原因の一つとして成長遅延が考えられる。熱ストレスからの運動回復の効果がどちらの抽出物にもあることから、熱ストレス耐性への効果が期待される。

今後は、遺伝子発現の解析や遺伝子欠損型の変異体を用いた解析などにより、作用機構の解明を行っていく予定である。

【参考文献】

1. Atsushi Shimakage, et al : Purification and Identification of ACE Inhibitory Substance from Protease-treated Hikiwari-natto and Anti-hypertensive Effect of Natto on Spontaneously Hypertensive Rats, *Food and Clinical Nutrition.*, 6(1) : 1-8 (2011)
2. Yasuhiro Suzukia, et al : Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery, *Life Sciences* 73 : 1289-1298 (2003)

スギ花粉症治療に向けたアレルゲンの生産

古野 晴香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 三浦 謙治 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

アレルギー疾患の中でも花粉症は主要なアレルギー疾患の1つである。花粉症といえども、スギ、ヒノキ、シラカバ、ブタクサ等があげられるが、スギ花粉症患者は2500万人にも及ぶと考えられている。スギ花粉の飛散量は年によって大きく変動するが、スギの木が大きく成長していること、気象の温暖化の影響で花粉は多く産生されるようになってきているとされ、今後もスギ花粉症患者は増加していくことが考えられる。花粉症治療には現状対処療法がメインであり、これは抗ヒスタミン剤や抗ロイコトリエン剤などの薬を投与することである。近年、アレルギーの根治治療として有望視されているのが減感作療法である。この作療法は、アレルギー原因物質(アレルゲン)を体内に少量ずつ与え免疫寛容、つまりアレルゲンに体を慣れさせる方法である。減感作療法の詳細な作用機序は分かっていないが、この方法で免疫寛容が引き起こされるといくつかの報告がある。これまでの減感作療法では皮下注射が主流であったが、鼻腔などのリンパ腺に近い部分への投与が提案されている。その中でも患者への負担が少ない方法として、舌下減感作療法が注目されている。国の方針で、舌下減感作療法が適用できる医者は、アレルギー学会等が主催した講習会を受けた医者のみとされている。だが、講習会自体、すぐに満員になるぐらい注目を集めている治療法である。例えば、この舌下減感作療法を花粉アレルギー患者10万人に1年間適用するとすると2tもの花粉が必要となる。通常、減感作療法による治療には1-2年が必要である。これから、アレルギー患者数が年々増大している現状を考えると、花粉から調製するだけでは賅えない可能性が増大している。

これまでも花粉アレルゲンの大量調製は試みられてきた。アレルゲン自体はタンパク質なので異種発現系として、大腸菌や酵母が用いられてきた。しかし、これらのタンパク質はアレルギー性がない、あるいは不溶化して精製が困難であった。花粉という植物由来のタンパク質を用いるので、植物を宿主とするタンパク質発現系を用いた方が可溶化しやすいと考えられる。現在、イネを用いた花粉アレルゲンの調製が行われているが、これはプロテインボディと呼ばれる部分に集積させることで小腸まで届けることができるという、食べるワクチンとしては機能するが、可溶性タンパク質としては調製できない。可溶性タンパク質を大量に調製することが本研究の目的である。

【材料・方法】

本研究ではレタスでの花粉アレルゲンの一過性発現と精製方法の検討を行った。レタスは植物工場ですぐに生育できることから、品質管理の面からも有益である。また、レタス自身もアレルギー性は非常に低い。このことからレタスを宿主としたタンパク質発現系を用いた。

標的タンパク質を発現するベクターを作製し、アグロバクテリウムへの形質転換を行った。アグロバクテリウムを培養した後、バキュームで減圧することで、アグロバクテリウムを浸漬させた。その後、3~5日間培養し、レタス葉から粗タンパク質を抽出した。硫安沈殿によりRubiscoを取り除き、透析後、各種クロマトグラフィーによってタンパク質の精製を行った。

アサガオの光周性花成及び形態形成に関わる遺伝子の研究

本田 光明 (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】

高等植物には自身を成長させ葉を茂らせる栄養成長相と、花を咲かせ次世代を生み出す生殖成長相の 2 つの発生ステージが存在する。栄養成長相から生殖成長相への移行は花成と呼ばれ、内因性・外因性の様々なシグナルによって引き起こされることが知られている。特に、日長を感受することで起きる花成のことを光周性花成といい、多くの植物が生殖に適切な季節に花を咲かせるための主要なメカニズムとして働いている。

高等植物の研究モデルであるシロイヌナズナの光周性花成は 2 段階のステップから構成される。始めに葉で日長が感受され、花成ホルモンタンパク質である FLOWERING LOCUS T (FT) が合成された後に篩部を通して茎頂まで移動する。このステップを花成誘導と呼ぶ。次に茎頂にて FT が FD タンパク質等と転写活性のある複合体を形成し、花器官形成のカギとなる APETALA1 等の遺伝子発現を促進することで花の原基形成が始まる。このステップを花成誘起と呼ぶ。花成誘起の関連遺伝子として LEAFY が知られている。LEAFY は APETALA1 と正のフィードバックループを形成するため、花成促進因子として機能する。また、LEAFY を欠損することで花弁・雄ずい・心皮が大量のがくに置き換わる表現型を示すことから花器官形成にも関与している。LEAFY のアサガオ相同遺伝子 PnLEAFY の光周性花成および形態形成に関わる働きを調べるのが本研究の目的である。

条件的長日植物であるシロイヌナズナは、日長以外のシグナルの影響を受けやすいために光周性花成を厳密に調べることは困難である。一方、本研究で用いたアサガオ (*Pharbitis nil*) は 12~16 時間の暗期を 1 回与えることで確実に花成が誘導される絶対的短日植物であるため、光周性花成研究において重要である。

本研究は前任者が作成したアサガオ品種ムラサキの PnLEAFY-RNAi 発現抑制系統の次世代である T2 種子を栽培し、種々の表現型を観察することで PnLEAFY の機能について考察することに重きを置いている。

【材料・方法】

PnLEAFY-RNAi 発現抑制系統 T2 種子を吸水・播種後 6 日間恒明条件下で栽培し、子葉が出そろった頃に生理暗室内で暗箱を用いて 16 時間または 12 時間の暗期を 1 回だけ与え、再び恒明条件下で約 1 ヶ月栽培した。

(1) 花芽形成数カウントによる花成強度測定

アサガオの生殖成長相では、1 つの葉腋に対して花芽が 1 つずつ形成される。その花成強度の強さに応じて基部から順に花芽を付ける性質をもつことから、花芽の数を数えることで花成強度の測定が可能である。PnLEAFY-RNAi 発現抑制系統と野生系統それぞれの花芽の個数を比較することで、PnLEAFY の花成強度への寄与を調査した。

(2) 形態観察

シロイヌナズナの leafy 欠損体では大量のがく形成以外にも様々な形態異常が見られる。アサガオの PnLEAFY-RNAi 発現抑制系統でも同様に多様な形態異常が見られることが予想されたので、花芽カウント後の個体を長日条件下で栽培して随時表現型を観察した。

(3) らせん葉序の観察

シロイヌナズナの leafy 欠損体の大量のがくは、らせん葉序にしたがって形成される。らせん葉序とは連続して発生する 2 つの器官原基が茎頂を中心として 137.5° の位置関係となる発生様式である。PnLEAFY-RNAi 発現抑制系統の大量のがく形成の花を顕微鏡で観察、角度を測定することで、らせん葉序の有無を確認した。

【結果・考察】

(1) 花芽形成数カウントによる花成強度測定

PnLEAFY-RNAi 発現抑制系統の花芽形成数は野生型のそれよりも少なくなる傾向が見られた。したがって PnLEAFY はシロイヌナズナの LEAFY と同様に花成の促進因子である。

(2) 形態観察

先行研究で報告されている奇形花、大量のがく形成、複数の腋芽形成に加えて、花芽・葉芽の共存、対生葉序、花序化したターミナルフラワー、包葉 (花の根元の微小な葉) 肥大、包葉数増加等の多様な形態異常が見られた。このことから PnLEAFY は分裂組織の範囲の限定や、包葉発達の抑制因子として機能する可能性が示唆された。PnLEAFY は花や葉のような側生器官の正常な形態形成に不可欠だと考えられる。

(3) らせん葉序の観察

PnLEAFY-RNAi 発現抑制系統の大量のがく形成花におけるがく同士の角度は 137.5° に近い位置取りとなったので、らせん葉序であることが示唆された。一方で野生型の正常な花のがくは 144° であるため正五角形の配置となる。したがって PnLEAFY は、らせん葉序の抑制因子でもある。

野生型シロイヌナズナの花はらせん葉序となる部分をもたないため、花器官発生の全期間にわたり LEAFY によるらせん葉序の抑制が効いていると推測できる。しかし、野生型アサガオでは花器官発生初期に形成される本葉・包葉がらせん葉序となることから、PnLEAFY のらせん葉序抑制能は花器官発生初期には比較的弱いことが想像できる。

【謝辞】

健康上の都合から一層ご迷惑をおかけしつつも、本研究を行うにあたり終始温かくご指導賜りました本大学院生命環境科学研究科の小野道之准教授、小野公代博士に深く感謝申し上げます。また、昨年 3 月にご逝去された故鎌田博教授に感謝申し上げますとともに心より哀悼の意を表します。

VLP 形質転換トマトを用いた経口インフルエンザワクチンの開発

Sakkrapong Wannawattana (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

既存の注射型ワクチンは生産、輸送、保存するのにコストがかかることや、ワクチン接種をする際、医療事故の危険性がある。これらの問題を解決するために、経口ワクチンが提案された。

食べるワクチンは、遺伝子組換え技術を用いて食用植物に経口ワクチンを生産させたものである。これらを食べることで、感染症を予防することが可能になる。しかし、ワクチンタンパク質は消化酵素により分解を受けやすいことが問題となる。本研究では、消化耐性を持つウイルス様粒子 (Virus-Like Particle: VLP) をキャリアタンパク質として使用し、抗原認識部位と融合させ、トマトに導入し、食べるワクチンの生産を行っている。VLP は本来ウイルスが持っているゲノムを含まないものであるため、感染の危険性がない。また、経口ワクチンは粘膜免疫と全身免疫という2つの主要な免疫システムを活性化できるという利点がある。

現在主流のインフルエンザワクチンは Hemagglutinin (HA) と Neuraminidase (NA) という2種類の抗原から作られているが、これらの抗原は変異が多く存在するため、新型インフルエンザに対応できない。そこで、当研究室は変異が少ないインフルエンザウイルスの膜タンパク質である Membrane ion channel 2 (M2 タンパク質) を使用している。

本研究では、免疫原性を確認するために、動物試験に向けて VLP 形質転換トマトを栽培し、サンプルを収穫している。さらに、VLP 形質転換トマトにおける T-DNA 挿入部位の特定を目的として実験を行った。

材料・方法

実験植物としてマイクロトム (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) を用いた。

当研究で使用した VLP は、消化耐性を持つ E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus: HEV) 由来の VLP である。また、HEV VLP と M2 タンパク質の間のリンカータンパク質として Herpes Simplex Virus (HSV) tag を用いた。

先行研究で、選択マーカーとして Kanamycin 耐性遺伝子 (NPTII) とトマト果実特異的な E8 プロモーターの下流に結合した HEV-HSVtag-M2 遺伝子をマイクロトムに導入した (図1)。

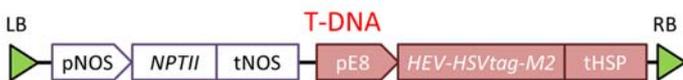


図1 導入遺伝子のコンストラクト

1. 形質転換体の選抜と栽培

先行研究で作出された VLP 形質転換マイクロトムを大玉品種トマト (愛知ファースト) と交配し、導入遺伝子が入った個体を選抜するために、PCR 解析で Genotype check を行った。そして、形質転換植物として特定網室で栽培するために、Agrobacteria 残

存試験を行った。育てたトマトの果実を収穫し、液体窒素で凍らせ、-80°C で保存した。

2. T-DNA 挿入部位の特定

T-DNA 挿入部位の特定は Genome Walking 法に従い、実験を行った。

2.1 DNA Library 作成

VLP 形質転換マイクロトムの DNA を抽出し、制限酵素を処理し、Adaptor を ligation して、DNA Library を作成した。

2.2 Nested PCR

特異性を高め、標的 DNA を増幅するために、LB 端と RB 端にそれぞれの primer を設計し、2 回の PCR (Primary PCR と Secondary PCR) を行った (図2)。

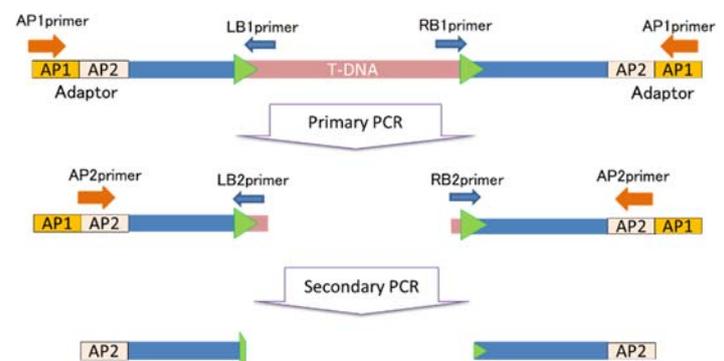


図2 Nested PCR

2.3 DNA Sequencing

PCR 産物を plasmid DNA に ligation し、大腸菌に形質転換した。標的 DNA が入っている colony を選抜し、plasmid DNA を抽出して、DNA Sequencing を行った。

2.4 解析

DNA Sequencing の結果をマイクロトムの Database と照合し、T-DNA の挿入部位を特定した。

結果・考察

現在進行中。

謝辞

本研究を行うにあたり、VLP 遺伝子を提供して下さいました (独) 医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター長 保富康宏 博士、導入遺伝子を用意して下さいました筑波大学 医学医療系 竹内薫 准教授、森川一也 准教授に心より感謝申し上げます。

ご指導頂きました植物発生理学研究室の小野道之 准教授、小野代 博士、三浦謙治 准教授、柴博史 教授、研究室の方々より御礼を申し上げます。

また、昨年3月に逝去された故鎌田博 教授に感謝申し上げますとともに心より哀悼の意を表します。

SeFLA 遺伝子を導入した耐塩性ジャガイモの開発

中村 匠汰 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

●研究概要

本研究の目的は *SeFLA* 遺伝子をジャガイモに導入することで、耐塩性が強化された遺伝子組換えジャガイモを作製することである。遺伝子導入を確認した後、独立した各系統において、*SeFLA* 遺伝子の発現が認められ、非組換え体と比べて耐塩性が強化されていることを明らかにした。

●背景・目的

近年、不適切な灌漑農業等によって塩類集積が引き起こされ、作物を栽培することが出来なくなった土地が拡大している。一方で、世界人口は増加の一途を辿っており、これまで以上に食糧を確保することが重要な課題となっている。これらの問題を解決する手段の一つとして、耐塩性形質を持つ作物の開発が挙げられる。本研究では、世界四大作物のひとつであり、食糧、また工業原料としても需要があるジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) に *Saricornia europaea fasciclin-like arabinogalactan protein* 遺伝子 (*SeFLA* 遺伝子) を導入することにより、耐塩性を強化することを目的としている。

●材料

～植物材料～

ジャガイモの品種は *Desiree* を用いた。*Desiree* は古くから主にヨーロッパで食用として利用され、研究材料としても用いられてきた品種である。また、他の品種と比べて強い耐塩性を持つことが知られている。植物材料は、Murashige and Skoog 固形培地上で25℃、16 時間明期、8 時間暗期 (明条件) の光条件下で培養し、維持した。

～導入遺伝子～

導入遺伝子は、東京農工大学小関研究室において単離された *SeFLA* 遺伝子を用いた。この遺伝子は、アッケシソウの培養細胞から得られた cDNA を大腸菌に導入し、塩条件下で生存する菌体が保持していたものである。そのため、この遺伝子は大腸菌に耐塩性を付与することが出来ると考えられている。

SeFLA タンパク質は *FLA* ファミリーに属し、主に、細胞伸長、細胞接着、細胞壁構成成分の調節等に関与することが知られている。また、ある *FLA* タンパク質が欠損したシロイヌナズナを塩条件下で培養すると、塩を加えていない条件下で培養したもの比べて形態的な変化が起こることから、*FLA* タンパク質が塩ストレス応答にも関与することが示唆されている。しかし、*SeFLA* タンパク質に関する知見は乏しい。

～アグロバクテリウム～

自然界にはアグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*) と呼ばれる土壤細菌が存在する。アグロバクテリウムは、Ti プラスミド等を保有しており、その T-DNA 領域を植物のゲノム中に

導入することが知られている。この T-DNA 領域中に任意の遺伝子を組込むことで、目的遺伝子を植物に導入する手法が広く用いられている。本研究では LBA4404 株を使用した。

●実験方法

1. 遺伝子導入

遺伝子導入は、*SeFLA* 遺伝子を含むコンストラクトを保持するアグロバクテリウムを、葉に感染させることにより行った。感染後は、暗条件下でカルスを誘導する培地に静置し、その後、明条件下で再分化を誘導する培地に移植することで再分化個体を得た。カルス誘導中に抗生物質カルベニシリンを加えることで、アグロバクテリウムの除菌を行った。

2. 組換え系統の確立

得られた再分化個体にアグロバクテリウムが残存していないことを確認した後、植物に遺伝子が導入されていることを、ゲノミック PCR により確認した。

アグロバクテリウムを用いた方法では、導入遺伝子は植物ゲノム中にランダムに挿入される。そのため、得られた再分化個体に対してサザンブロット解析を行うことで、系統の差異と *SeFLA* 遺伝子の導入数を確認し、系統の確立を行った。

3. 評価

独立の遺伝子組換え系統について、塩含有培地での培養により耐塩性レベルを評価し、qRT-PCR によって *SeFLA* 遺伝子の発現量を解析した。また、*SeFLA* 遺伝子と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、*SeFLA* タンパク質の細胞内における局在解析を実施している。

●結果・考察

現在までに独立した遺伝子組換え体、系統 17、28 を得た。系統 17、28 では、*SeFLA* 遺伝子の発現が認められ、非組換え体と比べて耐塩性が強化されていることが明らかとなった。

高い耐塩性を持つ系統の選抜、耐塩性レベルと遺伝子発現量の関係の考察を行うためにも、今後より多くの系統を確立し、評価していく必要があると考える。



イネの発達過程におけるペクチンアラビノース側鎖合成酵素 OsARAD1 に関する研究

清永 郁香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

植物の細胞壁は主にセルロース、マトリックス糖鎖、構造タンパク質で構成されている。マトリックス糖鎖の一群であるペクチン性多糖の主成分であるアラビノースは高等植物が特徴的に有する糖鎖であり、発達過程に大きく関わっている。アラビノース残基はアラビノキシラン、ペクチン、アラビノガラクトナンタンパク質 (AGP) などの細胞壁成分の側鎖として結合しており、中でもペクチンや AGP のアラビノース側鎖は生殖過程に強い関わりを持つと考えられている。これらの事から本研究では、ペクチンアラビノース側鎖の機能に注目して実験を行った。ペクチンアラビノース側鎖は Figure1 に示すように、アラビノース側鎖合成酵素から合成されることが知られており、現在までにシロイヌナズナにおいて CAZy データベースの GT47 ファミリーに属する *AtARAD1* が報告されている。イネゲノム中には *OsARAD1~8* が存在していることが分かっている。シロイヌナズナは双子葉植物であり植物体全体に占めるペクチンの割合が大きいいためペクチンアラビノース側鎖を制御すると栄養成長を含めた全ての発生過程に影響を与えるため致死となる事や、重複遺伝子による相補により表現型が現れないことが報告されている。一方で、単子葉植物では細胞壁全体に占めるペクチンの割合は非常に低いためにペクチンアラビノースを下方制御しても栄養成長には影響がないことが期待できる。そこで、栄養成長器官にはペクチン量が少ないが、生殖成長器官では豊富にペクチンを含むイネを用いてペクチンアラビノース側鎖合成酵素 *OsARAD1* の発現抑制体を作出した。本研究は、*OsARAD1*-RNAi の表現型観察などの解析を行うことで、高等植物の発達過程におけるペクチンアラビノース側鎖の機能を明らかとすることを目的としている。

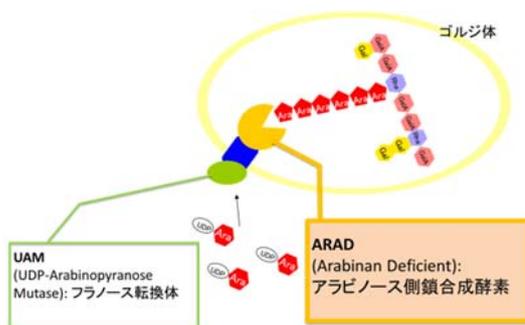


Figure1 アラビノース側鎖生成モデル

材料と方法

・材料

イネ (*Oryza sativa* 品種: 日本晴) を用いた。正常株、ベクターコントロールおよび *OsARAD1*-RNAi を特定網室において育成させた。イネの受粉前後の生殖器官 (穎、葯、柱頭、子房)、14 日目実生の葉、茎、根、生殖成長開始後の葉、葉鞘、茎、根をサンプリングし、RT-PCR による発現解析を行った。

・方法

イネゲノムおよび発現データベース (SALAD, Rap DB, RiceXpro) を用いてイネの 8 つの ARAD 遺伝子 (*OsARAD*) を決定した。*OsARAD1* の酵素活性領域にトリガー配列を設計した RNA コンストラクトを、pANDA ベクターを用いて作製した。これを用いて、イネに形質転換を行い、*OsARAD1*-RNAi を作出し、遺伝子導入が確認された個体を特定網室にて生育し、その表現型を調査した。

結果と考察

野生型イネの器官別に発現解析をしたところ、*OsARAD1, 4, 6* は、受粉前の葯や柱頭といった生殖組織において特徴的に発現し、その他の遺伝子は極めて発現レベルが低かった。作出された *OsARAD1*-RNAi では、*OsARAD1* 遺伝子の発現レベルが有意に減少していることが確認された。また、その他の ARAD 遺伝子の発現レベルには影響がなかった。

OsARAD1-RNAi の表現型の観察を行ったところ、栄養成長には野生型およびベクターコントロールと違いは観察されなかったが、稔実率が約 35% に以下に低下していた。そこで、花の発生過程に注目して調査を行った結果、雌しべには形態的な差がみられなかったのに対し、雄しべの葯における花粉の形成に異常が観察された。成熟花粉形成のマーカーであるデンプン蓄積について調査するために花粉のヨウ素染色を行ったところ、コントロールでは正常にデンプンが蓄積していたのに対して、*OsARAD1*-RNAi ではデンプンの蓄積が著しく低下している花粉が多く確認された。また、走査電子顕微鏡を用いて、花粉の表面構造を観察したところ、表面構造の異常が確認された。そこで、成熟花粉のアラビノース多糖の蓄積を確認するために、アラビノース鎖特異的なモノクローナル抗体である LM6 を用いて、成熟花粉形成期の葯の組織切片に対して免疫組織化学染色を行った。その結果、*OsARAD1*-RNAi では花粉におけるアラビノース多糖の蓄積がコントロールと比較して低下していることが示された。

以上の結果より、*OsARAD1* は成熟花粉形成過程に重要であることが示され、ペクチンアラビノース側鎖が成熟花粉の細胞壁形成に寄与している可能性が示唆された。ペクチンアラビノース側鎖は孔辺細胞の開閉等にも重要であるという報告もあるため、今後は乾燥などを含めた環境ストレス応答の表現型についても調査を行う予定である。

トマト果実軟化過程におけるカルシウム欠乏の細胞壁再編成への影響

宮地 桃子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

果実は、植物にとっては種子の保護や散布のために重要な生殖器官である。多くの果実では成熟に伴い、果実が軟らかくなることが知られている。この果実軟化の現象は細胞壁の分解が関係していると考えられている。しかし、その果実内部では種子形成が同時に進行していることから、細胞壁の分解のみでなく合成や架橋形成も必要であり、細胞壁の変化は組織ごとに異なるのではないかと考えられる。現在までに、細胞壁骨格であるセルロースとの架橋成分であるヘミセルロース性多糖類のキシログルカン、キシランは、ともに果実の軟化過程において、分解のみでなく合成もされていることが示唆され、外果皮と内果皮の輪郭部分では果実の形状を保つため細胞壁の特徴的な再構築が行われていることが示唆されている。また、このヘミセルロース性多糖類と架橋を行うペクチンでは、特に、外果皮において、ペクチン-Ca架橋や側鎖を持つペクチンが高密度に存在していたことから、これらのペクチンが外果皮の細胞間、組織間の接着に重要であると考えられている。本研究では、果実成熟過程の細胞壁再構築過程におけるCaと細胞壁との架橋のはたらきを明らかにするために、Ca欠乏条件下で栽培したトマト (品種Micro Tom) を用いて、果皮組織 (外果皮、中果皮、内果皮) におけるキシログルカン、キシラン、そしてペクチンの各組織における生化学的な分析について行った。これらのことにより、果実成熟過程の細胞壁再構築過程におけるCaのはたらきを調査することで、果実軟化メカニズムの一端を明らかにすることを目的としている。

【試料および方法】

1. トマトの水耕栽培およびCa欠乏処理

試料：トマト (品種：Micro Tom) を、24°Cのインキュベーター内でYin et al. 2010, JXBの方法を用いて水耕栽培を行った。水に濡らしたろ紙にトマト種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えを行った。Ca欠乏処理は花が咲きそろった時点でを行った。

2. サンプリング

1によって育てたトマト果実を成熟段階で4ステージ (Mature green (M), Breaker (B), Turning (T), Red ripe (R)、果実の組織を3つの組織 (外果皮、中果皮、内果皮) に分けて実験を行った。

3. ガスクロマトグラフィー (GC) による構成糖分析

2のサンプルから細胞壁を抽出し、得られた細胞壁に50 mM Na₂CO₃処理により細胞壁結合性の弱いペクチンを抽出、その後4 M KOH処理により細胞壁結合性の高いペクチンを抽出した。カルバゾール硫酸法を用いてこれらのウロン酸量を測定後、GCを用いて各サンプルをTMS化し、構成糖を分析した。

4. 種子の大きさと発芽率の測定

コントロール条件とCa欠乏条件のRの果実から種子を取り出し1日乾燥させた後、種子の大きさを測定した。測定後、水に濡らしたろ紙にトマト種子を播種して1週間後の発芽率を測定した。

5. トマトの力学的性質の測定

Rのトマト果実に音波振動を与え、力学的性質を測定した。

【結果および考察】

・Ca欠乏条件による生育への影響

Ca欠乏条件では葉の色は薄く、実の数、根の量も減少していた。しかしRになるまでの日数はコントロールより少なく、成熟が早いことが観察された。また、2つの果実が結合したような変形果の出現割合も高かった。

・GCによる構成糖分析

コントロールとCa欠乏条件では、細胞壁結合性の高いペクチン量が最大で約76%減少していた。また、ペクチンの側鎖を構成するアラビノース、ラムノースの減少がみられた。以上の結果から、Ca欠乏条件では側鎖を有するペクチンが減少していることが示唆された。

・種子の大きさと発芽率の測定

Ca欠乏条件では2.5 mm以下の種子の割合が増加していた。発芽率はコントロール条件、Ca欠乏条件、種子の大きさに関わらず、80%以上の高い値を示した。このことから、Ca欠乏条件下では貯蔵物質の少ない種子数は増えるが、正常な発芽能力を有した種子を形成することが出来ると示唆された。

・トマトの力学的性質の測定

トマトの硬さを示す弾性係数は、Ca欠乏条件下の果実の方が高く、コントロールよりも硬いことが示唆された。

【今後の展開】

本研究により、Ca欠乏条件下における細胞壁では、細胞壁と結合性の強いペクチンの減少がみられること、Ca欠乏ストレスは種子サイズには影響を及ぼすが、発芽能力には影響を及ぼさないことがわかった。今後は、細胞壁多糖類やCaの局在様式やCaとの結合に重要なペクチンメチルエステラーゼ等の酵素類の活性測定などの解析を行う予定である。

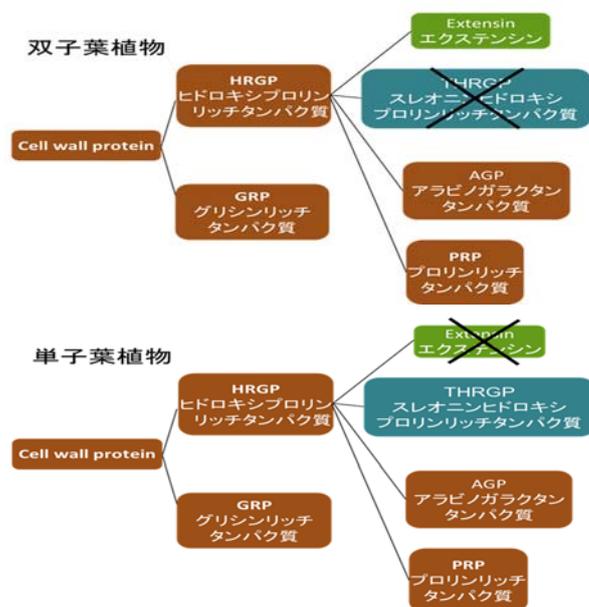


イネの発達過程における細胞壁構造タンパク質 THRGP に関する研究

渡辺 朝美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

植物細胞がもつ細胞壁は、単なる物理的構造の維持だけでなく、成長・発達や生殖といった個体発生のあらゆる面においても重要な働きを持つことが近年明らかになってきている。細胞壁はセルロースなどの多糖類を中心に複雑で多様な構造を持つことが知られているが、そのほかに細胞壁タンパク質と呼ばれる構造タンパク質もまた細胞壁成分のひとつとされている。構造タンパク質の一つに不溶化することで構造強化することで知られるエクステンシンがあげられるが、エクステンシンは双子葉植物のみが持ち、単子葉植物はエクステンシンを持たないことがゲノム配列情報からもわかっている。しかし、単子葉植物においては、エクステンシン同様の不溶化する働きを持つタンパク質の一つにスレオニンヒドロキシプロリンリッチプロテイン(THRGP)が存在する。THRGPは単子葉植物のみが持っている細胞壁構造タンパク質で、トウモロコシでは維管束の発生初期に発現していると考えられている。しかし、その機能や植物体内での分布、発現パターン等などについての報告がほとんどなされていない。そこで本研究では、トウモロコシと比較して様々な解析が可能である単子葉植物のモデル植物イネを用いることとした。イネの OsTHRGP に着目し OsTHRGP RNAi 形質転換体の作出と表現型解析を行った。また、THRGP RNAi の RNA の発現レベルと表現型の相関をと OsTHRGP タンパク質の局在様式についても調査を行った。これらの実験を通して、単子葉植物の発達過程と環境応答における細胞壁構造タンパク質の機能を明らかにすることを目的に研究を行うことで、細胞壁構造タンパク質を通じた細胞壁機能の一端を明らかにできている。



材料と方法

・材料

イネ(*Oryza sativa* 品種: Nipponbare)を用いた。日本の主要な穀物であるイネは全ゲノム配列が解読されており、リソースが豊富などのメリットがあるため単子葉のモデル植物として研究によく利用されている。正常株、ベクターコントロールおよび *OsTHRGP*-RNAi を特定網室において育成させた。

・方法

OsTHRGP の機能を調査するため RNAi 形質転換体を作成した。pANDA vector を使用し、形質転換イネを作出し、独立した形質転換ラインを得た。これらの個体において、成長、分げつや枝梗数、稔実率などの表現型を観察した。

結果と考察

独立した 20 株以上の *OsTHRGP*-RNAi 株を作成し、表現型の解析を行った。ベクターのみを導入したコントロールでは、正常に発達したのに対して、*OsTHRGP*-RNAi では、コントロールや正常株とは異なる表現型が観察された。

OsTHRGP-RNAi では、正常な種子形成が起こらないことで、稔実率が約 40 % に低下していた。また、稔実していた種子について、播種してみたところ、発芽率が低下しており、また発芽したのも正常に生育しなかった。*THRGP* は胚において発現が有するという報告もあることから、*OsTHRGP* が種子の形成に関与しているのではないかと考えられる。現在 *OsTHRGP* 発現レベルと稔実率が相関していた RNAi 形質転換体のラインにおいて再現性を調査している。

次に観察された表現型は、分げつの減少である。分げつはイネの根元付近からの枝分かれしたシュートの事を指すが、RNAi 形質転換体は分げつが少ない傾向があることが観察された。イネの分げつは根元付近にある側部分裂組織で形成されるため、*OsTHRGP* が側部分裂組織に局在しているのではないかと考え、分げつ形成直前の側部分裂組織の縦断面切片を作製し、*OsTHRGP* 抗体で免疫組織化学染色を行ったが、根端への局在は観察されたが、分げつに関わると考えられる側部分裂組織の局在は確認されなかった。また、穂の枝分かれである枝梗数が *OsTHRGP*-RNAi では少なかった。*OsTHRGP* の器官別発現解析では二次枝梗における発現が最も高かったことから、枝梗数の減少に *THRGP* が関与しているのではないかと考えられる。

栄養成長過程においては、*OsTHRGP*-RNAi のラミナジョイントの角度が大きくなっており、折れやすい性質が観察された。ラミナジョイント部分の縦断面切片を作製し細胞の形状や抗体を用いた *OsTHRGP* 局在の観察を行う予定である。

これらの結果より、*OsTHRGP* は側部分裂組織の正常な発達とラミナジョイントの力学的強度の維持、および正常な胚発生過程に重要な役割を持っている可能性が示唆された。

シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合過程における

マトリクスメタロプロテアーゼの作用機構に関する研究

小山 初音 (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】

接ぎ木や傷害において茎組織が切断されると、それを修復するように新しい組織が形成される。シロイヌナズナ花茎は傷害を受けると、すぐに髄細胞が分裂を始め、組織癒合は通常 7 日で完了する。

先行研究から、*Matrixmetalloproteinase (MMP)*の発現レベルが組織癒合の終期で上昇することが確認された。MMP は脊椎動物で細胞外マトリクスの分解と再編に関わるプロテアーゼであり、植物における機能の大部分が未知である。一方で、切断してない花茎ではほとんど発現が確認されなかったことから、MMPの発現が組織癒合に何らかの関連があると推測された。

次に MMP の発現部位を real time PCR によって解析した。その結果、通常は MMP の発現は地下部で見られるが、傷害を与えると傷害部の上部、下部で発現があることが確認された。

また、欠損変異体である *mmp* で癒合実験を行ったところ、本来癒合が完了する 7 日後に異常な細胞分裂が確認された。この *mmp* を background として MMP を過剰発現させると 7 日後に正常な癒合が完了した。WT を background とした MMP の過剰発現体でも正常に癒合が完了した。*mmp* の癒合部の細胞について解析を行うと、*at2-mmp* では WT に比べて細胞数が増加し、細胞分裂領域が拡大しており、*mmp* では癒合部の細胞分裂が促進されることが示された。これらの結果から MMP は組織癒合の終期に細胞分裂を停止させていると推測された。一方、プロテアーゼである MMP の内生基質の探索を目的とした浸漬培養で、WT、*mmp*、*MMPOX(WT)*を用いて、培地中の分解産物のプロテオミクス解析が行われた。その結果、*MMPOX(WT)*の浸漬培養でのみ見られるペプチドがいくつか見出された。

本研究では MMP の組織癒合過程における作用、プロテオミクス解析で得られたペプチドと組織癒合の関係を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

研究材料には、モデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の *MMP:GUS* 形質転換体、及びペプチドの欠損変異体を用いた。個体は MS 寒天培地に播種し、播種から 2 週間後で人工土に植え替えた。

1. *MMP:GUS* 形質転換体の染色

pAt2-MMP:GUS 形質転換体が抽臺して 7-10 日後に、花茎の第一節間を直径の半分までマイクロサージェリーナイフを用いて切断した。切断から 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 日後にサンプリングし、それぞれ切断部における GUS 染色性の違いを観察した。

2. 欠損変異体(mutant)の形態観察

mutant が抽臺して 7-10 日後に、花茎の第一節間を直径の半分までマイクロサージェリーナイフを用いて切断した。切断から 0, 1, 3, 5, 7 日後にサンプリングし、Technovit 樹脂に包埋した。その後、切断部位の組織癒合の経過について形態学的観察を行った。

【結果・考察】

1. *MMP:GUS* 形質転換体の染色

観察を行った結果、切断から 3, 5, 7 日後の花茎の切断部で GUS の染色性が高かった。一方、切断から 0, 1 日後の組織癒合前期、及び組織癒合完了後の切断から 10, 14 日後では GUS の染色が確認できなかった。これは、real time PCR から得られた組織癒合終期に *MMP* の発現レベルが高くなるという結果と一致した。

また染色は切断部の上部、下部で確認されたが、染色は表面に限定されており、髄組織での染色は確認できなかった。今後は、染色部位を特定するために GUS 染色後の花茎を Technovit 樹脂に包埋し観察を行う予定である。

2. mutant の形態学的観察

現在 genotyping により選抜した mutant のホモ個体を培養中である。

環境要因がポプラの根の成長や糖関連遺伝子の発現に与える影響

鈴木陽佳 (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

多年生の落葉性木本植物には、冬の低温や乾燥といった過酷な環境を突破するための“休眠”と呼ばれる環境適応機能が備わっている。晩夏から秋にかけて、短日を感じし、茎葉における頂芽分裂組織の生長を停止して茎の先端に休眠芽を形成する。そして冬の間、一定期間以上の低温にさらされることで、休眠が解除され、春の気温上昇とともに、茎の生長が開始する。このように木本植物が一年を通してその生育に年周期性を有していることは、明らかにその周りの外部環境の影響を受けているためと考えられ、環境変化に対してどのように植物が応答し適応しているのかを理解することが非常に重要である。

先行研究では、*Populus nigra* の根で合成された有機物質や、根で吸収された無機イオンを含む導管液の成分が年間において変動していることを見出した。中でもタンパク質量やグルコース量は、冬から春先に多く、夏から初秋にかけては少ないといった顕著な違いが観察された。このように季節における環境要因の変化によって導管液中の成分が変化していることは根の機能が年周期性をもち、ポプラの生育の年間リズム形成へ重要な役割を担っていることが考えられる。

そこで本研究では、冬季に増加するグルコース量に注目し、スクロースをフルクトースとグルコースに加水分解する酵素の一つであるインベルターゼを中心に研究を行った。これまでの研究でインベルターゼは短日条件、その後の低温によって発現が誘導されることが分かっており、低温耐性に関与している可能性が考えられた。そこで本研究では、インベルターゼの発現解析とともに、環境応答におけるインベルターゼの機能を明らかにすることを目的として研究を行った。関連して、近年明らかになった SWEET と呼ばれる細胞内および細胞内外の間で膜を通過するスクロース輸送に関与する糖輸送体にインベルターゼとの相関があるかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

研究材料には全ゲノムが解読された多年生の落葉性木本植物であるトリコカルパ (*Populus trichocarpa*) と多くの研究に使用され、世界的に資材として利用されているハイブリッドアスペン (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) line T89 を用いた。

1. 形態観察及び根の計測

培養室内においての、擬似年間サイクル (長日 3 週 → 短日 10 週 → 低温 4 週 → 長日 3 週) の中で、トリコカルパを 9 個体、ハイブリッドアスペンを 1 2 個体、地上部、根の形態に注目しながら育てた。特に根の成長に注目し、キルビメーターで計測を行い、成長量を求めた。各ステージで無菌ポットのポプラの地上部をデジタルカメラで撮影し、根についてはスキャナーを使用し記録した。

2. インベルターゼ、SWEET の発現解析

擬似年間サイクルの中で、各ステージで根をサンプリングし、mRNA を抽出して合成した cDNA を鋳型にして、リアルタイム PCR により発現解析を行った。

結果

地上部の成長はトリコカルパ、ハイブリッドアスペン共に、SD 2 週目に止まり、LD に戻した 1 週目で芽吹き始めた。それに対し、根の成長はトリコカルパでは LD 3 週目に成長量が最大になり、SD に移すと徐々に減少し、LT でほぼ完全に成長が止まり、LD に戻すと成長を再開した。また、ハイブリッドアスペンでは SD 2week 目に最大になり、その後徐々に減少し、トリコカルパ同様、LT で完全に成長がとまり、LD に戻すと成長を再開した。

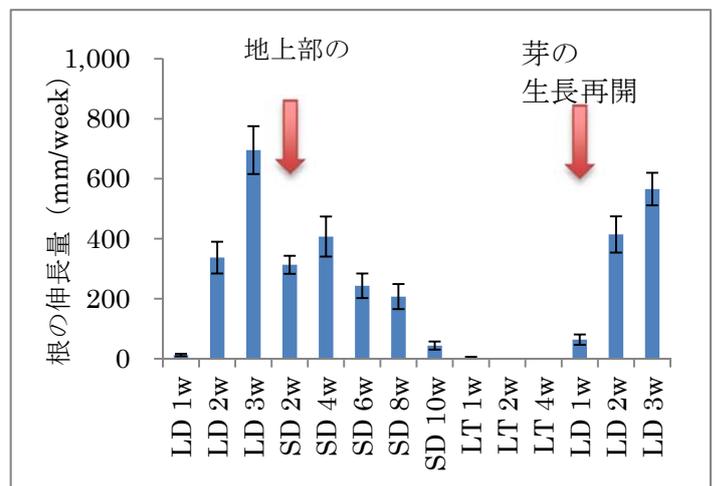


図 トリコカルパにおける根の伸長速度

LD : 長日 (16 時間明期/8 時間暗期)、

SD : 短日 (8 時間明期/16 時間暗期)、LT : 低温 (4°C、SD)

考察

培養室内で挿し木後の非常に若い株のポプラ (トリコカルパ、ハイブリッドアスペン) の 2 種類を無菌培地のポットで生育して擬似年間サイクルによる栽培を行った。また休眠の研究において、あまり注目されていない根の形態に注目した。その結果、2 種ともに擬似年間サイクルに対応して疑似的に操作した四季の中で成長の停止や休眠芽の形成、成長の再開という環境応答を示し、特にトリコカルパの根の成長は、地上部に比べ短日処理下においても長期間にわたって継続され、低温条件では完全に成長が停止していた。このことから、地上部よりも根での成長が長期間続いており、根の成長が地上部とは異なる環境応答の制御下にあることが示唆された。

今後はインベルターゼ、SWEET の RNAi 法による機能解析や、プロモーターGUS、*in situ* ハイブリダイゼーションによる組織特異的発現解析を進めていく予定である。

Dawn of Migrants - Heat Requirements of the Flight Forms in *Callosobruchus maculatus*

Niti Wattanasirichaigoon (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)

Introduction

Migration flight is an important response of insects to spacial or temporal variation in habitat quality. In some insects, the ability to disperse is discontinuous: populations consist of both distinct flightless and flying morphs. This phenomenon is called dispersal polyphenism, and is often used as subjects for studying phenotypic plasticity. Dispersal morph ratios usually depend on the intensity of environmental factors such as population density, predation, and food quality. These “cues” can promote changes during their early developmental stages, resulting in a specific developmental pathway to become flight morphs.

The bean beetle (*Callosobruchus maculatus*) is a worldwide pest of stored products that infests various types of beans. Their dispersal morph, or “flight form”, exhibits heavier body weight, longer lifespan, and less fecundity than the “flightless form”. Production of the flight forms in *C. maculatus* is triggered by an increase in temperature during the 2nd or 3rd instar periods (Sano, 1967, Appleby & Credland 2007). Normally, this increase in temperature results from accumulated metabolic heat of highly crowded larvae inside beans. Laboratory cultures of *C. maculatus* gradually lose their ability to produce flight forms under crowded conditions. Typical culturing practices results in the selection of the faster-developing and more fecund flightless morph. Although long-kept laboratory strains tend to lose their ability to produce flight forms, some experiments in previous studies were still able to produce flight forms. In this research, I investigated how laboratory strains with the ability to produce flight forms react to temperature cues differently from previous studies.

Materials & Methods

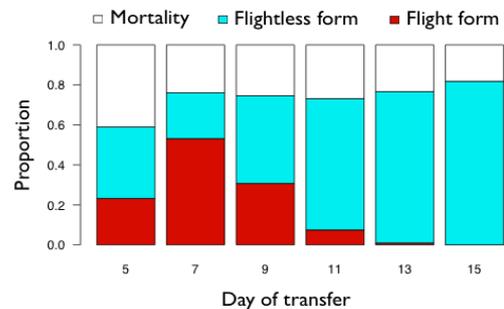
A total of 10 strains of *C. maculatus* cultures in the laboratory were investigated. Three strains were still able to produce flight forms despite being kept in the laboratory for a long time. The Kotakinabalu strain was obtained from Malaysia in 2003, the Nlongkak strain was obtained from Cameroon in 1998, and the Indra Chowk strain was obtained from Nepal in 2005. All cultures were reared in azuki beans at 30°C, 70 r.h. during this research.

The purpose of this experiment is to investigate the reaction to heat (in terms of morph ratios) of our three laboratory strains that are able to produce flight forms. For each strain, newly emerged adult females were allowed to mate and oviposit on mung beans (*Vigna radiata*) for 3-6 hrs, depending on the fecundity of each strain. The beans were

examined on the 5th day after oviposition and only those with 1 hatched egg were used in the experiment. A minimum of 60 beans per set were transferred from the 30°C rearing chamber to a 35°C incubator during different periods of early development (ranging from the 5th- 15th day after oviposition). This change in temperature was enough to produce sufficient flight forms according to previous studies.

Results

The Kotakinabalu and Nlongkak strains hardly produced any flight forms, while the Indra Chowk strain produced a much more sufficient amount of flight forms (figure below). Optimal production occurred when the rise in temperature was applied on the 7th day after oviposition. The most sensitive period corresponded to the 1st and 2nd instar periods.

**Discussion**

The results showed a different reaction to the temperature cue from those of previous studies. The Kotakinabalu and Nlongkak strains did not react strongly to the cue, possibly because the long-term culturing in the laboratory has raised their temperature threshold. The Indra Chowk strain reacted differently from previous studies where the sensitive period was reported to be the 2nd instar or between the 2nd and 3rd instars. The cue-sensitive period of Indra Chowk was around the 1st and 2nd instars where the most of the larvae are still near the peripheral of the beans (cooler than the center if it were crowded). These changes in cue-sensing thresholds and cue-sensitive periods are most likely the results of adaptations to avoid sensing the cue and prevent the production of the less-fecund flight form in laboratory cultures.

In order to fully understand the mechanism of flight form in *C. maculatus*, further research is needed. Understanding how *C. maculatus* produces the flight form can be applied to design practices in pest control to prevent their dispersal over stored products.

だめよ～、壁、壁！：ヨツモンマメゾウムシの幼虫は方言をしゃべるか？

戸嶋 知春（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）

【背景・目的】

生物が資源競争で勝ち残るかどうかは、他個体とのゲームでどのような戦略を選択するかによる。資源競争には、資源を分け合う共倒れ型と、互いに攻撃し合って優勢な個体が資源を独占する勝ち抜き型の2つの戦略がある(Nicholson 1954)。幼虫期のマメゾウムシにおいても資源競争がみられ、共倒れ型(逃げ型)と勝ち抜き型(攻撃型)のタカハトゲームの形をとる(Smith and Lessels 1985)。マメゾウムシでは、共倒れ型と勝ち抜き型どちらか一方の戦略をとることが一般的であるが、ヨツモンマメゾウムシは両方の戦略をとることができる。ほとんどのヨツモンマメゾウムシの幼虫は壁を形成することで争いを防ぐ共倒れ型を示すが、幼虫同士を強制的に対峙させると攻撃し合う勝ち抜き型の性質を保持している。ヨツモンマメゾウムシの幼虫が形成する壁は脆く、相手の攻撃を物理的に防ぐことはできないことから、ヨツモンマメゾウムシの幼虫の壁作りは、相手と資源を分け合う取り決めを行う意思伝達の1つであると考えられる。

ヨツモンマメゾウムシは南極以外の大陸に存在し(Southgate 1979)、各系統において個体の大きさ・産卵数・嗜好性・生育期間などに様々な地域差がみられる(Fujii 1968; Credland and Dick 1987; Messina 1989; Messina 1990)。このため、ヨツモンマメゾウムシの幼虫が意思伝達に用いる壁作りに関しても、地域によって異なる(方言がある)可能性がある。方言が存在した場合、資源を共有する相手が、同系統の場合と異なる系統の場合とで、意思伝達方法に違いが生じ、異なる系統が相手のとき勝ち抜き型に転じる可能性がある。一方で、ヨツモンマメゾウムシは人間が栽培化した大きな豆に寄生しているため、共倒れ型が有利である可能性もある(Toquenaga and Fujii 1991)。その場合、壁作りには方言がなく、地域が異なる場合でも意思を伝達できる方が有利であると考えられる。本研究では、ヨツモンマメゾウムシの幼虫の壁作りに方言があるかどうか調べるために、様々な国で採取されたヨツモンマメゾウムシを用いて実験を行った。階層モデルを構築し、各系統が緑豆内で壁を形成した割合を推定した。また、異なる系統を組み合わせた場合、壁を作る割合が変化するかどうか調べた。

【実験方法】

実験には、5カ国で採取された6系統のヨツモンマメゾウムシを使用した。緑豆1つにつき、同系統の卵を2つ、あるいは異なる2系統の卵を1つずつ産ませ、30日後に羽化した成虫の個体数、性別、系統名を記録した。勝ち抜き型の割合を求めるC-value(Takano et al. 2001)をもとに、同系統を組み合わせたときの羽化した成虫の個体数を用いて、各系統が緑豆内で壁を形成した割合(W)を推定した。また、異なる系統を組み合わせた場合は、WがΔWだけ変化すると仮定し、各系統のWの値と、異なる系統を組み合わせた場合の羽化成虫数から、ΔWを推定した。

【結果】

実験に用いた6系統はすべて、同系統に対して壁を形成した割合が高く(W = 0.80 ~ 1.00)、共倒れ型であった。また、すべての系統において、同系統のときに比べ、壁を作る割合が有意に変化した組み合わせ(ΔW≠0)と変化していない組み合わせが存在した(ΔW=0)。さらに、2つの系統のWの差とΔWの間に、負の相関がみられた(df = 28, r = -0.54, p = 0.002, 図1)。よって、ヨツモンマメゾウムシは、相手が自分よりも壁を形成し易い系統の場合、自分も壁を形成するように変化し、相手が自分よりも壁を形成しない系統の場合は、自分も壁を形成しないように変化した。

【考察】

異なる系統を組み合わせた場合、壁を作る割合が変化した組み合わせが存在したことから、ヨツモンマメゾウムシの幼虫の壁作りには方言があると考えられる。また、ヨツモンマメゾウムシは、相手が自分よりも壁を形成し易い系統の場合、自分も壁を形成するように変化し、相手が自分よりも壁を形成しない系統の場合は、自分も壁を形成しないように変化した。このことから、ヨツモンマメゾウムシは壁作りのゲームにおいて、相手の出した手をそのままこちらが返す、しっぺ返し戦略をとっていると考えられる。しっぺ返し戦略は、囚人のジレンマゲームの中で優れた戦略の一つであるが、マメゾウムシのタカハトゲームでも有効な戦略となりうるか、理論的に検討する必要がある。今後は、壁作りのゲームにおいて、勝ち抜き型を示すヨツモンマメゾウムシや他の系統を相手とする場合でも、しっぺ返し戦略が本当に行われているかどうか調べていきたい。

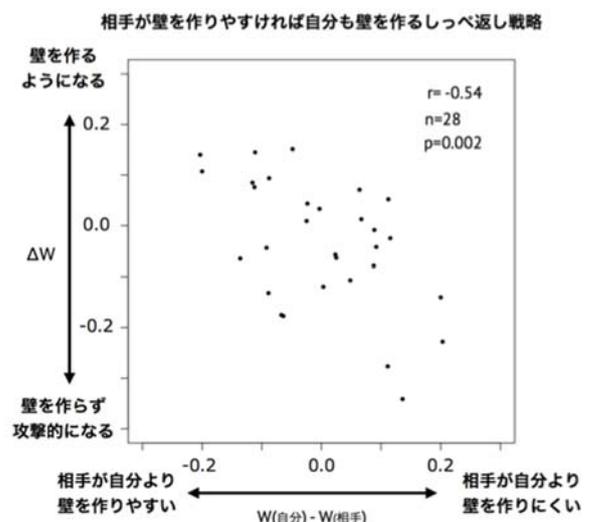


図1：「自分と相手のWの差」と「ΔW」の関係性
各点は、自分の系統と相手の系統の壁を作った割合の差(W(自分) - W(相手))と同系統相手と異系統相手の時での壁作りの変化量(ΔW)の関係性を示す。

塩化物イオンが *Aurantiochytrium* 18W-13a 株の生育に及ぼす影響の解析

進藤 雅史 (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・目的]

Aurantiochytrium 18W-13a 株は、スクアレン等の炭化水素を生成し大量に細胞内に貯め込む性質を有することから、バイオ燃料生産への利用が期待されている[1]。*Aurantiochytrium* 18W-13a 株は、本来汽水域に生息するため幅広い塩濃度環境で生育できるが、完全な淡水では増殖することができないことが知られている[2]。これまでに当研究室の福田らによって、海水中の塩化物イオンが細胞の生育に必要であると明らかになっているが、*Aurantiochytrium* 18W-13a 株の生育になぜ塩化物イオンが必要であるのか、そのメカニズムは依然不明である。そこで私は、塩化物イオンが *Aurantiochytrium* 18W-13a 株の生育におけるどの段階にどのような形で影響しているのかを解明するため、塩化物イオン欠乏状態の *Aurantiochytrium* 18W-13a 株に糖代謝の中間産物を添加した際の呼吸活性の変化を観察することで糖代謝との関連性の確認を試みた。

[実験内容]

・ *Aurantiochytrium* 18W-13a 株の培養

Aurantiochytrium 18W-13a 株の培養は GTY 培地 50 mL (Glucose 1 g, Bacto Tryptone 0.5 g, Bacto Yeast Extract. 0.25 g, H₂O 25 mL, 人工海水 25 mL) を培地として使用した。三角フラスコに分注した GTY 培地に接種し 20°C、70 rpm で振盪しながら 3 日間前培養した株を実験に用いた。細胞濁度は 24 時間毎に 660 nm の散乱を分光光度計で測定した。各サンプルは GTY で 20 倍に希釈して測定に供した。

・ 培地中糖濃度の測定

人工海水の代わりに NaCl、グルタミン酸 Na (Glu-Na)、リシン-HCl (Lys-HCl)、ソルビトールをそれぞれ 0.3 M 加えた 4 種の GTY 培地を用いて培養を行い、細胞濁度を測るとともに、フェノール硫酸法[3]によって培地中の糖濃度の減少量を計測した。

・ 呼吸活性の測定

酸素電極を用いて、塩化物イオンの有無・炭素源の有無の条件を変えた条件における呼吸活性を測定した。塩化物イオンを含まない培地へ継代した後、解糖系~TCA 回路における中間産物 (Glucose 100 mM, Fructose 100 mM, Glycerol 100 mM, Sodium acetate 10 mM, Sodium citrate 10 mM) を添加し呼吸活性が回復するかどうかを観察した。細胞濃度は OD₆₆₀=0.1 に希釈し、測定時の温度は 20°C に保った。

・ 塩化物イオン以外のハロゲン化物イオンについて

その他、NaCl の代わりに NaBr と NaI をそれぞれ 0.3 M ずつ加えた GTY 培地にて 5 日間培養を行い、24 時間毎に 660nm の波長の光の散乱を分光光度計で測定した。

[結果・考察]

塩化物イオンを含む培地 (NaCl, Lys-HCl) において培養 72 時間後にそれぞれ OD₆₆₀ が 13.1 と 10.1 に達し、糖濃度は 26.7, 25.6

g/L から 1.9, 6.1 g/L まで減少した (Fig.1 a, b)。一方、塩化物イオンを含まない培地 (Glu-Na, ソルビトール) における培養 72 時間後の細胞濁度はそれぞれ OD₆₆₀ が 1.38, 1.28 で、細胞増殖が正常に行われておらず、また培地中の糖濃度は培養 72 時間後にそれぞれ 18.4, 21.9 g/L であり、ほぼ減少していなかった (Fig.1 c, d)。この結果から塩化物イオンが解糖系から TCA 回路の糖代謝に関与している可能性を予想した。

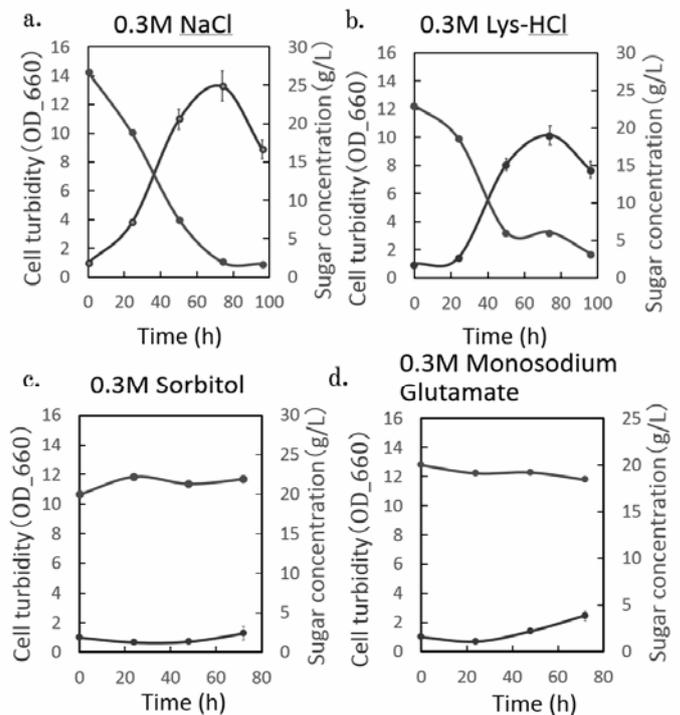


Fig.1 *Aurantiochytrium* 18W-13a株の細胞濁度と培地中糖濃度

そこで、塩化物イオンと糖代謝の関係を調査するために呼吸活性の測定を行った。塩化物イオンを含まない培地へ継代し、解糖系から TCA 回路における中間産物 (Glucose, Glycerol, Fructose, 酢酸, クエン酸) をそれぞれ添加し、呼吸活性を測定した。その結果、前培養 (GTY 培地) から塩化物イオンを含まないソルビトール培地へ継代すると呼吸活性が著しく低下することを確認したが、中間産物の添加による呼吸活性の回復は見られなかった。また培養実験において、NaCl ではなく NaI, NaBr を含む培地での培養を行ったところ正常な細胞増殖が見られたことから、塩化物イオン特異的な効果ではなくハロゲン化物イオンの必要性を見出した。今後は呼吸を測る以外の方法でのアプローチを検討していきたい。発表会にて詳細を報告する。

[参考文献]

- [1] Watanabe et al.: (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 2246-2248
- [2] Nagano et al.: (2009) *J. Oleo Sci.*, 58, 623-628
- [3] Dubois M. et al.: (1956). *Anal. Chem.*, 28, 350

オーランチオキトリウムのメバロン酸経路を律速する HMG-CoA レダクターゼの解析

藤原 直倫 (筑波大学 生物学類)

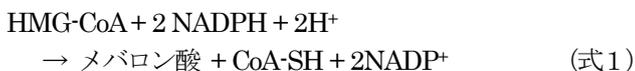
指導教員：鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

[背景・目的]

Aurantiochytrium は従属栄養性の卵菌類であり、ラビンラチュラ類に属している。中でも 18W-13a 株は炭化水素 (スクワレン) の含有量が高く、細胞の全脂質中の約 70% がスクワレンである [1]。スクワレンは、抗炎症性・免疫亢進性など様々な効果を有し、化粧品やワクチンの基材など多様な用途がある。従来深海ザメの肝油がその供給源とされてきたが、近年深海ザメの絶滅が危惧されており、この代替源として *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株が注目されている。また、スクワレンは炭化水素系のバイオ燃料としても利用可能であることから、効率的な生産系の構築が期待されている。

先行研究により、*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株のスクワレン生産性は、最適な通気量を供給して培養することが重要であることが知られている。

スクワレンはステロールの中間代謝産物であり、*Aurantiochytrium* においてはメバロン酸経路を経て合成されることが知られている。他の多くの生物同様、ステロール合成の律速段階はメバロン酸経路における、メバロン酸を合成する酵素 HMG-CoA レダクターゼ (HMGR; 式 1) の反応であると考え、培養における通気量と HMGR の酵素活性の関連を解析することにした。



[材料と方法]

・【培養条件】*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株を用い、GTY 培地 (2% グルコース、1% Bacto Tryptone、0.5% Bacto Yeast Extract、50% 人工海水) で培養した。前培養は 500 mL の坂口フラスコに GTY 培地を 300 mL 入れ、25°C、100 rpm、72 時間の振盪培養を行った。本培養は 500 mL の三角フラスコに GTY 培地を 200 mL、300 mL、400 mL を入れ、72 時間目の細胞を 0.1% の濃度になるように添加した。

・【細胞抽出液の調整】培養開始から 48 時間後、72 時間後、96 時間後の時点で 20 mL の培養液を採取した。細胞を遠心分離 (1,500 × g、5 分、4°C) により回収し、抽出液 (0.1 M リン酸バッファー、1 mM DTT、1 mM EDTA、10% (w/w) グリセロール) で一度リンスを行い、4 mL の抽出液を加えた後、超音波ホモジナイザーで 10 分間破碎し、遠心分離 (15,000 × g、15 分、4°C) で粗抽出液を回収した。さらに、上清 3 mL を超遠心 (100,000 × g、60 分、4°C) を行い、可溶性画分と膜画分を回収した。

・【酵素活性の測定】石英キュベットに 100 μL の細胞抽出液と 800 μL の反応液 [180 mM リン酸バッファー (pH 7.0)、0.03 mM DTT、0.03 mM NADPH] を加え、約 3 分後に 100 μL の基質である HMG-CoA (0.3 mM) を加え反応を開始させ、340 nm の吸光度の変化を測定した。さらに、細胞抽出液のタンパク質濃度

の測定は、Bradford 法にて BSA を標品に用いて行った。

・【阻害剤の効果の検定】HMGR の阻害剤としてコンパクチンの濃度を変えて反応液に添加し、コンパクチン無添加と比較して酵素活性に及ぼす影響を調べた。

[結果・考察]

可溶性画分と膜画分の酵素活性を測定したところ、可溶性画分にはのみ活性が見られた。ヒトを含む多くの種で報告されている HMGR のほとんどは小胞体 (ER) 膜画分に局在している [2]。しかし、本研究により可溶性画分におけるのみ活性が見られたことは、*Aurantiochytrium* の HMGR のユニークな特徴であった。

Aurantiochytrium の HMGR の粗抽出液における比活性は、4~10 nmol/min/mg protein であった。この値は、ハトの肝細胞やゴールデンハムスターの肝細胞の 0.047 nmol/min/mg protein [3] や 0.037 nmol/min/mg protein [4] と比較して、およそ 100 倍高かった。この高い比活性が *Aurantiochytrium* における多量のスクワレン蓄積に関与しているものと思われた。

また、今回検出した活性が HMGR によるものであることを示す 1 つの傍証として、HMGR の阻害剤であるコンパクチンを 130 μM 添加すると活性が阻害されることを見出した。

Pseudomonas などある種の生物では HMGR は、NADPH ではなく NADH を基質に用いることが知られているが [5]、*Aurantiochytrium* の HMGR は NADPH のみを利用することがわかった。

[今後の展望]

一般に HMGR は膜タンパク質として知られており、超遠心で細胞破碎液を回収した際に、膜画分の方に活性が見られる [2]。しかし、*Aurantiochytrium* においては、可溶性画分に酵素活性がみられ、他の多くの種とは異なり、可溶性である可能性が示唆された。今後は、*Aurantiochytrium* の mRNA から、逆転写酵素を用いて cDNA を作り、他の HMGR とは異なり N 末端側に膜貫通ドメインが無いことを示し、cDNA を大腸菌または酵母細胞に発現させ、可溶性画分に活性があることを確認するつもりである。また、通気量と HMGR 活性の変化についても詳細に解析を行いたい。

[参考文献]

- [1]. Kaya et al. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 2246-2248
- [2]. Friesen et al. (2004) *Genome Biol.* 5: 248.1-248.5
- [3]. Kenneth et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 11478-11483
- [4]. Takahashi et al. (1998) *J. Bacteriol.* 184: 1256-1263
- [5]. Kenneth et al. (1997) *Biochem. Mol. Med.* 61: 114-120

シアノバクテリアのグリコーゲン合成酵素の欠失が炭素代謝におよぼす影響

戸来 駿介 (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

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は酸素発生源光合成を行う原核生物であり、全ゲノム配列が解読されたモデル生物として代謝改変による研究が盛んに行われている。この生物は他の光合成生物と同様、カルビン・ベンソン回路により CO₂ を固定する。固定された炭素は通常グリコーゲンとして貯蔵され、呼吸基質として暗所で細胞の機能維持や保全に使用される。このシアノバクテリアを用いて、代謝改変により脂肪酸やエタノールなどの物質生産が試みられてきたが、固定した炭素が糖新生を経てグリコーゲンの合成に使用される為、ピルビン酸やアセチル CoA から合成される化合物の生産効率は高くなかった[2]。

本研究では、*Synechocystis* の糖新生からグリコーゲン合成に向かう経路に関連する 2 つの酵素遺伝子 (Fructose-1,6-ビスホスファターゼと ADP-glucose ピロホスホリラーゼ) をそれぞれ破壊することにより、固定した炭素を TCA サイクルの方向へ流すことを目指し、これらの変異が炭素代謝に及ぼす影響を調べることにした。

を行った。得られた変異株は、730 nm の濁度 (OD₇₃₀) を 0.05 に揃えた状態で、通常の無機培地 BG-11 で培養し、細胞の成長量とクロロフィル量は、それぞれ OD₇₃₀ と 90%メタノールで抽出した溶液の 665 nm の吸光度から測定した。

また測定 7 日後におけるグリコーゲン合成量の測定は、まずメタノール抽出残渣をグルコアミラーゼ処理し、グリコーゲンを Glucose へと分解した、生じ Glucose をヘキソキナーゼにより Glucose-6-リン酸へと変換し、NADP⁺存在下で Glucose-6-リン酸を Glucose-6-リン酸デヒドロゲナーゼによりグルコノラクトン-6-リン酸に変換する過程で、NADP⁺が NADPH と変換する速度を 340 nm の吸光度変化として測定した。

結果と考察

Fructose-1,6-ビスホスファターゼをコードする 2 つの遺伝子、また ADP-glucose ピロホスホリラーゼをコードする 1 つの遺伝子についてそれぞれ形質転換体を作成し、30°C の連続光下で 1 ヶ月間培養したが、この段階では野生型遺伝子を持つ染色体を完全には分離できていなかった。

ADP-glucose ピロホスホリラーゼの変異体について、BG-11 培地における成長量・クロロフィル量を測定したところ、変異株は野生株に比べ 1 日ほど長いラグタイムが存在したが、成長速度は野生株と大きな差は見られなかった。

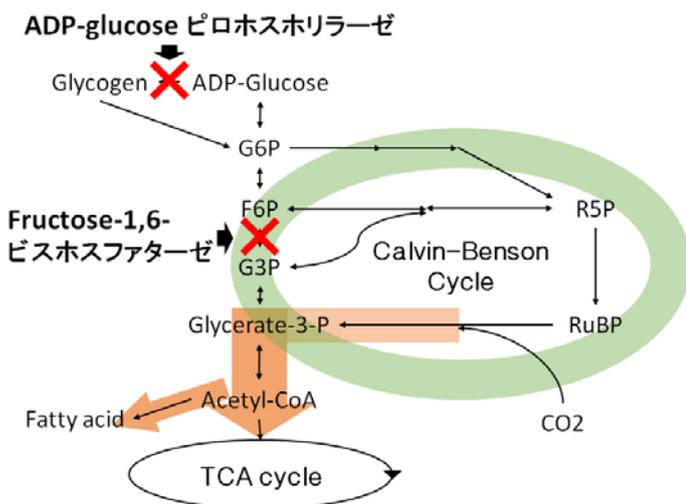
同じく ADP-glucose ピロホスホリラーゼの変異株について 7 日間培養した後のグリコーゲン合成量を測定したところ、野生株では 12.2 μg / μg Chl であったのに対し、変異株では 5.7 μg / μg Chl と約半分に減少していた。

今後の展望

今後は、Fructose-1,6-ビスホスファターゼ破壊変異体についても、成育およびグリコーゲン生産量を測定する予定である。Fructose-1,6-ビスホスファターゼについては、2 つの遺伝子があるため二重変異株の作成も行いたい。最終的に固定された炭素が TCA サイクル側に流れていることを確認するために、ピルビン酸・2オキシグルタル酸など代謝産物の測定を行いたい。これが確認出来た際に、目標となる有用物質を決定し、その生産のためのプラットフォーム細胞としての効果を評価したい。

参考文献

1. Gründel M *et al.* (2012), *Microbiol.* 158:3032-3043
2. Kudoh K *et al.* (2014), *J. Biosci Bioeng.* 118:20-28



材料と方法

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用い、欠損変異体の作成には二重相同組換を使用した。目的遺伝子上流と下流それぞれ 1 kb を PCR 法により増幅後、2 つの断片を PCR 法で結合した。この DNA 断片を TA クローニングによりベクターに組み込み、大腸菌へとトランスフォーメーションした。コロニーからプラスミドを回収し、塩基配列を 5 つのプライマーを用いて DNA シークエンシングにより確認した。最初の PCR で上流下流の断片の結合部位に BglIII 制限酵素サイトを導入しており、そのサイトに薬剤耐性遺伝子をライゲーションにより挿入した。これらのプラスミドをシアノバクテリア細胞の形質転換に用いた。

シアノバクテリアの形質転換はそれぞれ挿入した薬剤耐性遺伝子に応じた薬剤を加えたプレートで培養することにより選別

真核生物誕生仮説としての3菌栄養共生モデル

田村 拓海 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 桑原 朋彦 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

真核生物のゲノムは真正細菌のゲノムと古細菌のゲノムが融合したものとして知られている。真核生物誕生については多くの仮説が提唱されているが、我々は3菌栄養共生仮説を提唱している。この仮説ではエオサイトの発酵古細菌と発酵真正細菌、メタン菌の栄養共生を考える。この仮説は水素仮説とエオサイト仮説の長所を持ちあわせている。水素仮説は発酵細菌とメタン菌間の水素の授受に基づく共生から真核生物が誕生したシナリオを主張している (1)。この仮説の長所は発酵細菌とメタン菌が接近する駆動力を説明できることであるが、短所として真核生物のゲノムにメタン菌の遺伝子が含まれていないことが挙げられる。エオサイト仮説は古細菌の一種であるクレンアーキアの一部のエオサイトから真核生物が誕生したというシナリオを主張している。この仮説の長所は真核生物の細胞分裂機構がエオサイトのそれと似ている (2) ことであるが、短所として真正細菌と古細菌の接近のメカニズムについて述べられていないことが挙げられる。3菌栄養共生仮説ではエオサイトの発酵細菌とメタン菌、バクテリアの発酵細菌とメタン菌の2つの共生がメタン菌をポートとして成り立っていると考える。すると、2種の発酵細菌が接近し、遺伝子の交換が起きると予想される。このようにして、真核生物が誕生したと考えている。

本研究では淡水産の発酵真正細菌の *Thermotogales* 目の *Fervidobacterium* 属のうち、どの種が最も3菌栄養共生に適しているかを調べた。*Thermotogales* 目を用いた理由としては、遺伝子水平転移を多く受け入れている (3) ことが挙げられる。また、淡水産を用いた理由はエオサイトの発酵古細菌 (*Fervidococcus fontis*) が淡水産しか知られていないからである。淡水産で共生が確認されており、入手が容易なメタン菌としては *Methanothermobacter thermautotrophicus* が知られているのでこれを用いた。

材料と方法

Fc. fontis 用の培地の DSM395 培地から NaHCO_3 を除去した培地と *M. thermautotrophicus* 用の DSM231 培地から Na_2CO_3 を除去した培地を 1:1 で混合した培地を培養に用いた。*Fb. islandicum*、*Fb. nodosum*、*Fb. pennivorans* と *M. thermautotrophicus* のそれぞれの組み合わせを、それぞれの菌密度が 1.0×10^5 cells/ml となるように培地に植菌後、 N_2 気相に置換し、pH 6.5、65°C で5日間、共培養を行った。同様に *Fc. fontis* と *M. thermautotrophicus* の共培養を pH 6.7 で10日間行った。*Fb. pennivorans*、*Fc. fontis* および *M. thermautotrophicus* の3菌共培養を、pHを変化させ、10日間行った。培養後、バクテリア計数盤により遊離している菌の菌密度を、Molecular Sieve 5A カラムを用いたガスクロマトグラフィー (GC-5A; Shimadzu) によりメタン濃度を測定した。3菌共培養で生じた沈殿はケイ光顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し

た。後者においてはサンプルの固定に2% グルタルアルデヒドを用いた。

結果と考察

Fb. islandicum、*Fb. nodosum*、*Fb. pennivorans* と *M. thermautotrophicus* の組み合わせにおいて初期菌密度から300倍と7.5倍、640倍と10倍、540倍と13倍の増加が見られた。このときのそれぞれのメタン濃度は0.5%、0.4%および1.1%であった。*Fc. fontis* と *M. thermautotrophicus* の共培養においてはそれぞれ初期菌密度から440倍、1.3倍の菌密度の増加が見られ、メタン濃度は0.4%まで上昇した。この結果は、遊離している菌の菌密度は共生が起きたかどうかの判断に常に使えるわけではないことを示唆した。*Fb. pennivorans*、*Fc. fontis* および *M. thermautotrophicus* の pH 6.3 における3菌共培養ではそれぞれ初期菌密度から380倍、80倍、29倍の菌密度の増加が見られた。また、メタン濃度は1.3%まで上昇した。生じた沈殿を SEM で観察したところ、沈殿中に *Fb. pennivorans* と *M. thermautotrophicus* が見られたが、*Fc. fontis* の同定は困難であった (Fig. 1)。また、沈殿中の菌は複雑なネットワーク構造を形成していた。これは *Fb. pennivorans* の鞭毛によるものだと考えられる。多量の EPS が観察されたことから、*Fc. fontis* が EPS に埋もれて、存在していても見えない可能性がある。今後はよりよい3菌共培養の条件の調査と、定量 PCR による沈殿中の菌密度の測定をする予定である。

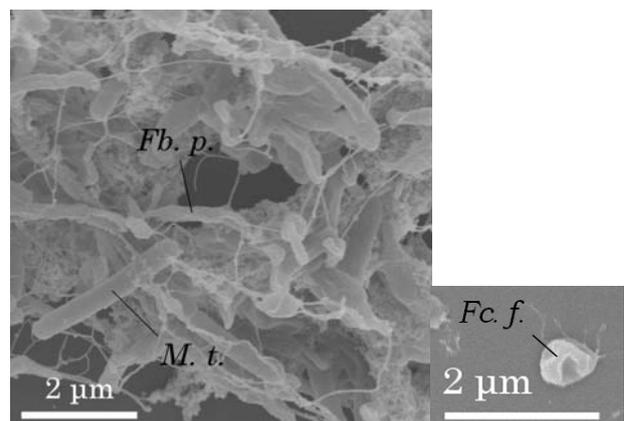


Fig. 1 *Fb. pennivorans*、*Fc. fontis* および *M. thermautotrophicus* の3菌共培養で生じた沈殿 (左) および遊離していた *Fc. fontis* (右) の SEM 写真。*Fb. p.*、*Fb. pennivorans*、*M. t.*、*M. thermautotrophicus* および *Fc. f.*、*Fc. fontis* を示す。

参考文献

- (1) Martin et al. (1998), Nature, 392, 37
- (2) Lindås et al. (2008), PNAS, 105 (45), 18942
- (3) Zhaxybayeva et al. (2009), PNAS, 106 (14), 5865

ミモシンによる植物の細胞周期進行停止作用の解析

瀧 ゆきな (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

ミモシンはオジギソウ属やギンネム属などによって生産される非タンパク構成アミノ酸であり、ミモシン高含有植物を食べた動物が脱毛や、繁殖障害等の症状を示すことが知られている。癌細胞においては活性酸素生成を介したアポトーシスや、動物細胞においてサイクリン D1 の発現抑制を介した分裂周期の停止を引き起こすことが報告されている。植物においては、数種の植物に対して生育抑制効果を持ち、異種個体に作用を示すアレロケミカルとしてのはたらきが報告されている。アレロケミカルは環境中で分解されやすく残留しにくい特性を有する場合は多いことから、農薬的利用も期待されている。

本研究の先行研究において、タマネギなどに対し低濃度でミモシンを処理すると根部で強い生育阻害が生じるが、コムギに対しては低濃度ではあまり変化がなく、ミモシンによる感受性は植物種により異なることがわかっている。また、ミモシンは、植物細胞でネクロシスを誘導することや、微小管形成阻害とは異なる機構で細胞分裂を停止させていることも示されている。さらに、ミモシン処理濃度に応じて DNA のランダムな断片化が増加するという報告もされている。しかし、どのように細胞周期進行停止が起こっているのかについてはまだ解明されていない。

そこで、本研究ではミモシンによる細胞分裂周期進行停止の発現機序の解析を目的とした。

材料

供試植物

- エノコログサ (*Setaria viridis*)
- コムギ (*Triticum aestivum* L. cv. Norin 61)
- シュンギク (*Glebionis coronaria*)
- タマネギ (*Allium cepa* L. Senshutyukoudaka)
- ニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun)
- ヒメタイヌビエ (*Echinochloa crus-galli*)
- レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lake366)

供試薬剤

- ミモシン ((S)- α -Amino- β -[1-(3-hydroxy-4-oxopyridine)]propionic acid : L-Mimosine)

方法

1. ミモシンによる生育抑制作用の検定

培養管に一定濃度のミモシンを含む0.5%寒天培地を用意し、供試植物の発芽種子を移植して、3日間グロースチャンパー(明 13h/暗 11h、25/20°C)内で生育させた。その後根・茎葉長を測定し、50%生育阻害濃度 (GR₅₀ 値) を算出した。

2. 細胞周期への影響

発芽させたタマネギ種子を、一定濃度 (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ M) のミモシンを含む0.5%寒天培地に移植し24時間生育さ

せた。根端1 cmを切り取り、エタノール/酢酸 (3:1) の混合液に1日浸漬させたのち、蒸留水で洗浄した。そして30分間5 Mの塩酸に浸漬し、シッフ試薬で染色した後先端の染色が確認できる部分を切り取ってプレパラートを作成し、顕微鏡で観察した。また、0.20 μ Mのミモシンを含む0.5%寒天培地に移植し2,4,6時間生育させたタマネギも同様に処理後観察した。

3. 活性酸素生成とアポトーシス誘導の検討

2と同様24時間処理したタマネギの、根端1 cmを切り取りジヒドロエチジウム (DHE) 溶液に2時間浸漬してO₂⁻の生成を調べた。また、根端5 mmを切り、TUNELアッセイによりアポトーシス特異的な断片化DNAを標識し、一方で、アネキシンV、ネクロシスをエチジウムホモダイマー、生細胞をヘキスト33342で標識する三重染色をおこない、共焦点レーザー走査型顕微鏡等を用いて観察した。

結果・考察

1. ミモシンによる生育抑制作用の検定

タマネギ・レタス・エノコログサ・ニンジン・ヒメタイヌビエでは低濃度のミモシン処理による生育阻害が、コムギやシュンギクでは高濃度でのみ生育阻害が観察された。このことから、ミモシンによる感受性は植物種により異なることが確認された。

2. 細胞周期への影響

タマネギにおける24時間処理では20 μ M以上の濃度において、そして20 μ M処理では4時間以降で細胞分裂期の細胞数の減少が確認された。いずれの分裂期においても細胞数が減少しているため、分裂期中ではなく間期において細胞周期進行阻害が生じていると考えられた。

3. 活性酸素生成とアポトーシス誘導の検討

DHE染色では濃度依存的な蛍光強度の増加が観察されたため、ミモシン処理によりO₂⁻発生が誘導されると考えられた。三重染色ではアネキシンVによる蛍光強度の増加は観察されなかったが、TUNELアッセイでは、蛍光強度の増加傾向が認められたことから、ミモシン処理によってアポトーシスの誘導も起きていることが考えられた。

今後の予定

フローサイトメトリを用いて細胞周期のどの段階で進行阻害が生じているかを確認し、どのように進行阻害が生じるか検討する予定である。

アレロケミカル L-DOPA による植物生育抑制作用と耐性機構の解析

小田切 美穂 (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

高等植物は種々の二次代謝産物を生合成して生息環境中に放出しており、それらの中には周囲の植物の生育に影響を与えるアレロパシーを引き起こすアレロケミカルとして知られている物質もある。マメ科のムクナに多く蓄積されている L-DOPA は、チロシンから合成される非タンパク性アミノ酸で、植物細胞内では代謝されてアルカロイド、リグニン、フェニルプロパノイドとなる。これが根部より土壤中へ放出されると周囲の植物の成長を妨げる。L-DOPA の作用には種選択性があることがわかっている。

L-DOPA は植物において、ポリフェノールオキシターゼ (PPO) もしくは自動酸化により、ドーパキノンおよびドーパミンキノンへと代謝され、メラニンが合成される。ドーパキノンおよびドーパミンキノンへと代謝されるこの過程で活性酸素 (ROS) が発生する。また、ドーパキノンおよびドーパミンキノンがシステインと結合することによってキノントタンパク質が生成される。先行研究において、このキノントタンパク質または ROS が植物の生育抑制に関与していることがわかっている。

本研究では、L-DOPA の ROS による酸化障害以外の作用による生育抑制機構を明らかにするため、感受性の高いレタス、キュウリに加えて、耐性を示すタイヌビエにおける L-DOPA の生育抑制効果を比較検討し、活性酸素が発生しているのに障害が出ないメカニズムについての検討を目的とする。

材料

供試植物:

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

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

タイヌビエ (*Echinochloa crus. galli* P. Beauv. var. *oryzicola* Ohwi)

供試薬剤:

L-DOPA (3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine)

実験方法

1. 植物生育抑制活性試験

0, 0.1, 0.5, 1 mM の L-DOPA を含む 0.5% の寒天培地でレタス、キュウリ、タイヌビエの発芽種子を移植しグロースチャンバー内 (明 13 h, 25°C/暗 11 h, 20°C) で 3 日間生育させたのち、根部の伸長を測定した。

2. 死細胞誘導の検討

フルオロセインジアセテート (FDA) とプロピジウムイオダイド (PI) による二重染色:

0, 0.1, 0.5, 1 mM L-DOPA で処理したレタス、キュウリ、タイヌビエの根部を切断し、それを FDA と PI の混合溶液に浸し暗条件で 10 分間振とうした。洗浄後、蛍光顕微鏡 (励起波長 450–490 nm、蛍光波長 520 nm 以上) で根からの蛍光を観察した。

Evans Blue 染色:

0, 0.1, 0.5, 1 mM L-DOPA で処理したレタス、キュウリ、タイヌビエの根部の先端 5 mm を切断し、それを 0.25% (w/v) Evans blue

溶液に浸漬し 1 h 室温で静置した。根を取り出して 15 分 DW で洗浄したのち N, N-dimethylformamide 500 μ l を用いて 30°C 暗条件 24 h で Evans blue を抽出し、600 nm の吸光度を測定した。

3. 活性酸素発生誘導の検討

0, 0.1, 0.5, 1 mM L-DOPA で処理したレタス、キュウリ、タイヌビエの根部を切断し、10 μ M ジヒドロエチジウム (DHE) 溶液に浸漬させた後、2 h 振とう染色した。洗浄後、蛍光顕微鏡 (励起波長 450–490 nm、蛍光波長 520 nm 以上) で根からの蛍光を観察した。

4. 過酸化脂質量の測定

薬剤処理後 3 日目の植物の根部を採取し、液体窒素を用いて磨砕した。これに 0.1% TCA を加えホモジナイズ後、10,000 \times g \cdot 4°C で 20 分間遠心し、上清 500 μ l に 0.5% TBA を含む 20% TCA 1 ml を加え、98°C で 30 分間静置した。その後氷上で 5 分間静置し、再度 10,000 \times g \cdot 4°C で 5 分間遠心した後、532 nm と 600 nm の吸光度から TBARS 量を算出した。

結果・考察

レタスとキュウリの根部においては 0.1 mM 以上の L-DOPA 処理で強い生育抑制を確認した。タイヌビエでは、0.1 mM 濃度以下では根部での生育抑制作用は確認されなかった。しかし 0.5 mM 以上では生育抑制が確認された。

細胞死率の測定では、レタスで死細胞が 8~10 倍に増加し、キュウリでは約 5~7 倍に増加した。一方タイヌビエの細胞死の増加率は 1.5 倍程度に止まり、レタスやキュウリと比べると非常に低かった。

DHE 染色では、レタス根部において 0.1 mM 濃度以上の L-DOPA 処理で $O_2^{\cdot -}$ による強い蛍光が確認された。一方、キュウリとタイヌビエでは明らかな発光は確認できなかった。

過酸化脂質の蓄積量はレタス根部では L-DOPA 処理により濃度依存的に蓄積量が増加した。しかし、キュウリとタイヌビエにおいては L-DOPA 処理濃度の増加につれて過酸化脂質の蓄積量は減少した。

レタスもキュウリも L-DOPA によって根部における強い生育抑制と細胞死の増加が引き起こされているが、キュウリでは酸化障害の指標である過酸化脂質の蓄積量が減少している。これはキュウリにおいては酸化障害以外の要因で生育抑制が引き起こされることを示唆する。

今後の展望・予定

キュウリとタイヌビエで酸化障害が起らないメカニズムを検討するために H_2O_2 含量の測定と抗酸化酵素アッセイを行う予定である。

キュウリの生育抑制機構を解明するにあたり、キノントタンパク質の蓄積量とメラニン代謝との関連について検討を行う予定である。

カロテノイド生合成系に作用する除草剤の標的酵素の推定

荘 苑 (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

除草剤には、作物の安定生産、農業の能率化、省力化などの多くの利点がある。除草剤は、作物を安定して生産するために、雑草の防除を行い、作物を保護している。除草剤は作物の生産性向上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ことによって、その薬剤に対して抵抗性を持ち、薬剤が効かなくなり、枯れなくなる抵抗性雑草が出現する事がある。また、除草剤には雑草だけでなく作物も同時に枯らしてしまう非選択性の除草剤があり、また、作物には影響を与えず雑草だけを枯らす選択性の除草剤がある。このような面から、除草剤の研究、新規の除草剤の開発はこの先も不可欠であると考えられる。

除草剤 A-002 は新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、感受性であるレタスを用いて生物試験を行い、作用点を検討中の A-002 に対しどの除草剤と似た応答を示すか明らかにし、標的となる可能性のある酵素の産物、ホモゲンチジン酸(HGA)を用いた添加回復試験を行うことにより標的酵素を推定することを目的とした。

材料

供試植物として以下の植物を用いた。

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

供試薬剤として以下の薬剤を用いた。

DTP(Destosyl Pyrazolate)

ノルフルラゾン(Norflurazon)

A-002

ホモゲンチジン酸(HGA)

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 A-002 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 時間浸漬しカロテノイドとクロロフィル含量を分光光度計で測定した。同じように、デストシルピラゾレート(DTP)、ノルフルラゾン(Norflurazon)でもレタスを用いて生物試験を行った。

結果・考察

生物試験において、レタスでは A-002 は 20 μ M 以上でカロテノイドとクロロフィル含量、20 μ M 以上で根長と新鮮重も減少させた。レタスの可視症状においては、子葉が薬剤処理の濃度依存的に白化症状を引き起こしていた DTP でも同じように 20 μ M 以上でカロテノイドとクロロフィル含量、20 μ M 以上で根長と新鮮重も減少させた。レタスの可視症状においては、子葉が薬剤処理の濃度依存的に白化症状を引き起こしていた。

添加回復試験では、ホモゲンチジン酸(HGA)の添加によりクロロフィルの含有量とカロテノイドの含有量は回復が見られ、100 μ M 濃度のホモゲンチジン酸(HGA)で処理したときに最も回復が大きく見られた。

今後の予定

今後の予定は、デストシルピラゾレート(DTP)によるレタス生育阻害の生物試験、PDS 阻害剤であるノルフルラゾンによるレタス生育阻害の生物試験、HGA を用いた PDS 阻害剤であるノルフルラゾンによる生育阻害の添加回復試験を行い、4-HPPD 阻害剤の DTP、A-002 による結果との比較を行う。

植物成育促進活性を有する植物由来の揮発性物質の探索と β -カリオフィレンによる根部の成育促進

効果の検討

大西 薫 (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

植物同士の相互作用の中にアレロパシーが存在する。これは植物が産生する化学物質が他の植物の成育に影響を与えるというものであり、現象そのものは非常に古くから知られていたが、実際にどのような物質が作用し、影響を与えているかについて研究され始めたのはここ 40 年のことである。

アレロパシーを起こす化学物質をアレロケミカルと呼び、アレロケミカルが植物体から放出される経路としては、根からの滲出、葉やリターからの溶脱、葉などからの揮散の主に 3 経路が知られているが、揮散によって放出される物質に関してはあまり着目されていなかったため、その研究例も比較的少ない。また、アレロパシーの作用の研究は成育阻害作用に関するものに集中しており、成育促進作用に関しては作物栽培における混植や、植物残さなどの梳き込みによる効果の検証が主立っており、成育促進作用を示すアレロケミカル分子の実体やその作用機構などについてはまだあまり調べられていない。

そこで、本研究では植物への成育促進作用を示す植物由来の揮発性物質の探索とその物質の作用機構を明らかにすることを目的とした。また、揮発性物質は香りの強い植物に多く含まれていると考えられるため、主に強い芳香を持つスパイスやハーブなどを対象とした。

材料

検定植物：

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes)トウモロコシ (*Zea mays* L.)

供試植物と使用部位：

オオバナサルズベリの葉部 (バナバ)、ダイコンの葉部 (ヒバ)、ニワトコの葉部、アカザの葉部 (レイヨウ)、ラフマの葉部、レイボスの葉部 (レイボステイ)、ニクズクの仁 (ナツメグ)、ハナハッカの葉部および花穂 (オレガノ)、オランダゼリの葉部 (パセリ)、コロハの種子 (フェネグリーク)、ケイヒの樹皮 (シナモン)、チョウジの花蕾 (クローブ)、コショウの果実 (ブラックペッパー)

方法

1. 植物への成育促進効果を示す植物種のスクリーニング

供試植物を磨砕し、一定量 (1gDW, 0.5gDW, 0.3gDW) を 6 穴マルチディッシュの一つの穴に添加した。残りの 5 つの穴にはレタスの発芽種子を 5 粒播種し、セロハンテープで密封した。25°C

暗条件下で 3 日間成育させ、幼根長・胚軸長を測定し、コントロールと比較、成長率を算出した。

2. 成育促進作用を示す揮発性物質の同定

1. と同様に、成育促進効果の見られた対象植物を破砕し、5 ml バイアル瓶中で密封し、25°C 暗条件下で 24 時間静置した。バイアル瓶のヘッドスペースからガスタイトシリンジを用いて気体を採取し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) で分析、揮発性物質を同定した。

3. 同定された物質の標準物質を用いた植物成育促進活性試験

30 ml バイアル瓶にレタスの発芽種子 5 粒を添加し、任意の濃度に希釈した揮発性物質を封入した。その後、25°C 暗条件下で 3 日間生育させ、幼根長・胚軸長を測定した。コントロールと比較して成長率を算出した。

4. β -カリオフィレンによる植物体根部成育促進効果の検討

50 mL バイアル瓶にトウモロコシの発芽種子を 3 粒播種し、任意の濃度に希釈した β -カリオフィレンを封入した。25°C 暗条件下で 3 日間生育させ、幼根長・胚軸長・幼根の新鮮重を測定した。

結果・考察

13 種の植物種のうち、ハナハッカとチョウジの 2 種で試料からの距離や添加量に依存したレタス根部への成育促進効果が見られた。

上記 2 種の植物から発生している揮発性物質を GC-MS 分析したところ、P-シメン、 γ -テルピネン、チモール、酢酸エチル、 β -カリオフィレンの 5 つの揮発性物質を同定した。これらの揮発性物質のうち、ハナハッカとチョウジの 2 種に共通して見られたのは β -カリオフィレンであった。

また、標準物質を用いた試験において、 β -カリオフィレンは特定の濃度域でレタスとトウモロコシの根部に成育促進作用を示した。さらにトウモロコシでは β -カリオフィレン処理後に胚軸が太く短くなり、側根数も増大する傾向が認められた。これらのことから β -カリオフィレンによる根部への成長促進作用は、植物ホルモンとの関連性も示唆された。

今後の予定

今後は、 β -カリオフィレンの根部成育促進作用と植物ホルモンとの関連について、更に検討を行う予定である。

筑波実験植物園内における内生性 *Phyllosticta* 属菌の生息調査

— *Phyllosticta capitalensis* の宿主嗜好性を探る —

三井 梢 (筑波大学 生物学類)

指導教員：岡根 泉 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

Phyllosticta 属菌は子囊菌門クローボタケ綱ボトリオスフェリア目フィロステクタ科に属し、多くは植物病原菌として知られ、葉や果実に斑点や褐斑を生じさせる。その一方で、*P. capitalensis* などのいくつかの種は内生菌として分離される。

武田薬品京都薬用植物園で行われた 42 科 69 属 94 種の植物についての内生性 *Phyllosticta* 属菌の調査では、38 科 54 属 66 種 1 変種から 10 種の *Phyllosticta* 属菌が分離された(Okane et al., 2003)。そのうち 36 科 43 属 53 種の植物から *P. capitalensis* が分離され、特に本種が多様な植物に優占的に内生していることが明らかにされている。しかし、内生性 *Phyllosticta* 属菌の種構成や宿主植物などに関して、異なる場所や地域間での異同や、宿主嗜好性を解明するための研究はほとんど行なわれていない。

そこで本研究では、異なる場所での内生性 *Phyllosticta* 属菌の種構成と宿主植物の異同および共通性を明らかにすると同時に、宿主嗜好性について検討するため、京都で調査された同じ植物を対象として、国立科学博物館筑波実験植物園における内生性 *Phyllosticta* 属菌の種構成とそれらの宿主植物および分離頻度を調査した。

材料と方法

1. *Phyllosticta* 属菌の分離

供試植物は筑波実験植物園に生育する 38 科 62 属 75 種を対象とした。これらの植物は武田薬品京都薬用植物園における供試植物と共通するものである。採集した葉を有効塩素濃度 1%NaClO を用いた表面殺菌法で処理し、約 1×1 cm の葉片(60 片/10 葉植物)に切断し、1/2 濃度麦芽エキス寒天平板培地上に静置し培養した。そして、*Phyllosticta* 属の形態的特徴を持つ菌を分離した。また、同時に分離頻度を求めた。

2. *Phyllosticta* 属菌の同定(分子系統学的解析と形態観察)

分離した *Phyllosticta* 属菌をコロニー形態で類別し、それぞれから代表菌株を選抜し解析に使用した。rDNA の 5.8S を含む ITS 領域の塩基配列を決定し、分子系統学的解析に用いた。形態観察は、それぞれの分離菌株で形成された子嚢、子嚢胞子、分生子を光学顕微鏡下で観察し測定した。

結果 (表参照)

供試した 75 種の植物のうち 26 科 45 属 50 種から *Phyllosticta* 属菌が分離された。種同定の結果、9 種が認識された。*Phyllosticta capitalensis*(図)は 45 種の植物から分離され、他の *Phyllosticta* 属菌はそれぞれ 1 種の植物からのみ分離された。また、*P. capitalensis* は他の *Phyllosticta* 属菌が内生していたオリーブとシャシャンボからも分離され、重複感染していた。

Phyllosticta capitalensis の分離頻度は植物種によって異なり、1.7~78.3%とばらつきがあった。ヒイラギとイヌマキから分離された *P. hubeiensis* と *P. podocarpicola* はそれぞれ 86.7%、91.7% と、他の *Phyllosticta* 属菌(分離頻度 3.3~28.3%)よりも高頻度で分離された。

表 筑波実験植物園において確認された *Phyllosticta* 属菌と分離頻度および京都での調査結果との比較

菌名	宿主植物(供試植物中の割合)	分離頻度(%)*	京都調査と共通する植物種数(京都での全宿主植物数)
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	ナンテン、ブナ、ヒサカキなど全 45種(60%)	1.7-78.3	30種(40種)
<i>Phyllosticta hubeiensis</i>	ヒイラギ(1.3%)	86.7	未検出
<i>Phyllosticta podocarpicola</i>	イヌマキ(1.3%)	91.7	未検出
<i>Phyllosticta gardenicola</i>	クチナシ(1.3%)	15.0	未検出
<i>Phyllosticta</i> sp.1	オリーブ(1.3%)	5.0	未検出
<i>Phyllosticta</i> sp.2	ツガ(1.3%)	11.7	未検出
<i>Phyllosticta</i> sp.3	ニシキギ(1.3%)	28.3	未検出
<i>Phyllosticta</i> sp.4	シャシャンボ(1.3%)	3.3	未検出
計	50種	1.7-91.7	30種(47種)

*分離頻度(%)=菌が分離された葉片数/全供試葉片数(60 片)×100

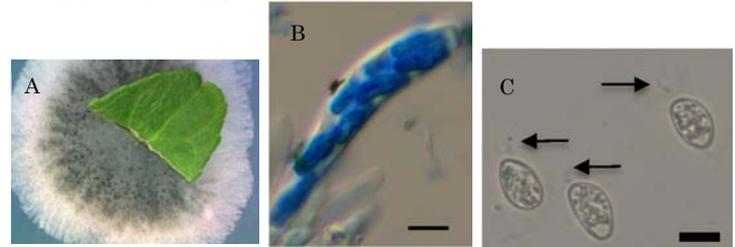


図 筑波実験植物園で優占的に分離された *P. capitalensis* の形態 A: 葉片から伸長したコロニー; B: 子嚢胞子を 8 個含んだ子嚢(ラクトフェノールコットンブルー染色); C: 頂端部に付属糸(矢印)を有する分生子。スケール=10 μm

考察

筑波実験植物園では 9 種の *Phyllosticta* 属菌が分離されたが、京都薬用植物園において同じ対象植物から分離された 8 種と比較したところ、共通種は *P. capitalensis* のみであることが ITS 領域の比較からも明らかとなった。異なる場所で種構成の違いがある一方で、*P. capitalensis* は他の種に比べ、遍在的に分布する種であることが示唆された。また、筑波実験植物園のイヌマキ、ツガ、ニシキギからはそれぞれ *P. podocarpicola*、*Phyllosticta* sp.2、*Phyllosticta* sp.3 のみが分離されたが、京都薬用植物園の同植物からは *P. capitalensis* が分離されている。各種の分布と宿主特異性についてはさらに検討が必要であると思われる。

筑波実験植物園において *P. capitalensis* は 45 種の植物に定着していたが、他の *Phyllosticta* 属菌はいずれも 1 種の植物にのみ内生していた。種構成の違いはあるがこの傾向は京都と類似しており、*P. capitalensis* は同所的に生息する他の *Phyllosticta* 属菌よりも多くの植物に優占的に生息しうることが示唆された。また、両植物園で共通する 30 種の植物から *P. capitalensis* が分離された一方で、ヒノキ科 3 種を含む 16 種の植物からは *P. capitalensis* が分離されなかった。このことから、様々な植物から分離される *P. capitalensis* には宿主嗜好性があることが示唆された。

今後は、さらに本属菌の種構成や分布の違い、宿主嗜好性を明らかにするために異なる場所・地域での調査が必要である。

糖尿病の病態形成におけるミトコンドリアゲノム変異の関与

高橋宗一郎 (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)

<背景>

ミトコンドリアは生命活動に必要なエネルギーである ATP の大部分を合成する細胞小器官である。ミトコンドリアは外膜と内膜の二重の生体膜によって完全に閉ざされており、内膜には ATP 産生を行なうための呼吸酵素複合体 I~V が存在する。また、この内膜の内側 (マトリクス) には核とは異なる独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞あたり数百~数千コピー含まれている。哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体を構成する構造遺伝子と、それらの翻訳に必要な rRNA および tRNA がコードされている。そのため、病原性突然変異が生じた mtDNA が蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病と総称される多様な疾患が惹起されることが知られている。

最近では、最も身近な生活習慣病である糖尿病の発症にも、変異型 mtDNA 分子やミトコンドリア呼吸機能異常が関与している可能性が示唆されるに至っている。しかし、病原性突然変異型 mtDNA 分子種を導入したマウス群や、ミトコンドリア機能低下を誘導したマウス群では、糖尿病 (高血糖) ではなく、低血糖を呈することが報告されている。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化の際に、副産物として活性酸素種 (ROS) を産生することが知られている。近年では、過剰に産生された ROS が糖尿病病態におけるインスリン抵抗性の亢進や、糖尿病合併症の発症などに関与している可能性が広く報告されている。このことを考慮すると変異型 mtDNA 分子種の差異、特に、それに伴う ROS 産生の差異が糖尿病の発症/病態形成に重要な役割を有していることが想定できる。

これまでに所属研究室は変異型 mtDNA 導入マウス (Mito-mice) 群を作製してきた。Mito-mouseND6 は呼吸酵素複合体 I のサブユニットである *ND6* 遺伝子に突然変異を有しており、ROS を漏出させる病原性を有している。一方、mito-mouseCOI は呼吸酵素複合体 IV のサブユニットである *COI* 遺伝子に突然変異を有しており、ROS 漏出の病原性は有していない。どちらのマウスも変異型 mtDNA によるミトコンドリア呼吸機能低下を共通して示すが、mito-mouseND6 でのみ老化に伴った ROS 過剰産生による B 細胞リンパ腫と高血糖が見られる。Mito-mice の核は B6J 系統であり、この核背景の下では ROS 漏出型 mtDNA の病原性は高血糖の誘導に留まったものの、予め糖尿病を発症する核背景では、病態形成の促進や重症度に影響を及ぼす可能性がある。

そこで、本研究では変異型 mtDNA 分子種の差異、特に ROS の過剰産生の有無が糖尿病の病態形成に関与するか否かを検証することを目的とし、変異型 mtDNA を 2 型糖尿病モデルマウス系統に導入することで、糖尿病を発症する核ゲノムと変異型 mtDNA を共存させたマウスを作製し、解析を行なうこととした。

<方法>

変異型 mtDNA を 2 型糖尿病モデルマウス系統に導入したマウスの作製には、以下の①~③の 3 系統のマウスを用いた。

①Mito-miceND6

呼吸酵素複合体 I の *ND6* 遺伝子の 13,997 塩基目のグアニンがアデニンに置換された点突然変異を有した mtDNA を有する。

②Mito-miceCOI

呼吸酵素複合体 IV の *COI* 遺伝子の 6,589 番目の塩基がチミンからシトシンに置換された点突然変異を有した mtDNA を有する。

③db/db マウス (BKS.Cg+ *Lepr^{db/+}* *Lepr^{db/Jcl}**)

核ゲノムのレプチン受容体遺伝子に変異を有した 2 型糖尿病モデルマウスである。

Mito-miceND6 および mito-miceCOI の雌マウス (mtDNA は母性遺伝する) と db/+ の雄マウス (db/db は不妊) を戻し交配することで作製した。それらを db/db mtND6、db/db COI、また野生型 mtDNA を有するマウスを db/db mtWT と表記する。

<結果>

作製した db/db mtND6、db/db COI、db/db mtWT を用い、糖尿病に関する病態解析として、体重や血糖値など血液成分の測定を行なっている。

<今後の予定>

変異型 mtDNA 分子種の病原性を確認するため、ROS の産生量および呼吸酵素複合体の活性を測定する予定である。

ミトコンドリア分裂の生物学的意義：ミトコンドリアゲノム変異の病原性制御

田村真 (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)

背景・目的

細胞小器官の1つであるミトコンドリアは、核とは異なる独自のDNA (ミトコンドリアDNA: mtDNA) を有しており、酸化的リン酸化によって生命活動に必要なエネルギーの大部分を生産している。mtDNA分子は、環状二本鎖の構造をしており、細胞あたりに数百~数千コピー含有されている。哺乳類のmtDNAにはミトコンドリア内の呼吸酵素複合体を構成する13種のタンパク質の構造遺伝子と、それらの翻訳に必要な2種のrRNA、22種のtRNAがコードされている。

細胞内の個々のミトコンドリアは分裂と融合を介して内容物(mtDNAや遺伝子産物)の交換を行っており、この分裂と融合のバランスによってミトコンドリアの形態と機能が維持されている(ミトコンドリア間相互作用)。所属研究室では、仮にmtDNAに病原性の突然変異が生じ、そのような分子種が蓄積したとしても、その蓄積が優位にならない限り、「ミトコンドリア間相互作用」の存在によって野生型mtDNA由来の遺伝子産物が突然変異型mtDNAの病原性を相補し、ミトコンドリアの呼吸機能は正常に維持されることを実験的に立証している。

所属研究室では、病原性欠失突然変異型mtDNA (Δ mtDNA) と野生型mtDNAを含有するミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウス(mito-mice Δ)の作製に成功している。このmito-mice Δ の病態発症も前述のミトコンドリア間相互作用によって制御され、細胞や組織に Δ mtDNAが含有されていても、それが優位に蓄積されない限り、病態は誘導されない。ごく最近、mito-mice Δ の組織ではミトコンドリア分裂が Δ mtDNAの蓄積とともに亢進する可能性が見出された。この現象の生物学意義を検証するため、mito-mice Δ の肝臓・血球組織特異的に核DNAにコードされたミトコンドリア分裂因子Drp1をノックアウトさせたマウスDrp1KO:mito-mice Δ を作出し、病態解析を行ったところ、Drp1を破壊した状況下では、 Δ mtDNAの含有率が低い場合でも、病原性が増強され、病態発症に至ることが分かった。これらの結果は、ミトコンドリアの分裂が Δ mtDNAの病原性制御、ならびにミトコンドリア関連疾患の病態制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。

このような所属研究室の先行研究をふまえ、本研究ではミトコンドリア分裂による変異型mtDNA分子種の病原性制御をさらに検証するため、活性酸素種(ROS)を漏出させる変異型mtDNAを導入したモデルマウス(mito-mouseND6)を活用した。mito-mouseND6は、ミトコンドリア呼吸酵素複合体Iを構成するサブユニット遺伝子(ND6)に病原性のG13997A点突然変異を有するmtDNA(mtDNA-G13997A)のみを含有し(ホモプラスミー)、老化とともに高血糖とリンパ腫が頻発する。本研究では、臓器特異的にDrp1を破壊したmito-mouseND6を作出し、1) mtDNA-G13997A点突然変異の病原性増強として更なるROSの漏出が誘導されるのか、否か、2) 高血糖やリンパ腫が早期に発症するのか、さらには新たな病態が誘導されるか、否かを検証することを目的

とした。

方法

mtDNA-G13997Aのみを含有するmito-mouseND6とCre-loxP系により肝臓と血球特異的にミトコンドリア分裂因子Drp1をノックアウトさせることのできるマウス(Drp1^{lox/lox};Mx1-Cre)を交配させた。得られたマウスは、mtDNA-G13997Aのみを含有し、さらに薬剤投与によって後天的にDrp1を肝臓と血球特異的に破壊することができる。本実験では、得られたマウスのうち雄のみを、薬剤投与によってDrp1を破壊したマウス群(Drp1KO:mito-mouseND6)と薬剤投与しないマウス群(Drp1WT:mito-mouseND6)に分類してその比較解析を行った。

結果

Mito-mouseND6(雌3個体)とDrp1^{lox/lox};Mx1-Creマウス(雄1個体)を交配させ、現在までに23個体(雄10個体、雌13個体)のF₁を得た。本実験では、Cre-loxP系がホモ接合体のマウスを利用する必要があるため(過去に作出されたDrp1KO:mito-mice Δ はホモ接合体であった)、得られたF₁個体をさらに交配し、150個体(雄80個体、雌70個体)のF₂を得た。これらのうち31個体はCre-loxP系がホモ接合体であり、ヘテロ接合体は89個体であった。得られたCre-loxP系のホモ接合体のうち、雄20個体(10個体は薬剤投与によるDrp1KO:mito-mouseND6、残りの10個体は薬剤非投与によるDrp1WT:mito-mouseND6)を本実験に用いることとした。ホモ接合体の雌(11個体)は薬剤非投与によるDrp1WT:mito-mouseND6と交配させることで、ホモ接合体である個体の維持、増殖に用いることとした。

現在、生後4週齢で薬剤投与したDrp1KO:mito-mouseND6と非投与のDrp1WT:mito-mouseND6の比較解析(体重と血液生化学)を実施している。生後16週(薬剤投与から11週)の時点で、両群に大きな差異は認められていない。今後、両群の比較解析を継続するとともに、肝臓や血球におけるROSの漏出を比較解析する予定である。

RNA 結合タンパク質 HNRNPK の相互作用因子の探索

藤井 佑衣 (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】

HNRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) は、核酸代謝や mRNA の選択的スプライシング、翻訳制御において重要な役割を持つタンパク質ファミリーである。HNRNPs の一種である HNRNPK (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) は転写・RNA スプライシング・翻訳などといったように、遺伝子発現の様々なステップにおいて機能している。また最近、当研究室の長沼らによって HNRNPK の新機能として RNA の選択的 3'末端プロセシングの制御が見出された¹⁾。HNRNPK の構造的な特徴としては、典型的な RNA 結合モチーフである KH モチーフを 3 つ持つということが知られ、そのうちの 1 つの KH モチーフは RNA のみならず DNA にも結合するということも解明されている。

さらに興味深いことに、HNRNPK はがん細胞において発現の亢進が観察されており、発現亢進した HNRNPK が遺伝子発現の様々なステップを異常調節することでがんの悪性化や転移を促進することが示唆されている²⁾。このがん細胞における HNRNPK の発現亢進は、細胞内の HNRNPK の発現制御機構の破綻によって誘発されると考えられる。

以上のように HNRNPK の局在や機能が明らかにされてきたにもかかわらず、細胞内における HNRNPK の制御機構については未だ不明である。従って、細胞内における HNRNPK の制御機構の解明を目指し、HNRNPK の制御に関わる相互作用タンパク質の探索を酵母ツーハイブリッド法により試みた。

【方法】

・酵母ツーハイブリッド法による HNRNPK と相互作用するタンパク質の探索

始めに、HNRNPK cDNA を PCR で増幅し、bait プラスミドとなる pGBKT7 に挿入することで酵母ツーハイブリッド法に必要な bait プラスミドを作製した。

その後、pGBKT7-HNRNPK プラスミドの塩基配列を DNA シークエンサーで解析し、bait プラスミドが正しく作製されていることを確認した。

この pGBKT7-HNRNPK(Bait)プラスミドを空の pGADT7 (Prey)プラスミドとともに酵母 PJ69-4A に形質転換し、HNRNPK のみでレポーター発現が起きないか、「偽陽性」の有無をチェックした。またその際、予め相互作用することが判明している pGBKT7-p53(pre)と pGADT7-T(bait)を形質転換してポジティブコントロールとした。Prey ベクターと Bait ベクターが同時に発現し、それぞれ発現するタンパク質が相互作用した場合、レポーター遺伝子(今回はアデニン合成酵素)の発現がおこるため、アデニン欠損培地で選択可能となる。

HNRNPK のみによる偽陽性がないことを確認した後、ヒト胎児脳由来の cDNA ライブラリーを pGBKT7-HNRNPK が導

入された PJ69-4A 酵母に形質転換することで酵母ツーハイブリッド法を行い、HNRNPK と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。

【結果及び展望】

現在、酵母ツーハイブリッド法を用いてスクリーニングを行っており、今後 HNRNPK と相互作用する因子を取得する予定である。しかし、これらの因子の中には、HNRNPK 非依存性に Prey のみでレポーターを発現する偽陽性が含まれている可能性があるため、再現実験 (Bait+Prey でポジティブか、Bait 空ベクター+Prey でネガティブか) を通し確認する予定である。そして偽陽性でないと確認できたものをシークエンシ、相互作用因子を同定する予定である。

今後は、HNRNPK との結合が確認されたタンパク質のうち、HNRNPK をユビキチン化または脱ユビキチン化するタンパク質を特定する。そしてそのユビキチン化の生理学的意義について明らかにする予定である。HNRNPK の制御機構を明らかにすることによって、mRNA が成熟 mRNA になるまでの過程を解明することが期待され、また細胞のがん化のメカニズムの一端が解明されることによって将来的にはがん特効薬の開発につながる可能性が期待される。

【参考文献】

- 1) Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T. "Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles." *EMBO J.* 2012, 31, 4020-34.
- 2) Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, Jackson SP. "hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage." *Cell* 2005, 123, 1065-78.

乳酸菌殺菌菌体による抗老化関連生理作用の解析

菊地 啓太 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中村 幸治 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

乳酸菌は、発酵食品の製造など、古くから人々に親しまれており、善玉菌に分類され、ヒトに対して様々な有用な作用があることが知られている。こうした乳酸菌を積極的に摂取し、腸内に生息する善玉菌の割合を増やすことが健康増進につながるとされている。

人体に有益な乳酸菌を摂取することにより、整腸作用・免疫系の活性化、引いては、老化抑制・寿命延伸につながるという報告があるが、その真相は明らかになっていない。これまで、腸内環境を整えるという観点から、発酵食品等を積極的に摂取することにより、乳酸菌などの善玉菌を生きたまま取り入れ、腸まで届けるという方法が取られており、また乳酸菌などを多く含む健康食品が開発されている。しかし近年、死菌を与えても生菌と同等の効果が認められる場合があることが分かかってきており、生菌製品の中に入っている死菌が様々な生理効果に寄与しているのではないかと指摘もある。事実、ほぼ生きた菌のみを飲ませた時より、死んだ菌が多く混ざったものを飲ませた方が、整腸効果が高かったという研究結果が報告されている。

本研究は、殺菌ビフィズス菌を用いて、マウスにおける抗老化関連生理作用の解析を目的とするものである。

【方法】

実験 1 : ストレス耐性実験

8 週齢の雄マウス (C57BL/6J) を 4 匹ずつ無作為に 3 つのグループに分け、1 つを対照群、2 つを実験群とした。実験群には 30 mg/kg BW、60 mg/kg BW の 2 つの濃度を設定し、dDW に混ぜた死滅したビフィズス菌を経口投与により与えた。対照群には dDW のみを同じく経口投与した。餌は CE-2 (日本クレア)、水は水道水を与え、自由摂食とした。実験期間中、毎日体重を計測し、週に一度摂食量を測定した。3 週間の経口投与の後、強制水泳試験を行った。実験後マウスを解剖し、肝臓・大腸を摘出、血液を採取した。血液から血清を分離し、血糖値・コレステロール量・トリグリセリド量を比較した。

実験 2 : 高脂肪食飼育下における死滅ビフィズス菌の生理効果の解析

グループ分けと死滅ビフィズス菌の濃度設定及び投与方法は実験 1 と同様に行った。餌は高脂肪食の Quick Fat (日本クレア)、水は水道水を与え、自由摂食とした。実験期間中、毎日体重を計測し、週に一度摂食量を測定した。3 ヶ月間経口投与した後、マウスを解剖し、肝臓・大腸を摘出、血液を採取した。血液から血清を分離し、血糖値・コレステロール量・トリグリセリド量を比較した。

【結果】

実験 1

①体重増加

対照群に対して、死滅ビフィズス菌を 30 mg/kg BW で与えたグループは体重が約 3.2%増加し、60 mg/kg BW で与えたグループは体重が 1.8%減少した。

②摂食量

実験期間全体を通して、60 mg/kg BW 群は僅かに摂食量が少ないものの、グループ間での摂食量の違いは 1 匹当たり約 1.2 g であった。

③ストレス耐性

30 mg/kg BW 群 > 対照群 > 60 mg/kg BW 群の順に絶望状態が長くなる傾向を示した。無動時間は、対照群に対し、30 mg/kg BW 群は 1.1 倍、60 mg/kg BW 群は 0.84 倍であった。

実験 2

①体重増加

対照群に対して、死滅ビフィズス菌を投与したグループでは体重増加促進傾向が見られ、30 mg/kg BW 投与群は 2.3%、60 mg/kg BW 投与群は 4.6%の体重が増加した。

②摂食量

対照群、および 30 mg/kg BW 群に対し、60 mg/kg BW 群は摂食量が多く、最も摂食量が少なかった 30 mg/kg BW 群に比べ、平均して 1 匹当たり約 7.5 g 多かった。

【考察と課題】

結果から、死滅ビフィズス菌の投与により体重増加に何らかの生理作用があることが推察される。特筆すべきは、高脂肪食飼育下における 60 mg/kg BW ビフィズス菌投与群の摂食量の顕著な差である。一般に、高脂肪食を与えた場合、摂食量が落ちることが知られている。ところが、実験 2 の結果で見られたように、このグループでは他のグループのように摂食量が下がることはなく、通常食の水準を維持していた。このことから、死滅ビフィズス菌には食欲減衰を防ぐ効果があると思われる。今後は摘出した大腸より腸内フローラを調べ、腸内環境に変化があったのか、また他の消化器官への効果も視野に入れ解析する。また、高脂肪食を与えたことによる食欲減衰だけでなく、加齢による食欲減衰に対しても防止効果があるのかどうか解析していく。

牛パラインフルエンザウイルス 3 型の増殖機構の解析

高田 麻里奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 竹内 薫 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

呼吸器ウイルスには、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS ウイルスなどがある。これらのウイルスは、鼻腔、咽頭、喉頭を含む上気道、また気管支や肺などの下気道といった呼吸器にのみ感染する。しかし、これら呼吸器ウイルスの感染機構、病原性発現機構には不明な点が多い。呼吸器にのみ感染し、他の組織には感染しないメカニズムは依然として不明である。そして、インフルエンザウイルス除けば、ヒト用のワクチンも未だ開発されていないのが現状である。

パラインフルエンザウイルス (Parainfluenzavirus: PIV) は、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス亜科に属し、非分節のマイナス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。PIV は、脂質二重層 (エンベロープ) に囲まれた粒子で、エンベロープにはウイルス表面タンパク質がスパイク状に突き出ている。この糖タンパク質は HN (赤血球凝集素ノイラミニダーゼ) と F (融合) タンパク質である。HN タンパク質は宿主細胞上のレセプターへの結合を担い、F タンパク質は細胞膜との融合を担っている。つまり、これらのタンパク質が宿主細胞への感染や出芽に重要な働きをし、また、PIV が全身では増殖せず、呼吸器の細胞でのみ増殖する臓器特異性に関っていると想定される。

本研究では、増殖力が強く、取り扱いが容易な牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (Bovine PIV type3: BPIV3) をモデルとして用い、当研究室で開発された BPIV3 の遺伝子操作系を用いて F タンパク質欠損型ウイルスを作製し、BPIV3 の細胞への感染と出芽における F タンパク質の機能を解析することを目的とした。

【材料と方法】

(1) F 遺伝子欠損 EGFP 発現 BPIV3 の作製

T7 プロモーターの下流に F 遺伝子欠損 EGFP (Enhanced green fluorescent protein) 発現 BPIV3 完全長ゲノムを持つプラスミド (pBPIV3 Δ F-EGFP) は、EGFP 発現 BPIV3 発現完全長ゲノムプラスミド (pBPIV3-EGFP) (Ohkura et al. Virology, 2015, in press) を鋳型にして F 遺伝子を除いた断片を PCR で合成し、ライゲーションで連結し、大腸菌 (Stbl2) を形質転換することによって構築した。

F 遺伝子欠損 EGFP 発現 BPIV3 (rBPIV3 Δ F-EGFP) は、T7 RNA ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス株 (MVA-T7) を感染させた HeLa 細胞に pBPIV3 Δ F-EGFP、T7 プロモーターの下流に N, P, L タンパク質の遺伝子を持つ N, P, L タンパク質発現プラスミド、欠失した F タンパク質を供給するための F タンパク質発現プラスミド (pCAGGS-F) を同時にトランスフェクションし、pCAGGS-F をトランスフェクションして F タンパク質を発現させた Vero 細胞と共培養しながら継代することによって回収した。EGFP 発現 BPIV3 (rBPIV3-EGFP) は当研究室の大倉らによって調製されたものを用いた。

得られたウイルスは、MDBK 細胞を用いて TCID₅₀ (Tissue culture infectious dose) を行い、力価を決定した。

(2) 走査型電子顕微鏡での感染細胞の観察

感染細胞でのウイルスの出芽の様子を観察するため、rBPIV3-EGFP、または rBPIV3 Δ F-EGFP を感染させた Vero 細胞と非感染 Vero 細胞を、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。まず、ウイルス感染後二日目の細胞を、2% グルタルアルデヒドおよび 0.1 M リン酸バッファーで 4°C にて 30 分以上置いて前固定した。次に、0.1 M リン酸バッファーで 5 回洗浄し、1% OsO₄ で後固定した。その後再び、洗浄を 5 回行い、エタノール脱水した試料を t-ブチルアルコール凍結乾燥法を用いて凍結乾燥させた。翌日、金属膜コーティングを行い、走査型電子顕微鏡 (日本電子 JSM-6320F) にて観察を行った。

【結果】

(1) HeLa 細胞と Vero 細胞と共培養し始めて二回目の継代後 4 日目で、およそ 50% の細胞に rBPIV3 Δ F-EGFP が感染していることが EGFP の蛍光により確認できた。また、感染後 4 日目のウイルスを上清から回収し、MDBK 細胞に感染させ、TCID₅₀ 法により力価を決定したところ、rBPIV3 Δ F-EGFP のウイルス力価は 2.2×10^7 TCID₅₀/ml に達したことがわかった。また、予想されるように MDBK 細胞での rBPIV3 Δ F-EGFP の感染は広がらなかった。

(2) rBPIV3 Δ F-EGFP も、非欠損型と同様に細胞から出芽していることがわかった。また、その形状は、どちらも球状ではなくフィラメント状になっていることがわかった。

【考察】

F 遺伝子欠損ウイルスの MDBK 細胞への感染は広がらなかったことから、二次感染は起こらなかったと考えられる。さらに、走査型電子顕微鏡での観察ではフィラメント状の粒子が出芽していることが確認できたことから、F タンパク質は感染には重要であるが出芽には必須ではないと考えられる。

また出芽しているウイルス粒子の形状がフィラメント状であったことは、現在報告されているパラミクソウイルス粒子の形状が球状であることから、興味深い結果である。出芽時にはフィラメント状であり、その後粒子状に成熟するのかもしれない。

応用面としては、この F 遺伝子欠損ウイルスは、増殖制限型のウイルスであり、いわゆる半生ワクチンとしての活用が見込まれる。一度感染することができるが、二次感染を起こすことができず、ワクチンとして安全性が高いと想定される。また、一度は細胞に感染し、細胞内でゲノムの複製、ウイルスタンパク質の発現が起こるので、液性免疫だけでなく細胞性免疫の誘導も期待されるため、有効性も高いのではないかと考えられる。

牛パラインフルエンザウイルス 3 型を用いたウイルスベクターの開発

松浦 遼介 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 竹内 薫 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (BPIV3) はエンペロペを有するマイナス一本鎖 RNA ウイルスであり、パラミクソウイルス科レスピロウイルス属に属する。BPIV3 はヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (HPIV3) の近縁種であることからヒト用ワクチンのプラットフォームとして注目され、多くのヒト用組換えウイルスの候補株が作製されている。

BPIV3 はウイルスベクターとして望ましい特徴をいくつか有している。一つは宿主ゲノムにインテグレートしないことである。これによって、ベクターとして働いているウイルスが除去された後にウイルスのゲノムが細胞内で発現する危険性や、遺伝子の変異によって、がん化する危険性などを考慮する必要がない。

また、BPIV3 は経鼻的に感染し、効率良く局所に免疫グロブリン A を、全身に免疫グロブリン G を誘導することができる。これによって、注射の必要のない安全で簡単な経鼻ワクチン接種をすることができ、突発的な感染症の発生に対しても予防接種をすることができると考えられる。

本研究では牛の病原体の抗原タンパク質遺伝子を BPIV3 のウイルスゲノムに組み込み、感染細胞で発現させることによって、抗体の産生を誘導し、免疫を与える動物用ワクチンの作製を目的とした。

【方法】

(1) 組換え BPIV3 の完全長 cDNA のプラスミド構築

当研究室の大倉らによって作製された BPIV3 の完全長 cDNA (Ohkura et al, Virology, 2015, in press) の N と P 遺伝子の間に、牛の病原体の抗原タンパク質の遺伝子を PCR で増幅し、制限酵素 *Mlu*I と *Sal*I を用いて組込んだ。その後、プラスミドを大腸菌 (*Stbl2*) にトランスフォーメーションし、大量精製を行った。

(2) 感染性ウイルスの回収

T7 RNA ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス株 (MVA-T7) を MDBK 細胞に感染させ、その後、T7 プロモーター下流に BPIV3 の N、P、L タンパク質の遺伝子を組込んだプラスミドと (1) で作製したプラスミドを Lipofectamine® 2000 を用いて HeLa 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 3 日後に HeLa 細胞培養液の上清を取り、MDBK 細胞の培養液に加えた。その後、MDBK 細胞の培養液の上清を回収し、感染性組換え BPIV3 を回収した。回収したウイルスは RT-PCR によって、抗原タンパク質の遺伝子を有していることを確認した。また、希釈したウイルス液を MDBK 細胞の培養液に加え、50% の細胞が細胞変性を起こす濃度を調べ (TCID₅₀ 法)、回収したウイルス液の力価を測定した。

(3) ウェスタンブロッティングによる抗原タンパク質の発現の確認

まず MDBK 細胞に (2) で回収した感染性ウイルスを感染させ、4 日後に細胞を細胞溶解液を用いて溶解した。その後、抗原タンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行い、BPIV3 に組込んだ抗原タンパク質が正常に発現をしているかを確認した。

(4) ハムスターへの接種実験

5 週令のハムスター 8 頭に回収したウイルスを両方の鼻から 50 μ l ずつピペットマンを用いて経鼻接種 (1.0×10^6 TCID₅₀/匹) した。感染後 21 日目に採血を行い、血清を分離した。

(5) 血清の中和抗体価の測定

100 TCID₅₀ の BPIV3 にハムスターより回収した血清を 96-well plate に希釈しながら加え、MDBK 細胞に添加し、細胞変性を指標に中和抗体価を測定した。その際に、血清は非働化したものとしていないものを用いた。

【結果】

牛の病原体の抗原タンパク質を有する BPIV3 の完全長プラスミドを構築し、感染性ウイルスの回収に成功した。

ウェスタンブロッティングによって、抗原タンパク質が発現していることを確認した。

しかしながら、ハムスターに接種したところ、BPIV3 に対する中和抗体価は上昇したものの、目的の病原体に対する抗体価は上昇しなかった。

【考察】

ウェスタンブロッティングの結果から、外来抗原の発現は確認していたので、抗原タンパク質が認識されなかったと考えられる。そこで、抗原タンパク質に BPIV3 の F タンパク質の膜貫通ドメインと細胞質内ドメインを付加し、正しく細胞膜上に発現されるように設計した。これによって、抗原タンパク質がウイルス粒子上にも取り込まれる可能性もあり、免疫原性が高くなることが期待される。

【今後の展望】

抗原タンパク質の細胞における発現はウェスタンブロッティングによって確認をすることができたが、そのタンパク質が抗原として働くためには、細胞膜表面に発現していること、あるいは細胞外へと分泌をされていることが必要となってくる。そのため、蛍光抗体法を用いて抗原タンパク質が細胞のどこに存在するかを確認する。また、組込んだ抗原タンパク質が生体内で抗原として働くかを調べる必要がある。そのため、再度、ハムスターへの接種実験を行い、血清を回収し、中和抗体価を測定することが必要となってくる。ハムスターで中和抗体価の上昇が確認できれば、次は動物衛生研究所で牛を用いた接種実験を行う予定である。

三次元培養造血系細胞の培養密度が増幅度に及ぼす影響

阿保 賢二 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 三好 浩稔 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

造血幹細胞移植は白血病などの重篤な血液疾患に対する有用な治療法であるものの、ドナー不足や採取できる細胞数が少ないといった問題から移植を受けられる患者数は限られており、広範には実施されていない。生体外で造血幹細胞を増幅することができればこれらの問題の解決につながると期待されることから、生体内の環境を模倣することで造血幹細胞を増幅するための研究が盛んに行われている。

生体内では、造血系細胞は造血支持細胞(ストローマ細胞)と三次元的に共存することによって造血微小環境を形成している。この三次元的な環境を模倣するために、医学医療系医工学研究室ではスポンジ状の polyvinyl formal (PVF) 樹脂多孔質体を担体とする造血系細胞の三次元培養法について検討してきた¹⁾。これまでに、ストローマ細胞と共培養することや、そのストローマ細胞を三次元凍結保存処理することによって、造血系細胞を効率的に増幅できることを明らかにした²⁾。しかし、これらの研究は特定の培養密度条件下で行われたものであり、培養密度が造血系細胞の増幅度に及ぼす影響については検討されていない。

そこで本研究では、多孔質樹脂を用いた三次元培養系において異なる密度で造血系細胞を播種して培養することで、培養密度が増幅度におよぼす影響について検討した。

方法

造血系細胞として、胎生 14 日目のマウスより採取した胎仔肝臓細胞 (FLCs) を用いた。細胞の三次元培養担体として、PVF 樹脂多孔質体を 2×2×2 mm の立方体状に細切したものにコーゲンコートして使用した。造血系細胞の培養には Hava 培地を用いた³⁾。

培養では、FLCs を 1×10⁷、2×10⁷、または 1×10⁸ cells/cm³ の 3 通りの密度で播種して 2 週間培養を行った (それぞれ D1、D2、または D10 とする)。各条件において、担体内部の総細胞数は MTT 法を用いて測定した¹⁾。

培養細胞中の各造血系細胞の比率は、フローサイトメーター (FACS) を用いた解析から求めた。抗体には、血芽球系細胞の指標である抗 Ter119 抗体 (PE 標識)、B 細胞の指標である抗 CD45R/B220 抗体 (FITC 標識)、造血前駆細胞の指標である抗 c-kit (CD117) 抗体 (PE 標識)、および造血前駆・幹細胞の指標である抗 CD34 抗体 (FITC 標識) を用いた。死細胞は propidium iodide (PI) の染色によって除外した。

培養細胞中の各 lineage の細胞数は MTT 法により測定した総細胞数と、FACS 解析の結果から得られた Ter119、B220、c-kit、および CD34 の陽性細胞の比率から求めた。

結果・考察

全細胞数および、各造血系細胞数が 2 週間の培養で何倍に増幅されたのかを表 1 に示す。全細胞数については、D1 と D2 の

低密度培養条件下で大幅に減少したのに対して、高密度条件下 (D10) では増加しており高い増幅度が得られた。各造血系細胞については、Ter119 陽性細胞を増幅することはできなかったものの、B220、c-kit、および CD34 陽性細胞は一部の条件下で増幅された。これらの細胞の増幅度を比較すると、低密度条件である D1、D2 に比べて、高密度条件である D10 でより高い増幅度が得られた。高密度条件 (D10) においては、特に造血幹細胞移植に重要である造血前駆細胞と造血前駆・幹細胞が高い割合で増幅された。

これらのことから、FLCs 中の造血系細胞を三次元培養する際には、低密度条件下では効率的に細胞を増幅できないことが示された。また、今回得られた増幅度の結果を、同様の三次元培養系において造血幹細胞をストローマ細胞と共培養した結果と比較すると³⁾、増幅度は共培養した場合のほうが高かった。したがって、ストローマ細胞を用いることで、より効率的に造血系細胞を体外で増幅できることが確かめられた。

今後の予定

造血系細胞の培養密度が増幅度に及ぼす影響をより詳細に調べるとともに、ストローマ細胞との共培養実験の結果と比較検討することで、造血系細胞の増幅に最適な条件を決定する。また、ヒト由来造血系細胞の増幅についても同様の検討を行う予定である。

表 1 全細胞および各造血系細胞の増幅度

播種密度	全細胞数	Ter119	B220	c-kit	CD34
D1	0.45	0.21	1.30	0.80	0.42
D2	0.29	0.05	0.18	0.76	3.04
D10	4.47	0.59	2.32	15.5	11.6

播種密度: D1、1.0×10⁷ cells/cm³; D2、2.0×10⁷ cells/cm³; D10、1.0×10⁸ cells/cm³

参考文献

- 1) Tun T, Miyoshi H, Ema H, Nakauchi H and Ohshima N. New type of matrix support for bone marrow cell cultures: in vitro culture and in vivo transplantation experiments. *ASAIO J.* 46: 522-526, 2000
- 2) Miyoshi H, Ohshima N and Sato C. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells on stroma formed within a porous scaffold: influence of scaffold shape and cryopreservation of the stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med* 7: 32-38, 2013
- 3) 内海 義生. 固定処理したストローマ細胞と造血系細胞の三次元共培養. 修士論文. 筑波大学, 2014

体内のアポトーシス細胞を除去するために転写因子 MafB がすること

浅野 圭吾 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

《 導入 》

生体内では1日に10億個のアポトーシス細胞が生じていると言われていたが、マクロファージが速やかにアポトーシス細胞を認識し、貪食するため、アポトーシス細胞が体内に蓄積することはない。しかし、何らかの理由でこの貪食機構が破綻し、アポトーシス細胞が体内で放置されると細胞内容物が放出され、その後自己抗体の産生が誘導されることで、自己免疫反応が生じる。つまり、マクロファージは体内のアポトーシス細胞を速やかに除去することで、自己免疫疾患の発症を防いでいると言える。

MafBは大Maf転写因子群に属するbZip型転写因子であり、ホモ二量体あるいはヘテロ二量体を形成して標的遺伝子のMaf認識配列(MARE)に結合し、転写制御を行う。また、血液細胞において、MafBは主にマクロファージに発現している。

アポトーシス細胞認識に関わる因子は今までに多数報告されているが、その転写制御メカニズムについては不明な点が多い。当研究室は、定量的RT-PCRやルシフェラーゼアッセイ、FACS解析などを用いた*in vitro*の実験系より、MafBはC1qa、C1qb、C1qcから構成される補体C1qの制御を介してマクロファージのアポトーシス細胞貪食に機能しており、MafB欠損によるC1qの発現の低下は、マクロファージのアポトーシス細胞貪食機構の破綻につながることを示唆された。しかし、実際にMafB欠損マウスが自己免疫疾患を発症するのか、またヒトの細胞でも同じメカニズムがあるのかはまだ証明されていない。

そこで本研究では、MafB欠損によるアポトーシス細胞貪食機構の破綻と自己免疫疾患の関連について調査し、さらにMafBによるC1qの転写制御メカニズムがマウス生体内(*In vivo*)及びヒトの単球・マクロファージの細胞株であるTHP-1でも起きているのかを検証した。

《 方法と結果 》

①MafB欠損マウスを用いた実験

*マウス

MafBを欠損させたマウスは生後間もなく死んでしまうため、成獣を用いた解析ができない。そこで、胎生14.5日のMafB欠損マウス胎児肝臓由来の血液細胞を、放射線照射した野生型マウスに移植することで、MafBが欠損した血液細胞を有するマウスを作製し、これをMafB欠損マウスとして解析を行った。また、マウスは全てC57BL/6J系統を使用した。

*自己免疫疾患との関連

自己免疫疾患を発症したマウスでは、抗核抗体や抗DNA抗体などの自己抗体の増加による糸球体腎炎が見られる。そこで、移植後20週経過したMafB欠損マウスの腎臓の切片をHE染色、PAS染色にて染色し、糸球体腎炎のスコアリン

グを行ったところ、MafB欠損マウスでは野生型に比べ、糸球体腎炎の症状が有意に見られた。

**In vivo*におけるMafB欠損マクロファージの解析

MafB欠損マウスの血液にはわずかながらレシピエントである野生型のマクロファージが存在しているため、MafB欠損マウスの脾臓細胞からMafB欠損マクロファージのみをセルソーターでソーティングし、C1qの遺伝子発現を定量的RT-PCRによって検証した。その結果、MafB欠損マクロファージではC1qa、b、cの遺伝子発現が顕著に低下していた。

②THP-1を用いた実験

*MAFBノックダウン

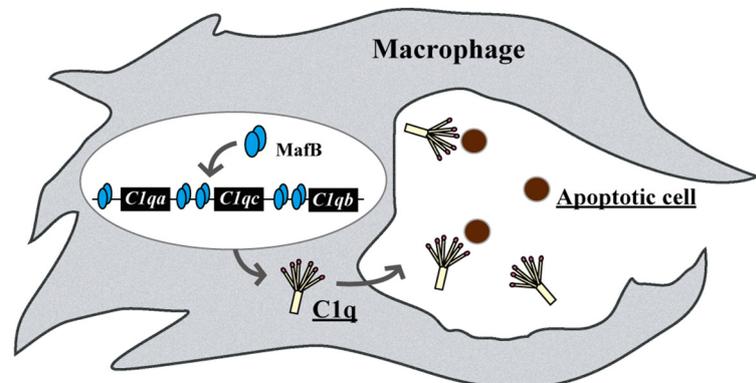
MAFBのmRNAを切断するように設計されたsiRNAをマクロファージへ分化誘導したTHP-1に導入することで、MAFBのノックダウンを行った。そして、このMAFBノックダウンによるC1Qの遺伝子発現の変化を定量的RT-PCRを用いて解析した結果、MAFBノックダウンによりC1Qの遺伝子発現量は低下することがわかった。

*クロマチン免疫沈降法

ヒトのC1QA、B、Cのプロモーター配列をEnsembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)より獲得し、half-MARE(tgctgca)の探索を行った。結果、C1QAで2箇所、C1QBで2箇所、C1QCで3箇所のMAREを候補として選出した。

そこで、ホルムアルデヒドで固定したTHP-1のDNAに超音波をあて、500bpほどの断片にしたものに対して、抗MAFB抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。得られたDNAは、候補として挙げたMAREを挟むように設計したプライマーを用いた定量的RT-PCRにより解析し、MAFBが直接結合しているか検証した。現在検証中であるため、結果は発表会にて報告する。

《 結論 》



MafBはC1qの発現制御を介してマクロファージのアポトーシス細胞貪食機構に関与している。また、マウスでこのメカニズムが崩壊すると、アポトーシス細胞の残存により自己免疫反応が引き起こされると考えられる。

MafB はマクロファージを介してがんを抑制する ; 腫瘍悪性化メカニズムの探究

今村 優希 (筑波大学 生物学類)

指導教員 : 高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

「がん」とは、突然変異によって生じた不死細胞が免疫の攻撃をかいくぐって生き残り、無限に増え続けたもので、日本においては最も死亡率の高い疾患である。「がん」を抑制するためには、不死細胞を取り除く免疫系が重要である。

免疫細胞の 1 つであるマクロファージは、外界から侵入した細菌などに対して防御的に働き、体内の老廃物などを取り除く。腫瘍が形成された際には、マクロファージは主に免疫反応を促進し、腫瘍の抑制に働くと考えられてきた。しかし近年、マクロファージが、腫瘍細胞の増殖や転移の促進、免疫抑制などを誘発し、むしろ腫瘍を悪性化させることが分かってきた。前者のような、免疫亢進に働くマクロファージは M1 マクロファージ、後者のような、免疫抑制に働くマクロファージは M2 マクロファージと分類されている。

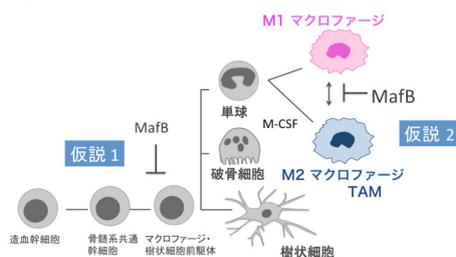
腫瘍内のマクロファージは、TAM (Tumor-associated macrophage [腫瘍随伴マクロファージ]) と呼ばれる。この TAM をターゲットとしたがん治療薬の開発も進められており、これからのがん研究においては、TAM の分子メカニズムを明らかにすることが重要となる。

当研究室の先行研究において、マクロファージに発現する転写因子 *MafB* の欠損したマウスでは腫瘍が大きくなることが示された。このことから、MafB は TAM の増殖を抑制する働きをもつと考えられる。しかし、その分子メカニズムは未だ明らかではない。そこで本研究では、腫瘍悪性化における転写因子 MafB の働きを明らかにすることを目的とし、TAM に着目して、その役割を検証した。

MafB が TAM の増殖を抑制するメカニズムとして、2 つの仮説が考えられる【図】。一方は、「マクロファージ前駆体の増殖抑制」である。マクロファージは造血幹細胞から、様々な前駆体を介してマクロファージに分化する。その分化の過程で、MafB による調節を受けている可能性がある。もう一方は、「腫瘍における、M1/M2 マクロファージの局在調節」である。腫瘍において、MafB が、免疫抑制に働く M2 マクロファージの増加を抑制している可能性がある。

本研究では、この 2 つの仮説について検証した。

【図】 MafB による TAM 増殖抑制の仮説



【材料・方法】

1. マウス

本研究にあたり、2 種類のマウスを用いた。

(1) *MafB*-GFP ノックインマウス - 当研究室にて作製されたマウスで、*MafB* アレルに GFP 遺伝子がノックインされている。この *MafB* 欠損マウスは、生後すぐ死亡するため、成体での解析が行えない。そこで、胎児肝臓由来の造血幹細胞を放射線照射したマウス (C57BL/6J) に移植して血液の再構築を行い、*MafB* 欠損マウス (以下 *MafB*^{-/-}マウス) を作製した。

(2) 8~10 週齢の野生型マウス (C57BL/6J)

2. 肺がん細胞 Lewis Lung Carcinoma (LLC) の移植

LLC を上記の 2 種類のマウスに皮下注射し、形成された腫瘍の大きさと重さを計測した。また、*MafB*^{+/-}マウスの腫瘍を免疫染色し、GFP およびマクロファージマーカーの発現を確認した。同様の解析を、T 細胞リンパ腫株 RMA、メラノーマ株 B16 のそれぞれを移植した *MafB*^{+/-}マウスでも行った。

3. マクロファージ前駆体の増殖抑制の検討

仮説 1 を検証するため、造血幹細胞のコロニーアッセイを行った。野生型マウスと *MafB*^{-/-}マウスの脾臓細胞を、コロニーを可視化できる培地にて培養し、マクロファージへと分化誘導した。1 週間後、コロニーを計数した。同様の解析を、LLC 移植後の野生型マウスおよび *MafB*^{-/-}マウスでも行った。

4. 腫瘍内における、M1/M2 マクロファージの局在調節

仮説 2 を検証するため、野生型マウスおよび *MafB*^{-/-}マウスに LLC を移植し、摘出した腫瘍を分離した。腫瘍細胞のうち、マクロファージマーカー陽性細胞のみをソーティングし、M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現を RT-PCR にて確認した。

また、腫瘍細胞をマクロファージマーカー、2 種類の M2 マクロファージマーカー、M1 マクロファージマーカーの計 4 種の抗体で標識したのち、FACS にて腫瘍内の M1/M2 マクロファージそれぞれの割合を調べた。

【結果】

1. *MafB*^{-/-}マウスでは、野生型マウスよりも腫瘍が大きくなった。免疫染色により、LLC、RMA、B16 のどのがん細胞株においても、形成された腫瘍内にはマクロファージがあることが確認できた。また、GFP 陽性細胞も同様に見られたことから、MafB が発現している可能性も示された。
2. LLC 未移植時、移植後ともに、*MafB*^{-/-}脾臓細胞は野生型より多くのマクロファージ前駆体のコロニーを形成した。
3. *MafB*^{-/-} TAM における M2 マクロファージマーカーの発現は、野生型とほとんど変わりがなかった。また、腫瘍内の M1/M2 マクロファージの割合もほぼ同じ値を示した。

【考察】

以上の結果より、MafB は脾臓ではマクロファージ前駆体の増殖を抑制していると考えられる。一方、腫瘍内では、MafB は M1/M2 マクロファージ局在に関与しない可能性がある。したがって、MafB によるマクロファージ数の制御が腫瘍増殖に関与すると考えられる。

イモリ嗅上皮における揮発性匂い物質に対する応答の電気生理学的解析

齊藤 美佳 (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】

嗅覚は外界の化学物質を受容・感知する感覚で、生命維持に必要な行動をとるために重要な役割を担う。エサの確保や天敵からの逃避行動、生殖活動など個や種の存続に関わる。そのため、嗅覚の受容やシグナル経路について、様々な動物種で研究が進められてきた。

外界には様々なにおい物質が混在している。今回は単一の匂い物質、混合した匂い物質をそれぞれ投与し、その応答性の違いを明らかにするために、電気生理学的解析を行った。

【材料と方法】

動物業者から購入した成体のアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を雌雄区別することなく使用した。まずイモリを断頭し、すぐに針で脊髄を破壊した。切り落とした頭を、イモリ Ringer 溶液 (組成: NaCl 110 mM, KCl 3.7 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 3 mM, Na-HEPES 2 mM, Na-pyr 1 mM, D-Glucose 15 mM, pH 7.2) で満たしたチャンバーに移し、針で頭を固定した。実体顕微鏡下ではさみを使用して鼻孔から切り込みを入れ、両頬上皮を除去し、嗅上皮を露出させた。

嗅上皮からの電気シグナルは EOG (electro-olfactogram) 記録法によって記録した。露出させた嗅上皮にガラス電極を密着させることで、電極周辺の複数の細胞の応答を加算した電流を記録できる方法である (Ottoson, 1956)。ガラス電極は micropipette puller (Sutter instrument; P-97) を用いて作製し、電極内は Ringer 溶液で満たした。ガラス電極内と不関電極には、分極を抑えるために塩化銀でコートした銀線を使用した。

匂い物質には揮発性匂い物質である n-amyl acetate、isoamyl acetate、cineole、limonene の 4 種を用いた。単一匂い物質溶液・混合溶液ともに Ringer 溶液で 0.05% に調製した。

匂い刺激は、Ringer 溶液を刺激溶液に素早く交換することでイモリ嗅上皮に投与した。Ringer 溶液は、刺激溶液投与時以外は常にチャンバー内に供給され、吸引ポンプで素早く排出した。刺激物質溶液は記録開始 1 秒後に、1 秒間投与し、素早く吸引した。

【結果と考察】

嗅上皮に刺激溶液を投与すると、電位応答が観察され、刺激がなくなると次第に元の電位に戻っていった (図 1)。

単一の匂い物質を投与したときの応答の大きさは、n-amyl acetate (N) では $523 \pm 24 \mu\text{V}$ (平均 \pm 標準誤差)、isoamyl acetate (I) では $494 \pm 60 \mu\text{V}$ であった。一方、混合匂い物質を投与したときの応答の大きさは、N-I 混合液では $264 \pm 40 \mu\text{V}$ であった。以上の結果から、単一の匂い物質に対する応答よりも混合匂い物質に対する応答の方が小さくなることが明らかになった。

脊椎動物の嗅覚受容体遺伝子は、1 つの嗅細胞に 1 種類の嗅覚受容体が発現する「1 細胞 1 受容体」という発現様式をとってい

る。また、嗅上皮に存在する嗅細胞で匂い物質を受容すると、嗅細胞はその軸索を嗅球へ投射し、糸球体という構造を形成する。以上のことから、1 つの糸球体は同じ嗅覚受容体を発現する嗅細胞に神経支配されている。混合溶液の場合は嗅細胞自体、あるいは近接する嗅細胞や糸球体間で抑制作用が働くことで、匂いの識別が行われていると考えられる。

【今後の展望】

イモリは両生類であり、揮発性匂い物質だけではなく水溶性物質のアミノ酸なども嗅覚で知覚することが知られている。アミノ酸投与においても同様の応答が見られるのか、検証が必要である。また揮発性匂い物質の受容機構は、アデニル酸シクラーゼを媒介したシグナル経路が明らかになっている。今後はニューロンの相互作用の同定や機能解明が期待される。

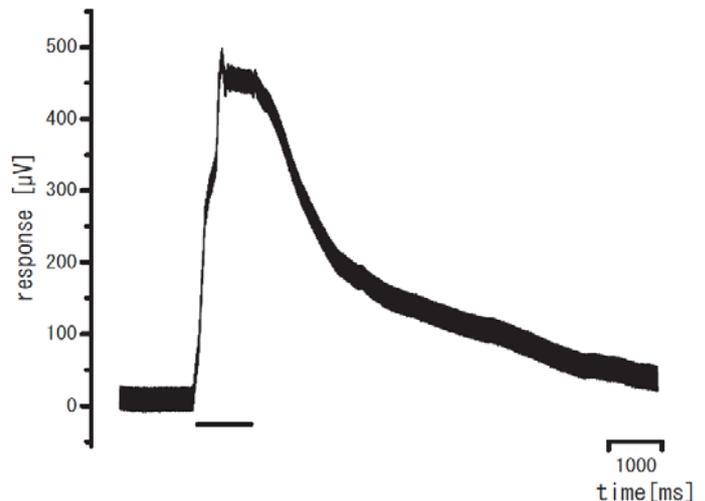


図 1. 揮発性匂い物質に対する嗅上皮の応答。バーは刺激物質を与えた時間を示す。

イモリ嗅細胞の電気的特性の解析

角田 圭輔 (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

匂いによって動物は食料の探索, 危険の察知, 生殖活動, コミュニケーションといった様々な活動のための情報を得ている. 匂いを感知する嗅覚は化学物質に対する感覚である. 脊椎動物では, 匂い分子が嗅上皮に存在する嗅細胞で受容され電気信号に変換される. この信号が高次の中樞神経系へと伝達されて匂いは認識される.

本研究では実験動物としてイモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いた. イモリ嗅細胞は他の動物と比べてサイズが大きく電気生理学的解析が行いやすい. またイモリは, 先行研究により空気中の揮発性物質及びアミノ酸といった水溶性物質を匂いとして受容することが明らかとなっている. しかしアミノ酸受容のシグナル伝達機構の詳細はまだ解明されていない. そこで本研究では, イモリ嗅細胞での匂い応答の詳細を明らかにする目的で, 単離したイモリ嗅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イモリを雌雄区別することなく使用した. 4 °C のインキュベーターで 30 分ほど保管することで低温麻酔したイモリを断頭し, 頭部を 2 価イオンフリー溶液 (Ca^{2+} , Mg^{2+} free) で満たしたチャンバーに浸した. 実体顕微鏡下でハサミを用い鼻孔を切開し嗅上皮を露出させた. ここから摘出した嗅上皮をピンセットで破断し 0.1 % collagenase を含む 2 価イオンフリー溶液に浸し, 36 °C 恒温器で約 10 分間放置した. この溶液を Ringer solution で 3 回リンスしたあと, パスツールピペットで約 40 回ピペッティングした. この操作によって単離された嗅細胞を含む溶液を ConcanavalinA でコート済みのディッシュに分注し, 細胞がディッシュに定着するまで約 20 分間放置した. この後ディッシュ全体に Ringer solution を満たした.

倒立顕微鏡ステージ上にディッシュを移し, 単離した嗅細胞を探した. さらにパッチ用ガラス電極を micropipette puller (Sutter instrument, P-97) を用いて作成し, ピペット抵抗が 8~13 m Ω となるようにした. このガラス電極に K^+ pipette solution を満たした. 倒立顕微鏡で観察しながらガラス電極を嗅細胞に接近させ, 十分に接近したところで陰圧を加えた. 膜抵抗値がギガオーム以上になることで細胞と電極が高密着した状態であることを確認した. 次に陰圧や電気パルスを細胞とピペットの接着面と与えて細胞膜に穴を開け, ピペット内液と細胞内が一体となるホールセルを形成した.

ホールセルを形成したのち, 電位を -60 mV に固定した. さらに -70 mV から +70 mV までのステップ電位を与えることで, イモリ嗅細胞における電位依存性チャネルの存在および電気的特性を調べた. 電位依存性電流が観察され, ホールセルの形成が安定して

いる場合は 40 mV に電位固定のもと揮発性匂い物質を投与し応答を解析した.

結果と考察

単離した細胞を顕微鏡下で観察すると, 細胞体の一方から樹状突起を伸ばしてその先端に繊毛があり, さらに細胞体の反対側からは軸索を伸ばす細胞がみられた. この形態的特徴から嗅細胞であると特定できた. これらの細胞にガラス電極を用いて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. この細胞に対して電位固定法により膜電位を -70 mV から +70 mV まで 10 mV ステップで変化させると電位依存性の電流が観察された.

続いて嗅細胞に匂い物質を投与した際の応答を観察した. 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で報告する.

今後の展望

今後はホールセルを形成したイモリ嗅細胞に対して, 各種匂い物質を投与した際の電気応答を観察し, それぞれの電気的特性を解析する予定である.

アカハライモリ松果体に存在する光受容体の生理的役割の検証

小柳 堯廣 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境系)

導入

松果体は下等脊椎動物では光受容能をもち第3の眼とも呼ばれている。眼は左右一対の器官であるが、松果体は脳上部の正中線上に存在する不對の器官である。松果体は袋状の構造をもち、内腔に向かって光受容細胞の光受容部位を突出させている。松果体の光受容細胞は側眼の視細胞と同じく繊毛型の視細胞であるが、視覚情報の感知というよりは明暗を検知し、内分泌系の制御や神経性情報を中枢神経系へ伝達していると考えられている。光受容能をもつ松果体は概日時計の光位相同調や日長時間の認識などに関わるとされているが、光受容細胞の生理的役割はまだ不明な点が多い。そこで今回、松果体光受容細胞が比較的発達した構造を持つアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を実験材料として用い、その生理的役割の検証を行った。本研究では、まず、周辺光が頭蓋骨内に存在する松果体ほどの程度到達するかを明らかにするために頭部における光透過率を測定した。また、側眼の網膜に存在する桿体細胞と松果体の光受容細胞の光応答の測定を試みた。さらに、松果体組織で発現している光受容体の種類を RT-PCR 法により調べた。

材料・方法

1. 光透過率の測定

可視光領域における光透過率の測定は、出力光源はキセノン光源を、受光部はツェルニーター型分光光度計を用いて波長スペクトルを計測した。試料はイモリ断頭後、頭上の表皮と頭蓋骨を含む組織を摘出し計測ステージ上に置いた。松果体が位置する部位に表皮側から白色光を当てた際のスペクトル強度 $I(\lambda)$ と、試料無し時のスペクトル強度 $I_0(\lambda)$ を測定し、光透過率 $I(\lambda)/I_0(\lambda)$ を導出した。

2. 光受容細胞の電気生理学的測定

動物業者から購入した成体アカハライモリを雌雄区別せず用いた。一晩暗順応させたイモリを氷上で低温麻酔させ、断頭した後、弱赤光下で眼または松果体を摘出した。網膜に存在する視細胞の場合は、暗視スコープを備えた実態顕微鏡下で、0.7×PBS に浸した眼球の角膜とレンズを取り除いて眼杯状にし、ピンセットで網膜を摘出した。摘出した網膜はイモリ Ringer 液 (組成: NaCl 110 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1.6 mM, CaCl₂ 1.0 mM, Na-HEPES 5.0 mM, D-Glucose 10 mM, EDTA 0.02 mM, BSA 0.1 mg/ml, pH: 7.8) 中で記録に至るまで暗所で保存した。各記録では、組織片を細かく切り刻んだのち、倒立顕微鏡ステージ上のチャンバーに移した。細胞は赤外光によりカメラを通して観察し、吸引電極法で光応答を測定した。マイクロピペットの内径は、視細胞外節の外径に合わせて作製した。光刺激は 520 nm 単色光を、刺激時間を 10 ms の条件で与えた。実験中はチャンバーにイモリ Ringer 液を還流した。記録は室温で行った。なお、イモリの解剖から実際の細胞応答記録に至る一連の過程は、全て暗室条件下で行った。

3. RT-PCR 反応

イモリを氷上で低温麻酔させ、断頭した後、4℃に冷やした 0.7×PBS (リン酸緩衝生理食塩水) に入れて解剖した。眼・松果体・脳の各組織を取り出し、RNA 分解が進まないようにドライアイス上で凍結させた。その後 RNAase 阻害剤を含む細胞溶解液を加え、ホモジェナイザーで細胞を破碎した。細胞破碎液から RNA 抽出キットを用いて全 RNA を抽出した。抽出 RNA は、-70℃で保管した。次に、この RNA をオリゴ dT プライマーで逆転写反応により cDNA を合成し PCR 反応を行った。PCR 反応ではピノプシン、オプシン 5、メラノプシン、VA オプシン、EF1 α (コントロール) 遺伝子配列に相補的なプライマーを用い、得られた PCR 産物をゲル電気泳動にて調べた。

結果・考察

1. 頭部における光透過性

成体イモリ頭部に光を照射し、その光の透過率を測定した結果、図 1 のような結果が得られた。イモリ頭上部では光強度が約 0.1% に減弱され、短波長領域に比べ長波長領域の方が高い光透過性をもつことが分かった。松果体に光受容能をもつ他の脊椎動物の頭蓋骨の光透過率は 0.1~5% 程度と報告されているが、イモリの光透過率は比較的低いことが分かる。頭部透過で減弱された光を受容するために、イモリ松果体光受容細胞の外節が発達した構造をもつと推察される。

2. 光受容細胞の電気生理学的測定

イモリ松果体に存在する光受容細胞は、網膜の光受容細胞とよく似た構造をしている。そこで比較のためにまず、網膜に存在する桿体視細胞の光応答の測定を行った。桿体細胞に光刺激を与えると、電流応答が変化した。応答の大きさは、飽和電流 (細胞における最大応答値) に達するまで、刺激光の強度に依存して増大した。現在、同様の手法を用いて松果体光受容細胞からの電気生理学的測定を行っている。

3. RT-PCR 反応

松果体組織から得られた増幅産物をゲル電気泳動した結果、ピノプシンの PCR 産物が観察された。このことから、松果体には光受容体としてピノプシンが発現していると考えられる。

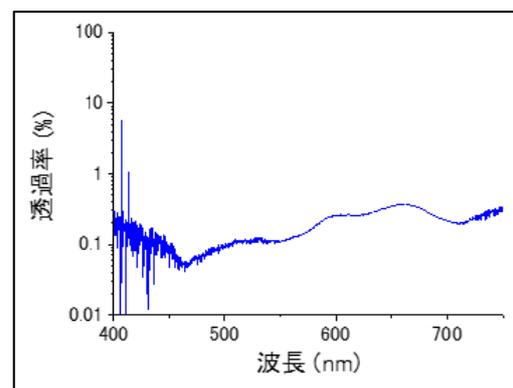


図 1. イモリ頭上部の可視光透過率

カタユウレイボヤ光受容細胞の生理学的解析

杉原 堯歩 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は脊索動物門に属する、脊椎動物に最も近縁な海産無脊椎動物である。幼生は脊椎動物とも共通したボディプランであるオタマジャクシ型形態をもち、脊索のほかに眼点や平衡器、脳胞など単純でありながらもはっきりと分化した器官を有している。以上の特徴からカタユウレイボヤは脊索動物におけるモデル生物として、主に発生学や遺伝学での研究が進んでおり、脊椎動物の視細胞の進化的系譜を調べるのに適した実験動物といえる。ホヤ幼生の眼点には色素細胞と約 30 の視細胞が存在しており、脊椎動物と同様繊毛型の視細胞であるが、形態的特徴と局在部位により 3 タイプに分類されている。色素細胞に隣接する I 型視細胞の他に、脳室に繊毛部を突出させている II 型及び III 型視細胞に分類される (Horie *et al.*, *J Comp Neurol.* 2008)。分子生物学的、解剖学的知見に比べ、ホヤ光受容器の生理的機能については未解明な部分が多く、これらの細胞の光応答特性を明らかにすることは、光受容器の進化的起源を解く上で重要な研究である。本研究では、カタユウレイボヤ幼生に存在する視細胞の生理的特性を、光学イメージング法及び電気生理学的手法を用いて明らかにし、脊椎動物との関連性や相違点を調べることで、脊椎動物の視覚の進化を生理学的側面から解明することを目指す。

材料・方法

1) ホヤ幼生への遺伝子導入

カタユウレイボヤの成体は NBRP から提供を受け、人工海水中で 18°C の恒温条件下で飼育した。遺伝子導入実験では、別々の個体から採取した卵子と精子を同一シャーレに入れ受精させた後、受精卵を覆うコリオン膜を除去するために、チオグリコール酸ナトリウムを含む人工海水で約 5 分間処理した。その受精卵を、終濃度が 75 ng/μL のプラスミド DNA と混合し、受精から 30 分後にエレクトロポレーション (電気穿孔法) により受精卵にプラスミドを導入した。エレクトロポレーションした受精卵は予めゼラチンコーティングしておいたシャーレに入れ、抗生物質を含んだ人工海水にて 18°C で培養した。プラスミド DNA はホヤ光受容細胞で特異的に働くアレスチンのプロモーターに蛍光タンパク質遺伝子を連結させたコンストラクトを用いた。導入した蛍光タンパク質はカルシウムイメージング法では G-GECO を、電気生理学実験では mCherry を用いた。

2) カルシウムイメージング法

エレクトロポレーション法により遺伝子を導入したホヤ幼生の個体の中から、蛍光実体顕微鏡下で眼点に蛍光のシグナルを発する個体を選別しイメージング実験に用いた。蛍光性カルシウムイオンセンサータンパク質 G-GECO は、カルシウムイオン濃度に応じて蛍光強度が変化する。このタンパク質を視細胞特異的に発現させることにより、光受容により誘起される視細胞内カルシウムイオン濃度の変化をモニターすることが可能になる。G-GECO を導入したカタユウレイボヤの幼生を正立顕微鏡の

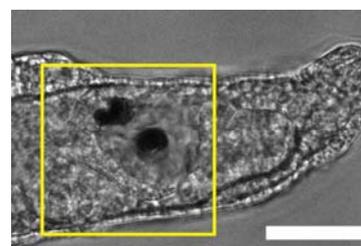
ステージへ移し、赤外光下で観察し 5 分以上暗条件で静置した。なお、幼生が動くと正確なイオン変化が読み取れないため、あらかじめ幼生の尾部は切断しておいた。480 nm の単色光の LED 光源を用いて蛍光タンパク質を励起させ、幼生の眼点周辺における蛍光強度の変化を、冷却型 CMOS カメラで 20 ms 間隔で画像取得した。実験中に還流させている人工海水を、脊椎動物の光シグナル伝達タンパク質の構成タンパク質ホスホジエステラーゼの阻害剤 IBMX を含む灌流液に切り替えることで、IBMX がカタユウレイボヤ幼生の光受容細胞の応答に及ぼす影響を調べた。なお、取得画像は ImageJ と Origin で解析した。

3) 電気生理学的解析

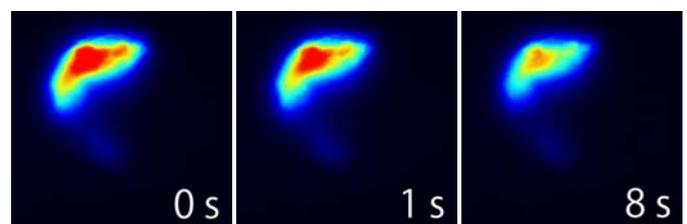
mCherry 遺伝子を導入したホヤ幼生を酵素で処理し、ピペッティング操作を施し物理的処理により細胞を単離したサンプルを顕微鏡のステージに移した。単離細胞の中から、赤色蛍光タンパク質 mCherry の蛍光シグナルを指標として視細胞を同定した。同定された視細胞に対してパッチクランプ法を用いて電気生理学的な測定を試みた。

結果・考察

カルシウムイメージング法の結果、カタユウレイボヤ幼生の光受容細胞には、光刺激に応じて異なる 2 タイプのカルシウム動態が観察された。ひとつは、光刺激後によって細胞内の蛍光強度が低下する応答で、脊椎動物の繊毛型視細胞の光応答と同様のカルシウム動態である。ことから、カタユウレイボヤ視細胞には、脊椎動物の視細胞と同様、光依存的に過分極性の光応答を示すホスホジエステラーゼを介した光シグナル伝達系の存在が示唆される。他方、光照射前よりも蛍光強度が上昇するカルシウム動態を示す細胞も確認された。この結果は、ホヤ視細胞には脊椎動物型の視細胞と異なる細胞が存在する可能性が考えられるが、今後視細胞のタイプとの関連を明らかにする為に、詳細な解析を行う予定である。また、細胞を単離してパッチクランプ法を実施することで、電気生理学的な応答を調べられるのみならず、光受容細胞のタイプとの対応関係も判明させられると思われる。電気生理学の実験は現在実行中である。



左図:カタユウレイボヤ幼生の頭部。スケールバーは 50 μm。下図:枠線内の蛍光観察画像。左から光照射直後、1秒後、8秒後の蛍光の様子。時間経過にしたがって蛍光強度が減少している。



変異錐体オプシンを発現するトランスジェニックイモリ作製の試み

高津光平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 櫻井啓輔 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

脊椎動物の網膜には明るい所での視覚に関わる錐体細胞と暗い所での視覚に関わる桿体細胞の2種類の視細胞が存在する。これらの細胞は機能する光環境の違いにより、錐体視細胞では色の認識に関与し高解像度を持つものに対して、桿体視細胞では高い光感度を持つという異なった光応答特性を示す。これらの細胞の光受容に関わるタンパク質を比較すると、それぞれ異なる遺伝子グループに属するタンパク質で構成されていることが知られている。このことから、これらの視細胞は共通の祖先となる視細胞から派生し光環境へ対応していく中で、異なる光応答特性を獲得してきたと考えられている。先行研究によると、桿体光受容タンパク質であるロドプシンは4種類ある錐体光受容タンパクグループの一つのグループよりも約1,000倍も熱的に安定しており (Sakurai *et al.*, 2007)、この光受容タンパクの高い熱安定性は暗所における視覚に重要であると考えられている。本研究では、このような桿体と錐体の光受容タンパク質の分子的性質の違いに関わるアミノ酸残基を明らかにすることを旨とする。この目的のために、熱安定性に関わると考えられるアミノ酸残基の変異を導入した錐体光受容タンパクを桿体細胞に異所発現するトランスジェニック動物を作製し、電気生理学的手法を用いて導入タンパクの性質を解析する。

本研究ではまず、アミノ酸に変異を加えた錐体光受容タンパク質を桿体細胞に異所発現させるのに必要なベクターを設計し、そのベクターを用いてトランスジェニックイモリの作製を試みた。

材料と方法

1) コンストラクト作製

ベクターのコンストラクトは、導入DNA配列とその両端に連結したメガヌクレアーゼ *I-SceI* 認識配列で構成される。導入DNA配列は上流から、全身性に働く CAG プロモーター配列、変異ヒト赤錐体オプシン (hRed opsin) 遺伝子、リボソームをリクルートし翻訳を開始させる機能を持つ IRES (Internal Ribosome Entry Site) 配列、蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子配列、SV40 ポリ A 付加配列の順に連結し、この配列を *I-SceI* 認識配列で挟むようにコンストラクトを構築した。このようなコンストラクトを作製した場合、IRES 配列下流の mCherry の蛍光シグナルの有無が、トランスジェニック体の選別マーカーとなる。

2) トランスジェニック体の作製

受精卵採取の為のイモリは 18°C の恒温条件下で 60 L の水槽に飼育した。イモリに生殖腺刺激ホルモンを定期的に注射することにより産卵を促し交配させた。得られた1細胞受精卵を2% チオ硫酸ナトリウム溶液で脱ゼリー処理した後、6% Ficoll 溶液を入れた96穴プレートに移し、1つの受精卵につきコンストラクトDNA溶液4nLをマイクロインジェクターで注入した。コンストラクトDNAの最終濃度は0.02 µg/µL または0.2 µg/µL となるように調製した。この溶液には *I-SceI* が含まれており、37°C で40

分間インキュベート処理によって *I-SceI* 認識配列が切断されて、目的の配列が遺伝子に組み込まれるようになる。インジェクションしたイモリ卵は14°Cで飼育した。インジェクション後2日経過した卵の内、胞胚期まで正常に発生した胚を選別し、アガロースでコートしたディッシュで飼育した。イモリ胚における蛍光タンパクの発現の有無は、神経胚以降の個体を实体蛍光顕微鏡で観察した。なお、これらのトランスジェニックイモリ作製の手順に関しては千葉研究室の先行研究 (Casco-Robles *et al.*, 2010) に従った。

結果

平均61個の受精卵にインジェクションを行った。またインジェクション後に正常に発生した卵は平均22個だった。ベクターDNAは、低濃度と高濃度の異なる条件で受精卵に注入し、その導入効率を選別マーカー mCherry の発現を指標として比較した。その結果、低濃度 DNA 条件においては mCherry の蛍光が観察された個体はほとんど得られなかったのに対して、高濃度 DNA 条件においてはインジェクション後に正常発生した卵の内、約50%の胚において mCherry の蛍光が確認された (Fig. 1)。

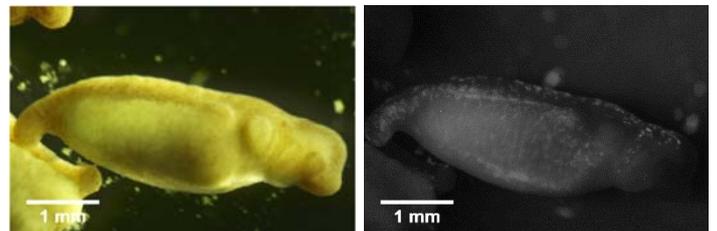


Fig. 1: イモリ尾芽胚 (左) における mCherry の蛍光画像 (右)

考察・今後の展望

今回の結果では、遺伝子導入効率は注入した DNA 量に大きく影響を受けた。今後は高い導入効率を得られた条件を用い、トランスジェニック体の作製を進めて行く予定である。また mCherry の蛍光シグナルが確認されたことから、トランスジェニック体は機能性タンパク質である錐体オプシン遺伝子の発現も期待できる。今後の研究では、網膜での錐体オプシンの遺伝子の発現について生化学的手法を用いて調べると共に、錐体オプシンが異所発現する桿体細胞の応答特性について電気生理学的手法を用いて解析する予定である。

参考文献

- (1) Sakurai K *et al.* 2007. Physiological properties of rod photoreceptor cells in green-sensitive cone pigment knock-in mice. *J Gen Physiol.* 130:21-40.
- (2) Casco-Robles MM *et al.* 2010. Simple and efficient transgenesis with *I-SceI* meganuclease in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Dev Dyn.* 239:3275-3284.

癌か再生か？－イモリに対する c-Myc 強制発現の試み－

山本 慧（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）

背景と目的

iPS 細胞をもちいた細胞・組織創製技術の開発とそれらの医療応用に向けた研究が目覚ましい勢いで前進している。しかし、これらの材料を移植医療に用いる場合、癌化の可能性は常に配慮されるべき問題点の一つである。一方、有尾両生類のイモリは、体細胞の脱分化（リプログラミング）を介した高い再生能力をもつにもかかわらず、癌になることはないと考えられている。実際、癌を患ったイモリは報告されていない。興味深いことに、イモリの眼球内や肢の組織中に癌を誘導する物質を投与すると、いずれも癌は生じず、眼球内には新たな水晶体が生じ、肢には癌誘導物質を埋め込んだところから新たな肢（過剰肢）が伸び出す現象が報告されている[1]。これは、癌化を誘導する化学的刺激が、イモリの再生を惹起する刺激と類似しているためではないかと考えられているが、メカニズムは明らかにされていない。癌は形成されているが、何らかのメカニズムで取り除かれている可能性も否定できない。実際、自然界のイモリには、ウイルス性の腫瘍（いわゆるイボ）様の腫瘍を皮膚にもつ個体がしばしば見出されるが、腫瘍は悪性化することなく、そのまま縮小して消滅してしまうか、脱落することが知られている。

そこで本研究では、イモリの再生が癌化と共通のメカニズムで始まるのかどうかを明らかにするとともに、癌細胞を排除するメカニズムが存在するかどうか調べるため、イモリ個体に癌遺伝子を強制発現させる実験系の開発を行った。今回、癌遺伝子の候補として *c-Myc* に着目した。この遺伝子は、iPS 作製の際に必要な因子であるとともに癌化のリスクを与える因子として知られている。また、成体イモリにおいても体細胞のリプログラミング過程で発現することが知られている[2]。

方法と結果

実験にはアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いた。まず、*c-Myc* 遺伝子が哺乳類と同様にこの動物に腫瘍を作らせるかどうか検討するため、トランスジェニック用の DNA コンストラクトをデザイン・作製し、イモリの受精卵に打ち込んだ。

具体的な方法と結果については、研究のプライオリティ保護のため公開は控させていただきます。発表会の場で報告させていただきます。

参考文献

- [1] Tsonis, P.A. and Eguchi, G. Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and 4-nitroquinoline-1-oxide on limb regeneration in adult newts. *Differentiation* **20**: 52-60, 1981.
- [2] Islam, M.R., Nakamura, K., Casco-Robles, M.M., Kunahong, A., Inami, W., Toyama, F., Maruo, F. and Chiba, C. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. *Sci. Rep.* **4**, 6043, 2014.

動物の変態の共通性を理解するためのホヤ RXR 関連遺伝子のノックアウトの試み

中畑 あずさ (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

変態とは、動物の成長過程において、その姿形を大きく変化する現象である。多くの動物で認められる変態であるが、その様式は動物種によって非常に異なる様相を呈するため、一見すれば、各動物のグループで独立して獲得されたようなものに思える。一方、現存する動物は共通祖先から進化してきた。その進化過程の中で、変態という現象もまた共通祖先から受け継いだ現象なのか、それとも各動物が独立に獲得してきたものなのかについてはこれまで議論的であった。その背景のなか、近年の発生生物学的研究は、動物の変態が分子レベルで共通である可能性を指摘してきた。

RXR(Retinoid X Receptor)は、動物間で広く保存されている核内受容体で、他の核内受容体とヘテロダイマーを形成して作用する。近年、RXR 相同遺伝子が凍胞動物、節足動物、脊椎動物で共通して変態を制御することが判明した。この共通性は、動物が共通の分子機構を基に変態を進化させてきたことを支持するものである。しかしながら多くの動物群での RXR の機能解析は進んでおらず、RXR を中心にした分子機構が真に変態の共通原理であるかどうかを結論づけるにはさらなる解析が必要である。

ホヤは、幼生期はオタマジャクシの形態を取り、活発に泳ぎまわりますが、変態を終えて成体になると殆ど動きまわらない固着生活を始める。ホヤの変態は昆虫類や両生類の変態とは異なり、数日で完了する非常にダイナミックなものであり、素早く変態が行われることから、研究に非常に適した材料である。また、ホヤは脊索動物であり、我々脊椎動物と最も近い動物群であるが、ホヤは脊椎動物と分岐してのちに、独自に変態機構を獲得したと考えられている。私はホヤの変態が進化過程で獲得されたメカニズム、特に他の動物と共通の分子機構を基に進化したのか、について興味を持ち、ホヤの RXR を中心に機能解析を進めることとした。

RXR が変態においてどのような影響があるかを調べる際、RXR は脊索動物においてレチノイン酸経路で働いていることが知られているため、変態における機能とレチノイン酸経路での機能を区別するため、本研究では RAR(Retinoic Acid Receptor)についても研究対象とした。さらに、ホヤは脊椎動物との直接の姉妹群を形成する動物であり、両者の変態機構の共通性を重点的に調べたい。両生類の変態においては甲状腺ホルモン受容体が RXR とヘテロダイマーを形成することで中心的な役割を果たしている。ホヤにはこの受容体の相同遺伝子 NOR1 があり、この遺伝子の機能解析も同時に進めた。本研究では、ホヤの 1 種であり、カタユウレイボヤを用いて実験を行った。カタユウレイボヤはゲノム DNA の塩基配列が既に決定されており、また、TALEN を用いた遺伝子ノックアウトが可能である。そこで TALEN を用いて RXR、RAR、NOR1 のノックアウトを行い、RXR を中心とする遺伝子群がホヤの変態に与える影響を検証することを本研究の目的とした。

方法

RXR、RAR、NOR1 のそれぞれについて、遺伝子をノックアウトするための TALEN を作製した。ホヤのゲノムデータベースより、カタユウレイボヤの RAR、RXR、NOR1 の遺伝子配列を得た。それぞれの遺伝子配列から TALEN Targeter (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>) により作製する TALEN の配列を決定した。デザインした TALEN に対する cDNA は Golden Gate 法により作製した。TALEN cDNA をハウスキープ遺伝子 EF1a の転写調節領域に結合し、発現ベクターを構築した。TALEN 発現ベクターをカタユウレイボヤ卵にエレクトロポレーションで導入し、その後発生させた胚からゲノム DNA を抽出し、DNA のターゲット領域に変異が入っていることを CelI エンドヌクレアーゼを用いて検証した。続いて該当 DNA 領域をクローニングし、配列決定、野生型と配列を比較することで変異が入っていること、及び変異導入率を確認した。

結果

最終的に、RXR、RAR、NOR1 遺伝子に効率よく変異を導入する活性を有する TALEN の作製に成功した。RXR については DNA 結合ドメインと開始 ATG をターゲットとする TALEN をそれぞれ 2 種類作製した。開始 ATG に対する TALEN について、CelI ヌクレアーゼを用いた解析で変異導入を示唆するバンドを検出できた。シーケンス解析の結果、開始 ATG をターゲットとするものの 1 種類について、確かに DNA の塩基配列に変異が導入されていることが確認され、その変異導入効率は約 75%と推定された。DNA 結合ドメインをターゲットとする 2 種類については CelI ヌクレアーゼ解析では変異導入活性を有していなかったため、以後の解析には用いなかった。

RAR については DNA 結合ドメインをターゲットとした TALEN を 3 種類作製した。そのうち 1 種類について、確かに DNA の塩基配列に変異が導入されていることが確認され、その変異導入効率は約 87.5%と推定された。残りの 2 種類については CelI ヌクレアーゼ解析では変異導入活性を有していなかった。NOR1 については TALEN を 1 種類作製し、CelI ヌクレアーゼを用いた解析で変異導入を示唆するバンドを検出できた。シーケンス解析の結果、変異導入効率は約 100%と推定された。

考察

RXR、RAR の双方について、同一遺伝子をターゲットとするにも関わらず、変異効率の高い TALEN と低い TALEN が存在した。変異効率の低い TALEN については、ゲノム DNA の修飾やクロマチン状態などの理由から、DNA の 2 重鎖切断の起こりにくい部位をターゲットにしていたことが、変異効率を下げた可能性として考えられる。今回得られた TALEN を用いて、今後 RXR 関連遺伝子の機能解析を進めていきたい。

ウニ胚神経外胚葉特異的因子 foxQ2 の転写を調節するメカニズムの解析

山本 茜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：谷口 俊介 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

体軸形成は、あらゆる動物の発生過程において最も初期に起こる現象の 1 つである。ウニの初期発生では、動物極と植物極を結ぶ前後軸（一次軸）と、それに直交する背腹軸（二次軸）に沿って細胞運命の決定がされていく。前後軸形成には、植物半球における Wnt/ β -カテニンシグナルの機能が重要な役割を担う[1]。一方、背腹軸形成には、腹側に局在する Nodal シグナルとその下流ではたらく Lefty、BMP2/4、Chordin などの TGF- β ファミリー分子群が必須な役割を担う[2]。直交して働く 2 つのシグナル経路は、それぞれ独立して細胞運命の決定に関与しているとされてきたが、2006 年と 2008 年に谷口らにより、それらが転写因子 FoxQ2 を介してリンクしていることが報告された[3, 4]。

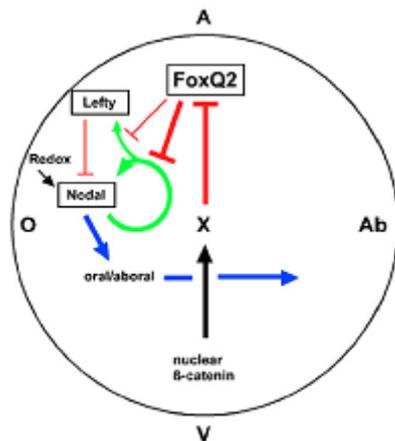


図 1: ウニの初期発生における一次軸と二次軸間の制御経路モデル [3]。

foxQ2 は AV 軸と DV 軸を繋ぐ重要な転写因子である。Wnt シグナルは foxQ2 に対して抑制的にはたらく、foxQ2 は Nodal に対して抑制的にはたらく。

A, 動物極; V, 植物極; O, 口側(腹側); Ab, 反口側(背側)

具体的には、Wnt/ β -カテニンシグナルで中心的な役割を果たす β -カテニンの核移行を抑制すると、正常胚では前端部領域に限局している神経外胚葉が胚全体に広がり、かつ、その胚は背腹軸を完全に失う現象がまず報告された[3]。さらに、神経外胚葉領域の形成に必須な転写因子 FoxQ2 の発現が、Wnt/ β -カテニンシグナルに間接的に制御されていること、および、背腹軸形成をコントロールしている Nodal の発現を FoxQ2 が抑制していること、の 2 点が報告された[4: 図 1]。しかしながら、Wnt/ β -カテニンシグナルの下流で、直接 foxQ2 の転写を抑制する因子や、動物極において foxQ2 の転写を誘導するメカニズムに関してはいまだに不明であった。

そこで、本研究では foxQ2 の転写を調節する機構を解析することで、体軸形成の過程で神経外胚葉がなぜ胚の前端部領域にのみ形成されるのかを理解することを最終目的とした。パフンウニゲノムには、foxQ2a と foxQ2b の 2 つの遺伝子が存在する。本研究室の先行研究により、foxQ2a, b 双方とも発生初期において発現がみられるが、それぞれの空間的発現パターンがわずかに異なることが明らかにされた[図 2]。本卒業研究ではその違いを生み出すメカニズムを明らかにするため、直接 foxQ2a および foxQ2b の転写調節をおこなう因子の特定を試みた。

【材料】

パフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus*

【方法】

- foxQ2a, b の基本コンストラクトの作製
すでにゲノム解読がされている北米ムラサキウニゲノムを参考にして、foxQ2a, b の発現調節に関わると思われる領域 8kb のクローニングをそれぞれ行った。クローニング産物を pCS2 ベクターに組み込み、GFP 発現解析のために 8kb の後に turbo Green Fluorescent Protein (tGFP) と MODC 配列を付加し、解析の基本となるコンストラクトを作製した。
- マイクロインジェクションと胚の観察
foxQ2a (もしくは b) 領域+tGFP+MODC の断片を PCR により増幅し、制限酵素 EcoRV で切断したゲノムをキャリアーとして KCl と混合後、受精卵にマイクロインジェクションを行った。発生 38-41hr 後に蛍光顕微鏡下でインジェクション胚における GFP 発現領域の観察し、同時に、GFP 発現率を求めた。

【結果・考察】

foxQ2a-cis 解析

foxQ2a の転写制御に関わる領域を探索し、11ヶ所の候補に絞り込むことができた。さらなる解析は現在進行中である。

foxQ2b-cis 解析

foxQ2b の転写制御に関わる領域を探索し、10ヶ所の候補に絞り込むことができた。foxQ2b については 3 つの部位が発現制御に関与していることを示唆する結果を得ることができた。その領域に結合すると予測される転写因子が foxQ2b の転写を直接 ON にしている (発現の促進) 可能性が高いため、現在候補因子の特定を行っている。また、転写因子 Myb が foxQ2b の発現調節に関与することが以前の解析から示唆されていたので、その遺伝子発現パターンについても現在解析中である。

foxQ2a, b-cis 解析結果の詳細については発表会で報告する。

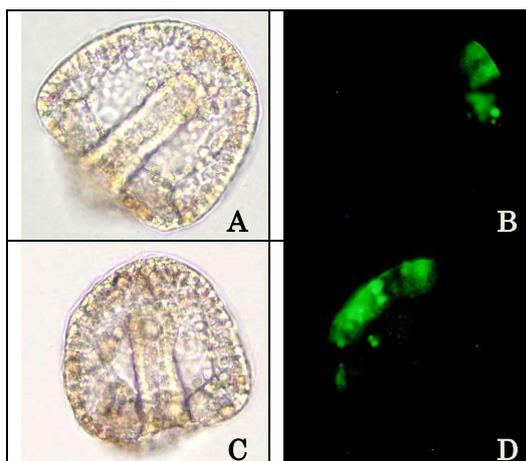


図 2: foxQ2a, b-tGFP の空間発現パターンの違い。受精後 40hr では、foxQ2b (D) の方が foxQ2a (B) よりも、GFP 発現領域が広い傾向がある。(A, B) foxQ2a の発現領域 (C, D) foxQ2b の発現領域

参考文献

- Logan et al. (1999) Development 126, 345-357.
- Duboc et al. (2004) Dev Cell 6, 397-410.
- Yaguchi et al. (2006) Development 133, 2337-2346.
- Yaguchi, S., et.al. (2008) Dev Cell 14, 97-107.

ショウジョウバエ雑種雌の生存力に対する欠失染色体の効果

林 貴朗 (筑波大学 生物学類) 指導教員：澤村 京一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) とオナジショウジョウバエ (*D. simulans*) の間には雑種ができる。キイロショウジョウバエが雌親、オナジショウジョウバエが雄親の場合、雑種は雌が不妊、雄が致死となる (Sturtevant, 1920)。また、25 °C で生育した場合、多くの雑種雌は蛹から羽化できずに死ぬか、羽化してから数時間で死ぬ。この交配において、オナジショウジョウバエの *Lethal hybrid rescue* (*Lhr*) 遺伝子の機能欠損変異系統を用いると、雑種雌を致死から救済することができる (Watanabe, 1979)。*Lhr* は第二染色体に存在し、ヘテロクロマチン結合タンパク質 (HP3) をコードしている。一方、キイロショウジョウバエの *Lhr* 遺伝子の機能欠損変異系統を用いると、雑種雌を救済することができない (Brideau *et al.*, 2006) が、雑種雌を羽化後の致死から救済することが本研究による先行研究によって発見された (Shirata *et al.*, 2014)。本研究では、*Lhr* と同様にキイロショウジョウバエの機能欠損変異によって雑種雌の致死を救済するようなゲノム領域の探索を行った。

材料・方法

第三染色体に欠失をヘテロ接合で持つ様々な系統のキイロショウジョウバエ雌に野生型のオナジショウジョウバエ雄を交配し、生まれてきた雑種雌の生存力を調査した (図1)。また、羽化できずに死んだ個体を解剖し、欠失染色体を持つ個体かどうかを判別した。

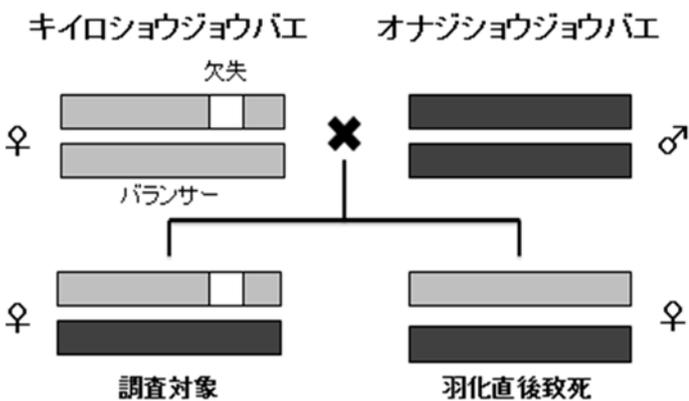


図1 第三染色体の欠失を用いた種間交配

結果・考察

雑種雌の蛹や羽化直後での致死から救済するような欠失染色体を発見した。ここでは一例として *Df(3R) mbc-R1* のデータを示し (図2)、その他の欠失については当日会場において発表する。今回発見したゲノム領域にも *Lhr* の様な DNA 結合タンパク質遺伝子が存在し、致死の救済に関わっている可能性がある。

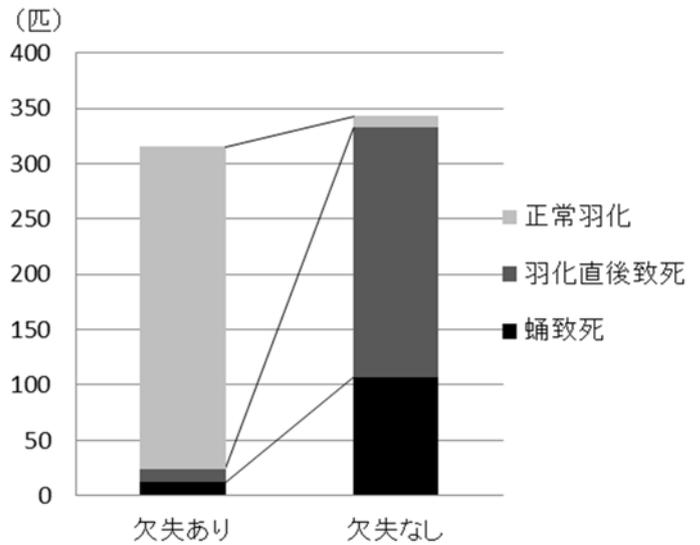


図2 *Df(3R) mbc-R1* を持つ雑種雌の生存力

謝辞

本研究に際し、京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センターより系統の提供を受けたので、ここに感謝の意を表す。

引用文献

- Brideau NJ, Flores HA, Wang J, Maheshwari S, Wang X, Barbash DA (2006) Two Dobzhansky-Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *Science* 314: 1292-1295.
- Shirata M, Araye Q, Maehara K, Enya S, Takano-Shimizu T, Sawamura K (2014) Allelic asymmetry of the *Lethal hybrid rescue* (*Lhr*) gene expression in the hybrid between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: confirmation by using genetic variations of *D. melanogaster*. *Genetica* 142: 43-48.
- Sturtevant AH (1920) Genetic studies on *Drosophila simulans*. I. Introduction. Hybrids with *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 5: 488-500.
- Watanabe TK (1979) A gene that rescues the lethal hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Jpn. J. Genet.* 54: 325-331.

ショウジョウバエ雑種雌の生存力を回復する遺伝子のマッピング

三浦 康平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 澤村 京一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) とオナジショウジョウバエ (*D. simulans*) は種間交配により雑種をつくることができる。キイロショウジョウバエ雌とオナジショウジョウバエ雄で種間交配を行った場合、生まれる雑種は雄が致死、雌は不妊となるが、雑種雌も高い温度 (摂氏 25 度) で致死となる (Sturtevant, 1920)。雑種の生存力にかかわる欠失マッピングでは、雑種雌の生存力を低下させるゲノム領域が 10 箇所ほど発見されている (Coyne *et al.*, 1998; Matute *et al.*, 2010)。これらの先行研究では高温下における雑種雌の生存力の回復については触れられていない。本実験では、高温下での雑種雌の生存力を回復するゲノム領域を探索した。

材料・方法

先行研究のデータには、雑種雌の生存力が上がっていると思われる領域が存在するが、それらについて先行研究では触れられていない。これらのゲノム領域について、欠失を持つ雑種雌が、欠失を持たない雑種雌に対して有意に生存力が大きいものを抽出した (一次スクリーニング)。また、抽出した領域を欠失しているキイロショウジョウバエ系統の雌と、野生型オナジショウジョウバエ系統の雄との間で交配を行った (二次スクリーニング)。

結果・考察

先行研究のデータを元に行った統計処理の結果 (一次スクリーニング) を図 1 に示す。これらの領域を欠失している系統を用いた交配 (二次スクリーニング) を進めている。今後は、欠失領域が重なる系統を用いて交配実験を行うことで、雑種の生存力にかかわる遺伝子を特定することが期待できる。

謝辞

この研究を行うにあたって、系統の提供をお願いした京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センターと、プログラミングに関する助言を頂いた応用動物昆虫学研究室の徳嶋賀彰氏に感謝の意を表す。

引用文献

- J. Coyne *et al.* (1998) Relative paucity of genes causing inviability in hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics* 150: 1091-1103.
- D. Matute *et al.* (2010) A test of the snowball theory for the rate of evolution of hybrid incompatibilities. *Science* 329: 1518-1521.
- A. Sturtevant (1920). Genetic studies on *Drosophila simulans*. I. Introduction. Hybrids with *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 5: 488-500.

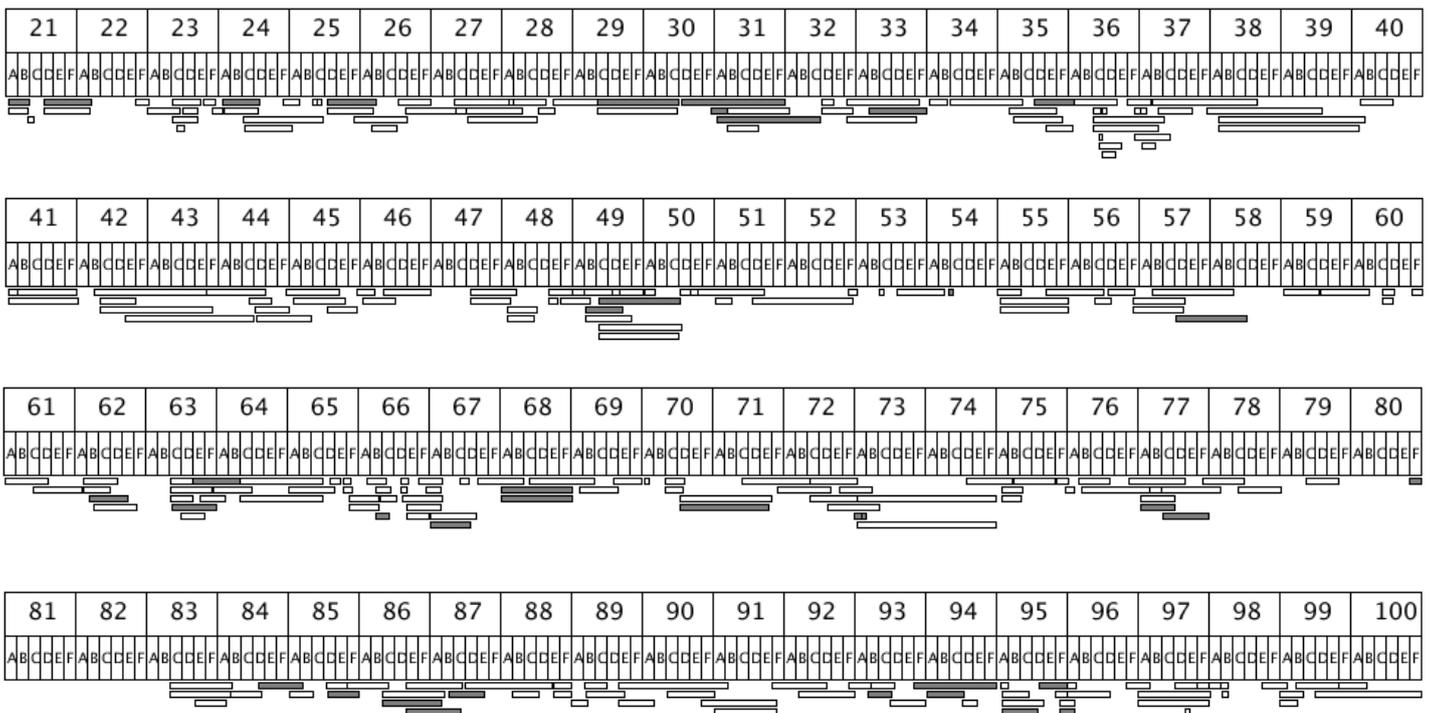


図 1 雑種雌の生存力を回復する欠失領域のスクリーニング (Coyne *et al.*, 1998; Matute *et al.*, 2010 をもとに作成)

第 2 染色体を 21-60、第 3 染色体を 61-100 の番地に分け、これらをそれぞれ A-F で区切った。下のバーが解析に使用した欠失領域を示しており、このうち塗りつぶしてあるものは雑種雌の生存力が有意に大きい欠失である。

ショウジョウバエのステロイドホルモン生合成を調節する新規神経細胞の同定と機能解析

井村英輔 (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

多細胞生物の一生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た後、死を迎えることで終わる。時間軸に沿った成長過程における最も重要なステップの1つは、子を残すことができない未熟な段階（子供）から子を残すことができる成熟した段階（大人）への変化である。こうした成熟過程の代表例として、ヒトでは思春期が、また昆虫では変態が挙げられる。そして、ヒトと昆虫のいずれの例においても、子供から大人へ移行する発育段階の変遷にはステロイドホルモンが重要な役割を果たす。私は、昆虫の変態を促すために必要なステロイドホルモン「エクジステロイド」の役割に関心を持ち、その生合成を調節する神経系の解明を目指して研究を行ってきた。

私の研究材料は、モデル生物の1つ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) である。ショウジョウバエは完全変態昆虫であり、幼虫期に2回の脱皮を行った後、体が十分なサイズに到達すると蛹、そして成虫へと変態する。ショウジョウバエの成長の過程で、血リンパ中のエクジステロイド濃度が時間的に適切に変動することで、脱皮と変態のタイミングが決定される。このエクジステロイド濃度の時間的な上昇と下降は、主には内分泌器官「前胸腺」でのエクジステロイド生合成の活発化の度合いによって調節されている[1]。前胸腺でのエクジステロイド生合成活性は、昆虫を取り巻く様々な外環境（餌、光、温度など）によって変化する。そして、こうした環境による変動は、前胸腺へとシグナルを伝達する神経系によって制御されていると考えられている。

先行研究によって、ショウジョウバエの脳から前胸腺に投射し、光あるいは栄養条件に応答してエクジステロイド生合成を促進させる2種類の神経細胞が同定されている[2,3,4]。一方で、個体を取り巻く複雑な外環境の変化に応じたエクジステロイド生合成の調節が、既知の2種類の神経細胞だけでは担うとは考えがたい。また、生体内でのエクジステロイド濃度の変動を考えれば、エクジステロイド生合成の制御に対して抑制的に作用する神経細胞も存在すると予想される。しかし、ショウジョウバエにおいてはそのような抑制的な神経はまだ見出されていない。これらの理由から、私はこれまで未発見の前胸腺に投射する神経細胞が存在すると仮説を立てた。そこで私は本研究で、前胸腺に投射しエクジステロイド生合成を制御する新規神経細胞・経路を発掘し、エクジステロイド生合成制御の新たな神経メカニズムを明らかにすることを目指した。

方法

前胸腺に投射する新規神経細胞を発見する上で、数万個もある神経細胞の中から何の情報もなしに新規神経細胞を見つけ出すのは難しい。そのため、まず初めにアメリカのハワードヒューズ医学研究所 Janelia Farm によって公開されているショウジョウバエ脳のイメージングデータベース[5]を活用し、ウェブサイト上で

閲覧できる約10000系統の脳神経細胞の解剖学的画像データを私自身の視点から精査し、脳から前胸腺に向かって投射する可能性のある神経細胞の候補を絞った。次に、候補の神経細胞を可視化するためのトランスジェニックシステムをアメリカの Bloomington *Drosophila* Stock Center から入手し、神経細胞の形態と前胸腺への投射を共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM700) を用いて詳細に記載した。

結果・考察

私は、Janelia Farm の画像データベースの情報を精査し、神経細胞可視化のための *GALA* トランスジェニック系統群の中から、前胸腺に投射する神経細胞をマーキングしている可能性のある79系統を選別した。その後、これらの *GALA* 系統を *UAS-GFP* 系統と交配させ、GFP ラベルされた神経細胞群の形態を詳細に観察した。この一連の研究の過程で私は、前胸腺に投射するこれまで未記載の新規神経細胞を複数発見することに成功した。さらに私は、未完成ながらもこれらの新規神経細胞の細胞体の同定と投射パターンを明らかにした。この結果は、私の当初の予測どおり、前胸腺でのエクジステロイド生合成は3種類以上の神経経路によって制御されることを示唆する。

一方、現段階ではこれらの新規神経細胞の解剖学のおよび機能的な特徴づけで多くの未解明の部分が残されている。最も重要な未解明の点として、新規神経細胞が発生過程のどのような局面で発火するのか、エクジステロイド生合成過程のどの触媒段階を制御しているのか、そしてそれは正か負のいずれの調節に関与するのかを挙げられる。こうした問題に対してさらに深く迫ることができるならば、本研究はエクジステロイド生合成を支配する新たな神経基盤の理解、さらには外環境に対して柔軟に適応する動物の発生メカニズムの理解に貢献すると考える。

参考文献

- [1] 丹羽 (2011) エクジステロイド生合成の調節機構、『脱皮と変態の生物学：昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う』（園部、長澤編） pp. 55-76
- [2] Siegmund and Korge (2001) Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*, *Journal of Comparative Neurology* 431, 481-491
- [3] McBrayer et al. (2007) Prothoracicotrophic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*, *Developmental Cell* 13, 857-871
- [4] Shimada-Niwa and Niwa (2014) Serotonergic neurons respond to nutrients and regulate the timing of steroid hormone biosynthesis in *Drosophila*, *Nature Communications*, 5, 5778.
- [5] Li et al. (2014) A GAL4 driver resource for developmental and behavioral studies on the larval CNS of *Drosophila*, *Cell Reports* 8, 897-908

ショウジョウバエのステロイドホルモン合成器官で発現する新規遺伝子の機能解析

高尾 悠 (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様々な多細胞生物の正常な発生や成長に重要な役割を担っている。昆虫における主要なステロイドホルモンはエクジステロイドと呼ばれる。

エクジステロイドは、脱皮を意味する「ecdysis」に由来する名称の通り、脱皮や変態などの昆虫の発生過程における劇的な変容を適切なタイミングで誘導するのに必須である。エクジステロイドが適切に機能するためには、これらの時間的ポイントの前に体内での生合成を活性化させることが必要である。現在まで検討されたあらゆる昆虫の幼虫において、エクジステロイドは前胸腺またはその相同な内分泌腺で生合成されることが確認されている[1]。

特にキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を用いた研究から、過去 10 年の間にエクジステロイド生合成を担う酵素の解明が飛躍的に進んだ。現在までに知られているエクジステロイドの生合成経路と生合成酵素は 図 1 のとおりである[1,2]。

これらのエクジステロイドの生合成を行う酵素の遺伝子群は Spook や Phantom といった幽霊を意味する名前が付けられていることが多く、これにあやかり「ハロウィン遺伝子群」と総称される。一方で、ハロウィン遺伝子群によってコードされている酵素の機能や活性は、発生過程の段階に応じて適切に制御されているはずであるが、その制御メカニズムには未だ不明点が多い。

私が所属する研究室の小村らによる先行研究で、ショウジョウバエ前胸腺でのエクジステロイド生合成の制御に必要な新規遺伝子の探索が行われた。この研究によって、いくつかの機能未知の遺伝子の前胸腺内での発現を二重鎖 RNA 干渉 (RNAi) 法によって抑制したところ、成虫にまで成長せずに死んでしまう表現型が現れた。また、それらのさらにいくつかの遺伝子では、発現抑制によって現れたその表現型が、活性型エクジステロイド (20-ヒドロキシエクジソン; 以下、20E) を摂取することにより回復することが分かった。私は、これらの機能未知の遺伝子群は前胸腺でのエクジステロイド生合成に関与する制御遺伝子をコードするのではないかと考えた。本研究では、既知の機能ドメインとの類似性を全く示さないタンパク質をコードする遺伝子 *UGE_{PG-1}* (仮称) について機能解析を行った。

方法

本研究で用いた、2 つの *UGE_{PG-1}* のノックアウト系統は、CRISPR/Cas9 システム[3] によって小村によって樹立された系統である。この系統は *UGE_{PG-1}* 遺伝子のコーディング領域の途中に 1 塩基または 4 塩基の欠失を持ち、結果として読み枠の途中にストップコドンを生じる (小村ら 未発表)。またこの系統は GFP を発現するバランスーによってバランスされているため、ノックアウトホモ接合体の識別は GFP 蛍光の有無によって判断できる。

(1) 致死時期の決定

UGE_{PG-1} ノックアウト個体の致死時期を調べるために、*UGE_{PG-1}* ホモ接合体あるいはヘテロ接合体 (コントロール) の幼虫を孵化直後に採取し、孵化後 2~36 時間での生存率を 2 時間ごとに計測した。

(2) 20E 摂取

UGE_{PG-1} RNAi 個体の成長阻害は 20E を摂取させることにより回復したが、*UGE_{PG-1}* ノックアウト個体でも同じように回復するか確かめる必要があった。この目的のために *UGE_{PG-1}* ノックアウトホモ接合体とヘテロ接合体 (コントロール) を、20E を混ぜ込んだ餌を含むグレーププレートに移し、72 時間後にそれぞれの生存率と成長段階を調べた。

(3) ハロウィン遺伝子群の発現量測定

UGE_{PG-1} は前胸腺でのハロウィン遺伝子群の発現調節に関与するかどうかを調べた。産卵後 36 時間経った *UGE_{PG-1}* ノックアウトホモ接合体とヘテロ接合体 (コントロール) から RNA を抽出し、定量逆転写 PCR によってハロウィン遺伝子群の発現量を測定した。

(4) *UGE_{PG-1}* の時間的な発現量変化の測定

野生型 Oregon-R の幼虫を孵化後 2~36 時間にかけて、2 時間ごとに採取し、RNA を抽出した。それらを鋳型として定量逆転写 PCR によって *UGE_{PG-1}* の発現量の時間的な変化を測定した。

結果

詳細は発表会にて報告する。

参考文献

- [1] 丹羽(2011)『脱皮と変態の生物学 - 昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う』(園部、長澤編) pp. 55-76.
- [2] Niwa and Niwa (2014) *Biosci Biotechnol Biochem* 78: 1283-1292.
- [3] Kondo and Ueda (2013) *Genetics* 195: 715-721.

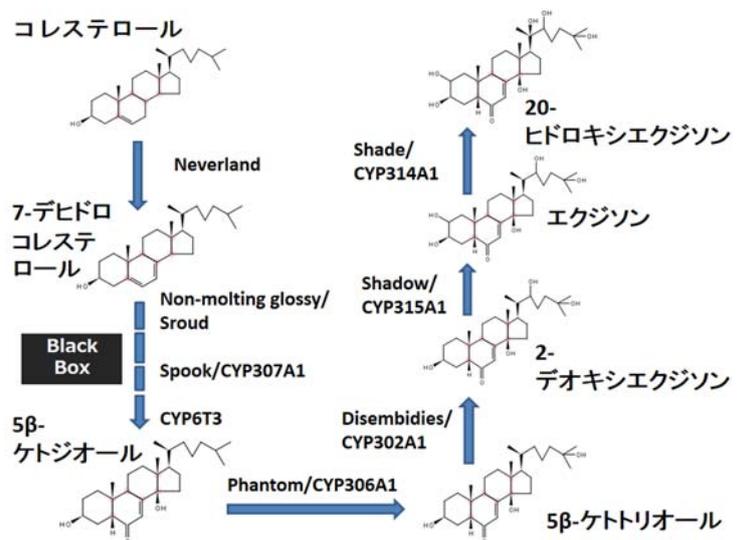


図 1 エクジソン生合成経路とそれに関与する酵素 [1]

ショウジョウバエの栄養状態に応答したモノアミン生合成酵素遺伝子の発現変化

竹股 ひとみ (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、発生や成長、生殖など様々な側面で役割を果たしている。中でも、動物において発生タイミングの制御における役割は重要で、幼若期にステロイドホルモンが特定のタイミングで生合成されることで個体は適切な時期により成熟したステージへと移行できる。この生合成タイミングは栄養状態や光といった外部環境によって変化するが[1,2,3]、外部環境がステロイドホルモン生合成タイミングを制御するメカニズムについては不明な点が多い。

今回私は、個体の栄養状態がステロイドホルモン生合成タイミングに影響を与えるメカニズムの解明を目的とし、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を材料として研究を行った。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、ショウジョウバエでは前胸腺という器官で生合成される。そこで私は、外部環境因子を前胸腺へ伝えるシグナル、そして前胸腺にはそれを受け取る受容体があるのではないかという仮説を立てた。

当研究室の島田が行った前胸腺特異的 RNAi スクリーニングにより、前胸腺でのエクジステロイド生合成に必須と考えられる受容体候補遺伝子が見出された(未発表)。本研究ではその受容体候補遺伝子のリガンドに注目し、幼虫期に摂取する栄養状態によってリガンドをコードする遺伝子やリガンドの生合成を担う酵素をコードする遺伝子の発現が、生体内のどこでどのように変化するかを解析した。

材料・方法

(1)ショウジョウバエ系統

野生型ショウジョウバエとして *Oregon-R* を用いた。後述(4)の実験に利用した *ddc-GAL4* と *UAS-GFP* 系統は米国の Bloomington *Drosophila* Stock Center より入手した。

(2)エサの調製とショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエにとって主なタンパク源は酵母である。当研究室の島田による先行研究より、酵母量の違うエサでショウジョウバエを飼育すると蛹化のタイミングに差が出るのがわかっている[4]。この先行研究を参考として私は、通常ハエを飼育しているエサの酵母量を基準とし、それよりも酵母量が多いエサ (Rich food) と少ないエサ (Poor food) を調製した。野生型の成虫を集めて交尾させ受精卵を回収したのち、孵化したばかりの1齢幼虫を Rich food と Poor food に分けて 25°C で飼育した。Rich food で飼育した野生型幼虫では孵化後平均 3.7 日で半数が蛹化するのに対して、Poor food で飼育した野生型幼虫では孵化後平均 6.8 日で半数が蛹化することを確認した。

(3)発現解析

飼育 4 日目の 3 齢幼虫の全身において、上述の候補受容体のリガンドをコードする遺伝子、またはリガンドの生合成を担う酵

素をコードする遺伝子の発現量を、定量的逆転写 PCR によって検討した。Rich food と Poor food で発現量に差があった遺伝子については、同じ条件で飼育した後に各組織を解剖によって摘出し、それぞれに由来する逆転写物を用いて定量的 PCR を行った。

(4)蛍光観察

発現量が高い組織が特定された遺伝子のうち、後述するように私はドーパ脱炭酸酵素遺伝子 (*dopa decarboxylase*, 以下 *ddc*) に焦点を当てた。*ddc* の組織別発現を詳細に検討する目的で、*ddc* のプロモーター活性の支配下で緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) を幼虫体内で発現させたトランスジェニック系統の蛍光を観察した。具体的には、ショウジョウバエで整備されている異所的遺伝子発現システムである GAL4/UAS システムを利用し、*ddc-GAL4* 系統と *UAS-gfp* 系統を交配させ、その子孫の幼虫での蛍光シグナルを蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(5)体液成分分析

Rich food あるいは Poor food で飼育した野生型幼虫から体液を採取した。体液中に含まれるモノアミン、アミノ酸、そして糖の成分を、質量分析計を用いて分析した。この分析に当たっては、(独)理化学研究所生命システム研究センターの升島努チームリーダーの研究室のご協力を得た。

結果・考察

飼育 4 日目に採取したサンプルで行った定量的逆転写 PCR により、飼育したエサの違いによって発現に差を示す候補リガンド遺伝子あるいは候補リガンド生合成関連遺伝子が特定された。その中でも特に顕著な発現の違いを示した遺伝子は、ドーパミンとセロトニンの生合成に必須の *ddc* であった。幼虫の各組織に由来する逆転写物を用いて定量的 PCR を行ったところ、*ddc* の発現量は幼虫表皮で顕著に高かった。*ddc* が幼虫表皮で多く発現していることは以前から知られていたが、その発現が栄養状態に応答するという報告はされていない。もし栄養状態に応答して発現が変化するのであれば、幼虫表皮の DDC によって生合成されるモノアミン類がシグナルとなり前胸腺へ働きかけ、エクジステロイド生合成に影響を与えて個体の発生を変化させるという仮説が考えられる。現在、*ddc* を含む複数の遺伝子の発現の違いが栄養状態と発生段階のどちらによるものなのかを調べるための準備を進めている。結果は発表会にて報告する。

参考文献

- [1]Rewitz *et al.* (2013) *Curr. Top. Dev. Biol.* 105: 37-67
- [2]Yamanaka *et al.* (2013) *Science* 341: 1113-1116
- [3]Niwa and Niwa (2014) *Genes Genet. Syst.* 89: 27-34
- [4]Shimada-Niwa and Niwa (2014) *Nat. Commun.* 5: 5778

内在性ステロイドホルモンは個体の寿命に影響を与えるか？

～ショウジョウバエを用いた分子遺伝学的追究～

山本 知奏（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）

目的・背景

ステロイドホルモンは、ヒトを含むほとんどの動物の発生や成長、性成熟に関与する生理活性物質である。昆虫における主要なステロイドホルモンは「エクジステロイド」と呼ばれている。エクジステロイドは昆虫の脱皮や変態の誘導に重要な役割を果たすことがよく知られている。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、長期記憶や卵形成、覚醒-睡眠サイクルの制御、求愛行動記憶などの様々な生理機能の制御に関与するとされている[1]。近年、エクジステロイド生合成に関する主要酵素の多くが同定され、幼虫期における生合成組織や発生過程における意義が解明された[2]。しかし成虫における生合成組織やその機能については明らかにされていない点が多い。

私の所属研究室では個体レベルの遺伝子解析に優れた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、エクジステロイドの機能に関する研究を行っている。所属研究室の天久らの研究によって、エクジステロイド生合成酵素遺伝子 *neverland* (*nvd*) の RNAi 個体では寿命が減少することが明らかになった(未発表)。これまで、エクジステロイドに対する核内受容体がショウジョウバエの寿命に関与することは報告されていたが[3]、天久らの研究成果は生合成過程の関与を示すはじめての成果である。そこで私は、ショウジョウバエ成虫を研究対象として寿命におけるエクジステロイド生合成の意義、成虫におけるエクジステロイド生合成組織の特定、およびエクジステロイドの効果の性差の解明を目的として研究を行った。

材料と方法

(1) ショウジョウバエ系統

本研究において、野生型として *yw* を用いた。 *nvd* 遺伝子をトランスジェニック RNAi によってノックダウンさせるためのヘアピン型一重鎖 RNA (*nvd-IR*) の発現には *UAS-nvd-IR* 系統[4]を用いた。 *nvd-IR* を全身あるいは神経特異的に誘導させるためにそれぞれ利用した *tubP-GALA* 系統と *elav-GALA* 系統は、いずれも米国 Bloomington *Drosophila* Stock Center より入手した。

(2) 寿命測定

羽化後 8 時間以内の未交尾メスを回収し、卵巣の成熟のために 3 日間置いた。その後、オスと 3 日間交尾をさせた。オスを回収し、エタノール含有の練酵母を塗ったグレープアガーの入ったバイアルにメスを移し、25°C で飼育した。その後、1-2 日おきに成虫の生存数をカウントした。測定には野生型、神経特異的 *nvd* RNAi 個体、および全身での *nvd* RNAi 個体を用いた。

結果

神経特異的な *nvd* RNAi 成虫のオスとメスを交尾させ、そのメスの寿命を測定したところ、野生型オスと交尾した野生型メスと比較して寿命の減少が見られた。この *nvd* RNAi メスにエクジステロイド生合成経路の中間物質である 7-デヒドロコレステロール(7dC)を混ぜた餌を摂食させたところ、寿命の回復が見られた。

次に、メスの寿命に交尾をするオスの遺伝型が影響する可能性を排除するために、メスと交尾をするオスの遺伝型をすべて野生型にしたところ、意外なことに神経特異的 *nvd* RNAi メスでの寿命の減少は見られなくなった。逆に、野生型メスを神経特異的 *nvd* RNAi オスと交尾させたところ、野生型メスの寿命の減少が見られた。オスがメスの寿命に影響を与えることの信ぴょう性を確かめるために、現在、 *nvd* RNAi 個体を用いた詳細な寿命の測定を行っている。結果は発表会にて示す。

考察

今回の寿命測定の結果から、エクジステロイドは成虫の寿命を制御しているということが示唆された。また、メスの寿命が交尾をするオスの神経系での *nvd* の活性に依存して変化することを示唆する結果から、エクジステロイドによって制御させるオスの何らかの要因がメスの寿命に影響を及ぼしている可能性が見出された。今後、交尾の際にオスからメスに受け渡される物質や交尾刺激など、どのファクターがメスの寿命に影響を及ぼしているのかを検討していく。また、エクジステロイド生合成に欠陥のある成虫の寿命が既存の寿命制御メカニズム(インスリンシグナルなど)に影響を与えるかどうか、詳細な発現解析などで追究していく。ショウジョウバエ成虫におけるエクジステロイドの役割を明らかにすることができれば、昆虫だけでなく幅広い生物に存在するステロイドホルモンによる生理活性機能の解明につながると考える。

参考文献

- [1] Schwedes and Carney (2012) *J. Insect Physiol* 58:293-302.
- [2] Niwa and Niwa (2014) *Biosci Biotechnol Biochem* 78:1283-1292.
- [3] Simon et al (2013) *Science* 299:1407-1410.
- [4] Yoshiyama et al (2006) *Development* 133:2565-2574.

Anti-Melanoma Effect of Caffeic acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester through the alleviation of Oxidative Stress

Maezono, Sakura Eri B. (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)

Introduction. According to American Academy of Dermatology (2013), one person dies every hour in the U.S. due to melanoma while incidence rates are higher in Australia. Oxidative stress activates transcription factors that lead to inflammatory pathways and in the long run, can play an important role in carcinogenesis mechanism i.e. melanoma development. Proliferation at high rates in cancer cells is closely associated to high concentrations of reactive oxygen species (ROS) [1]. Caffeic acid (CA), a polyphenolic phytochemical present in coffee beans and most vegetables, has numerous beneficial properties i.e. its anti-thrombotic effect [2]. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an ester derivative of CA found in Propolis, is another ideal example exhibiting diverse biological activities such as anti-inflammatory, neoplastic and anti-cancer activities as tested on a variety of cell lines [3,4]. Both compounds inhibit NF- κ B and certain enzyme activities such as lipoxygenases, cyclooxygenase, GST & xanthine oxidase and have been reported to have anti-metastatic and anti-tumor effects via selective MMP-9 enzyme activity suppression [5]. There are anti-cancer drugs available but are highly cytotoxic and have side effects. CA and CAPE meet the criteria of a desirable drug in terms of their bioavailabilities [6,7] and bioactivities having dual inhibitory activities for specific enzyme activities and melanoma-related proteins at the molecular level.

Materials and Methods. DPPH assay was performed on pure compounds of CA (C0625) and CAPE (C8221) to measure their radical scavenging activities. MTT assay was performed on B16 mouse melanoma and human epidermal melanocyte (HEM) to determine the effect of CA and CAPE on cell viability. Intracellular hydrogen peroxide produced by cells was measured using the OxiSelect fluorometric assay carried out on B16 and SK-MEL-28 human melanoma. Extracted proteins and RNAs were subjected to western blotting and real-time PCR, respectively, to quantify the expressions of the proteins associated with oxidative stress inhibition as well as to elucidate the pathways involved. Cell cycle assay was done to determine which phase the cells were arrested.

Results and Discussion. Various concentrations of CA and CAPE were tested and 15 μ m and 20 μ m were found to be the optimum concentrations. The effect of CA and CAPE were observed to be dose-dependent and their IC₅₀ values for DPPH radical scavenging activity were comparable to that of the standard, Trolox. Our results agree with previous studies [5] that structural factors contribute to apparent active scavenging radical activity of both test compounds specifically the catechol moiety with a 3,4-dihydroxyl configuration which

heavily influences their degrees of radical scavenging activity. These results suggest that these two compounds may be beneficial antioxidants for counteracting various free radicals under intracellular conditions. Differentiating the two, CA has one phenolic ring while CAPE have two phenolic rings linked by an esteric bond, as well as, a higher lipid solubility. A sensitive quantitative fluorometric assay was also carried out on untreated (control), pre- or post-treated with CA or CAPE to measure the hydrogen peroxide concentrations present in the cells. Interestingly, although CA was able to lower the level of oxidative stress brought by treatment with hydrogen peroxide. Given either as pre- or post-treatment, α -MSH (positive control) and CAPE were limited to inhibiting oxidative stress when given as a pre-treatment. This phenomenon is suggested to have been affected by the loss of α -MSH in the cell lines in the study which was naturally found in normal cells as its defense mechanism against ROS. The inhibitory activities can be explained by the regulation of oxidant and antioxidant balance in the cells and that non-enzymatic antioxidants like CA and CAPE react with oxygen free radicals to suppress the need for endogenous O₂-scavenging antioxidants and enhance the cellular antioxidant activity. The extent of inhibition of melanoma-associated proteins distinguishes the biological activities of the two compounds apart. There appears to be a structure-activity relationship responsible for the compound differences. Regulation of proteins p-38, p-21, AKT, phospho-p53, and genes *Mitf* and *Atm* revealed its action mechanism to be related to DNA damage response and repair. The cell cycle results indicated that the specific inhibition of *Mitf* in cells treated with CA and CAPE were associated with G0/G1 arrest. Both have potential anti-aging effects and possibly prevent melanoma owing to their anti-oxidant properties. Further studies will be performed to elucidate the mechanism of action of CA and CAPE and their possible therapeutic effects against melanoma *in vivo*.

References

- [1] Sosa V. et.al.(2013) *Ageing Res Rev.* **12**, 376-90
- [2] Gebhard C. et.al. (2013) *Biol Pharm Bull.* **36**(6):1032-5.
- [3] Yang C. et.al. (2005) *Toxicology.* **213**(1-2):81-96.
- [4] Hsu, L-Y., et.al. (2005) *Biol. Pharmaceu. Bull.* **28**:1211-1215.
- [5] Chung, TW, et.al. (2004) *FASEB J.* **18**(14):1670-81
- [6] Olthof MR, Hollman PC & Katan MB. (2001) *J Nutr.* **131**(1):66-71.
- [7] Demestre, M, et.al. (2009) *Phytother Res.* **23**(2):226-30.

The function and expression of anthocyanin pigments in the carnivorous plant, *Drosera rotundifolia*

Molly Jordan (筑波大学 生物学類) 指導教員 : Louis Irving (筑波大学 生命環境系)

When light stressed, the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* expresses red pigments known as anthocyanins, which causes the plants to change from green to red. This study seeks to address the cryptic function of anthocyanin pigments in *D. rotundifolia* by comparing capture rates of different insects between plants with expressed pigments and those without. We will determine when and why anthocyanins are expressed, and if this expression can be limited through increased prey nitrogen levels. Ten plants were chosen to determine if this expression could be depressed. Half of the plants were fed three worms a week for one month and the other half were cut off from all food sources. As a result, fed plants were greener, healthier and produced more leaves per plant. In contrast, unfed plants were smaller, less healthy and more susceptible to necrosis. Histograms showed a drastic decrease in red pigments in fed plants and an anthocyanin extraction protocol was used to confirm the existence of anthocyanins. Using a spectrophotometer we were able to determine the concentration of anthocyanins in both groups of plants.

Carbon and nitrogen interactions between *Phtheiospermum* /*Orobanche minor* and host *T. pratense*

Fu Xingyu (筑波大学 生物学類) 指導教員 : Irving Louis (筑波大学 生命環境系)

<Introduction>

Parasitic plants are reliant on their hosts' nutrient supply. They can be characterized into different categories in the terms of their physiological properties.

Phtheiospermum is a xylem feeding facultative hemiparasite, which can perform photosynthesis by itself and is primarily parasitic for N and water from the host's xylem. *Orobanche minor* is a phloem feeding obligate holoparasite, which cannot perform photosynthesis, thus, it is mainly parasitic for C from the host phloem.

Previous studies mainly focused on studying the compared the influence of *Phtheiospermum* and *Orobanche* on a single host, *Trifolium pratense* (red clover), to investigate the carbon and nitrogen interactions between parasites and their host. We hypothesized that the photosynthetic performance of the *Phtheiospermum* infected host would be lower than the control, due to N deficiency caused by infection, which inhibits the synthesis of chlorophyll and photosynthetic proteins. On the other hand, for the *Orobanche minor* infected host, we hypothesized that the photosynthetic capacity would be elevated due to the C deficiency of the host. (1)

<Materials and Method>

Seeds of *T.pratense* (host) were germinated and *O. minor* seeds were inoculated onto the roots of the host, while *Phtheiospermum* seedlings were placed near the host.

Plants were grown in a growth chamber, with a 16 h light at 25°C: 8 h dark photoperiod at 15°C with a relative humidity of 75%. Hoagland solution was supplied to each group. On 45, 60, 75 days, the chlorophyll fluorescence (ΦPSII and Electron transport rate) of the host was investigated. After 11 weeks' growth, the hosts and parasites were harvested and separated into roots and shoots. Representative leaves of infected and uninfected *T. pratense* were ground to measure the N, chlorophyll, Rubisco content and all plant parts were dried and weighed.

<Results and Discussion>

The shoot mass and root mass of *O. minor* infected hosts was significantly lower than controls, while, the only the shoot mass of *Phtheiospermum* infected hosts was significantly lower compared with control. This result indicated the growth of parasitized host was suppressed.

By 75 days, the ΦPSII and ETR of each groups were same, which differed from the our hypothesis. Further, we had a novel finding of temporal changes of the photosynthetic performance

in parasitized hosts. For *Phtheiospermum* infected host, the ETR was lower than control on 45days, however it had recovered to control levels by 60 days. Similarly, for *O. minor* infected host, the ETR was lower than control on 45 and 60days, but it recovered to the control level on 75 days. This result may indicated that the infected hosts were physiologically stressed at the early stages of infection, but recovered to normal physiological conditions after the parasites had been growing for a period of time.

There was no significant differences in the N, chlorophyll, or Rubisco content between parasites infected hosts and control plants.

In conclusion, under N sufficient condition, there was no significant differences in the N, chlorophyll, and Rubisco content between infected hosts and uninfected plant. However, the infection of parasites suppressed the host photosynthesis at the early stage and inhibited the host' s growth.

<References>

1. J. M. HIBBERD *et al* (1999) Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobanche cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant, Cell and Environment* 22, 937-947

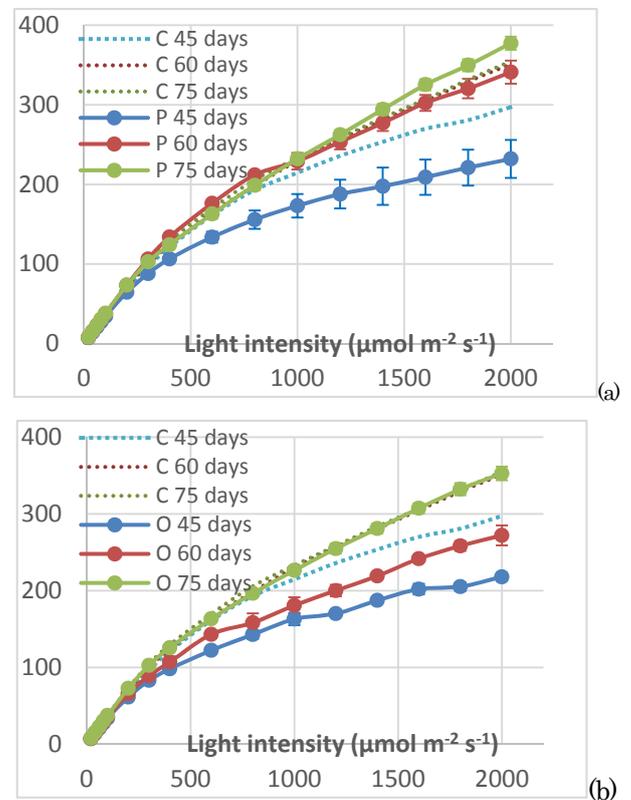


Fig. Temporal changes of ETR of infected hosts (solid lines) and control (dotted lines). a. Infection by *Phtheiospermum*, and b. Infection by *O. minor*.