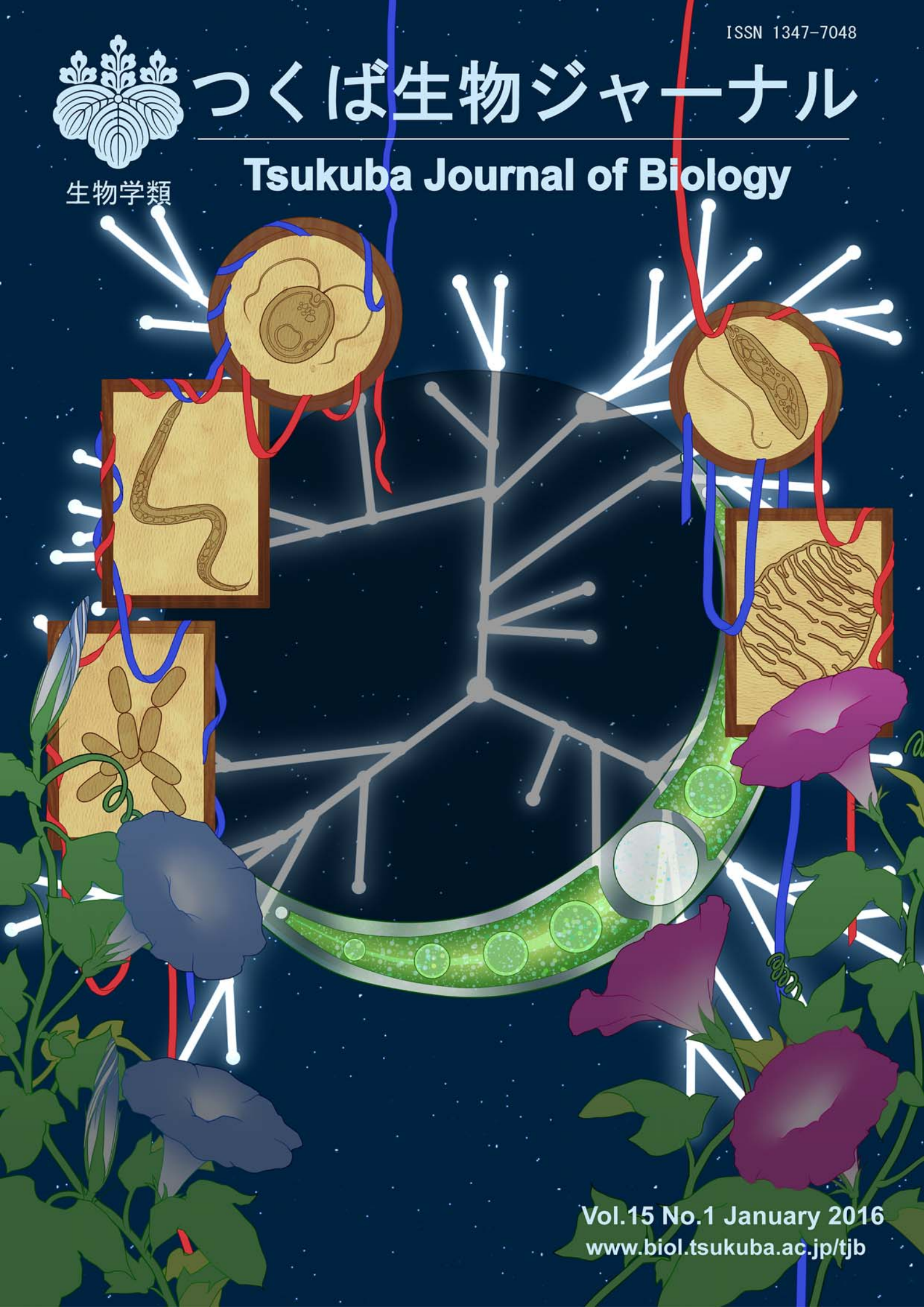




生物学類

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.15 No.1 January 2016
www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

平成 27 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 28 年 2 月 20 日

筑波大学
生物学類

第一会場 2B411 教室

8:55 – 9:10	柴田 健司	線虫の寿命延伸に対する米ケフィランの生理作用解析	2
9:10 – 9:25	菅原 賢也	長寿遺伝子を介した線虫のホルミシス効果の解析	3
9:25 – 9:40	高橋 遥	線虫を用いた琥珀エタノール抽出物の生理活性機能の解析	4
9:40 – 9:55	四元 陽香	α -mangostin はメラノーマ細胞のメラニン生成を抑制する	5
10:10 – 10:25	石塚 絢子	光受容細胞で遺伝子を特異的に発現させるメカニズムの解明	6
10:25 – 10:40	田島 由佳子	動物間で保存された <i>Hox</i> 遺伝子群のホヤにおける新規機能の解明 - <i>Hox13</i> による感覚器官の形成-	7
10:40 – 10:55	山路 草太	変態期にホヤ幼生の尻尾が吸収されるメカニズムの解析	8
10:55 – 11:10	松永 杏樹	成体イモリがみせる網膜再生の原理を適用した新規 RPE 培養法の開発	9
11:10 – 11:25	加瀬谷 治樹	大脳皮質ニューロンの神経回路形成におけるセロトニン 4 型受容体の機能解析	10
12:15 – 12:30	佐藤 雪歩	オルガネラバイオロジー：変異型 mtDNA が及ぼす影響	11
12:30 – 12:45	谷 春菜	植物ホルモン様物質がミトコンドリアの機能に及ぼす影響の解析	12
12:45 – 13:00	長島 瑠子	ミトコンドリア tRNA 遺伝子に病原性突然変異を有するマウスの作製	13
13:00 – 13:15	本間 耀	ミトコンドリア病モデルマウスの病態発症機構におけるミトコンドリア分裂の役割	14
13:15 – 13:30	小林 央人	ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ遺伝子の成体マウス脳における発現細胞の解析	15
13:45 – 14:00	黒木 崇央	インフルエンザウイルスゲノムの細胞膜へのターゲティングを制御する分子機構	16
14:00 – 14:15	多久 智大	鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物細胞への感染性を規定する分子機構の解明	17
14:15 – 14:30	松永 有里菜	骨を溶かす細胞(破骨細胞)が分化する過程で転写因子 MafB は何を行うのか	18
14:30 – 14:45	涌井 宏優	マクロファージにおけるムチン型糖鎖の生理機能解析	19
14:45 – 15:00	岩崎 加奈子	遺伝薬理学的手法による中枢セロトニン神経の除去と睡眠覚醒への影響	20
15:00 – 15:15	吉田 光作	線虫 <i>C. elegans</i> を用いた睡眠を制御する遺伝子の探索	21

第二会場 2B412 教室

8:55 – 9:10	亀井 優奈	カフェインで誘導される新規細胞死経路関連遺伝子の探索	22
9:10 – 9:25	関口 実歩	細胞は右利きか左利きか？－運動方向性の偏りの解析－	23
9:25 – 9:40	吉田 健太郎	逆遺伝学的手法による細胞性粘菌のソリトン様運動関連遺伝子の探索	24
9:40 – 9:55	綿谷 光高	生細胞における三量体型 G タンパク質の活性検出のためのプローブ開発	25
10:10 – 10:25	小林 和真	ゾウリムシの化学受容に対する環境因子の効果	26
10:25 – 10:40	鈴木 菖平	ゾウリムシの繊毛再生とそれに伴う行動反応の変化	27
10:55 – 11:10	酒井 祐貴子	ウシガエル味細胞の電気的特性の解析	28
11:10 – 11:25	中川 将志	イモリ嗅細胞の混合臭刺激に対する応答の解析	29
12:15 – 12:30	森山 大気	USP15 による mRNA スプライシング制御と特異性解析	30
12:30 – 12:45	風穴 彰洋	プロテアソーム制御因子欠損マウスが雄性不妊であることの原因を探る！	31
12:45 – 13:00	相原 拓馬	脳内オートファジーと連動する新規経路の解析	32
13:00 – 13:15	市村 春嘉	ミクログリア応答を制御する新規候補因子の解析	33
13:15 – 13:30	岡島 智美	細胞外因子によるミクログリア活性制御機構の解析	34
13:45 – 14:00	井口 彰	ショウジョウバエ概日時計調節遺伝子の発現メカニズムの追究	35
14:00 – 14:15	松岡 怜奈	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因子の探索と機能解析	36
14:15 – 14:30	吉成 祐人	生殖幹細胞の増殖を制御する因子の探索－ショウジョウバエを用いた解析－	37
14:30 – 14:45	山岸 美菜	赤痢アメーバにおけるグリセロール生合成経路の同定と解析	38
14:45 – 15:00	倉持 大地	精子における”転写”は、刷り込みメチル化の引き金となるのか？	39
15:00 – 15:15	石坂 望生	繊毛虫 <i>Tetrahymena thermophila</i> の細胞質ダイニン DYH1 の機能解析	40

第三会場 2C404 教室

8:55 – 9:10	加藤 雄大	クロララクニオン藻に近縁な無色ケルコゾア生物の探索	41
9:10 – 9:25	鈴木 大智	ヤブレッツボカビ類における炭化水素高生産株の探索	42
9:25 – 9:40	塚越 智夏	ハプト藻 <i>Chrysochromulina parkeae</i> の培養株確立と微細構造	43
9:40 – 9:55	谷 徳美	塩濃度条件の変化に対するオーランチオキトリウム淡水順化株の脂質合成量の解析	44
10:10 – 10:25	浦尾 唯	トマト果実成熟過程における果実硬度変化に対する塩ストレスの影響	45
10:25 – 10:40	竹内 春樹	ペクチン分解酵素過剰発現イネを用いた環境ストレス応答におけるペクチンの機能解析	46
10:40 – 10:55	柳 英弓	環境ストレス条件下のトマト果実成熟過程におけるアスコルビン酸細胞壁可溶化機構に関する研究	47
10:55 – 11:10	納谷 典明	キシロシダーゼ過剰発現イネを用いた重力屈性の偏差成長における細胞壁機能に関する研究	48
11:10 – 11:25	服部 優理那	シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合に関与する細胞壁酵素に関する研究	49
12:15 – 12:30	影山 丈士	アイSprant由来 <i>RBP</i> 遺伝子の機能解析と耐塩性付与を目的としたジャガイモへの導入	50
12:30 – 12:45	宍戸 敦子	ラン藻由来 <i>Δ9 desaturase</i> 遺伝子導入ユーカリの隔離ほ場試験による耐冷性評価	51
12:45 – 13:00	永田 真梧	マングローブの耐塩性遺伝子を導入したジャガイモの作成と耐性評価	52
13:00 – 13:15	小林 安那	CRISPR/Cas9 によるアサガオのゲノム編集	53
13:15 – 13:30	矢澤 美季	GM 作物を用いた食べるワクチンの開発に関する研究	54
13:45 – 14:00	上舘 巧嵩	除草剤多剤抵抗性タイヌビエにおける ACCase 阻害剤抵抗性機構の解明	55
14:00 – 14:15	竹内 優奈	トウモロコシ幼植物体での β -カリオフィレンによる生育促進作用におけるオーキシシンとエチレンの関与	56
14:15 – 14:30	横田 麻梨子	種内での遺伝的多様性と温暖化に対する安定性との関係	57
14:30 – 14:45	草刈 雅和	微生物による植物由来芳香環化合物の代謝に関する研究	58

第四会場 2C410 教室

8:55 – 9:10	鈴木 瑞穂	ヒラタアブ属が示すためらい行動の適応的意義の解明	59
9:10 – 9:25	船本 大智	見た目とミスマッチな受粉様式：ツリガネニンジンにおける夜行性ガ類にたよった花粉媒介	60
9:25 – 9:40	宮田 凌佑	セスジアカムカデ中のアピコンプレクサ寄生虫のリボソーム RNA 系統解析	61
9:40 – 9:55	山下 祐紀子	不完全さび菌 <i>Uredo iyoensis</i> の系統位置の推定と夏胞子の二形性についての検討	62
10:10 – 10:25	柏原 秋穂	ショウジョウバエの痛覚受容シグナルに関わる神経ペプチドの探索	63
10:25 – 10:40	佐藤 智士	新規カルシウムレポーターCaMPARI を使用したショウジョウバエ報酬神経系の解析	64
10:40 – 10:55	相馬 朱里	ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク遺伝子 <i>DISC1</i> と脆弱 X 症候群遺伝子 <i>FMRI</i> との遺伝学的相互作用の解析	65
10:55 – 11:10	奥成 潤	人工飼養ミツバチ (<i>Apis mellifera</i>) の幼虫における初期カースト分化関連遺伝子の発現解析	66
11:10 – 11:25	石原 輝人	細胞性免疫に関わるアワヨトウレクチンの機能解析	67
12:15 – 12:30	網本 壮一郎	形成メカニズムの比較からヤツメウナギと顎口類の脊椎骨の相同性を探る	68
12:30 – 12:45	梶野 瑞貴	ワレカラ類における付属肢の発生学的研究—第 3,4 胸肢の喪失と再獲得—	69
12:45 – 13:00	仁戸部 真生	ヒトデのブラキオラリア腕に関する進化発生学的研究	70
13:00 – 13:15	清水 壮	南西諸島および台湾のウスモンアメバチ属 <i>Leptophion</i> の分類学的研究	71
13:15 – 13:30	関口 桂菜	唇脚類における卵巣の比較形態学的研究	72
13:45 – 14:00	Chang Kai Yuan	Experimental Analysis of Effects of Ocean Acidification on Coastal Phytoplankton Community	73
14:00 – 14:15	山崎 航	Thermal performance of the temperate coral <i>Porites heronensis</i> : significance for its future distribution	74
14:15 – 14:30	恵比須 春菜	γ -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin の抗腫瘍活性検討	75
14:30 – 14:45	工藤 駿	海産生物由来抗ウイルス活性物質 eudistomin C の作用機構解析	76
14:45 – 15:00	山崎 洋平	微生物由来可逆的 tight junction 開口物質作用機構解析	77

平成 27 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

倉持 大地

石崎 光理

ガニエ 拓也

小林 沙羅

佐々木 悠子

佐藤 啓輔

高野 美幸

町野 弘明

三田 堂人

山川 宇宙

山川 隼平

表紙画

高橋 遥

表紙画の解説：

夜空に広がる星座を模した系統樹は、生物学という宇宙のように広大な学問の規模を示しています。額縁はその生物学を探索する人間の「限りある視野の狭さ」を表しており、生命の本質である DNA の二本鎖をイメージした赤色と青色のリボン、そしてモデル植物であるアサガオで彩りました。今後とも視野を広げながらも驕らず謙虚な姿勢で生物学に携わっていければと思います、こちらの表紙画を描かせて頂きました。

表紙画を描く機会を与えてくださった倉持大地さん、ならびに制作にあたって助言をくださった先生や同期の皆さん、本当にありがとうございました。

平成 27 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあって

倉持 大地（筑波大学 生物学類 4 年）

JR 秋葉原駅から、電車で 46 分。都心から離れ、つくば市に移り住んだのは思えばもう 4 年前。染み入るような寒さの中、入学式に参加したことが昨日のように感じられます。大学での大きなイベントも残りわずか、その一つが卒業研究発表会です。

初めて発表会に赴いたのは 1 年生の終わり頃、大学生活にも慣れ、4 年生になった時の自分を少しずつイメージし始める時期でした。概論を終え、「少しは発表内容を理解できるだろう」と踏んでいましたが、全くの見当違い。聞き慣れない専門用語、飛び交う質疑に、ただただ圧倒されました。自身の勉強不足を思い知り、「3 年後、先輩方のようになれるのだろうか？」と不安に感じたことを良く覚えています。

2、3 年生では、運営スタッフとして卒業研究発表会に関わりました。特に印象深かったのは 3 年生の頃に参加した発表会。見知った先輩方の発表を見ることができたためです。いつもにこやかな先輩方の顔も発表の際は、打って変わって真剣そのもの。張りつめた空気の中、堂々と発表を行う先輩方の姿は、卒業研究を行った 1 年間の濃密さを窺わせるものでした。それから 1 年の月日が経ち、今年はいよいよ、私たちが発表をする立場です。

卒業研究では、数多くの慣れない作業をこなす必要がありました。英語論文の閲覧や、数々の実験など、例を挙げればきりがありません。たった 1 年間ですが、苦勞したことや失敗したことなど、苦い思い出がたくさんあります。しかしながら、大変な思いをしてデータを得られた時の喜びは何事にも代え難いものでした。発表会では、内容はもちろんのこと、発表者にも注目していただければと思います。きっと、どこか誇らしげな姿をしていることでしょう。

発表会は、後輩の皆さんにとって、卒業研究を知るまたとない機会です。積極的にたくさんの発表を聞いてみてください。疑問が浮かんだら質問をしてみるのも良いです。大勢の前で質問をするのが恥ずかしければ、個別に聞きに行くことも可能です。優しく、丁寧に答えてくれると思います。もしかすると、研究室についても聞けるかもしれません。

最後になりますが、卒業研究発表会の企画、運営をして下さった 2、3 年生には、大変な苦勞をかけたことと思います。本当にありがとうございました。そして、4 年間ご指導をして下さった先生方、支えて下さった事務の方々に心より感謝申し上げます。先生方の奥深い授業、事務の方々のサポートのおかげで、生物学についてより深く知ることができました。皆様のお力添えがなければ、今の私たちはありません。

つくば駅に向かう途中、意識をしながら周りを見渡すと、様々なものが見えてきます。ループ道路に設置された街灯、1 学に出来たグローバルコモンズ、体芸エリアの大きな体育館、そして、つくば駅前の BiVi つくば。いずれも、私たちが入学した頃は存在しなかったものです。「気づかぬうちにいろいろなものが出来ていたのだな」と感じ入る今日この頃。足早に過ぎ去った 4 年間も、実際には長い期間だったのだと実感させられます。

Communicated by Kenji Miura, Received January 13th, 2016.

線虫の寿命延伸に対する米ケフィランの生理作用解析

柴田 健司 (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】

昨今、国民の平均寿命と健康寿命の間のギャップ(約 10 歳)が大きな社会問題とされており、健康や寿命に密接に関わる食についても関心が高まっている。世界的に長寿で知られるコーカサス地方では、発酵乳ケフィアが伝統的に愛飲され、その中に含まれる粘質多糖ケフィランが長寿の秘訣とされている。粘質多糖ケフィランには抗動脈硬化や抗アレルギー作用、整腸作用などの効果があることが分かっているが、健康寿命を司る長寿遺伝子に対する作用はまだ解明されていない。

そこで本研究では、粘質多糖ケフィランをより多く含む機能性食品の米ケフィランを用い、線虫に対する生理作用の解析を通して長寿遺伝子への働きを調べることを目的とした。

本研究では、長寿遺伝子の中でもフォークヘッド型転写因子ファミリーの FoxO サブグループに属する *daf-16* に焦点を当てた。FoxO 遺伝子は、ストレス防御や老化速度を決定する上で中心的な役割を果たすことがこれまでに確認されている。

【材料・方法】

(材料)

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 (Nematode Growth Medium) プレート上で飼育した。

(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 と米ケフィラン抽出物の混合液を塗布した NGM プレート上に移した。同調処理した幼虫を成虫になるまで 96 時間培養し、実験に用いた。飼育温度は 20 °C である。

(1) 寿命に対する効果

96 時間培養した線虫を 20 °C の環境下で飼育した。2 日毎に生存個体数を測定した。

(2) 熱ストレス耐性(生存率)に対する効果

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

(3) 熱ストレス耐性(運動性)に対する効果

96 時間培養した線虫に 35 °C の熱ストレスを 4 時間与え、4 時間後を 0 時間として、0、12 時間後の線虫のスラッシング運動回数を測定した。また *daf-16* 欠損型の変異体を用いて同様の実験を行った。

(4) 老化に伴う運動性低下に対する効果

96 時間培養した線虫を 20 °C の環境下で飼育した。0、3、6、9 日後の線虫のスラッシング運動回数を測定した。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。

【結果】

- (1) 米ケフィラン抽出物の投与により線虫の寿命が延伸した。
- (2) 熱ストレス下において、米ケフィラン抽出物の投与により、線虫の生存率の低下が抑えられた。
- (3) N2 株では 0 時間後には変化がみられなかったが、12 時間後では米ケフィラン抽出物の投与により、熱ストレス処理後の運動性の回復増進効果がみられた。また変異体ではすべての時間で変化しなかった。
- (4) 米ケフィラン抽出物投与により、老化による運動性低下が回復した(一部、研究室の既知の見解を含む)。
- (5) 米ケフィラン抽出物の投与により、線虫の体長が若干伸長した。

【考察・今後の展望】

本実験から、米ケフィラン抽出物は寿命延伸や熱ストレス耐性を始めとした様々な生理作用を示すことが示唆された。寿命延長やストレス耐性の向上などの生理作用は長寿遺伝子の活性化が一因していることが報告されていることから、米ケフィラン抽出物は長寿遺伝子に何らかの影響を与えていると考えられる。

また N2 株では熱ストレス後の運動性が米ケフィランにより顕著に回復したが、*daf-16* 欠損変異体では変化がみられなかった。そこで、今後は *daf-16* を中心として具体的な長寿遺伝子に焦点を当て、変異体を用いた生理作用解析や、DAF-16 の活性化および遺伝子発現の解析など作用機序の解明を行う予定である。

長寿遺伝子を介した線虫のホルミシス効果の解析

菅原 賢也 (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】

細胞や生物個体は、強いストレスを受けるとタンパク質の変性や細胞死を起こすのに対し、弱いストレスに対しては生理作用の活性化が起こり、そのストレスに対しての抵抗性を得る。このような現象をホルミシス効果という。

これまでに、ホルミシスを起こした生物では、ヒートショックファクターやヒートショックプロテインなどのストレス応答性の遺伝子の活性化が報告されている。

一方、長寿遺伝子は古くは酵母、線虫、ショウジョウバエで発見され、現在では相同な遺伝子の一つである FoxO などがヒトを含む高等動物でも幅広く発見されている。この遺伝子を活性化することで様々な生理作用が活性化し、寿命が延伸することが報告されている。

モデル生物として知られる線虫 (*C. elegans*) は、通常 20°C の環境で寒天培地を用いて培養するが、35°C の強い熱ストレス環境下では 18 時間程度しか生存することができない。そこで、本研究では、ホルミシスを起こさせるストレス源として 30°C の弱い熱ストレス刺激を用いた。本研究は、線虫を弱い熱ストレスに曝すことで、長寿遺伝子を介したホルミシス効果が得られるかどうかを解析することを目的とした。

【方法】

本研究では弱い熱ストレスに曝すことを「プレトリートメント」と称した。また、いずれの実験も発生段階を揃えるため、NaClO により成虫を破碎、卵を回収した後、S-basal で 18 時間培養(同調処理)した線虫を用いた。同調処理後、96 時間経過した線虫を成虫期とした。

(1) 熱ストレス耐性の測定

30 分、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした成虫期の野生型線虫(N2)を 35°C の熱ストレスに曝し、10 時間経過後から 2 時間おきに生存個体数を測定した。また、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした欠損変異体(*daf-16*)を用いて同様の実験を行った。

(2) 運動性能維持の測定

成虫期の線虫に毎日 2 時間プレトリートメント処理をして、スラッシング運動回数を 3 日毎に測定した。また、幼虫期の線虫に対して 30 分、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした後、スラッシング運動回数を 3 日おきに測定した。

(3) 欠損変異体を用いた寿命の測定

30 分、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした成虫期の線虫(N2 及び *daf-16*)を 2 日毎に観察し、生存個体数を測定した。線虫の生殖機能を阻害するために同調処理後 72 時間、96 時間後に DNA 合成阻害剤である FUDr を添加した。

【結果】

- (1) プレトリートメント処理をした線虫では生存率が上昇していた。また、4 時間プレトリートメントしたものが最も効果が高かった。欠損変異体を用いた実験でも同様に 4 時間プレトリートメントしたものが最も効果が高かった。
- (2) プレトリートメント処理をした線虫はしなかった線虫と比べてスラッシング回数の減少が抑えられた。また、幼虫期の線虫に対して行った実験では、4 時間プレトリートメントしたものが最も効果が高かった。
- (3) 野生型においてプレトリートメント処理をした線虫としなかった線虫の寿命に変化はなかった。また、欠損変異体を用いた実験でも同様に寿命に変化はなかった。

【考察と今後の予定】

本実験の結果から、弱い熱ストレス刺激は線虫の熱ストレス抵抗性を上昇させた(ホルミシス効果)。また、プレトリートメントは 30 分や 1 時間処理した場合よりも 4 時間処理した場合の方が効果が高かったことから、長時間のプレトリートメント処理の方がより効果的であると考えられる。また、線虫は老化により運動性能が減少していくが、プレトリートメント処理した線虫はその現象が抑えられていることから、プレトリートメント処理には一種の抗老化作用があると考えられる。

長寿遺伝子が活性化した線虫では、ストレス耐性の上昇、運動性能の維持、寿命の延伸などの効果が報告されていることから、プレトリートメント処理をした線虫では長寿遺伝子が活性化していることが予想される。

本実験の結果から、熱ストレス耐性が上昇していたため、熱ストレス耐性に関わる遺伝子の上位に存在する長寿遺伝子の *daf-16* に注目したが、欠損変異体を用いた実験と野生型の実験の結果に差がなかったことから、ホルミシス効果には *daf-16* は関係していないと考えられる。今後はその他の長寿遺伝子が活性化されているかどうかを確認し、更には活性化した長寿遺伝子の同定を検討している。

また、(2)の実験で幼虫期の線虫にプレトリートメント処理をしたものでも成虫段階の運動性能が維持されていたことから、幼虫期の遺伝子活性が成虫期でも維持されているか qRT-PCR を用いた測定を検討している。

線虫を用いた琥珀エタノール抽出物の生理活性機能の解析

高橋 遥 (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】

装飾品として広く用いられている琥珀 (コハク) は元を辿れば古代マツ科の樹液で、樹脂や精油、コハク酸を含有する植物由来の宝石である。宝石として重用される一方で、体の不調を緩和する民間療法としても琥珀は世界各国で古くから利用されてきた。

現在ではマウスや動物細胞を用いた研究から、肌荒れ防止効果やチロシナーゼ活性阻害能、B16 メラノーマ細胞におけるメラニン産生抑制活性やグルタチオン産生促進活性など健康や美容に対する効果が報じられており、琥珀の持つ生理活性機能が着目されつつある。琥珀の生理活性機能を実験的に明らかにし、採掘されたコハクの装飾品以外の産業利用ひいては健康利用に役立てることが本研究の目的である。

本研究では、モデル生物である線虫 *C.elegans* に琥珀エタノール抽出物を投与し、生理活性機能の解析を行った。

【方法】

<モデル生物>

本研究では *C.elegans* var. Bristol (N2 株) を用いた。線虫は大腸菌 OP50 株を播種した NGM (Nematode Growth Medium) プレートで飼育した。飼育温度は 20°C である。

<同調処理/材料>

発生段階を揃えるため、成虫となった線虫を次亜塩素酸処理によって破碎し虫卵のみを回収後、18 時間 S-basal で培養した。琥珀エタノール抽出物を Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、更にこれを OP 飼料と混合し NGM プレートに添加した (琥珀プレート)。その後、幼虫を琥珀プレートで 72~96 時間培養し、これを実験に用いた。

(1) 脂肪蓄積量の測定

96 時間培養した線虫を Nile-Red で染色し、8% エタノールにより麻酔後、蛍光顕微鏡で観察した。

(2) 体長の測定

72 時間培養し、8% エタノールで固定後線虫の体長を測定した。

(3) 熱ストレス耐性 (生存率)

96 時間培養した線虫を 37°C の熱ストレス下で飼育し、2 時間毎に生存個体数を測定した。

(4) 熱ストレス耐性 (運動性)

96 時間培養した線虫を無菌培地に移した後、4 時間 35°C の熱ストレス下で飼育した。4 時間後を 0 時間とし、0, 12, 24 時間おきに線虫の thrashing 運動の回数を測定した。

(5) 抗老化 (運動性)

96 時間培養後、3 日毎に線虫の thrashing 運動の回数を測定した。幼虫の混入を防ぐため、DNA 合成阻害剤である FUdR を用いた。

(6) 寿命測定

96 時間培養後、2 日毎に生存個体数を測定した。幼虫の混入を防ぐため、DNA 合成阻害剤である FUdR を用いた。

【結果】

琥珀エタノール抽出物の投与により、

- (1) 脂肪蓄積量は変化しなかった。
- (2) 体長は短縮する傾向が見られた。
- (3) 37°C の熱処理により、生存個体数は減少した。
- (4) 熱ストレス耐性 (運動の回復率) は上昇する傾向が見られた。

(5)、(6) は現在進行中であり、上記の実験も必要に応じて繰り返し実施中である。

【考察・今後の展望】

体長短縮の理由として成長・発生の遅延が考えられるため、琥珀エタノール抽出物の投与による発生・老化の解析を予定している。また、熱ストレス耐性の実験においては運動性に変化が見られたことから、琥珀エタノール抽出物は運動性の低下を抑制する可能性がある。

今後は生理活性機能の解析を重ね、更に遺伝子発現の解析や変異体を用いた解析などにより作用機構を解明すると同時に、有効成分の同定を行う予定である。

α-mangostin はメラノーマ細胞のメラニン生成を抑制する

四元 陽香 (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、ポリフェノールやカテキンなど様々な植物由来の化学物質 (ファイトケミカル) が健康や美容に対してよい効果を示すことが明らかにされ、社会から多くの関心を集めている。その一つに、マンゴスチンという植物の果皮の主成分でポリフェノールの一種である α-mangostin が知られている。マンゴスチンは熱帯地域に生育する常緑樹であり、その果実は東南アジアを中心に生産されている。現地では、マンゴスチンの果実は食用だけでなく様々な民間治療薬として古くから使われており、皮膚病や胃腸不全の治療薬や解熱剤としても利用されている。

これまでに、α-mangostin については様々な基礎研究が行われており、抗腫瘍作用や抗酸化作用を示すことが知られている。本研究の先行研究では、脂肪細胞 (3T3L-1) の分化抑制や脂肪蓄積抑制効果を示すことが分かっており、肥満防止効果が期待されている。

本研究では、皮膚細胞、特にメラニンを生成する皮膚がん細胞であるマウスメラノーマ細胞 (B16F10) に対する、α-mangostin の生理活性作用の解析を目的とした。

【方法】

いずれの実験もマウスメラノーマ細胞 (B16F10) を用いて行った。α-mangostin は DMSO に溶かし、濃度は 3, 6, 9 μM に設定した。各実験のコントロールは DMSO とした。(1) (2) (4) の実験は α-mangostin 処理から 3 日後の細胞を用いた。

(1) 細胞生存率

細胞内ミトコンドリア活性を調べる MTT assay と Trypan blue による細胞内染色法を用いて、α-mangostin が細胞生存率に与える影響を調べた。

(2) 細胞内メラニン生成量

α-mangostin がメラノーマ細胞のメラニン生成にもたらす効果を調べるために、細胞内のメラニン生成量の測定を行った。試薬処理 3 日後の細胞を回収して NaOH に溶かし、波長 475 nm における吸光度を測定した。各値はタンパク量で補正した。

(3) 細胞増殖率

α-mangostin が細胞増殖に与える影響を調べるため、試薬処理 0 日目から 5 日目までの細胞増殖率を調べた。各サンプルの細胞を回収し血球計数盤で細胞数を数え、細胞増殖率の推移を比較した。

(4) チロシナーゼ活性

メラニン生成を促す酵素チロシナーゼに対する α-mangostin の働きを調べるため、チロシナーゼ活性を測定した。細胞を回収後粉碎し、チロシナーゼの基質である L-DOPA を与えた。メラニン生成量はチロシナーゼ活性に伴い上昇することから、各サンプルの 1 時間のメラニン生成量の変化を 10 分間隔で測定した。

【結果】

- (1) MTT assay による解析では、α-mangostin は濃度依存的に細胞毒性を示した。Trypan blue による測定では、3, 6 μM の濃度で細胞生存率に変化はみられなかったが、9 μM では生存率が減少した。
- (2) 細胞内メラニン生成量は α-mangostin の濃度依存的に減少し、α-mangostin 投与群はコントロールと比べメラニン生成量が抑制された。
- (3) 細胞増殖率は α-mangostin の濃度依存的に減少したが、3 μM ではコントロールとほとんど変化がなかった。
- (4) チロシナーゼ活性は、コントロールに比べて α-mangostin の濃度依存的に減少した。

【考察・今後の展望】

本実験結果から、α-mangostin はマウスメラノーマ細胞 (B16F10) に対して濃度依存的にメラニン生成量を減少させることが分かった。また、α-mangostin はチロシナーゼ活性を減少させることでメラニン生成を抑制しているのではないかと考えられる。9 μM の α-mangostin は細胞生存率に影響するため、今後は低濃度の α-mangostin を投与する予定である。また、遺伝子発現を調べメラニン生成に対する効果やそのメカニズムを解明したいと考えている。更に、皮膚がん細胞だけでなく正常ヒト皮膚細胞への投与実験も行い、α-mangostin が美白成分として効果を示すことを期待している。

光受容細胞で遺伝子を特異的に発現させるメカニズムの解明

石塚 絢子 (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

光受容細胞は光の感知に特化した神経細胞であり、外部からの情報を伝達することに特化した細胞である。形態的にも機能的にも特化した神経細胞である光受容細胞の分化機構を解明することは、多様な神経細胞が産み出されるメカニズムを解明するための良いモデルとなる。

脊索動物ホヤの1種であるカタユレイボヤ *Ciona intestinalis* は幼生期にはオタマジャクシ型の形態をしており、脳内に色素細胞が付随した2つの感覚器官、眼点と平衡器を有している。形態学的、生理学的な研究から、眼点は光受容に、平衡器は重力感知に関与することが明らかとなっている。変態後は岩などに固着しほぼ動かないが、幼生期には遊泳生活を送る。ホヤ幼生の光に対する行動は詳細に調べられており、明刺激後の暗刺激に対して遊泳運動を開始し、暗刺激後の明刺激に対して遊泳行動を停止させることが明らかとなっている。このホヤ幼生の光に対する行動には、カタユレイボヤオプシン1遺伝子 (*Cropsin1*) が必須の役割をしており、*Cropsin1* の機能を阻害すると光応答は完全に消失する。*Cropsin1* の発現パターンの解析から、ホヤ幼生の脳内には *Cropsin1* を発現する2種類の光受容細胞、眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞が存在しており、このうち眼点光受容細胞がホヤ幼生の光に対する行動を制御している。このように *Cropsin1* を発現する光受容細胞に関する生理機能は明らかになりつつあるが、*Cropsin1* を発現する光受容細胞の分化機構、および *Cropsin1* を光受容細胞に特異的に発現させるメカニズムは不明である。そこで本研究では、*Cropsin1* の発現調節領域の解析を行い、*Cropsin1* の光受容細胞に特異的なシスエレメントの同定を試みた。さらに、ホヤ幼生の光に対する行動を制御する神経回路を明らかにすることを目的として、光受容細胞で特異的に経シナプストレーサーを発現させ、組織学的な解析を行うことにより、光受容細胞を起点とする神経回路の解析も行った。

材料・方法

(1) *Cropsin1* の発現調節領域の解析

Cropsin1 の開始 Met から上流 (5'領域) 約 5kb を単離し、蛍光タンパク質 Kaede と連結させたコンストラクトを作製した。エレクトロポレーション法により、ホヤ受精卵へと遺伝子導入を行い、幼生期 (受精後 22 時間) に Kaede の蛍光パターンの観察を行った。次に、段階的に上流領域を 5'側から削ったコンストラクトを作成した。新たに作製したコンストラクトについても同様にエレクトロポレーション法により、ホヤ卵へと遺伝子導入を行い、Kaede の蛍光パターンの解析を行った。さらに推定される転写因子結合配列に変異を入れたコンストラクトを作製した。

(2) 光受容細胞を起点とした神経経路の解析

同定した光受容細胞特異的な遺伝子発現調節領域を用いて、経シナプストレーサー WGA (小麦胚芽レクチン) および蛍光タンパク質 CFP を光受容細胞で特異的に発現するコンストラクトを作

製した。作製したコンストラクトをエレクトロポレーションによってホヤ受精卵へと導入し、幼生期 (受精後 22 時間) にホルマリリンにより固定を行った。固定したサンプルは抗 WGA 抗体、抗 GFP 抗体を用いて、免疫染色を行った。

結果・考察

(1) *Cropsin1* の発現調節領域の解析

Cropsin1 の開始 Met から上流約 5 kb を Kaede と連結させたコンストラクトを導入したところ、Kaede の蛍光は眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞の 2 か所で観察された。したがって、*Cropsin1* の開始 Met から上流 5 kb に光受容細胞に特異的なシスエレメントが含まれていることが確認された。次に上流領域を 5'側から 400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp と段階的に 50 bp ずつ欠失させたコンストラクトを導入したところ、上流 250 bp から段階的に Kaede の発現率は低下し、上流 150 bp ではほぼ Kaede の発現は消失した。したがって *Cropsin1* の光受容細胞特異的なエンハンサー領域は開始 Met から上流 300 bp から 150 bp の間に複数箇所存在することが示唆された。この上流 300 bp から 150 bp の範囲に存在する転写因子の結合配列を調べたところ、Otx、Homeobox、bHLH、Fox などの結合配列が存在していることが明らかとなった。したがって、*Cropsin1* の光受容細胞特異的な発現はこれらの転写因子によって誘導されると考えられる。カタユレイボの眼点の分化にはホメオボックス型転写因子 Rx が重要な役割を担っており、また、多くの動物において Otx が光受容細胞の分化に必須の役割をすることが知られている。今後は、これらの転写因子の機能阻害実験、過剰発現実験により、これらの転写因子が光受容細胞の分化における役割を明らかにしたい。一方で、今回の実験では眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞を明確に区別するシスエレメントは同定することは出来なかったが、さらに詳細な解析を行うことで、眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞をそれぞれ区別することが出来ると期待される。

(2) 光受容細胞を起点とした神経経路の解析

WGA 抗体で染色を行った結果、光受容細胞特異的に WGA を発現させることには成功したが、今回の実験では期待したような 2 次ニューロン以降への WGA の輸送は確認することが出来ず、光受容細胞を起点とした神経経路を同定することが出来なかった。今後、いくつかの条件を検討することにより、光受容細胞を起点とする神経経路を同定したいと考えている。

動物間で保存された *Hox* 遺伝子群のホヤにおける新規機能の解明-*Hox13*による感覚器官の形成-

田島 由佳子 (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)

背景および目的

動物は初期発生において、様々な遺伝子の発現によりその形態を作り上げる。特に脊椎動物においては、複雑なボディプランを保持しており、私はその複雑な形態の形成に関わる遺伝子の進化に興味を持った。進化を理解するためには、祖先型動物を知ることが重要となる。尾索動物は脊椎動物に最も近縁な動物群であり、原始的な形質を多く残している。一方で、脊椎動物と相同な遺伝子も多く保存しており、尾索動物は脊椎動物の祖先を考える上で最も適した生物である。

本研究では *Hox* 遺伝子に焦点を当てる。*Hox* 遺伝子群は動物間で保存されており、前後軸に沿った構造の形成に寄与するなど、動物のボディプランの進化を考える上で欠かすことができない遺伝子群である。この *Hox* 遺伝子群の1つである *Hox13* は、脊椎動物において体節構造の最も後方で発現し、「体節構造形成の終末」を決める遺伝子としてはたらく(1)。しかし、脊椎動物ゲノムには *Hoxa13* から *Hoxd13* の4つのパラログが存在するため、完全な機能解明には至っていない。

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は、尾索動物門に属し、世代時間の短さや遺伝子構成の単純さから、遺伝子機能解析の好材料である。加えて全ゲノムが解読されており、1セットの *Hox* 遺伝子群を保存していることが明らかとなっている(2)。また、ホヤは明確な体節構造を持たないため、*Hox* 遺伝子群の機能も脊椎動物とは大きく異なる可能性もある。先行研究より、カタユウレイボヤでは変態後の消化管に *Hox13* の発現が認められているが(3)、その機能は明らかになっていない。そこで本研究ではカタユウレイボヤの *Hox13* のノックアウトを行い、遺伝子の機能解析を行った。

方法

○*Hox13* ノックアウト

Hox13 のホメオドメインをターゲットとする TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) を設計して導入し、表現型の観察を行った。また、種々の組織で特異的に遺伝子発現を引き起こすプロモーターを用いて TALEN を発現させ、組織特異的なノックアウトを行った。

○トランスジェニック系統の作製

トランスポゾンベクターである Minos を用いて、*Hox13* のプロモーターに *Kaede* の配列をつなげた人工 DNA を導入し、ゲノムへの形質転換を誘導した。この個体を飼育し、野生型と掛け合わせ、ゲノム DNA に *Hox13>Kaede* コンストラクトが組み込まれた個体を継代して、系統を樹立した。

○逆転写 (RT-PCR)

発現を確認したい器官または組織を摘出し、AGPC 法を用いて RNA を精製した。この RNA を鋳型に cDNA を合成し、*Hox13* のプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動でバンドの有無を確認した。

結果

○*Hox13* ノックアウト

TALEN を導入した個体では、輸精管先端に存在する赤色素細胞が集積した感覚器官 Orange Pigment Organ (OPO) が形成されなかった。また OPO マイナスの個体では精子形成は認められたものの、輸精管内に貯蔵されない傾向があることが明らかとなった。この *Hox13* のノックアウト個体は生存可能であり、先行研究より *Hox13* の発現が確認されていた消化管では、異常は観察されなかった。このノックアウトを組織特異的に行うと筋肉と神経で *Hox13* をノックアウトしたときに同様の表現型が得られた。

○トランスジェニック系統の観察

先行研究では *in situ hybridization* によって *Hox13* の発現が確認されている。しかしながら、発現量が少ない組織では、この手法での発現の検出は困難である。トランスジェニック系統を用いることで、安定かつ高感度な蛍光タンパク質を用いた遺伝子発現の可視化が可能となる。

トランスジェニック系統の観察を行うと、先行研究で明らかになっていた消化管での発現に加えて入水孔や出水孔、脳、さらに輸精管での *Kaede* の発現が明らかになり、これらの器官で *Hox13* が発現していることが示唆された。RT-PCR を行うと、脳と OPO での *Hox13* の発現が確認された。一方で、OPO を構成する赤色素細胞では、*Kaede* の発現は確認されなかった。

結論と展望

本研究によって、カタユウレイボヤにおける OPO の形成不全という *Hox13* ノックアウトの表現型を初めて確認した。また、筋肉と神経組織で組織特異的にノックアウトを行うと同様の表現型を示すことが明らかになった。この OPO マイナスの個体では精子を貯蔵することができないことが明らかとなった。カタユウレイボヤの放精は光刺激によって引き起こされ、OPO は適切なタイミングでの放精に関与していると考えられる。また、この OPO では RT-PCR によって *Hox13* が発現していることが明らかとなった。これらにより OPO 形成における *Hox13* の関与が強く示唆された。

加えて、現在までに報告されていた領域以外での *Hox13* の発現も、トランスジェニック系統の観察と RT-PCR により新たに発見した。この発現領域には、OPO を構成する赤色素細胞に類似した赤色の細胞が存在した。しかしながら、どの赤色素細胞でも *Hox13* の発現は確認されなかったことから、*Hox13* は赤色素細胞の機能に細胞自律的な関与ではなく、間接的な関与、例えば輸精管先端への色素細胞の集合を制御していると考えられる。今後はより詳細な OPO 形成メカニズムについて研究を進め、*Hox13* の形態形成における機能解明と、脊椎動物と機能の比較を行う。

参考文献

1. Teddy Y. et al. (2009) *Dev Cell* **17**, 516-526.
2. Dehal P. et al. (2002) *Science* **298**, 2157-2167.
3. Ikuta T. et al. (2004) *PNAS* **101**, 15118-15123.

変態期にホヤ幼生の尻尾が吸収されるメカニズムの解析

山路 草太 (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)

[背景と目的]

ホヤを含む尾索動物亜門は脊椎動物に最も近い無脊椎動物として知られており、そのホヤのオタマジャクシ型幼生は、単純ながらも典型的な脊索動物のボディプランを持つことから、発生学と進化学研究の好材料として用いられている。そのため、受精卵からオタマジャクシ型幼生までへと至る初期発生過程の研究がホヤ研究の殆どを占めていた。

一方、ホヤのオタマジャクシ幼生が、固着生活を送り濾過摂餌を行う成体へと変化する変態過程の理解は十分ではない。ホヤの成体の様な固着生活を送る生活様式を持つ動物群は、脊索動物の中ではホヤ以外に存在しない。また、脊索動物の祖先動物は一生を遊泳して過ごす動物であったと推定されており、ホヤの祖先動物が他の脊索動物群と分岐した後に変態する能力を獲得し、固着生活するように進化したと考えられる。そのため、ホヤの変態過程を詳しく研究することは、ホヤがその独特の生活様式をどのように獲得したのかを知ることに繋がる。

本研究では、様々な変態イベントの中で、大きく形態が変化する「尾部吸収」に注目した。遊泳生活から固着生活へと変遷するにあたり、これまで幼生の遊泳運動を駆動してきた尾部は、たった1~2時間で吸収されてしまう。この僅かな時間で、幼生の体の大部分を占める尾部が見かけ上消失することは、細胞の振る舞いとしても非常に興味深い。そこで、この尾部吸収過程で、各組織がどのように変化することによって尾部を体幹部へ吸収させているのかを明らかにすることを目的とした。

[材料]

カタユウレイボヤ

[方法と結果]

1. *p35*の過剰発現によるアポトーシスの阻害

先行研究により、尾部吸収に伴って生じる尾部の筋肉や表皮組織のアポトーシスが尾部吸収に必要であることが報告されている^①。しかし、単なる細胞死で、急速に完了する尾部吸収を説明できるのか、疑問の余地が残る。そこで、本当にアポトーシスが尾部吸収に重要であるか検証するために、アポトーシス抑制遺伝子である*p35*の強制発現を試みた。*p35*はbaculovirus由来のタンパク質であり、これを強制発現することにより様々な動物においてアポトーシスを抑制できることが報告されている^②。

この*p35*を全身で発現させアポトーシスを抑制したところ、先行研究の結果に反して「尾部吸収は完了する」ことが分かった。つまり、両生類の尾部吸収と異なり、アポトーシスはホヤの尾部吸収に必須ではない事が示唆された。

2. 薬剤処理による尾部吸収の阻害

細胞死が尾部吸収に必須ではない事が分かったため、細胞形態の変化や細胞運動によって尾部吸収が生じている可能性が考えられた。そこで、細胞形態や細胞運動を調節する細胞骨格であるアクチン繊維の重合を阻害し、尾部吸収への影響を検討した。

アクチン重合阻害剤であるCytochalasin BとLatrunculin Aを変態前のホヤに添加したところ、尾部吸収が阻害された。この

結果より、アクチン重合による細胞形態の変化や細胞運動が尾部吸収を駆動していることが示唆された。

3. 蛍光タンパク質による細胞形態の観察

尾部吸収の最中に細胞形態の変化や細胞運動が生じている可能性が示唆されたため、変態の前後で細胞形態が変化している組織を探索することにした。そこで、細胞膜移行型蛍光タンパク質GFP-CAAXを組織ごとに発現させ、各組織で細胞膜を可視化し、細胞形態の変化を詳細に観察することにした。

その結果、変態する前と後で尾部表皮細胞が前後軸に沿って収縮していることが分かった。表皮組織の収縮が形態形成に重要な働きをしていることはホヤや他の動物を用いた研究で明らかにされている^③。そのため、今回観察された尾部表皮細胞の収縮が尾部吸収を駆動する力である可能性が示唆された。

変態前後で尾部表皮細胞が収縮していることが分かったので、その収縮過程を生きたまま観察することを試みた。通常よりも低濃度のGFP-CAAXをホヤ卵に導入し、蛍光を呈する細胞のモザイク性を高め、細胞一つ一つの挙動を観察できるようにした。尾部吸収が開始した直後、共焦点顕微鏡下に移しz-stackを取りつつtime-lapse撮影を行った。撮影した動画は、画像編集ソフトZENとImageJで解析した。

現在、尾部吸収中に表皮細胞が突起を形成しながら運動している様子や細胞辺を収縮させている様子を動画に収めている。また、それぞれの表皮細胞が、その一つ前に位置する表皮細胞の基底側に滑り込む様子も観察された。

[考察]

以上の実験より、アポトーシスではなく細胞運動や細胞の形態変化によってホヤの尾部吸収が進行することが強く示唆された。さらに、変態の前後で、尾部表皮細胞が前後軸に沿って収縮していることから、表皮細胞の収縮が尾部吸収の駆動力である可能性が示唆された。しかし、现阶段では、この表皮細胞の収縮が自身の能動的な収縮なのか、他の組織の形態変化による受動的な収縮なのか、明らかでない。今後は、尾部のどの組織の形態変化が尾部吸収を駆動しているか検証するために、細胞運動や形態変化に必要な細胞質ミオシンII等を、表皮を中心に各組織で機能阻害することにより、尾部吸収に重要な組織を同定することを検討している。

また、細胞が決まった方向に運動することや形態を変化させるためには、体軸とは別に細胞自身が極性を持つ必要がある。尾部は体幹部へ向かって一定方向に吸収されていくので、吸収に先駆けて尾部の細胞は細胞内平面極性(PCP)などの機構を獲得している可能性がある。そこで、PCP形成に重要な働きをするコアPCPタンパク質をKOするなどして、細胞の極性化にかかわる経路が尾部吸収に関与する可能性について検討していきたい。

[参考文献]

- (1) Chambon *et al.* *Development* 129, 3105-3114 (2002)
- (2) Bruce *et al.* *Development* 120, 2121-2129 (1994)
- (3) Sawyer *et al.* *Dev Biol* 341, 5-19 (2010)

成体イモリがみせる網膜再生の原理を適用した新規 RPE 培養法の開発

松永 杏樹 (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

視覚は、脊椎動物の重要なモダリティの一つである。多くの動物の生存は視覚に依存しており、ヒトもまた、外界から得る情報の約 9 割を視覚に頼っている。この視覚機能において、光子の受容および初期情報処理という重要な役割を担っているのが網膜である。網膜の損傷や変性は、様々な網膜疾患および失明の原因となる。

近年、iPS 細胞から作製した神経上皮の袋から立体的な神経性網膜を作製し、これを網膜疾患患者に移植することで視覚機能の再建を目指す研究が進んでいる。この神経性網膜の端 (すなわち毛様体辺縁部) には、眼発生時と同様に網膜幹細胞が存在することから、培養条件下で成長 (面積を拡大) させることができる。しかし、シート状でしかも眼球内を覆う広い面積の網膜を作製するのは簡単ではない。一方、成体イモリは、眼球から神経性網膜をすべて失っても、約 2 ヶ月で網膜色素上皮 (RPE) から完全な網膜を再生する。すなわち、眼球内を覆う網膜を短期間につくりだすことができる。本研究室では、イモリがどのような原理で広い面積の網膜組織を同期的に構築できるのか研究してきた。

成体イモリの RPE 細胞は、神経性網膜を失うとすぐに上皮-間葉転換に似た (EMT-like) 行動を示す。この過程で、RPE 細胞はユニークな多能性細胞 (RPE stem cell: RPESC) にリプログラムされる。RPESCs は 2 集団に分離され、それぞれは基底膜 (ブルックス膜) 沿って内外 2 層の細胞層を形成する。間葉-上皮転換に似た (MET-like) 過程と増殖を経て、内層 (pro-NR) は神経性網膜を、外層 (pro-RPE) は RPE 自身を再生する。このようにイモリは、小さな網膜をつかってそれを成長させるのではなく、眼球内を覆う基底膜上に RPESCs を均一に配置することで、必要な面積の網膜を同期的に構築している。

もし、この原理がヒトの組織工学に適用できれば、どのような面積の網膜組織も培養下でつくりだすことが可能である。しかも、作製時間が面積に依存しないため、より効率的な立体網膜作製法になるかもしれない。しかし、そのためには、ヒト・哺乳類 RPE の前に、まず *in vivo* で網膜を再生する能力のあるイモリ RPE を用いて、それぞれの再生の段階を再現する培養条件を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、その基礎として、*in vitro* で RPE 細胞を RPESC に転換させる条件を検討した。

方法と結果

成体アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の正常眼球から RPE 細胞を単離し、様々な条件で培養を行った。

詳しい方法と結果については、発表会の場で報告させていただきます。

展望

RPE 細胞から立体網膜を作製する培養法をイモリで確立することができれば、iPS 細胞由来の RPE シートを出発材料にすることで、ヒトへの応用が可能である。勿論、このシステムはイモリ網膜再生のメカニズムを解明する強力なツールにもなり得る。

大脳皮質ニューロンの神経回路形成におけるセロトニン4型受容体の機能解析

加瀬谷 治樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 志賀 隆 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

セロトニン (5-HT) はモノアミンの一種であり、成体の脳では神経伝達物質として神経精神活動を制御し、その異常はうつ病などの精神疾患に関与する。また、発達期では神経栄養因子としてニューロンの生存や分化、樹状突起の発達、シナプス形成などの神経発生過程を制御するが、5-HT 受容体の役割について不明な点が多い。

神経回路は感覚や運動だけでなく記憶学習を含む高次機能などの神経機能の基盤をなす。この神経回路の形成における 5-HT 受容体の役割を理解するために、発達期の神経細胞を用いて、単一の細胞の形態変化に注目した。発達過程において、神経細胞は細胞体から複数の神経突起を伸ばし (神経突起の新生)、それらが伸長や分岐をしながら軸索と樹状突起に分化する。これらのプロセスによって、ニューロンは特徴的な樹状突起と軸索の形態をとるようになり、その形態は機能と密接な関連がある。神経細胞間の情報伝達は樹状突起や細胞体で情報を受け取り、軸索を通じて周囲の神経細胞に情報が伝達されている。そこで情報の受信側であり、神経回路形成の制御に関与している樹状突起に注目した。

5-HT 受容体は7つのファミリー (5-HT₁₋₇) に分類され、現在までに14種類のサブタイプが同定されている。5-HT₃ 受容体はイオンチャネル型受容体であり、その他の受容体はすべて G タンパク共役 7 回膜貫通型受容体である。これらの受容体の中で、5-HT_{1A}、1B と 2A、2C、4 受容体の発現が大脳皮質の前頭皮質において報告されている。

ラット胎仔の大脳皮質ニューロンを用いた培養実験で 5-HT_{1A} 受容体作動薬は神経突起の伸長と分岐形成を抑制する一方、5-HT_{2A/2C} 受容体作動薬は作用時間に応じて樹状突起形成を抑制、または促進することが報告されている。また、5-HT₄ 受容体作動薬がマウス新生仔の海馬ニューロンの全神経突起長と神経突起数を減少させるという報告があるが、大脳皮質ニューロンの樹状突起における 5-HT₄ 受容体の役割を調べた報告はまだない。そこで本研究では 5-HT₄ 受容体作動薬を用いて、ラット胎仔の前頭皮質の初代分散培養を行い、樹状突起の発達における 5-HT₄ 受容体の作用を探ることを試みた。

方法

1. 前頭皮質の初代分散培養

胎生 18 日目のラット (WistarST) の前頭皮質を剖出後に神経細胞を分散し、血清培地に 4×10^4 cells/cm² で播種した。8 時間後に無血清培地に交換し、5-HT₄ 受容体作動薬 (RS67333) を含む無血清培地に交換した。播種後 2 日目に培地を交換し、4 日目に 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。また、拮抗薬を添加する場合には作動薬を添加する 30 分前から添加した。

2. 蛍光免疫染色

分散培養したニューロンを樹状突起のマーカーである微小管関連蛋白 2 (MAP2) と抑制性ニューロンのマーカーであるグル

タミン酸脱炭酸酵素 65 (GAD65) に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色した。

3. 観察・画像解析

共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 META, Carl Zeiss) で画像を取得し、樹状突起解析ソフト Neurocyto Image Analyzer (KURABO) を用いて興奮性ニューロンの樹状突起の形態を解析した。解析では全樹状突起長 (すべての樹状突起の長さの合計)、一次樹状突起数 (細胞体から直接出る樹状突起の数)、平均樹状突起長 (全樹状突起長 / 一次樹状突起数)、平均分岐回数 (全分岐回数 / 一次樹状突起数) を測定した。なお、一次樹状突起数、平均樹状突起長、平均分岐回数はそれぞれ樹状突起の新生、伸長、分岐形成を示す指標と考えられる。

結果・考察

1 nM、10 nM、100 nM の RS67333 の 4 日間添加により、大脳皮質の興奮性ニューロンの全樹状突起長と平均樹状突起長、平均分岐回数が増加した。一方で、一次樹状突起数は 100 nM のときのみ増加した。次にこの作用の 5-HT₄ 受容体特異性を明らかにするために、RS67333 (100 nM) と 5-HT₄ 受容体の拮抗薬である GR125487 (1 nM) を同時添加したところ、作動薬による全樹状突起長と平均分岐回数の増加が拮抗薬により完全に打ち消された。また、一次樹状突起数の増加が拮抗薬によりほぼ打ち消された。したがって、5-HT₄ 受容体を介して、樹状突起の新生と分岐形成を促進させることが示唆された。この結果に対して、5-HT₄ 受容体に関する先行研究では海馬ニューロンの全神経突起長と神経突起数を減少させる。本研究と先行研究の結果の違いは、培養に用いたニューロン (大脳皮質 vs 海馬)、観察対象 (樹状突起 vs 神経突起)、培養期間 (4 日 vs 1 日)、作動薬 (RS67333 vs BIMU8)、薬剤の添加時間 (4 日 vs 20 時間) が異なることが考えられる。

5-HT₄ 受容体は G_s タンパク質と共役しているため、アデニル酸シクラーゼを活性化させる。そしてこの細胞シグナルの下流において脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現が活性化されるという報告がある。そこで BDNF の受容体である TrkB の拮抗薬 (Cyclotraxin-B) を用いて形態変化の観察を行った。RS67333 (100 nM) と Cyclotraxin-B (100 nM) を同時添加したところ、作動薬による全樹状突起長と平均樹状突起長、平均分岐回数の増加が拮抗薬により打ち消された。したがって、5-HT₄ 受容体の作用機序として BDNF / TrkB を介することで樹状突起の伸長と分岐形成を促進させることが示唆された。なお、作用機序についてはまだ解析した例数が十分ではないため、今後さらに検討する必要があると思われる。

オルガネラバイオロジー：変異型 mtDNA が及ぼす影響

佐藤 雪歩（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】

生命活動に必要なエネルギーである ATP は、真核生物においてその合成の大部分をミトコンドリアに依存している。

ミトコンドリアは、外膜と内膜の二重の生体膜をもち、内膜に局在する I～V の呼吸酵素複合体によって酸化的リン酸化反応を行い、エネルギーを産生する細胞内小器官（オルガネラ）である。

ミトコンドリアは祖先型真核生物に共生した α プロテオバクテリアに起源をもち、外膜は祖先型真核生物に由来し、内膜は α プロテオバクテリアに由来する。また内膜の内側（マトリクス）には α プロテオバクテリアに由来する独自の環状 DNA（Mitochondrial DNA : mtDNA）を複数コピーもつが、ミトコンドリアの祖先がもともと有していた遺伝子の大部分は核 DNA に移行しており、ミトコンドリアの機能が核ゲノムによる制御を受けていることがわかっている。

mtDNA には呼吸酵素複合体 I, III, IV, V のサブユニットの一部を構成する 13 種の構造遺伝子と 22 種の tRNA と 2 種の rRNA がコードされている。したがって mtDNA に生じる突然変異の病原性は、ATP 産生低下として表現されることが予想される。しかし近年、ミトコンドリア病をはじめ、がん、神経変性疾患、糖尿病など、多様な病態表現型に突然変異型 mtDNA が関与するとして注目を浴びている。

ミトコンドリアは高等動物のオルガネラの中では唯一その起源が異なることから、他のオルガネラとは独立して機能していると考えられていた時代もあった。しかし前述のように核 DNA の制御を受けることが解明され、ごく近年になって、ミトコンドリアが他のオルガネラと協働し、細胞内生理の様々な機能を担っていることが解ってきた。

そこで本研究では、ミトコンドリアが相互作用しているオルガネラとして小胞体（Endoplasmic Reticulum : ER）に着目した。ER は一重の生体膜からなる、板状もしくは網目状のオルガネラであり、タンパク質の合成・修飾・貯蔵や、脂質合成、カルシウムイオンの貯蔵などの機能を担う。ミトコンドリアの融合・分裂制御、オートファゴソームの形成などにおいて、ミトコンドリアとの相互作用が報告されている。

多様な病態を生じさせる突然変異型 mtDNA の分子病理を理解することを本研究の最終目的として、異なる突然変異型 mtDNA 分子種を含有するモデル細胞を用いて、ミトコンドリアと ER の形状や局在に変化や多様性が見られるか、否かを比較解析した。

【材料・方法】

所属研究室が所有している以下の①～④に示す細胞株を用いて、ミトコンドリアと ER をそれぞれ Mito-tracker と ER-tracker によって蛍光標識した上で、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。なお、全ての細胞株で核 DNA の遺伝的背景は C3H/AN 系統マウス由来の Fibroblast に起源をもつ。

- ①B82mtB6 : 野生型 mtDNA のみを含有するマウス細胞株。
- ②B82mtA11 : 複合体 I のサブユニット ND6 をコードする領域に点突然変異 (G13997A) を含有するマウス細胞株であり、この突然変異はミトコンドリアでの ROS 産生を上昇することが知られている。
- ③B82mt Δ : 4696 bp の大規模欠失を有する mtDNA (欠失型 mtDNA) と野生型 mtDNA の両方を含有するマウス細胞株で、欠失型 mtDNA の含有率が病原発揮の閾値を超えると著しい呼吸機能異常 (ATP 産生低下) が誘導される。
- ④B82mtPolG^{mut/mut} : 核 DNA にコードされた mtDNA 複製因子 PolG の校正機能のみを破壊したマウスの血小板を融合させたマウス細胞株で、多様な突然変異が生じた mtDNA 分子種を含有している。著しい呼吸機能異常 (ATP 産生低下) が誘導される。

【結果・考察】

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察によって、野生型 mtDNA のみを含有する細胞株①に比べ突然変異型 mtDNA を含有する細胞株②～④において、ミトコンドリアの短径が小さいことを明らかにした。また、著しい呼吸機能異常 (ATP 産生低下) が誘導される細胞株③・④において、細胞株①・②で高頻度に観察される密集した大きな ER 凝集は低頻度で観察され、細胞株①・②で低頻度に観察される細胞質に散在する小さな ER 凝集が高頻度で観察された。

この二つの変化は、細胞株の性質を反映した変化であり、病態表現型の多様性を誘導する一端を担っている可能性がある。近年、ミトコンドリアの融合・分裂に ER とミトコンドリアの物理的な接触が関わっていることを示唆する報告がなされ、注目を集めている。本研究で呼吸機能が低下している細胞株③・④において高頻度で観察された細胞質全体に広がる ER の分布は、ER とミトコンドリアの接触頻度を高めるものであり、これらの細胞においてミトコンドリアの融合や分裂の頻度が上昇していることを示唆する。

植物ホルモン様物質がミトコンドリアの機能に及ぼす影響の解析

谷 春菜 (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>

ミトコンドリアは生体内におけるエネルギーの大部分を産生する細胞小器官であり、核ゲノムとは独立した環状二本鎖構造のミトコンドリア DNA (mtDNA) を細胞あたり数百~数千コピー有している。mtDNA には、ATP 産生を行う呼吸酵素複合体を構成する 13 種類の構造遺伝子とそれらの翻訳に必要な 2 種類の rRNA と 22 種類の tRNA がコードされている。

病原性突然変異の生じた mtDNA が細胞内にある一定以上の割合で蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能低下が引き起こされ、その結果、ミトコンドリア病と総称される一連の疾患が誘発されることが知られている。ミトコンドリア病は脳卒中様症状や運動機能低下などを呈する重篤な疾患であり、様々な治療法の研究がされているが未だ確立された治療法は存在していない。

また、ミトコンドリア内膜はクリステという非常に特徴的な形態を形成している。ミトコンドリアにおける ATP 産生を担う呼吸鎖酵素複合体は内膜に存在しており、クリステの形成は内膜の表面積を増加させることで、ATP 産生の効率化に寄与していると考えられている。近年、クリステの形成/維持は内膜に存在する MICOS 複合体 (mitochondrial contact site and cristae organizing system) が関与することが明らかとなった。また MICOS 複合体は外膜のタンパク質とも相互作用をし、外膜と内膜の接触部位を形成するなどミトコンドリアの形態制御においても重要な役割を果たすことが報告されており、ミトコンドリアの機能維持において非常に重要な要素として注目を集めている。

クリステの崩壊はミトコンドリア呼吸機能低下と関連することが知られているが、病原性突然変異型 mtDNA に起因するミトコンドリア呼吸機能不全における MICOS 複合体の関与や重要性などはほとんど報告されていない。そのような中、ごく最近、植物ホルモン様物質であるインドール化合物をスクリーニングする事で得られた新規化合物 (MA-5) が MICOS 複合体の主要因子である mitofilin に結合するという新たな事実が発見された。MA-5 は mitofilin に結合しクリステの安定化に寄与することで、ミトコンドリア呼吸機能や ATP 産生能の向上に繋がる可能性が考えられている。

そこで本研究では MA-5 の mitofilin 結合能力に着目し、病原性突然変異型 mtDNA を含有するモデル系を用いて、MA-5 のミトコンドリア呼吸機能に対する効果を検証することで、ミトコンドリア病の新規治療法として可能性を明らかにすると共に、ミトコンドリア呼吸機能不全における mitofilin の生物学的意義を理解することを目的とする。

<方法>

(1) 突然変異型 mtDNA 含有細胞における mitofilin 含有量の検証

ミトコンドリア呼吸酵素複合体は核 DNA と mtDNA の両者から由来するタンパク質によって構成されているため、mtDNA の影響を直接的に評価出来るように核が HeLa 細胞に統一された下記の細胞を用いた。

HeEB 細胞: HeLa 細胞を薬剤処理によって mtDNA を消失させた細胞 (HeLap0 細胞) に、HeLa 細胞の mtDNA を再度導入した細胞

HeLamt Δ 細胞: HeLap0 細胞に野生型 mtDNA より 5,196 bp が欠失した大規模欠失型 mtDNA (Δ mtDNA) を 93.6% で含有する細胞

HeLamt3243 細胞: HeLap0 細胞に *tRNA^{Leu(UUR)}* に A3243G 点突然変異が生じた mtDNA を 88.1% で含有する細胞

HeLamt Δ 細胞の持つ Δ mtDNA、HeLamt3243 細胞の持つ A3243G 点突然変異型 mtDNA はヒトのミトコンドリア病の原因となる変異である。HeEB 細胞は野生型 mtDNA のみを持つ為、この細胞を control として用いた。

これら計 3 種類の HeLa 細胞株において mitofilin の含有量をウェスタンブロッティング法により定量を行った。

(2) 突然変異型 mtDNA 含有細胞に対する MA-5 の作用の検証

上記に示した HeEB 細胞株、HeLamt Δ 細胞株、HeLamt3243 細胞株に対し、MA-5 を 100 μM で添加し 24h 培養後、ミトコンドリアの呼吸機能の解析を行った。

(3) ミトコンドリア病態モデルマウスに対する MA-5 の作用の検証

Control として野生型マウス (C57BL/6J)、ミトコンドリア病態モデルマウスとして mtDNA 上の 6 つの tRNA 遺伝子と 7 つの構造遺伝子を含む 4,696 bp が欠失した大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA4696) をマウス胚に導入することで所属研究室が作製したモデルマウス (mito-mice Δ) を使用した。Mito-mice Δ は体内に含有する Δ mtDNA の割合が個体により異なり、Δ mtDNA が加齢と共に蓄積することでミトコンドリア呼吸機能低下に起因する病態を発症する事が知られている。

これらのマウスに対して、MA-5 を corn oil に溶かし、50 mg/kg body weight となる様に 1 日 1 回の長期的な経口投与を行い、病態に対する影響の評価を行った。

<結果>

詳細な結果については発表会にて報告予定である。

ミトコンドリア tRNA 遺伝子に病原性突然変異を有するマウスの作製

長島 瑠子 (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>

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって生命活動に必要なエネルギーである ATP を産生する細胞小器官である。ミトコンドリアは脂質二重膜によって細胞質から閉鎖されており、その内膜には酸化的リン酸化を行う呼吸酵素複合体 I-V が存在し、更にその内部のマトリックスにはミトコンドリア独自の環状 DNA (ミトコンドリア DNA ; mtDNA) を有している。一細胞当たり二コピーしか存在しない核 DNA と異なり、mtDNA は一細胞当たり数百から数千コピー存在しており、呼吸酵素複合体 I, III, IV, V を構成する構造遺伝子と、その遺伝子の翻訳に必要な tRNA, rRNA をコードしている。mtDNA に突然変異が生じ、かつ、その分子種が高率に存在すると、呼吸酵素複合体の機能低下を介して、ミトコンドリア病や神経変性疾患、がん、糖尿病と言った疾患や老化という生命現象の原因となることが報告されている。

ミトコンドリア病と総称される疾患の中で最も罹患者数が多い疾患は、ミトコンドリア tRNA 遺伝子における突然変異を起因とするミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症状 (MELAS) である。しかし、MELAS モデル動物は未だ樹立されておらず、病態発症機構の解明のみならず、治療方法の確立、創薬研究の点からも、MELAS モデル動物の早期樹立が求められている。

ミトコンドリア病を含む、突然変異型 mtDNA を起因とする疾患モデルマウスの樹立が、他の遺伝性疾患モデルマウスよりも遅れている原因は、mtDNA に対して、人為的に、かつ、高率に目的の突然変異を導入することが困難である点にある。核 DNA を含む核膜には核膜孔があり、また、細胞分裂の過程で核膜が消失する為、比較的容易に遺伝子を改変することが可能である。しかし、ミトコンドリアが脂質二重膜によって細胞質から閉鎖されていること、また、mtDNA が一細胞に数百から数千コピー存在すること等が、突然変異の人為的な導入を阻む障害となっている。その為、これまで突然変異型 mtDNA を導入したマウス (ミトマウス) の作出報告は殆ど為されていなかった。

それに対し、所属研究室では、これまで数例のミトマウスの樹立を行ってきた。その際、突然変異型 mtDNA を高率に有する細胞を、細胞の複製過程で自然に生じた mtDNA 体細胞突然変異の濃縮や、薬剤処理により誘導された突然変異を利用して樹立してきた。その中で、ミトコンドリア tRNA 遺伝子上に、MELAS の症例報告が為されている点突然変異に相当する突然変異型 mtDNA を高率に有する細胞株の樹立に成功している。

本研究は、その培養細胞における呼吸酵素複合体の機能、並びに、病態を評価すること、また、MELAS モデルに相当するマウスを樹立することを念頭に、その細胞を利用して樹立した ES 細胞がマウス個体を形成できるか評価するべく、三胚葉分化能を有するか確認することを目的とした。

<方法>

所属研究室では、これまで下記手順に従ってミトマウスの樹立を行ってきた。また、アルキル化剤処理による突然変異の誘導、及び、濃縮によってミトコンドリア tRNA 遺伝子上に MELAS の原因突然変異として報告例のある突然変異に相当する突然変異型 mtDNA を 100% に有する細胞株を樹立した。本研究では、その細胞を使用し、下記手順に従って各実験を行った。

ミトマウス樹立手順

- ①突然変異型 mtDNA を高率に有する細胞株の樹立と病原性の確認
- ②ミトコンドリアを除去した ES 細胞と、除核した①の細胞質体とを細胞融合し、ES 細胞へ突然変異型 mtDNA を導入
- ③②で樹立した ES 細胞を用いてのキメラマウス作製
- ④③で作製したキメラマウスの交配による、生殖系列への移行を介し、全身に突然変異型 mtDNA を有するミトマウスを樹立

<結果・考察>

この突然変異型 mtDNA を有する細胞について、培養細胞における呼吸酵素複合体の活性を評価するべく、酸素消費量測定、COX/SDH 染色法を行った。その結果、当該変異を有する細胞が、酸素消費量の有意な減少と、呼吸酵素複合体 IV の活性低下を示した (①)。このことから、当該変異がマウス培養細胞において呼吸酵素複合体の活性低下を誘発するという病原性を有することが確認された。そこで、当該変異を有する細胞を除核して得た細胞質体と、薬剤処理によりミトコンドリアを除去した ES 細胞とを細胞融合し、当該変異を有する ES 細胞を樹立した (②)。更に、この ES 細胞がマウス個体を形成する分化能を維持しているか評価するため、マウス背部皮下に移植して奇形腫を形成させ、三胚葉分化を確認し、今回樹立した ES 細胞がキメラマウス作製に利用可能か判断した。現在、手順③に相当するキメラマウスの樹立を試みている。

<展望>

現在作製中のキメラマウスを得られた後に、そのキメラマウスを交配させることにより、全身の細胞に突然変異型 mtDNA を高率で有するミトマウスを樹立する。そして、得られたミトマウスを用いて、生体内における MELAS の病態発症機構の解明に繋げる予定である。

所属研究室では、ミトコンドリア病三大病型のうち、MELAS を除く、慢性進行性外眼筋麻痺、並びに、赤色ぼろ繊維を伴うミオクロースてんかんについて、各モデルとなり得るマウスが樹立されている。今回のミトマウス樹立後は、それらのモデルマウスとの比較解析を行い、異なる突然変異が「呼吸酵素複合体の活性低下」という共通の過程を経ながらも全く異なる病態を示す発症機構の差異に関して、各突然変異型 mtDNA が呼吸酵素複合体に及ぼす影響の差異を足掛かりとして解析を行う予定である。

ミトコンドリア病モデルマウスの病態発症機構におけるミトコンドリア分裂の役割

本間 耀 (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

ミトコンドリアは細胞小器官の一つであり、酸化的リン酸化によって生体内に必要な ATP の大部分を産生している。しかし、ミトコンドリアの担う役割はそれだけにとどまらず、赤血球における酸素運搬に必須であるヘム合成や、アポトーシス誘導、脂肪酸代謝など、細胞内において様々な役割を担っている。また、ミトコンドリアは核と異なる独自のゲノムである環状二本鎖のミトコンドリア DNA (mtDNA) を 1 細胞あたり数百~数千コピー有しており、哺乳類の mtDNA にはミトコンドリア内で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。

mtDNA への病原性突然変異の蓄積はミトコンドリア呼吸機能低下を引き起こし、ミトコンドリア病と総称される疾患群の原因となる。一方でミトコンドリアは融合・分裂を繰り返し、内容を交換することによって相補し合い、一定量の病原性突然変異型 mtDNA が存在しても、それによる病態発症を抑制するというユニークな特性を有している。事実、所属研究室で樹立された、大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) と野生型 mtDNA を共に有する病態モデルマウス (mito-mice Δ) は、 Δ mtDNA の含有率 (% Δ) が 70-80%程度まで蓄積しないと、顕著な病態を呈さないことがわかっている。さらに、病態の発現には組織特異性があり、腎臓や心筋には重篤な影響が現れる一方で、肝臓や血液では軽度な貧血がある以外に目立った病態が認められない。このマウスでは、% Δ 依存的にミトコンドリアの分裂に関わる因子の発現量が増加していることが示されており、 Δ mtDNA による病態発現を抑制する機構に、ミトコンドリアの分裂が重要な役割を担っているのではないかと考えられた。この仮説を検証する目的で、 Δ mtDNA による病態が発現しにくい肝臓と血球系組織特異的にミトコンドリアの分裂因子 Drp1 をノックアウトしたマウスが既に樹立されている。

冒頭でも述べた通り、ミトコンドリアはヘムの合成において重要な役割を担っており、ミトコンドリアの機能が低下すると、ヘムに正常に配位できなかった遊離の鉄イオンがミトコンドリア内に蓄積し、鉄染色によって視認できるようになる。Mito-mice Δ の血球系で Drp1 をノックアウトすることにより、赤血球におけるヘモグロビン形成に異常をきたし、これまで Δ mtDNA の蓄積単独では認められなかった新たな病態が血球系において発現する可能性がある。本研究では、血球系で Drp1 をノックアウトした mito-mice Δ の病態解析を通じて、病原性突然変異型 mtDNA の蓄積による病態発症機構におけるミトコンドリア分裂の生物学的意義を検証することを目的として、実験を行った。

方法

Δ mtDNA と野生型 mtDNA の両方を有し、また Cre-loxP 系により Mx1 プロモーター制御のもと薬剤投与を行うことで後天的に肝臓・血球系組織特異的にミトコンドリア分裂因子 Drp1 のノ

ックアウトを誘導できるマウス (Mx1-Cre/Drp1^{fl/fl}/mito-mice Δ) のうち比較的% Δ の低い 3-4 か月齢の雄個体を実験に用いた。このマウスを以下 4 群に分け、血球系組織における病態の比較解析を行った。具体的には末梢血塗抹標本の鉄染色やヘマトクリット測定による貧血症状の解析を行い病態の有無や悪性度の検証を行った。

①Drp1 WT/ Δ Low

薬剤 (PolyI:C) を投与するものの Cre リコンビナーゼを有さないために Drp1 がノックアウトされず、かつ% Δ が低い mito-mice Δ

②Drp1 WT/ Δ Middle

薬剤を投与するものの Cre リコンビナーゼを有さないために Drp1 がノックアウトされず、かつ% Δ が中程度である mito-mice Δ

③Drp1 KO/ Δ Low

薬剤投与により肝臓・血球系組織特異的に Drp1 をノックアウトし、かつ% Δ が低い mito-mice Δ

④Drp1 KO/ Δ Middle

薬剤投与により肝臓・血球系組織特異的に Drp1 をノックアウトし、かつ% Δ が中程度である mito-mice Δ

結果

3-4 か月齢における各群のマウスの末梢血塗抹標本を鉄染色した結果から、Drp1KO Δ Middle の群において他群と比較して担鉄赤血球の割合に有意な増加が見られた。

考察・展望

Drp1 KO/ Δ Middle の群において担鉄赤血球の割合が他の群と比較し有意に増加したという結果から、この群のマウスではミトコンドリアにおける鉄代謝の異常が起きていることが示唆される。また、Drp1 KO/ Δ Middle の群において% Δ が 70%に満たないにも関わらず病態発症が確認されたことから、ミトコンドリア分裂がミトコンドリア病態発症機構において抑制的に関与していることが示唆される。

% Δ は加齢に伴い上昇すると考えられていることや、所属研究室の先行研究により示された Δ mtDNA の蓄積に伴うミトコンドリア分裂の亢進の可能性から、月齢の異なる各群のマウスにおいても同様に病態解析を行い比較することで、より詳細な知見が得られることが期待される。

今後、同様の解析に加え FACS による末梢血、骨髄、脾臓における血球系細胞の lineage 解析、骨髄塗抹標本の鉄染色及びメイ・ギムザ染色を、より加齢させた各群のマウスにおいて行い、病態解析を行う予定である。

へパラン硫酸エンドスルファターゼ遺伝子の成体マウス脳における発現細胞の解析

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

・背景と目的

へパラン硫酸はイズロン酸またはグルクロン酸とグルコサミンからなる二糖が繰り返してできる糖鎖であり、コアタンパクに結合しへパラン硫酸プロテオグリカンの形をとっている。へパラン硫酸プロテオグリカンは細胞外基質や細胞膜上に存在していて、成長因子などと相互作用し、細胞の分化、増殖、移動に関わっている。へパラン硫酸は 2-O-、6-O-、N-位が硫酸化されるが、その硫酸化が不均一であることにより、構造多様性を有する。へパラン硫酸エンドスルファターゼである Sulf1 はへパラン硫酸の 6-O-位を脱硫酸化することで成長因子などのシグナル伝達を調節している。これまでに Sulf1 は嗅覚神経回路や情動・報酬に関する側坐核などに強く発現することが見いだされている。側坐核は腹側線条体の一部で、報酬・快楽などの役割を果たす。線条体は、その投射細胞により、直接路と間接路の二つの経路で構成されている。直接路は線条体から黒質網様部につながり報酬行動に関与していて、間接路は線条体から淡蒼球を介して黒質網様部に至り忌避行動に関与している。直接路のニューロンはドーパミン D1 受容体やサブスタンス P を強く発現していて、間接路のニューロンはドーパミン D2 受容体やエンケファリンを強く発現している。本研究では成体マウス脳において、Sulf1 とサブスタンス P の前駆体プレプロタキキニン A 遺伝子 (Tac1)、エンケファリンの前駆体プレプロエンケファリン A 遺伝子 (Penk) のダブル *in situ* hybridization を行い、Sulf1 が直接路・間接路のいずれのニューロンで発現しているかを明らかにすることを目的とした。

・方法

プローブの作製

Tac1 と Penk のプローブについてはクローニングから行った。まず、Tac1 の mRNA から 749 bp、Penk の mRNA から 1163 bp の配列をプローブの配列として選び、RT-PCR で増幅し、TA クローニングを行った。インサートのシーケンスを確認し、プラスミドを調製した。これを制限酵素によって一カ所で切断しテンプレートを作製した。Sulf1 のプローブの配列は感度を上げるために 3'UTR とコーディング領域の二つを選んだ。直鎖化したテンプレートと RNA ポリメラーゼを用いてジゴキシゲニン (DIG) で標識した Sulf1 と Fluorescein で標識した Tac1 と Penk のプローブを、センスプローブとアンチセンスプローブの両方について合成した。

in situ hybridization

5~7 週齢の野生型マウスの脳を取り出し、O.C.T コンパウンドで包埋・急速凍結し、厚さ 15 μm 、冠状断の切片を作製した。この切片を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) /リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 40 分間固定し、PBS で洗浄した。次に無水酢酸トリエタノールアミン溶液で 10 分間アセチル化し、PBS で洗浄した。その切片にハイブリダイゼーション溶液 (5 \times SSC, 50%ホルムアミド, 5 \times Denhardt's 溶液, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Yeast tRNA, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Salmon sperm DNA) をかけ、プレハイブリダイゼーションを行った。その間に、ハイブリダイゼーション溶液に、Sulf1 は 2 種のプローブを 0.5 $\text{ng}/\mu\text{g}$ ずつ、Tac1 と Penk はそれぞれプローブを 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ になるように加え、80°C で 5 分間変性させ、氷で急冷した。ハイブリダイゼーション溶液を捨て、プローブ溶液をかけて 72°C で 18 時間ハイブリダイズした。

翌日、72°C の 0.2 \times SSC で 30 分間ずつ 3 回洗浄した。次に、TS7.5 (0.1 M Tris-HCl, pH7.5, 0.15 M NaCl) で 5 分間洗浄し、1% Blocking reagent で 1 時間ブロッキングを行い、1% Blocking reagent にアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体とペルオキシダーゼ標識抗 FITC 抗体をそれぞれ 1000 倍と 4000 倍に希釈したものをかけ、4°C で 18 時間反応させた。

翌日、TNT (TS7.5, 0.05% Tween-20) で洗浄し、biotin tyramide 反応液をかけ 5 分間反応させた。TNT で洗浄し、1000 倍に希釈した Streptavidin-Alexa488 をかけ 30 分間反応させた。次に、TNT で洗浄し、TS8.0 (0.1 M Tris-HCl, pH8.0, 0.1 M NaCl, 10 mM MgCl₂) で 10 分間平衡化し、HNPP/Fast Red をかけ顕微鏡で観察しながら適当なところで PBS-EDTA (10 mM EDTA in PBS) によって反応を止め、FluoromountG で封入した。

・結果と考察

この実験を行うにあたって Sulf1 の検出と Tac1、Penk の検出をそれぞれ別にして条件検討を行った。

使用するマウスの脳については、灌流固定してから急速凍結した脳よりも新鮮凍結脳の方が強いシグナルを得られた。

Sulf1 のプローブについて、3'UTR の領域だけのものと、コーディング領域のプローブを加えた場合を試すと、コーディング領域のプローブを加えた方が強いシグナルが得られた。

Tac1 のプローブの濃度を、0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ と変えたところ、0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ではシグナルが弱く、5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ではバックグラウンドが強くなるので、濃度を 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ と決めた。

Fluorescein の検出で抗 FITC 抗体の希釈倍率を 1000 倍、2000 倍、4000 倍と変えると、希釈倍率が 1000 倍、2000 倍ではバックグラウンドが高くなったので 4000 倍とした。

ペルオキシダーゼの検出を biotin tyramide と Streptavidin-Alexa488 の組み合わせと tyramide-Alexa488 のみの二通りを試した。しかし tyramide-Alexa488 の反応時間が 5 分、10 分のときはシグナルが得られず、20 分ではバックグラウンドが高くなり、適切な条件が見つからなかった。そこで biotin tyramide と Streptavidin-Alexa488 の組み合わせで検出を行うこととし、biotin tyramide の反応時間を変えると、7.5 分と 10 分ではバックグラウンドが高くなったので、反応時間を 5 分間とした。

それぞれで検出できる条件が見つかったので、その条件で二重検出を行った。その結果、Sulf1 と Penk でははっきりしたシグナルを得ることができた。しかし、Tac1 に関しては強いシグナルが得られなかったため、更なる条件検討が必要である。

インフルエンザウイルスゲノムの細胞膜へのターゲティングを制御する分子機構

黒木 崇央 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

インフルエンザウイルスは8種類の一本鎖RNA (vRNA) をゲノムとして持ち、末端にウイルス由来のRNAポリメラーゼ複合体が結合し、15~25塩基ごとにRNA結合タンパク質であるNPが数珠状に結合することでリボヌクレオプロテイン (vRNP) 複合体を形成している。複製されたvRNP複合体は核外輸送後、微小管重合中心 (MTOC) に集積し、リサイクリングエンドソーム (RE) を介して細胞膜へと輸送される。細胞膜直下ではアクチン・ミオシンネットワークのダイナミックな動態変化を利用してウイルス粒子が形成される。

エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた物質の輸送および選別はエンドソームによって制御される。取り込まれた物質は初期エンドソームへと輸送され、分解経路、あるいはリサイクリング経路へと選別される。エンドソームの動態は膜の出芽、輸送、融合を伴うダイナミックなものであり、この制御には低分子量Gタンパク質であるRabファミリータンパク質が必須である。

そのうちREを制御するのはRab11であり、細胞膜からエンドサイトーシスで取り込まれた分子の細胞膜への再輸送に関与する。REの輸送は微小管およびアクチンを介して行われる。モータータンパク質のうち、微小管上の逆行輸送にはダイニン、順行輸送にはキネシン、アクチン上の輸送および繫留にはミオシンが必要であり、Rab11と各モータータンパク質の結合がREの細胞内の空間配置を決定する。Rab11とモータータンパク質は、アダプター分子として機能する5種類のRab11 Family Interactive Protein (FIP1~FIP5) を介して結合する。FIP5はII型キネシンと結合し微小管を介したREの輸送を、FIP2はミオシンVbと結合しアクチンとREの結合を制御することが知られている。

vRNP複合体の細胞膜への輸送には微小管との相互作用、およびウイルス粒子の形成にはアクチンとの相互作用が必要であることが明らかにされている。しかし、それぞれの細胞骨格を介したvRNP複合体の細胞内動態を制御する分子機構については明らかにされていない。

本研究では、vRNP複合体と微小管、vRNP複合体とアクチンの相互作用の経時的変化をProximity Ligation Assay (PLA) により解析し、それぞれの結合におけるREの必要性について解析を行った。

【材料と方法】

1. vRNP複合体の細胞内局在の観察

1.0x 10⁵ cells/dish となるようA549細胞を播種し、細胞接着後にInfluenza A/PR/8/34 (PR8) 株をMOI=10で感染させた。所定の時間で細胞を洗浄後、3%PFAで固定した。anti- α -tubulin抗体、蛍光標識Phalloidin、anti-NP抗体を用いて間接免疫蛍光染色法 (IFA) を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各タンパク質の細胞内局在を観察した。

2. siRNAによるFIP5, FIP2のノックダウン効率の検討

1.0x 10⁵ cells/dish となるようA549細胞を播種し、Lipofectamine™ RNAiMAXとsiRNAの混合液を添加し60時間培養することで標的遺伝子をノックダウンし、その後細胞を回収した。細胞から全RNAを抽出し、逆転写反応を行った後、FIP5, FIP2の遺伝子配列を特異的に認識するプライマーを用いたqRT-PCRによってノックダウン効率を評価した。

3. PLAによるvRNP複合体と細胞骨格の相互作用の解析

0.5x 10⁵ cells/dish となるようA549細胞を播種し、2.の方法に従ってFIP5およびFIP2をノックダウンした。その後PR8株をMOI=10で感染させ、所定の時間で細胞を回収し、固定した。固定した細胞に対してPLAを行いvRNP複合体- α -tubulinおよびvRNP複合体- β -actinのタンパク質相互作用を検出した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した画像は画像処理ソフトウェアImarisを用いて解析した。

【結果と考察】

IFAの結果より、感染後2時間ではvRNP複合体は核に局在し、感染後5時間になるとMTOCに集積し、その後微小管に沿って細胞膜側へ移行する様子が観察された。また、感染が進むにつれ細胞膜直下のアクチンとvRNP複合体との共局在が強くなる様子が観察された。

また、vRNP複合体と微小管、およびvRNP複合体とアクチン間のPLAシグナルを定量したところ、IFAの結果と一致して、感染初期から中期ではvRNP複合体と微小管の相互作用が増加するのに対し、後期に移行すると、vRNP複合体は微小管からリリースされ、アクチンとの相互作用が増加することが示唆された。これらの結果から、vRNP複合体は微小管上を輸送された後、アクチン上に乗り移る可能性が推測される。現在、FIP5およびFIP2をそれぞれノックダウンし、vRNP複合体の細胞内動態に与える影響を解析中である。

鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物細胞への感染性を規定する分子機構の解明

多久 智大 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

[背景・目的]

A 型インフルエンザウイルスは 8 本のマイナス極性 1 本鎖 RNA を有するウイルスであり、血清型により 100 以上の亜型が存在する。すべての亜型は自然宿主であるカモで維持されているが、宿主域を超えてヒトを含む他の動物種へと適応変異したウイルス (新型ウイルス) が出現した場合、我々はこれらのウイルスに対して免疫を保持していないため、世界的大流行を引き起こす可能性が高く、宿主域を規定する分子機構を明らかにすることは重要である。これまでに、宿主域を規定する分子機構として、哺乳動物細胞ではウイルスポリメラーゼの核内輸送に必要なインポーチンやウイルスレセプターであるシアル酸が鳥インフルエンザウイルスでは機能しないことが知られている。一方、これらの経路に関与しないアミノ酸変異によっても、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物へ適応する例も報告されており、様々なウイルスの増殖過程において、インフルエンザウイルスの宿主域は規定されていると考えられる。

本研究は、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物へ適応するための新たな分子機構を解明することを目的とする。そのために、既知の適応変異を持たないにもかかわらず哺乳動物への感染性を獲得したウイルス株 (A/duck/Zambia/03/08、以降 Z08 と表記) と、哺乳動物への感染性を持たないその近縁株 (A/duck/Zambia/10/09、以降 Z09 と表記) を用いて解析を行った。

[方法]

(1) 細胞

哺乳類の培養細胞として、イヌ腎細胞由来の MDCK 細胞とヒト肺細胞由来の A549 細胞を、鳥類の培養細胞としてカモ胎児由来の DEF 細胞を使用した。

(2) 各ウイルスの培養細胞内での増殖能試験

MDCK 細胞および DEF 細胞に対して MOI=0.01 で各ウイルスをトリプシン処理下で感染させ、感染後 24、36、48、60 時間のウイルス力価を HA アッセイにより測定した。

(3) ウイルスタンパク質の細胞内発現及び局在解析

細胞を 3%paraformaldehyde/PBS で固定後、抗 NP 抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。サンプルの観察には、共焦点顕微鏡を用いた。

(4) 定量的 RT-PCR

MDCK 細胞、DEF 細胞に対して MOI=10 で各ウイルスを感染させ、感染後 2、5、8 時間で細胞を回収した。また、Cycloheximide 処理下で、MDCK 細胞へ各ウイルスを MOI=10 で感染させ、感染後 4 時間で細胞を回収した。回収した細胞から AGPC 法によりウイルス RNA を抽出して、抽出した RNA を Super Script III 使用して逆転写した。その後、Fast start SYBR Green を用いて TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System によって cDNA 量を定量した。

[結果・考察]

哺乳動物細胞への適応を確認するため、Z08、Z09 両株の培養細胞感染時の増殖能を比較した。HA アッセイによって感染経時的に各ウイルスの力価を比較した結果、DEF 細胞では同様の増殖能を示した。一方、哺乳動物細胞である MDCK 細胞に感染させたところ、Z08 株は 320 HA/ml まで増殖したのに対して、Z09 株は 80 HA/ml までしか増殖しなかった。そこで次に、MDCK 細胞へ各ウイルス株をそれぞれ MOI=0.1、1、10 で感染させ、間接蛍光抗体法で NP を検出し、感染の有無を観察したところ、各株とも MOI=0.1 では約 7%、MOI=1 では約 30%、MOI=10 では 100%の感染効率を示した。この結果から、Z08 株と Z09 株は同程度の MDCK 細胞に対する吸着効率をもつことが示唆された。

細胞に吸着後、ウイルス粒子から放出されたウイルスゲノムは、RNA 結合タンパク質である NP の核局在化シグナルを介して核へと移行する。そこで、両株の NP タンパク質を A549 細胞に過剰発現し、細胞内局在を観察した。その結果、Z08 株及び Z09 株由来のどちらの NP タンパク質も核内に局在していたことから、どちらのウイルス株でもウイルスゲノムは正常に核内移行することが示唆された。

哺乳動物細胞内でのウイルスポリメラーゼの RNA 合成活性を評価するため、各ウイルス株を MDCK 細胞へ感染させ、mRNA およびウイルスゲノム量を定量的 RT-PCR によって測定した。その結果、Z08 株の方が、Z09 株に比べ約 3 倍の転写量および約 5 倍の複製量を示した。また、MDCK 細胞を Cycloheximide で処理し、ウイルスゲノムの複製に非依存的な転写量を検討したところ、各株ともに同等の転写量を示した。よって、Z08 株は、ウイルスゲノム複製活性が促進されることで哺乳動物細胞に適応したと考えられる。

骨を溶かす細胞(破骨細胞)が分化する過程で転写因子 MafB は何を行うのか

松永 有里菜 (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】

我々の体内では、常に新しい骨が作られ、同時に古い骨が破壊されている。このサイクルは骨代謝と呼ばれ、骨芽細胞と破骨細胞がこの働きを担っている。骨芽細胞は骨形成に、破骨細胞は骨融解に働いている。骨代謝のバランスの崩れは様々な骨疾患を発症させると考えられており、その中でも破骨細胞による骨融解方向への傾きは、骨粗鬆症や骨融解症の発症への主要な原因となっており、この破骨細胞の働きについて知ることは骨疾患を改善させる上で重要であると考えられる。

破骨細胞は血液細胞由来であり、近年では、マクロファージや樹状細胞と同じ起源の未分化な細胞から破骨細胞が分化することが明らかとなってきたが、詳細は明らかになっていない。その分化には M-CSF (macrophage colony stimulating factor) と RANKL (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand) の2つのサイトカインが必須である。また破骨細胞は多核の細胞であり、分化の最終段階で単核の細胞同士が融合することで多核の破骨細胞へと分化する。

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。

先行研究より、MafB は破骨細胞分化に対して抑制的に働くことが報告されているが、その詳しい分子メカニズムや働きについては未だ解明されていない。そこで本研究では、転写因子 MafB に着目し、破骨細胞分化における機能メカニズムを明らかにすることを目的とした。

本研究では *Matb* 欠損マウスを用いて破骨細胞分化における MafB の働きについて検証した。

【材料・方法】

1. マウス

本研究にあたり、2種類の *Matb* 欠損マウスを用いた。

(1) *Matb*-GFP ヘテロノックインマウス

当研究室にて作成されたマウスで、*Matb* 遺伝子座に GFP 遺伝子がノックインされており、MafB が発現する細胞で GFP が発現する。

(2) *Matb* コンディショナルノックアウトマウス

Matb^{fl/fl} マウスに Cre loxP システムにより血液細胞のみで MafB を欠損させたマウス (*Matb*^{fl/fl} :: Tie2-Cre、以下 *Matb* cKO マウスと略)。

2. 破骨細胞培養実験

Matb cKO マウスと野生型マウスから骨髓を取り出し、M-CSF と RANKL を加えて破骨細胞へと培養することでその違いについて観察した。染色には破骨細胞マーカーである TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) を用いた。

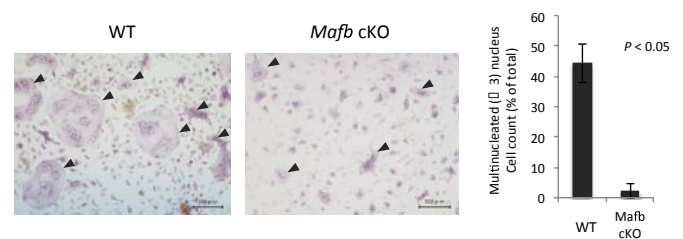
3. *Matb*-GFP ヘテロノックインマウスを用いた解析

Matb-GFP ヘテロノックインマウスの骨髓を培養し、破骨細胞分化過程において MafB がどのように発現しているのか、GFP を用いて観察した。

【結果】

1. 破骨細胞分化培養実験

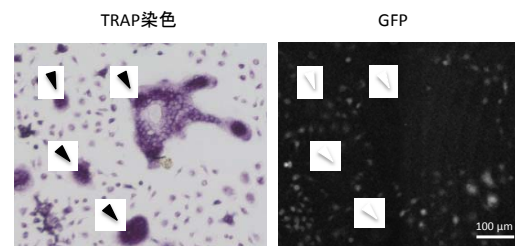
Matb cKO マウスでは野生型マウスと比べて多核の破骨細胞の数が優位に減少していた。しかし一方で *Matb* cKO マウスでは単核の破骨細胞は観察された。つまり、*Matb* cKO マウスではほとんどの細胞が単核の破骨細胞であった。



矢頭は多核 (3 個以上) の破骨細胞を示す。

2. *Matb*-GFP ヘテロノックインマウスを用いた解析

単核の破骨細胞では GFP の発現が観察されたが (右図白色)、多核の細胞ではその発現は観察されなかった。つまり、単核の破骨細胞では MafB の発現が観察されたが、多核になるとその発現が減少していることを示している。

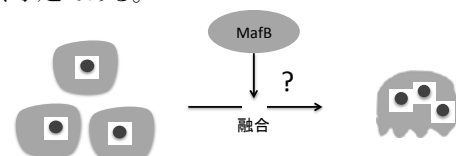


矢頭は多核 (3 個以上) の破骨細胞を示す。

【考察と今後の予定】

以上の結果より、*Matb* cKO マウスでは多核の破骨細胞の減少が見られ、また多核の細胞になると MafB の発現が減少していた。これらのことから、MafB は分化の最終段階で起こる融合および多核化に関係している可能性があり、これまでに報告されている破骨細胞分化抑制と反対の働きを持つことを示唆している。

今後は実際に MafB が破骨細胞の融合に働いているのか、融合に関連する遺伝子の発現などを *Matb* cKO マウスを用いて解析していく予定である。



マクロファージにおけるムチン型糖鎖の生理機能解析

涌井 宏優 (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】

生体内では、多くの膜貫通・分泌タンパク質が糖鎖修飾を受け、糖タンパク質となる。糖鎖は多種多様な糖転移酵素によって合成され、多様な構造を呈する。タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に付加された糖鎖を O 型糖鎖と呼び、そのうち 1 つ目の単糖が N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) であるものをムチン型糖鎖と呼ぶ。ムチン型糖鎖修飾は数ある糖鎖修飾の中でも頻度が高いもので、代表的なものには体外へ分泌される粘液の主成分である、ムチンなどが挙げられる。

ムチン型糖鎖は合成の過程で「コア (core)」構造を経由する。コア構造には core 1 から core 4 があり、core 1 構造はセリン/スレオニン (Ser/Thr) 残基に結合した GalNAc に、ガラクトース (Gal) が付加された、Gal-GalNAc-Ser/Thr 構造のことを指す。この Gal 付加反応は糖転移酵素である core 1 ガラクトース転移酵素 (C1galt1) によって触媒される。また、C1galt1 が機能するためにはその特異的シャペロンである core 1 synthase specific molecular chaperone (Cosmc) が必要である。そのため、C1galt1 または Cosmc を欠損するとムチン型糖鎖は正常に合成されなくなる。C1galt1 を全身で欠損させたマウスは胎生致死を示すことが報告されている。また、Cosmc の欠損でも C1galt1 の欠損と同じ表現型が見られる。これらのことから、ムチン型糖鎖はマウスの正常な発生に必要であることが分かる。しかし、ムチン型糖鎖が生体内で具体的にどのような機能を果たしているのかは解明されていない。

マクロファージには、ムチン型糖鎖修飾を多く受ける Tim-4 が発現している。I 型膜貫通タンパク質である Tim-4 は、アポトーシス細胞の "eat me" シグナルであるホスファチジルセリンの受容体である。Tim-4 はムチンドメインを持っており、多くのムチン型糖鎖が付加されると予測されている。そこで、本研究ではムチン型糖鎖の、Tim-4 の機能との関わりに着目し、マクロファージ特異的な Cosmc コンディショナルノックアウトマウスを解析した。

【材料・方法】

・マウス

マクロファージ特異的 Cosmc 欠損マウス (オス: *LysMCre::Cosmc^{flav}*、メス: *LysMCre::Cosmc^{flav/flav}*、C57BL/6J 系統) を用いた。コントロールには、野生型 (WT) として同腹仔の Cre の個体を使用した。実験には 8~12 週齢の個体を使用した。

・定量的 RT-PCR

Cosmc 欠損マウスから腹腔常在マクロファージを回収し、Cosmc 遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR により検証した。

・レクチンブロット

Cosmc 欠損マクロファージはムチン型糖鎖を正常に合成できなくなっていると考えられる。そこで、core 1 合成の前駆体構造である Tn 抗原 (GalNAc-Ser/Thr) を認識するレクチンである

Helix pomatia agglutinin (HPA) を用いてレクチンブロットを行い、糖タンパク質上のムチン型糖鎖の変化を調べた。

・食食アッセイ

Tim-4 欠損腹腔常在マクロファージは、アポトーシス細胞を食食する能力が低下することが報告されている。Cosmc 欠損マクロファージでは Tim-4 タンパク質上のムチン型糖鎖が欠損すると考えられるので、このマクロファージの食食能を *in vivo* で測り、Tim-4 タンパク質上のムチン型糖鎖の重要性を調べた。C57BL/6J マウスから取り出した胸腺細胞をデキサメタゾンでアポトーシス誘導し、野生型と Cosmc 欠損マウスの腹腔内に注入した。それぞれの腹腔常在マクロファージによる食食率はフローサイトメーターで測定した。

・マクロファージ細胞表面における Tim-4 の発現

Cosmc 欠損マウスの腹腔常在マクロファージを採取し、Tim-4 の発現量をフローサイトメーターで測定した。

【結果】

・定量的 RT-PCR

マクロファージ特異的 Cosmc 欠損マウスの腹腔常在マクロファージでは、Cosmc の遺伝子発現が 9 割程度減少していた。一方、C1galt1 の発現は mRNA レベルでは変化が見られなかった。

・レクチンブロット

腹腔常在マクロファージから抽出したタンパク質でレクチンブロットを行った。WT マクロファージのタンパク質には Tn 抗原がほとんど見られなかったのに対して、Cosmc 欠損マクロファージのタンパク質は Tn 抗原陽性であった。このことから、Cosmc 欠損マクロファージは core 1 構造を作れず、ムチン型糖鎖は不完全な状態にあることが確認された。

・食食アッセイ

Cosmc 欠損腹腔常在マクロファージの食食能は、WT のものに比べ有意に減少した。

・マクロファージ細胞表面における Tim-4 の発現

Tim-4 陽性腹腔常在マクロファージの、Tim-4 の MFI (mean fluorescent intensity) は、WT マウスに比べ Cosmc 欠損マウスで有意に減少していた。一方、mRNA レベルでは Tim-4 の発現量に変化は見られなかった。

【考察】

以上の結果から、Cosmc 欠損腹腔常在マクロファージでは Tim-4 上にムチン型糖鎖が正常に合成されなくなり、その結果 Tim-4 タンパク質の細胞表面での発現量が低下したと考えられる。アポトーシス細胞の食食能が Tim-4 欠損マウスと同程度減少したことから、Tim-4 の機能にムチン型糖鎖が必要であることが示唆された。

今後はウエスタンブロッティングにより Tim-4 の分解や細胞内局在の変化を調べる。さらに、Tim-4 以外の分子が今回確認された表現型に関わっている可能性についても検討していく。

遺伝薬理学的手法による中枢セロトニン神経の除去と睡眠覚醒への影響

岩崎 加奈子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

生理活性アミンの一種であるセロトニン (5-HT) は 全身で様々な働きに関わっているが、中枢神経系においては神経伝達物質のひとつとして知られている。セロトニン神経の大部分は縫線核に集中しており、中脳・橋・延髄にまたがって存在する。その役割は摂食や体温調節など多岐に渡る事が知られており、特に中脳の背側縫線核(DR)と内側縫線核(MR)は覚醒経路の一部として視床下部などから入力を受け、脳の広範囲に投射している。またセロトニンの受容体は7つのサブファミリー、14種のサブタイプに分類されている。

睡眠覚醒リズムとセロトニン神経の関係については、先行研究によって受容体ごとのアゴニスト、アンタゴニストによる影響が報告されているが、レセプターのサブタイプによって変化は様々だった。セロトニン神経全体としてどのように睡眠覚醒に関与しているのかは明らかにされておらず、これを知る手法の一つとしてノックアウトマウスによる研究が考えられるが、通常のノックアウトマウスでは他の神経による代償機構が働きセロトニン神経除去による変化が現れないという懸念がある。

そこで本実験では、遺伝薬理学的手法により成体マウスで中枢セロトニン神経を後天的に除去し、それが睡眠覚醒に及ぼす影響を調べた。今回神経の除去に用いたジフテリアトキシン (DTA) はジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) が合成するタンパク質性毒素であり、タンパク質合成の転移を触媒する伸長因子 EF2 の側鎖アミノ酸を ADP リボシル化する事でタンパク質合成を阻害する。この DTA はジフテリアトキシンレセプター (DTR) に結合しエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるが、ヒトに発現している hDTR が高い DTA 感受性を持つものに対して、マウスに発現している mDTR は DTA 耐性である。この性質を利用し、セロトニン神経特異的に hDTR を発現させたトランスジェニックマウスに DTA を投与する事によって、成体マウスにおいてセロトニン神経のみ除去する事を目指した。

方法

(1) Pet1/DTR マウスの作成

セロトニン産生細胞特異的に発現している *Pet1* 遺伝子のエンハンサー下流に Cre 発現配列を持つ ePet-cre マウスと、*ROSA26* 遺伝子座に *Floxed stop cassette*, *hDTR*, *tdTomato* を含むコンストラクト (図1) が挿入された DTR マウスを交配させる事で、Cre-loxP 系によりセロトニン産生細胞特異的に hDTR が発現する Pet1/DTR マウスを作成した。



図1. *Rosa-LSL-DTR-tdTomato*

(2) カニューラ・電極の取り付け

雄の Pet1/DTR マウスに、側脳室に DTA を直接投与するためのカニューラと、脳波と筋電図測定用の電極を麻酔下で取り付けした。カニューラはブレグマから尾側に 0.2 mm、側方に 1.0 mm の位置に装着し、ガイドの深さは頭骨表面から 2.0 mm とした。

(3) 脳波・筋電図測定と解析

まず DTA 投与なしの状態でもコントロールを測定した。その後 DTA 投与から 9 日後、16 日後、23 日後にそれぞれ連続 48 時間測定を行った。測定室の明暗周期は 12 時間明期、12 時間暗期で設定された。測定された脳波・筋電図を、マウス脳波の一般的な基準と照らし合わせて 20 秒ずつのエポックでノンレム睡眠、レム睡眠、覚醒の3つの状態に振り分けた。

(4) DTA の投与

DTA は人工脳脊髄液 (aCSF) を溶媒にして濃度を調節した。投与する液量は 1 μ l に設定し、DTA 濃度を 2.5 ng/ μ l から 20 ng/ μ l の間で振り、適切な濃度を検討した。DTA の投与はカニューラを通じて行った。

(5) 深部体温、体重、血糖値の測定

セロトニン神経は摂食や体温など様々な機能の調節に関与しているため、カニューラ電極手術後から週に 2 回直腸温と体重を測定し、健康状態を確認した。また *Pet1* 遺伝子は膵臓のランゲルハンス島 β 細胞での発現も見られるため、脳波・筋電図を測定した翌日に血糖値を測定し、膵臓への影響も観察した。

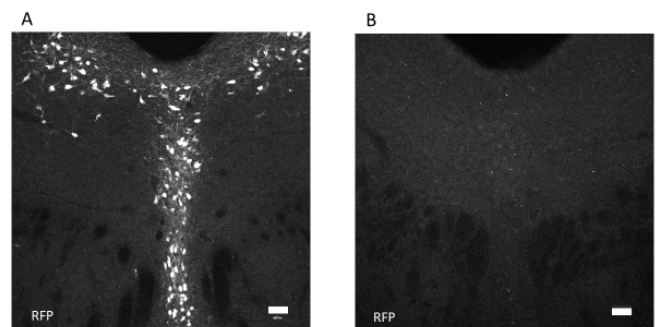
(6) 免疫組織化学

マウス全脳の凍結サンプルを作成し、そこから厚さ 40 μ m の冠状断面の切片を作成した。anti-5HT、anti-RFP 抗体と DAPI を用いて免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

DTA 投与なしの Pet1/DTR マウス、DTA 投与後の Pet1/DTR マウスの同一冠状断面の切片上で観察された細胞数をカウントし、DTA 投与による細胞数の変化を観察した。

結果と考察

免疫組織化学によって、DTA 投与による RFP 陽性細胞の減少が観察された (図2)。この他の詳細な結果については測定・解析中のため、発表会にて示す。



Bregma -4.96におけるDRのanti-RFP免疫組織化学像 (A)DTA投与なし (B)DTA投与後 スケール=50 μ m

図2. ジフテリア投与による RFP 陽性細胞の減少

線虫 *C. elegans* を用いた睡眠を制御する遺伝子の探索

吉田 光作 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

睡眠は多くの動物種に広く見られる現象である。しかしながら、睡眠を制御する分子機構についてはほとんど明らかになっていない。

一般に、睡眠の基準として、可逆的である、恒常性の制御下にある、刺激に対して反応性の低下を示す、などがあげられる。単純なモデル動物である線虫 *Caenorhabditis elegans* においても、これらの基準を満たす、睡眠のような状態が存在する。Lethargus と呼ばれる、脱皮の直前に現れる状態である。通常線虫はサインカーブ状に体を曲げながら前後に移動するが、lethargus 中は体をホッケーのスティックのように伸ばしてほとんど移動しなくなる。Lethargus 中でも強い機械刺激に応じて動き出す素早い可逆性がみられるなど、上記の睡眠の基準を満たしている。

これらに加え、線虫が遺伝学的技術を適用しやすい点を踏まえると、睡眠制御に関わる新規の遺伝子を探索するうえで非常に有用なモデルであると期待される。そこで本研究では、まず、過去のマイクロアレイなどの研究から、脱皮のタイミングに関連して発現が周期的に変動することが分かっている遺伝子群に着目し、その変異体について解析を行った。これらの遺伝子群は線虫のみならず哺乳類でも広く保存されており、動物普遍的な睡眠制御遺伝子の同定につながることを期待された。

方法

線虫を個体ごとに、かつ複数の個体を同時にある程度高い倍率で観察する必要があるため、以下の図 1 に示すようなチャンバーを用いて長時間の撮影を行なった。撮影で得られた画像から線虫の動きを検出し、lethargus に異常がみられる変異体を探した。Lethargus の検出には fraction of quiescence (FOQ; どれだけ自発的運動が低下しているか) を算出した。

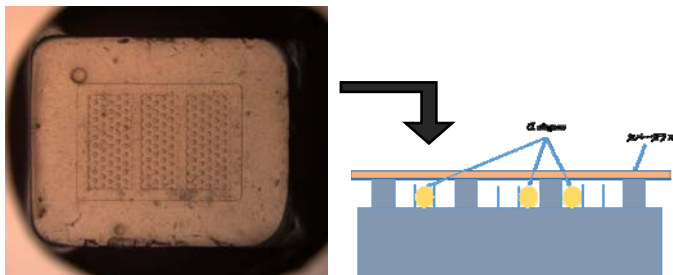


図 1 撮影用のチャンバーと断面の模式図

結果

野生型では、lethargus に入ると FOQ が急激に上昇し、FOQ の高い状態が 4 時間ほど続いた(図 2)。一方、解析した複数の変異体のうち、変異体 1 では、FOQ の上昇が野生型に比べ緩やかであった(図 3)。また変異体 2 では FOQ の高い状態が野生型に比べ長時間持続した(図 4)。現在、サンプル数を増やし、再現性や統計的に有意な差の有無を検討している。また、より多くの変異体の解析を行い、スクリーニングの規模を拡大している。

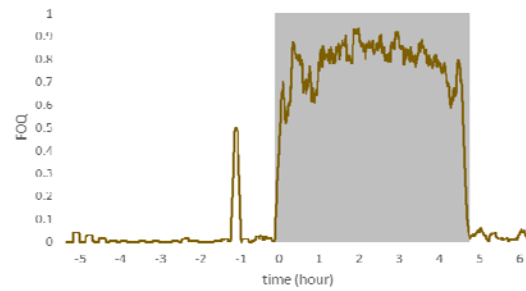


図 2 野生型の lethargus

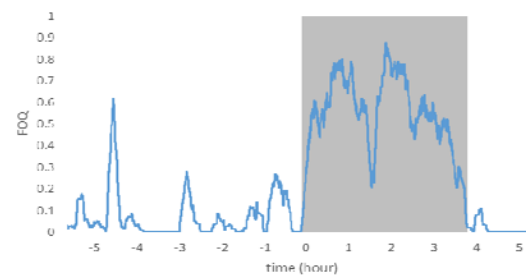


図 3 変異体 1 の lethargus: 野生型より緩やかに lethargus に入る。

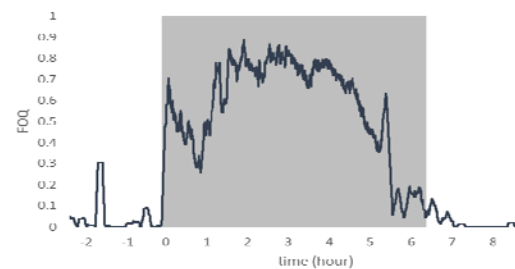


図 4 変異体 2 の lethargus: 野生型よりも lethargus が長い。

考察と今後の計画

今回、まだ統計的解析や再現性の検討が不十分であるものの、覚醒状態から lethargus への移行のステップおよび、lethargus の持続時間に異常があると期待される変異体の同定に成功した。今後、これらの変異体およびその原因遺伝子の解析により、覚醒状態から睡眠への切り替えの分子機構や、睡眠の持続期間を規定する分子機構についてその一端を解明できると期待される。

今後は、線虫において、これら候補遺伝子がどのように lethargus の制御に関わるか、その作用機構を明らかにすると同時に、哺乳類における役割も明らかにするために、マウスでの解析も行う。本研究により、動物普遍的な睡眠の分子機構の一端が明らかになると期待される。

参考文献

- (1) Raizen D. M. et al. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state Nature 2008
- (2) Lockery S. R. et al. Artificial dirt: Microfluidic substrates for nematode neurobiology and behaviour journal of neurophysiology

カフェインで誘導される新規細胞死経路関連遺伝子の探索

亀井 優奈 (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

細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)と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も多細胞の生活環を有する生物である。この生物は以下の利点から、発生や細胞運動のモデル生物として研究に利用されている。①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。②全遺伝子情報が解読されており、ゲノム配列も公開されている。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するが、飢餓状態におかれると一部の細胞がcAMPを分泌し始める。その後、周囲の細胞がcAMPに対する走化性応答により集合し、ナメクジ状の多細胞体を形成後、最終的に胞子と柄からなる子実体を形成する。

一般的に個体レベルでの適度なカフェインの摂取は精神覚せい作用等の有用な効果をもたらす。しかし、過剰な摂取は細胞レベルにおいて細胞周期を遅らせたり、細胞死を引き起こしたりする。細胞性粘菌およびヒト培養細胞を用いた当研究室の先行研究により、カフェインにより引き起こされる細胞死は *plaA* (ホスホリパーゼ A₂) 遺伝子が関連することが明らかになった(Kuwayama, Scientific Reports, 2012)。

ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)はアラキドン酸合成酵素として *plaA* 遺伝子によってコードされ、この遺伝子が欠損するとアラキドン酸の合成を行うことが出来なくなる。アラキドン酸は細胞膜リン脂質にエステル結合した形で貯蔵されており、PLA₂のはたらきにより細胞内へ遊離される。アラキドン酸の代謝物はプロスタグランジン等の重要な生理活性を有しているため、アラキドン酸は生体維持に必須な物質であると言える。

先行研究において細胞性粘菌の *plaA* 欠損株が高濃度カフェインによる細胞死に対して耐性を有することが分かった。これは高濃度カフェインによってアラキドン酸が遊離され、遊離したアラキドン酸が細胞死を促進するという、アラキドン酸がこれまで知られている生命維持の機能とは逆に、細胞死の機能を有することが明らかになった。さらに、この細胞死機構はカスパーゼ非依存的に、つまりアポトーシス経路とは別の経路であることも判明した。

しかしながら、現在まで高濃度カフェインによる細胞死経路の詳細は不明であり、遊離したアラキドン酸の具体的な作用と細胞死に至る経路はわかっていない。そこで本研究では、ジーンタギング法 (REMI 法) を利用した新たな高濃度カフェイン耐性変異株を作製することにより、この新規細胞死経路に関連する遺伝子群の探索を行うことにした。

材料と方法

実験 I REMI 法による変異株作製

REMI 法とは制限酵素によりゲノム DNA を部分的に切断し、その部位に外来の薬剤耐性遺伝子を導入することにより突然変異を誘発させる方法である。まず、変異株の薬剤選択マーカーであるプラスチジン耐性遺伝子発現カセット DNA 断片 (BSR) を

pmBSR を制限酵素 *BamHI* による制限酵素処理することにより抽出した。その後、BSR をエレクトロポレーションでゲノムを切断するための消化により *BamHI* と同様の DNA 末端を生じる制限酵素 *DpnII* と共に *plaA* OE 株に導入し、細胞内のゲノムに制限酵素配列依存的な変異を生じさせた。また、エレクトロポレーション後に 4 枚の 96well で培養を行い、導入する *DpnII* や BSR の DNA 量を変えて形質転換効率を調べた。

実験 II 高濃度カフェイン耐性株スクリーニングの条件検討

様々な濃度のカフェインを含有する細胞性粘菌を培養する培地 HL5 を作製した。それらの培地中での野生株 AX2 と *plaA* 欠損株の培養を独立に行い、培養時間における生存率を調べ、野生株 AX2 が死滅し *plaA* 欠損株が生存できる条件の探索を行った。

結果と考察

実験 I

plaA OE 株で下記の条件で REMI 法を行うと、以下のようになった。また、DNA 量は電気泳動により測定をおこなった。

表 1 各条件における変異対数

DNA(μg)	<i>DpnII</i> (units)	形質転換体数(株)
4.2 ≤ x ≤ 12	25	5
8.4 ≤ x ≤ 25	25	16
8.4 ≤ x ≤ 25	100	47

DNA や *DpnII* を増やすと分離される変異体数は増加した。しかしながら、新規細胞死経路関連遺伝子の探索を行うためには、100 程度以上の形質転換体数を得る必要があるため、さらなる条件の検討が必要であることがわかった。

実験 II

3, 10, 45, 50, 100 mM の各濃度のカフェイン存在下での 84 時間までの細胞生存率を測定した。100 mM の高濃度カフェインの条件ではカフェイン耐性を持つ *plaA* 欠損株も生存できなかった。逆に 3 mM といった低濃度では AX2 が生き残ってしまった。10 mM では野生株 AX2 の生存率と *plaA* 欠損株の間に有意な差が見られたが、野生株 AX2 の生存率は 0%には至らなかった (表 2)。現在、AX2 の生存率が 0%になり、かつ欠損株が生存しうる培養条件を引き続き探索している。

表 2 カフェイン 10 mM における生存率

培養時間(h)	0	24	48	72	84
<i>plaA</i> 欠損株 (%)	100	60	43	22	17
AX2 (%)	100	29	19	7	5

今後の展望

引き続きスクリーニングの条件が見つかり次第、効率化された REMI 法により高濃度カフェイン耐性株をスクリーニングし、挿入変異により破壊された遺伝子の同定を行い、新規細胞死経路に關与する候補遺伝子の同定を進める計画である。

細胞は右利きか左利きか？—運動方向性の偏りの解析—

関口 実歩（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

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、土壌に生息する真核微生物である。普段は単細胞アメーバ様でバクテリアを捕食し、単純分裂によって増殖する。しかしながら、飢餓状態に陥ると10万個ほどの細胞が走化性運動により集合して多細胞体を形成する。集まった細胞は、マウンドと呼ばれる塊、走光性を有するナメクジ体を経て、最終的には子実体を形成する、というユニークな生活環を取る。その過程において、幾度か右回りもしくは左回りに細胞集団が運動することが知られている。例えば、集合時にみられる渦巻き模様や、ナメクジ体移動時の細胞の流動、子実体形成時のねじれなどである。このような現象について、現在様々な方法で解析が行われている。

本研究では、アメーバ細胞の運動に焦点を当てる。アメーバ細胞が、人為的に作製された迷路の分岐に当たった時、右または左のどちらへ進むかを観察することで、個々の細胞の空間認識への知見を深めることを目標とする。

材料と方法

(1) tdTomato 発現株の作成

アメーバ細胞の運動の観察を始めるにあたり、きわめて明るい蛍光タンパク質である tdTomato を野生株 (AX2 株) に導入した株の作製を行った。

市販されているヒト細胞での遺伝子発現用 tdTomato Vector を鋳型に、制限酵素サイトを付加した DNA プライマーを用いて PCR 法による増幅を行った。PCR 産物を Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit を用いてクローニング、配列をサンガーシーケンシング法により確認した。

制限酵素処理を行い、Wizard® DNA Clean-Up System を用いて電気泳動後の tdTomato 配列領域を切り出した。*D. discoideum* 用発現ベクターである pHK12bla / neo とのライゲーションを行い、ライゲーション産物を作製した。

振盪培養法により 2.0×10^6 cells / ml となるよう調整した AX2 株の培養液を遠心分離し、 5.0×10^7 cells / ml となるようエレクトロポレーション緩衝液と懸濁した。細胞懸濁液 $400 \mu\text{l}$ とライゲーション産物 $40 \mu\text{l}$ を混合し電気刺激 (500 V , $100 \mu\text{s} \times 10$) を与えた。その後、選択薬剤 (BlasticidinS または G418) を加えて細胞の増殖が確認されるまで培養を行った。

得られた細胞を蛍光顕微鏡で観察し、tdTomato の発現を確認した。

(2) PDMS チップを用いた細胞の観察

本研究では、人為的な迷路として PDMS チップを用いた。PDMS (シリコーンゴム) の表面に、幅 $1 \mu\text{m}$ 、一辺 $60 \mu\text{m}$ の正六角形の溝がハニカム状に彫られているもの

である。また、観察する細胞は事前に 1.0×10^7 cells / ml となるよう PB buffer (10 mM Na/K PO₄ buffer, pH 6.5) と懸濁し、6 時間の振盪培養を行った。これは、細胞を適度に飢餓状態とすることで運動性の向上が見られたためである。また、飢餓した細胞は cAMP を分泌し、これをファーストメッセンジャーとして細胞の集合、すなわち運動への干渉が発生する。これを防ぐため、cAMP 合成阻害剤であるカフェインを最終濃度 4 mM となるよう添加した PB buffer を用意した。

表 1. 飢餓時間に対する運動性

飢餓時間 (h)	1	3	6
移動距離 (相対値)	0.23	0.18	1.48

ガラス底シャーレに、PDMS チップを空気が入らないように置き、キムワイプなどで水分を取り除きガラス面と密着させた。その上に $0.6 \sim 1.0 \times 10^5$ cells / ml に調整した細胞懸濁液を乗せ、10~20 分静置し細胞を沈着させた。その後、シャーレから上澄みを除去し、PB buffer + 4 mM カフェイン を静かに注入し、置換を行った。その後、蛍光顕微鏡を用いて 20 分間運動を記録した。

結果と考察

tdTomato 発現株は、BlasticidinS, G418 耐性いずれも作製に成功した。PDMS チップを用いた観察については、研究発表会でのデータの提示を目標としているが、細胞が溝から這い出すなどの問題が生じることが明らかになった。

今後の展望

PDMS チップの利用には様々な障害があり、今後より一層の検討が必要である。特に、細胞が溝から這い出てしまうことを防ぐ方法の確立が急がれる。

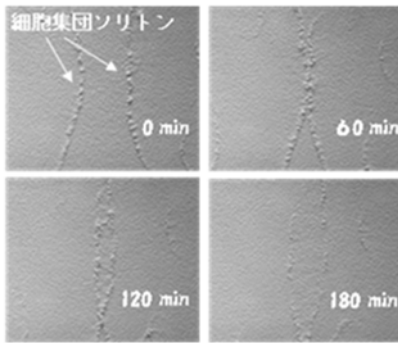
今後も、細胞学的手法を軸に、アメーバ細胞の運動・時空間認識についての解析を継続する計画である。

逆遺伝学的手法による細胞性粘菌のソリトン様運動関連遺伝子の探索

吉田 健太郎 (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

細胞性粘菌は土壌に生息する社会性真核アメーバ細胞である。細胞性粘菌は普段は単細胞生物として増殖する。しかし飢餓状態におかれると細胞同士が走化性応答により集合し、その後集団で移動する多細胞体となり、最終的には孢子細胞と柄細胞に分化するというユニークな生活環を持っている。また、培養系も確立されており実験室での扱いも簡便であり、様々な遺伝学的、分子生物学的手法が利用できるため細胞運動や細胞間相互作用、細胞分化や形態形成の研究をする上で優れたモデル生物として利用されている。



先行研究において、ある非走化性突然変異株の細胞集団が物理現象のソリトン波(他の波の干渉を受けず、形状や速度が一定の孤立波)によく似た運動を行うことが発見された(Kuwayama and Ishida 2013)。この細胞性粘菌のソリトン様運動は時に構成する細胞を入れ替えながらも、その形状やサイズ、運動の向きや速さを変えないこと、またソリトン波様細胞集団運動同士の衝突において細胞が入り替わりながらも見かけ上すり抜けることが観察された。これらの観察は、ソリトン波様の形状や運動量には記憶が存在し、その記憶は構成され、この細胞集団運動ソリトン現象は、多細胞生物の発生における形態形成の普遍的なメカニズムの一端を示していると推測し、現在所属研究室では生物学的、数理科学的な解析が行われている。しかしながらこの非走化性株が示すソリトン様運動が野生株のどのような遺伝子の機能変化によるものかはまた明らかになっていない。

ソリトン様運動を行う KI-5 株、KI-10 株は、親株である XP55 株にランダムに変異を引き起こし作成された株である(Kuwayama et.al, 1993)。昨年度までの先行研究では、次世代シーケンサーを用いた解析により、ソリトン株(KI-5 株、KI-10 株)、また親株である XP55 株の全ゲノム DNA の配列決定が行われた。さらに、bowtie2 と bwa のプログラムを用いて、配列を比較し、変異箇所のマッピングをすることによって変異遺伝子を明らかにした。

本研究では判明した変異遺伝子からの責任遺伝子の同定を目的とした。同定方法は、明らかになった変異遺伝子に対する正常遺伝子をクローニングし発現コンストラクトを作製、ソリトン株(KI-5 株)に形質転換による遺伝子導入を行うことによって、野生株へと表現型を回復する遺伝子の探索を行った。

材料と方法

(1) total cDNA の作製

野生株 (AX2 株) の細胞を 0 h、4 h、8 h 飢餓状態におきそれぞれから total RNA を抽出した。これらを混合した total RNA

を鋳型として、逆転写酵素とオリゴ dT プライマーを用いて cDNA library を合成した。

(2) 変異遺伝子の cDNA インサートの作製

変異遺伝子のうち、サイレント変異等を除いた 52 個の変異遺伝子に対して、制限酵素配列を付加した PCR プライマーを作製し、cDNA library を鋳型に PCR 法による増幅を行った。これらの PCR 産物を Zero Blunt®TOPO®PCR Cloning Kit を用いてクローニング、配列をサンガーシーケンシング法により確認した。

(3) 発現コンストラクトの作製

細胞性粘菌の遺伝子発現コンストラクトは、染色体外で複製型シヤトルベクターである *pHK12bla,pHK12neo* を使用した。これらのベクターに、上記で作製した正常遺伝子を組み込み、発現コンストラクトを完成させた。

(4) ソリトン運動株(KI-5 株)への形質転換

まず、振盪培養法により細胞密度が $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ cell/ml になるように調製した KI-5 細胞をエレクトロポレーション緩衝液で細胞密度が 5.0×10^7 cell/ml になるようにすみやかに懸濁をした。この細胞懸濁液 400 μ l と発現コンストラクト >1 μ g を混合しエレクトロポレーション法(500 V, 100 μ sec \times 10)による遺伝子導入を行った。その後、選択薬剤(BlasticidinS もしくは G418)を加えて、細胞の増殖が確認されるまで (10~14 日) 培養を行った。

(5) 表現型の観察

細胞が十分に増えたシャーレから細胞を分取し、餌となるバクテリア(*Klebsiella aerogenes*)を撒いた A-medium 寒天培地に植えた。10~14 日ほど 21 $^{\circ}$ C で培養を行い、ソリトン様細胞集団の形成の有無、集合能や子実体形成能の獲得などを視点として表現型を観察した。

結果と考察

52 個の変異遺伝子のうち、6 個の遺伝子について発現コンストラクトを作製し、遺伝子導入を行った。そのうち 5 個の遺伝子では集合能やソリトン様運動の変化は観察されなかった。1 個の遺伝子導入株では KI-5 株に比べてソリトン様運動の消失が観察された。この株においては、今後導入遺伝子の発現確認や細胞集団運動の詳細な観察を行う必要がある。

現在、その他 46 個の変異遺伝子については形質転換体の選択や現在発現コンストラクト作製中であり、卒業研究発表会には結果を更新する予定である。

今後の展望

これまでのところ責任遺伝子の同定には至っていないが、引き続き残りの変異遺伝子についても解析を進める予定である。候補責任遺伝子が判明次第、野生株の遺伝子破壊や変異遺伝子導入を行い責任遺伝子の確定を行う。また責任遺伝子が判明したら、細胞活動においてどのように機能に関わりソリトン様運動を引き起しているのかを生化学的、細胞学的手法により分子レベルで詳しく解析する予定である。

生細胞における三量体型 G タンパク質の活性検出のためのプローブ開発

綿谷 光高 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 桑山 秀一 (筑波大学 生命環境系)

背景、目的

細胞性粘菌の一種であるキイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*) は、増殖期には単細胞として生息するが飢餓状態に陥ると cAMP を介した走化性応答により集積し、多細胞体を形成する。キイロタマホコリカビの走化性応答は細胞の前後において高低差 1% の細胞外 cAMP の濃度勾配を判別する非常に高い感度を有している (Mato et al, Proc Natl Acad Sci USA, 1975)。一方で、cAMP を受容するヘテロ 3 量体型 G タンパク共役型膜受容体 (GPCR) から細胞骨格形成につながるシグナルカスケードは哺乳類と比較してよく保存されており、GPCR を介したシグナル伝達のモデル系として研究の対象となっている。

ヘテロ 3 量体型 G タンパク質は $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ の 3 つのサブユニットから構成される。ヘテロ 3 量体型 G タンパク質はリガンドに結合した GPCR により活性化されると $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ に分離し、 $G\alpha$ はそれまでの不活性化型 (GDP 結合型) から活性化型 (GTP 結合型) へと変換される。GTP 結合型として遊離した $G\alpha$ は自身の持つホスホターゼ活性により GDP 結合型に変化し、細胞膜に移動した後再び $G\beta\gamma$ とヘテロ三量体を形成する。遊離した $G\alpha$ サブユニットあるいは $G\beta\gamma$ は細胞応答へのシグナル伝達を担うことが知られている。

近年、キイロタマホコリカビにおいて細胞質中で GDP 結合型 $G\alpha$ を GTP 結合型に変換する酵素 Ric8 が発見された。この遺伝子を欠損した細胞では低濃度域で勾配感知能の低下が見られた (Rama Kataria 2013)。また、GDP 結合型 $G\alpha$ が三量体を形成することで $G\beta\gamma$ の活性の阻害を示唆している実験結果 (Freek van Hemert 2010) もあり、細胞質中での $G\alpha$ のダイナミックな活性制御が走化性において重要であることが示唆されている。

キイロタマホコリカビの走化性応答において、G タンパク質の活性化解析は三量体から $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ への分離を指標に行われてきた。しかし、この方法では細胞質中の $G\alpha$ が GDP 結合型か GTP 結合型かを判別できない。そこで本研究では、活性化型 $G\alpha$ サブユニットの細胞内局在を定量的に計測できるプローブを開発することを目的とした。このプローブが開発されることにより、細胞外刺激に対する細胞内の応答特性を時空間的に解析することが可能となり、細胞内情報伝達機構の理解が格段に進むことが期待される。

材料と方法

・プローブ発現ベクターの作製

活性化型 $G\alpha$ サブユニットの検出は、蛍光顕微鏡下で測定できる系として蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用する。FRET とは、距離が 1 Å 付近あるときに 2 個の色素分子の間で励起エネルギーが電子の共鳴により直接移動する現象のことであり、蛍光タンパク質を利用する場合は波長の短いタンパク質 (CFP 等) の励起波長を当て、波長の長いタンパク質 (YFP 等) の蛍光波長を観測する。本研究では、先行研究により収集された活性化型 $G\alpha$ と特異的に結合するペプチド断片候補 (G Protein Alpha subunit Binding sequence: GPAB 配列、表 1) の両端に色調の異なる蛍

光タンパク質 (mseCFP; CFP の改変タンパク質と yPet; YFP の改変タンパク質) を融合させ細胞内で発現させる。G α と結合した時に構造が変化して蛍光タンパク質同士が接近、あるいは離反し FRET における蛍光シグナルの変化を観察できる GPAB 配列を選択する。GPAG 配列は、先行研究により cAMP の走化性応答シグナル伝達に関連する $G\alpha$ タンパクである $G\alpha 2$ サブユニットに活性化型のみ特異的に結合する配列として Yeast Two Hybrid (Y2H) 法によって 45 種類のポリペプチド断片を選出した。この配列は両端に発現ベクターのクローニングサイトに対応した制限酵素認識配列を付加したプライマーを用いて PCR 法によって増幅後、クローニング、配列決定し、作製した両端に蛍光タンパクを持つベクターに組み込んだ。

蛍光タンパクの特性は mseCFP (励起波長:434 nm, 蛍光波長:474 nm, 量子収率:0.4) 及び YPet (励起波長:517 nm, 蛍光波長:530 nm, 量子収率:0.77) である。これらの遺伝子を発現ベクターにおいて N 末端あるいは C 末端にクローニングし、その間に特異的な制限酵素認識配列を組み込むことで任意の配列を導入することが可能となる発現ベクターを、pHK12 を元に 2 種作製した。

(図 1)。また、コントロールとして用いるために、N 末端あるいは C 末端のみに傾向タンパクを持ち、任意の GPAG 配列を組み込めるプローブも同時に作製した。

・キイロタマホコリカビの培養、遺伝子導入、発現解析

キイロタマホコリカビは AX2 株 (野生株)

を用いた。HL5 培地中 21 °C で培養した AX2 株細胞への発現ベクターの遺伝子導入は電圧ポレーション法によって行った。次に選択薬剤である G418 を添加し、遺伝子導入株を取得、さらに培養細胞を PB buffer で置換した後、蛍光顕微鏡で CFP、YFP の蛍光波長を観察し、蛍光タンパクの発現を確認することにより蛍光の発現量の高いクローンを選別した。

結果と考察

現在、N 末端に mseCFP、C 末端に YPet を持つベクター 12 種と mseCFP あるいは YPet のみ発現するベクターをキイロタマホコリカビに遺伝子導入し、クローニングまで終わっている。

今後、cAMP を加える前後の細胞の蛍光波長を測定、比較することで FRET 活性を持つプローブを選出する。次に $G\alpha 2$ の特異性の検証、そして FRET 効率を改善し、生細胞での活性化型 $G\alpha 2$ の時空間解析を行う。

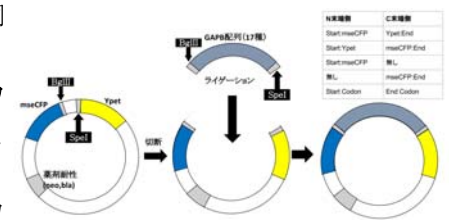


図1 ベクターの構造

ゾウリムシの化学受容に対する環境因子の効果

小林 和真 (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と相互作用をして生きている。生物の刺激応答性を理解することは生命現象を解明する上で重要である。ゾウリムシは体表の繊毛を用いて遊泳する単細胞生物である。ゾウリムシは単純な体制だが、外界の様々な環境要因を刺激として受容し、それに対して行動反応を示す。例えば、遊泳中のゾウリムシが前方の物理的障害物にぶつかると、回避行動と呼ばれる一連の行動反応をとり、これを回避する。また、ゾウリムシは様々な化学物質に対しても、行動反応を示すことが知られている。

私は、動物の刺激応答性のうち、化学受容に興味をもった。身近な例では、人の味覚は化学受容に依存している。味覚は食物摂取や毒物の忌避、塩分摂取に対応し、動物の生存にとって重要である。ヒトでは、「さめたスープはまずい」といわれるように、温度により同じ化学物質に対する感覚が異なることがある。これは、化学受容に温度刺激が影響した結果であると考えられる。このような味覚でみられる複雑さが、単純な体制のゾウリムシで存在するのか、また、どの様な形で発現するかについて調べることをこの実験の目的とした。

ゾウリムシに存在する化学刺激受容系は直接、人の味覚とは対応づけられていないが、この実験では、ヒトに対する基本味5種類のうち、ゾウリムシが特に顕著に反応を示す塩味と苦味に着目し、ゾウリムシの化学受容が温度変化によりどのように変化するかを調べる実験を行った。

<方法>

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) はコムギの抽出液を用いて20°Cで培養した。実験に用いた標準溶液の組成は1 mM KCl、1 mM CaCl₂、1 mM Tris-HCl (pH7.4)である。ゾウリムシは標準溶液で3回洗い、30分以上放置した後、実験に用いた。刺激を与える際、ゾウリムシを小さいピペットで一つの溶液から別の溶液に移した。刺激のない溶液でこの操作を行っても、ゾウリムシは通常の遊泳と同じ前進遊泳を続けた。今回の実験で、化学刺激には、塩化物であるKClと苦み物質であるキニーネ塩酸塩二水和物(塩酸キニーネ)を用いた。温度刺激には、15°C、20°C、25°Cを設定し、それぞれの温度に保ったインキュベーターを用いて溶液の温度を調節した。異なる温度に移した溶液の温度変化は3分以内であれば1°C以内に治まったため、実験は3分以内に行った。ゾウリムシの行動反応は実体顕微鏡下で観察した。

<結果>

初めに、ゾウリムシに温度変化を与えたときの行動反応を調べた。溶液の化学組成は一定とした。ゾウリムシを20°Cの標準溶液から15°Cの標準溶液に移すと約1分間、前進遊泳と後退遊泳を交互に行う反応を示し、その後20°Cのときと変わらない前進遊泳に戻った。20°Cから25°Cに移したときも、基本的な行動反応は同様であった。

次に化学刺激を与えたときのゾウリムシの行動反応を調べた。温度変化を与えずに、ゾウリムシをKCl濃度の高い刺激液(K刺激液)に移すと、ゾウリムシは一過性の後退遊泳を示した。この後退遊泳の速度は徐々に低下し、やがて一か所で、お尻側を軸にして回転を始めた。この回転のあと、ゾウリムシは前進遊泳に戻った。

次にK刺激液に対するゾウリムシの行動反応を温度を変えて調べた。20°Cの標準溶液から15°CのK刺激液にゾウリムシを移すと、温度変化のないときと同様の行動反応を示したが、後退遊泳の持続時間、回転運動の持続時間が短くなった。

逆に20°Cの標準溶液から25°CのK刺激液に移したときも一連の行動反応の様子は同様であったが、後退遊泳の持続時間と回転運動の持続時間が長くなった。

次に、キニーネに対するゾウリムシの行動を観察した。キニーネ単独の刺激に対するゾウリムシの行動を観察するために、温度を変えずに0.5 mM 塩酸キニーネを含む刺激液(キニーネ溶液)に移すと、ゾウリムシは激しく前進遊泳と後退遊泳を繰り返した。後退遊泳の頻度は時間とともに低下した。

ゾウリムシにキニーネと温度の両方の刺激を与えた。ゾウリムシは20°Cの標準液から15°Cのキニーネ溶液に移すと、前進遊泳と後退遊泳を交互に繰り返した。後退遊泳の頻度を測定すると、同じ温度で刺激したときよりも、低くなっていた。ゾウリムシを25°Cのキニーネ溶液に移すと、前進と後退を繰り返す行動反応の様子は変らなかったが、後退遊泳の頻度は若干増加した。

<考察>

今回の実験結果から、ゾウリムシは受容する刺激物質によって異なる行動反応をすることが確認された。ゾウリムシのKClに対する反応は、人の塩受容に対応するものであると考えられる。無機塩類に対する受容系は、人の体液の恒常性維持に重要であるだけでなく、直接外液の化学組成の変化にさらされる単細胞生物にとっても重要であると考えられる。一方、キニーネは人にとって苦み物質として知られるが、ゾウリムシもこの物質に対して顕著な行動反応を示し、負の化学集合を見せることが知られている。この物質は、mM オーダーでゾウリムシに対する毒性が観察された。

今回の実験で、これらの塩と苦味に対する行動反応が、温度変化を同時に与えることで変化するかどうか調べたところ、どちらも、与えた温度変化に依存して変化することが明らかとなった。

今回の実験でみられたゾウリムシの化学受容に対する温度変化の効果が、特上のスープが冷めた時に、大変味が落ちることと対応するかどうかは定かではないが、単純な体制の生物においても、異種刺激の存在が刺激に対する応答性の変化をもたらすことが明らかとなった。

今後の研究の課題としては、何がゾウリムシの化学受容の感受性を増加させたのかを特定することであると考えている。

ゾウリムシの繊毛再生とそれに伴う行動反応の変化

鈴木 菖平 (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、発達した運動性に依存して生きている。単細胞生物であるゾウリムシは、体表にある多数の繊毛によって水中を活発に遊泳する。ゾウリムシは様々な外界の刺激を受容し、その結果、遊泳を変化させることが知られている。ゾウリムシは、通常、直線的に前進遊泳するが、前方の障害物にぶつかると、繊毛逆転が生じ一時的に後退遊泳を行う。その後、ゾウリムシは一カ所で頭を回す動きをとり、再び前進遊泳に戻る。このような一連の行動反応により、ゾウリムシは障害物を回避することができ、結果的に、生存に適した環境を選択することが可能となる。

ゾウリムシの運動活性をになう体表の繊毛はエタノールを含む溶液中で振盪すると脱落することが知られている。脱繊毛のあと、ゾウリムシは比較的速やかに繊毛を再生する。

私は脱繊毛したゾウリムシが繊毛を再生する過程において、行動反応にどのような変化が起こるのか、また、各種外界の刺激に対する反応がどのように回復してゆくのかについて興味を持った。この実験では、はじめに、ゾウリムシが脱繊毛する条件を詳細に検討し、次に、脱繊毛後の繊毛再生に伴う行動反応や刺激応答性の変化を解明することを目的とした。

材料・方法

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦藁の抽出液を用いて 20°C で培養した。培養したゾウリムシは標準溶液 (1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Tris - HCl, pH7.4) で 4 回洗い、30 分以上順応させた後、実験に用いた。

ゾウリムシの脱繊毛処理は、エタノール (5%、7%、10%) を含む標準溶液とゾウリムシを試験管に入れ、ボルテックスミキサー (2500 rpm) を用いて攪拌して行った。攪拌後、ゾウリムシはすみやかに標準溶液へ戻した。脱繊毛処理の後、ゾウリムシの遊泳活性、化学刺激に対する反応性を時間を追って調べた。

脱繊毛前後のゾウリムシの繊毛の様子は光学顕微鏡 (400 倍) 下で観察した。今回の実験では、化学刺激として、標準溶液中の KCl 濃度を上げた溶液を使用した。ゾウリムシの行動は実体顕微鏡で観察、もしくは暗視野照明下でビデオテープへ記録し、解析した。

結果

(1) 脱繊毛の条件

はじめに、5%エタノールを含む標準溶液で 10 秒間攪拌しゾウリムシに脱繊毛処理を行った。およそ 8 割の個体は遊泳を停止したが、残りの個体は遊泳行動を続けていた。攪拌する時間を長くしても遊泳を停止する個体の割合はほとんど変らなかった。

次に、10%エタノールを含む標準液で脱繊毛処理を行った。攪拌する時間に関わらず、ほとんどの細胞が膨張して死亡した。

7%エタノールを含む標準溶液を用いて脱繊毛処理を行うと、全ての個体で遊泳行動の停止が観察されたが、攪拌する時間を長くするほど、膨張して死亡する個体が増えた。脱繊毛処理直後に

は、ゾウリムシの繊毛は顕微鏡下で確認できなかった。脱繊毛後、1 時間程すると、短い繊毛の再生が確認できた。脱繊毛後 6 時間程すると、再生した繊毛は未処理の繊毛と同等の長さになった。この後の実験では 7%エタノールで 4 秒間攪拌という条件で脱繊毛処理を行った。

(2) 遊泳行動を再開する個体の割合

脱繊毛処理後、遊泳行動を再開したゾウリムシの割合を時間を追って調べた。脱繊毛した直後は全ての個体が遊泳行動を停止していた。脱繊毛後 1 時間ほどで 3 割程度の個体が遊泳行動を再開した。遊泳を再開する個体数は時間とともに増え、脱繊毛後 3 時間でおおよそ 6~7 割の個体が遊泳行動を再開した。残りの細胞は膨張して死亡していた。

(3) 脱繊毛後の遊泳速度の変化

脱繊毛処理をしたゾウリムシの遊泳速度が時間経過に伴ってどのように変化するかを計測した。脱繊毛処理をしないゾウリムシの遊泳速度は約 2.4 mm/s であった。ゾウリムシの遊泳速度は脱繊毛後 1 時間で 0.02 mm/s、2 時間で 0.03 mm/s となり、脱繊毛処理をしない個体の遊泳速度と比べると非常に遅い結果であった。ゾウリムシの遊泳速度は時間とともに回復し、3 時間後には 0.2 mm/s、6 時間後には 0.7 mm/s であった。遊泳速度は 6 時間後以降ほぼ一定の値を示した。

(4) 脱繊毛後の化学刺激に対する反応行動

脱繊毛後のゾウリムシの化学刺激に対する反応行動は、現在、調べているところである。

考察

これまでの実験では、ゾウリムシの脱繊毛は 5%エタノールを用いているが、今回の実験条件では、この濃度では完全な脱繊毛はできなかった。脱繊毛後、回復する個体の割合は若干悪くなるが、今回の実験では、7%エタノールによる脱繊毛が最適であると判断した。

脱繊毛後の繊毛の再生の時間経過を調べると、およそ 1 時間ですでに再生が始まっており、約 6 時間まで再生が進んでゆることが明らかとなった。一方、細胞の運動活性の回復過程を調べると、脱繊毛後停止した遊泳行動は、約 1 時間後に再開した。繊毛再生直後の遊泳速度は非常に低いが、脱繊毛後およそ 6 時間まで増加し、一定となった。これらの事実は、繊毛はその全長が再生しなくても、運動を再開することが可能であり、長さの回復と、ゾウリムシの運動活性にある程度の相関がみられることを示している。

今後、繊毛の再生と運動活性を更に詳しく調べるとともに、繊毛の再生と刺激に対する応答の関係性を調べる予定である。

ウシガエル味細胞の電気的特性の解析

酒井 祐貴子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

導入

生物は生命維持のために様々な栄養素を外界から取り入れている。その一つ的手段に摂食行動が挙げられる。摂食行動の際に、食物に含まれている化学物質が受容器によって感知され、生じる感覚が味覚である。味覚は生命活動に有用な化学物質を積極的に摂取し、有害な物質を回避するのに必要な感覚である。甘味・塩味・旨味・苦味・酸味の5種類の基本味に分けられ、一般的に甘味・塩味・旨味に対しては誘引的な行動を、苦味・酸味は回避的な行動を引き起こすと考えられている。

両生類であるウシガエル (*Rana catesbeiana*) の味覚は苦味と酸味に対して特化した性質があることが示唆されている。本研究では、生物の生息環境と味覚の特性の関係を明らかにすることを目的として、ホールセルパッチクランプ法の習得とウシガエル味細胞の電気的特性の解析を行った。

材料と方法

動物業者から購入した 300g から 600g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を雌雄の区別なく用いた。はさみを用いて脊椎を切断し、切断面から針を差し込み頭側と体側の神経を破壊した。さらに口を開いて舌下神経と舌下筋を切除して下あごから舌を単離し、Ca²⁺ free ringer で洗浄した。単離した舌は Ca²⁺ free ringer で満たしたチャンバーに浸した。チャンバーには事前にシリガードコーティングをしておき、複数の虫ピンで舌を引き伸ばすように固定した。刃の反ったはさみを用いて、実体顕微鏡下で舌表面に散在する円盤状の味覚器を切り取った。約 80 個の味覚器を集め、2% Collagenase を含む二価イオン free 溶液で置換し、10 分間保温した (36°C)。その後、二価イオン free 溶液で 2 回リンスし、10 mM L-cystein、10 U/mL Papain を含む二価イオン free 溶液を置換して 6.5 分保温した (36°C)。その後、Ringer 溶液で 2 回リンスし、パストゥールピペットを用いて、ピペッティングを 20 回程度行い、物理的刺激を与えて味細胞を単離した。Concanavalin A でプレコーティングしたチャンバーディッシュに単離した味細胞を敷き、10 分静置して細胞をディッシュの底に沈ませた。

パッチクランプ法の一つであるホールセルパッチクランプ法を用いて味細胞を流れる電流を記録した。マイクロピペット・プレー (Sutter instrument, P-57) を用いて作成したパッチ用ガラス電極の中に K⁺ pipette 溶液を充鎮した。パッチ電極が bath solution に浸かった時の抵抗値は 6~9 MΩ だった。顕微鏡下でマニピュレーター (MX-1, Narishige) を用いて電極を操作し、電極先端を単離味細胞に近づけ、陰圧を与えて細胞膜と電極を密着させた状態 (ギガ・シール) を作った。このときの抵抗値は 1~5 GΩ であった。次いでさらに強い陰圧やパルスを与えることで細胞膜に穴をあけ、ホールセルを形成した。

味細胞内の電位を -80 mV に固定し、-80 mV から +60 mV まで 10 mV ごとのステップ電位を与え、味細胞における電位依存性チャンネルの存在について調べた。

結果と考察

単離した細胞を顕微鏡下で観察したところ、細胞体からデンドライトを伸ばす味細胞が観察された。これらの細胞は形態的特徴から Type Ib、Type II、Type III の 3 種類に分類することができた。ホールセルを形成した味細胞に -80 mV から +60 mV まで 10 mV ずつのステップ電位を与えたところ、Type Ib、II、III に共通して一過性の内向き電流と、それに次ぐ持続性の外向き電流が観察された。次にこの結果から、それぞれの固定電位に対する内向き電流と外向き電流の大きさをプロットし (data not shown)、電流と電圧の関係 (I-V relation) を解析した。内向き電流は 20 mV 付近から見られ始め、+20 mV 付近でピークを迎えたあと、電位の増加に伴って減少した。外向き電流は電位の増加にしたがって増加した。この結果から、一過性の内向き電流成分は電位依存性 Na⁺電流であり、持続性の外向き電流成分は電位依存性 K⁺電流であると推察される。すなわち、単離ウシガエル味細胞に電位依存性 Na⁺チャンネルと電位依存性 K⁺チャンネルが存在し、味物質を受容した時に受容器電位を発生させるに足る機能を持つと考えられる。

今後の展望

今後は、ホールセル法の技術をさらに向上させ、ホールセルを維持したままデンドライトに局所的に味物質を与える。刺激に対する電氣的応答を観察し、各細胞タイプの電気的特性を解析することが目標である。また、味細胞における細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、各種阻害剤を作用させた時の変化や、電流成分の分析を行う予定である。

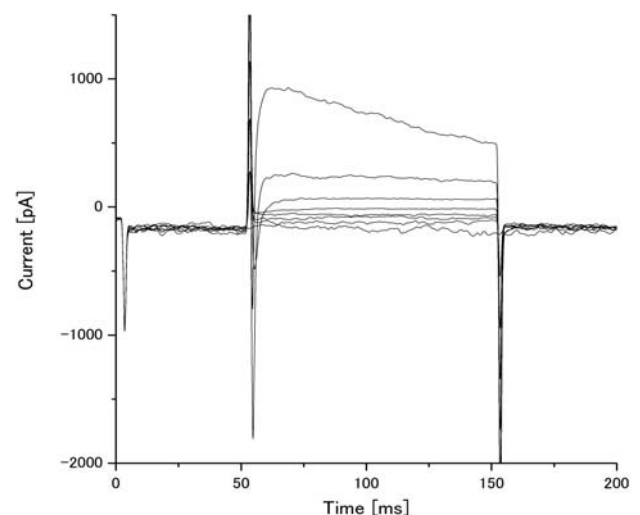


図 1. ウシガエル Type Ib 味細胞における電位依存性電流

イモリ嗅細胞の混合臭刺激に対する応答の解析

中川 将志 (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

嗅覚は外界の匂いを受容する感覚であり、食物の探索や危険の察知、生殖など、様々な活動を行う上で重要な役割を担っている。脊椎動物の場合、匂い物質は嗅上皮に存在する嗅細胞で受容され、嗅覚受容体共役型Gタンパク質を介したシグナル伝達経路により電気信号に変換される。この信号が高次の中樞神経系へ伝達されることで、匂いが認識される。

これまで2種類以上の匂い刺激による相互作用について議論されてきた。例えば、ある種の匂い物質が電気信号を抑制する抑制性匂い応答の存在が知られている。本研究では、嗅細胞での匂い物質による相互作用について調べるため、イモリ嗅上皮における電気シグナルをEOG (electro-olfactogram) 記録法により記録し、観察した。

材料

【動物】成体のアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を、雌雄の区別なしに使用した。このアカハライモリは業者より購入し、自由に陸地と水中を行き来できる容器内において、室温 (約 22°C) で飼育した。

【匂い刺激】匂い刺激には、揮発性匂い物質である *n*-amyl acetate (N)、isoamyl acetate (I)、cineole (C)、そして limonene (L) の4種類を用いた。単一臭刺激および混合臭刺激は、共に Ringer 液 (組成; NaCl 110 mM, KCl 3.7 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 3 mM, Na-HEPES 2 mM, Na-pyruvate 1 mM, D-Glucose 15 mM, pH 7.2) で 0.05% に調製した。

方法

【標本の作製】イモリの頭部を切断し脊髄を破壊した。次に切断した頭部を Ringer 液で満たしたディッシュに移し、針で頭を固定した。そして実体顕微鏡下ではさみを用いて鼻孔より切り込みを入れ、両頬上皮を除去し嗅上皮を露出させた。

【匂い刺激の投与】匂い刺激は、Ringer 液を刺激溶液に素早く交換することで嗅上皮に与えた。Ringer 液は、匂い刺激を与える時以外はディッシュ内に常に供給され、また吸引ポンプによって常に排出させた。匂い刺激は記録開始1秒後に2秒間与えた。

【記録】外径 1.2 mm のガラス管電極を、マイクロマニピュレータを操作して嗅上皮に位置させた。このガラス管電極を Ag-AgCl 電極を介して増幅器に接続し、嗅上皮における EOG を記録した。なお EOG 記録法とは、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する方法である。

結果

嗅上皮に単一臭刺激を与えると脱分極性の電気応答が観察され、また刺激がなくなると次第に元の電位に戻る様子が観察された。C と L を刺激として用いた場合の応答について、単一臭刺激を与えた時の応答の大きさは、C では 0.71 ± 0.11 mV (n=18)、L で

は 0.49 ± 0.11 mV (n=11) だった。続いて混合臭刺激を与えた時の応答の大きさは、C-L 混合液では 0.26 ± 0.04 mV (n=8) だった。以上より、単一臭刺激に対する応答よりも、混合臭刺激に対する応答の方が小さくなる様子が観察された。この応答の一例を図に示した。

同様の実験を4種類の匂い刺激すべてに対して行ったところ、単一臭刺激を与えた時の応答の大きさは、N では 0.51 ± 0.11 mV (n=13)、I では 0.35 ± 0.03 mV (n=25) だった。一方、混合臭刺激を与えた時の応答の大きさは、N-I 混合液では 0.33 ± 0.04 mV (n=7)、N-C 混合液では 0.48 ± 0.13 mV (n=5)、N-L 混合液では 0.13 ± 0.03 mV (n=7)、I-C 混合液では 0.15 ± 0.06 mV (n=5)、そして I-L 混合液では 0.15 ± 0.01 (n=12) だった。以上より応答の大きさは刺激の種類によって様々だったが、いずれの刺激を用いた場合でも抑制性の匂い応答を確認することができた。

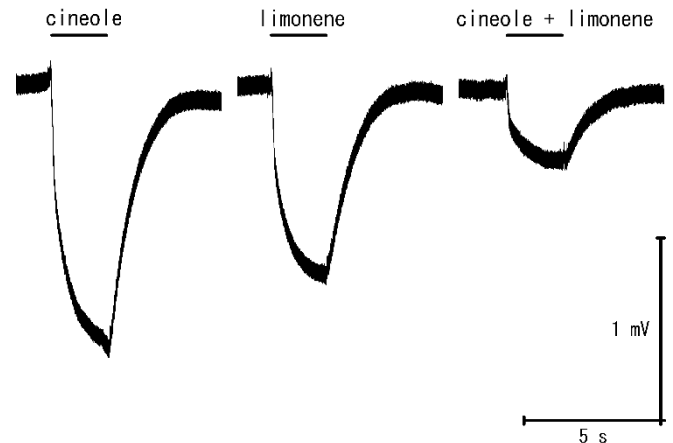


図. 嗅上皮の EOG 記録図

バーは刺激を与えた時間を表す。

考察

今回の結果から嗅覚の電気応答において、混合臭刺激の応答は単純にそれぞれの応答の加算になるとは限らず、抑制性の応答となることが確認できた。心理物理学の分野で知られている現象に、嗅覚マスキングが挙げられる。マスキングとは感覚の相互作用を指すが、これは例えば、ある種の匂いを提示することで不快臭等を感じさせなくするといった応用に用いられることがある。今回の結果は、このマスキング現象を生理学的に示す結果である。またマスキング現象が、嗅上皮—嗅覚受容細胞のレベルで行われている可能性を明らかにした。

さらに今回、いずれの匂い物質においても抑制効果が確認されたが、抑制効果の程度は匂いの分子によって異なるようだった。

抑制効果のメカニズムの詳細については未だ詳しく知られていないが、今後はニューロンの相互作用の同定および機能解明が期待される。イモリは両生類であり、水溶性の匂い物質であるアミノ酸も嗅覚として知覚することが知られている。アミノ酸を匂い刺激として用いた場合の応答の解析も進めたい。

USP15 による mRNA スプライシング制御と特異性解析

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

【背景・目的】

ユビキチンシステムは、脳の恒常性を維持する上で必須の生体反応機構である。ユビキチンシステムは、プロテアソームを介した選択的タンパク質分解以外に、DNA 損傷修復、膜輸送、シグナル伝達など多彩な細胞内メカニズムを制御している。近年、基質タンパク質へユビキチンを付加するユビキチンリガーゼ以外に、ユビキチン化を除去する脱ユビキチン化酵素 (Deubiquitinating enzymes: DUBs) の働きに注目が集まっている。先行研究から、ヒトでは約 100 近くの DUBs の存在が報告されており、Ubiquitin specific protease (USP) ファミリーは最も大きなグループを形成する。その中の一つ、USP15 は様々な細胞内シグナル伝達の制御に関与することが報告されている。また USP15 の異常は、自閉症を始めとする様々な脳神経疾患発症との関連が示唆されている。しかしながら、神経系における USP15 の詳細な分子メカニズムは不明な点が数多く残されている。

本研究の先行研究で、USP15 遺伝子欠損 (USP15 KO) マウスが月齢依存的に小脳変性や筋萎縮を伴った運動障害様の表現型を呈すること、また個体差はあるものの行動異常の表現型を示すことを見出している。さらに、USP15 がスプライシング制御因子であるヌクレオチド転移酵素 TUT1 を脱ユビキチン化し、グローバルな RNA スプライシング制御に関与することも明らかにしている。これまでに本研究室では、Affymetrix GeneChip Exon Array を用いたスクリーニングで、USP15 KO 脳でスプライシング変動を起こす標的候補 mRNA を数多く同定しているが、これら mRNA のスプライシング変化が USP15 KO の表現型の原因となりうるのか、また USP15 によるスプライシングがどのように制御されているのか、詳細なメカニズムは未解明であった。

本研究では、Exon array のスクリーニングで高い Splicing index を示した標的遺伝子の一つ Sparcl1 に着目した。Sparcl1 はアストロサイトから分泌される細胞外タンパク質で、視床皮質における興奮性シナプス形成を制御することが報告されている。また病態との関連として、自閉症などの発達障害、多発性硬化症などの神経疾患に関与することが報告されている。本研究では、USP15 KO で得られた表現型に Sparcl1 の mRNA スプライシング変化が関係するか明らかにすることを目的に、Sparcl1 の mRNA スプライシング解析を行った。また USP15 KO による mRNA スプライシング制御に法則性がないか、*in silico* 解析を行い、USP15 によるスプライシング制御の分子基盤を検証した。

【材料・方法】

1. RT-PCR

野生型(WT)ならびに USP15 KO マウス的大脑から ISOGEN II (NIPPON GENE) を用いて total RNA を精製し、ReverTra Ace (TOYOBO) で逆転写して cDNA library を作成した。これを鋳型に KOD Plus DNA polymerase を用いて RT-PCR を行った。

2. *in silico* でのスプライシング解析

Affymetrix GeneChip mouse Exon Array の結果から、Splicing index に大きく差がある mRNA を同定し、変動のあるエクソン領域のプローブを NetAffx Analysis Center

(<https://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) で解析し、どのエクソン領域に差があるか UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) を用いて特定した。

【結果考察】

Exon array の結果から、USP15 KO による Sparcl1 mRNA のスプライシング制御を起こす領域は最終エクソンであることが推測できた。Sparcl1 の C 末端領域は EF hand を持つことから、機能制御に重要な領域であることが考えられる。まず Sparcl1 mRNA の 3' UTR を含む最終エクソンのスプライシング調節に USP15 が関与するか、RT-PCR で確認した。その結果、WT と USP15 KO 脳由来の RNA に有意な差は認められなかった。しかしながらサンプル間の誤差も存在することから、実験条件を再検討する必要性が考えられた。

RT-PCR を用いた実験で、WT ならびに USP15 KO 間で明確な差が認められなかったことから、コンピューターを用いた *in silico* 解析を行い、USP15 によるスプライシング制御に法則性がないか検証した。Exon array で得られた結果のうち、splicing index の高い候補因子を選択し、どの領域のエクソンが変化しているか検証したところ、いくつかの mRNA では Sparcl1 と同様、最終エクソンが脱落していることを見出した。このことから、USP15 によるスプライシング制御は、「共通配列」ではなく「位置」が重要なのではないかと推測した。

【展望】

現段階までに、Sparcl1 mRNA の RT-PCR の結果は Exon array をサポートする内容に至っていない。実験条件をはじめとする様々な原因も考慮しつつ再度検証する。また、より詳細な情報を得るために qPCR を用いたスプライシング解析や RNA-Seq なども視野に入れて検証していく予定である。

また *in silico* 解析から、mRNA の最終エクソンに変化があるものが複数認められことから、解析するサンプル数を増やしてスプライシング変動の法則性を詳細に検証していく。今後、USP15 のスプライシング制御の分子メカニズムを解析すると同時に、Sparcl1 をはじめとする候補 mRNA のスプライシング変化が、USP15 KO 依存的な神経機能の異常に関与するのかが詳細に検証していく予定である。

プロテアソーム制御因子欠損マウスが雄性不妊であることの原因を探る！

～PA200と Ecm29の機能および関連性の解明を目指して～

風穴 彰洋 (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)

◆目的・背景◆

プロテアソームはタンパク質分解を行う巨大な複合体であり、すべての真核生物において高度に保存されている。その中でも26Sプロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を認識して分解することが知られており、これはプロテアーゼ活性を持つ20Sとポリユビキチン鎖を認識する19Sの複合体である。また、19Sの他にも20Sと結合し、タンパク質分解を制御する因子としてPA200、Ecm29などが知られている。

PA200は核に局在してDNA損傷修復に関与していること、精巣においては約90%のプロテアソームがPA200と結合した状態で存在しており、PA200-20S-PA200型やPA200-20S-19Sのハイブリッド型が存在するということが報告されている。また、精子形成時にPA200はアセチル化コアヒストンを認識して分解するということが報告されている。また、精子形成時にPA200はアセチル化コアヒストンを認識して分解するということが報告されている。また、精子形成時にPA200はアセチル化コアヒストンを認識して分解するということが報告されている。

Ecm29に関しては、20S-19Sのアダプターとして機能することや、26Sプロテアソームに結合してATPase活性を抑制することが報告されている。なおEcm29はPA200と同様に精巣において発現量が多いことが先行研究により判明している。

PA200とEcm29はHEAT様リピート配列を有しているという構造的類似性があり、酵母においてBlm10 (PA200のオーソログ)とEcm29の両方を欠失した変異株は、単独変異株よりも高温とカナバニンに対する感受性が高まることが報告されている。したがって、哺乳類においてもPA200およびEcm29が機能的な面で補完的な機能を有している可能性が考えられる。

そこで本研究ではPA200およびEcm29を欠損した二重遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型を解析することで、PA200およびEcm29の補完的な機能およびその関連性を解明することを目的とした。まず各単独遺伝子欠損マウスは繁殖可能であったが、PA200およびEcm29の双方を欠いた二重遺伝子欠損マウスは雄性不妊であった。そこで、精子形成や精子成熟を調べるために精巣および精巣上体の組織学的解析を行った。

◆方法・材料◆

●組織固定・パラフィン組織切片作製

Bouin 固定液 (ピクリン酸：ホルマリン：酢酸=15:5:1) または4%PFA/PBS 固定液を用いて精巣および精巣上体を固定し、エタノール脱水、キシレン浸透、パラフィン浸透後パラフィン包埋し、組織切片を作製した。

●PAS 染色

パラフィン組織切片からパラフィンを除去し、過ヨウ素酸とシッフ試薬に反応させ多糖類を染色し、亜硫酸水で洗浄した。ヘマトキシリンで核染色し、顕微鏡で観察した。

●免疫染色

パラフィン組織切片からパラフィンを除去し、抗原賦活化を行い、ブロッキング後、目的タンパク質の1次抗体を反応させた。洗浄後、蛍光物質の結合した2次抗体を反応させ、蛍光像を観察した。

◆結果・考察◆

●PA200とEcm29の二重欠損マウスが雄性不妊である可能性があったため、精巣および精巣上体のパラフィン組織切片を作製し、PAS染色によって観察した。この結果、精巣では一部の精原細胞が欠落し、精巣上体では精子が非常に少ないことが分かった。このことから、PA200およびEcm29はともに精子形成に重要であり、精子形成過程において分解される必要のあるタンパク質を認識して分解する可能性が考えられた。また分解されるべきタンパク質が分解されずに残ることによって精子形成に異常が起こると考えられた。精巣上体において精子が少なかった理由は、精子が形成されなかった可能性のほか、セルトリ細胞が異常な精細胞を貪食した可能性が考えられた。

●増殖細胞マーカーとしてPCNA抗体を用い、精巣の免疫染色を行い、精原細胞を観察した。この結果、精巣においてPCNA陽性の細胞は、二重遺伝子欠損マウスで著しく減少していることが分かった。このため、精原細胞が増殖を止めるまたはアポトーシスを起こした可能性が考えられた。

◆まとめ・今後の展望◆

プロテアソーム制御因子の二重遺伝子欠損マウスについて解析を行った結果、雄性不妊の原因は精巣で精原細胞が減少したためと考えられる。

精子形成には、セルトリ細胞からのエネルギー供給やライディッヒ細胞のホルモン放出などが密接に関与する。そのため、今後はセルトリ細胞やライディッヒ細胞についての解析も行うほか、PA200およびEcm29に共通した基質タンパク質の同定を行い、両因子の機能と関連性を解明する。

脳内オートファジーと連動する新規経路の解析

相原 拓馬 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

哺乳動物の脳内では、温度変化をはじめとする特定の条件下において、ダイナミックなシナプス再構成が生じる。例えば、冬眠動物では睡眠時と覚醒時で体温変化に連動した神経細胞の形態変化、ならびにシナプスの消失・形成が観察される。動物が低温状態に晒されると RNA-binding motif protein 3 (RBM3) と Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) と呼ばれる低温応答性タンパク質 (Cold shock protein: CSP) が発現する。前者は、神経変性によるシナプスの消失を抑える神経保護の役割を持ち、神経可逆性にも大きく関与している。一方、後者は UV 照射、低酸素などの外部ストレスを受けたときにも発現され、ストレス応答を制御する働きを持つ。しかし、脳内における CSP の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

本研究室では、脳神経系におけるオートファジーの役割を検証するために神経特異的 Autophagy-related protein 7 欠損マウス (ATG7 KO) を用いて解析を行ってきた。オートファジーは細胞内の不要になったタンパク質やオルガネラを分解する、生体にとって必須の制御機構である。この機能が損なわれると、異常な構造を持ったタンパク質が脳内に蓄積し、神経変性につながる。Affymetrix GeneChip Exon array を用いた本研究室の先行研究で、ATG7 KO マウス脳では、野生型マウス (WT) のもの比べて RBM3 がより多く発現することを見出している。しかし、現段階では、オートファジーと RBM3 ならびに CIRP との関連や生理的意義の詳細は解明されていない。

本研究では、低温刺激 (Cold shock: CS) 応答が脳依存的か調べるために Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) とマウス脳を用いて RBM3 や CIRP の mRNA 量が CS 依存的に上昇するか調べた。また、オートファジー経路の欠損が CS 応答を引き起こすかを調べるために、ATG5 KO マウスの MEF、及び ATG7 KO マウスの脳で RBM3 と CIRP の量が増えるかを調べた。

【実験方法】

1. 細胞・マウスへの CS

1.0×10⁶個の野生型 (WT)、ならびに ATG5 KO の mouse embryonic fibroblasts (MEFs) をそれぞれ 6 cm ディッシュに撒き、37°C で一晩培養した。その後、細胞に CS (4°C で 30 分、30°C で 24 時間、そして 33°C で 24 時間) を与え、速やかに回収した。P14 の WT マウス (C57BL/6) に CS (4°C で 3 時間) を与えた後、マウスの大脳皮質と小脳の一部を搾取した。同様に高温刺激 (Heat shock: HS) がこれらのタンパク質の発現に影響を与えるか調べるために、WT マウスに HS (37°C で 3 時間) を与え、脳の一部を回収した。

2. 免疫組織染色 (IHC)

パラフィン包埋によって作成した P16 の WT マウス、及び ATG7 KO マウスの脳切片を脱パラフィン化し、RBM3 抗体と CIRP 抗体を用いて染色した。これらの CSP の発現領域の違いを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

3. RT-qPCR

搾取したサンプルを Isogen II で処理し、ReverTra Ace を用いて逆転写を行った。得られた逆転写産物と Thunderbird SYBR qPCR Mix を用いて、RBM3 と CIRP の発現量の違いを qPCR で測定した。

【結果】

ATG7 KO 脳で RBM3 の発現量が上昇していたことから、他の細胞でもオートファジー異常によって RBM3 mRNA が上昇するか、ATG5 KO MEFs を用いて検証した。その結果、RBM3 や CIRP の発現量は、WT と ATG5 KO の間で差が見られなかった。このことから、RBM3 や CIRP の発現には細胞特異性が関与すると考えられた。

次に ATG7 KO 脳の切片を用いて、RBM3 や CIRP の発現領域を解析した。その結果、RBM3 の発現は大脳海馬で、CIRP の発現は大脳海馬と小脳のプルキンエ細胞層で見られた。また興味深いことに、ATG7 KO の海馬歯状回 (Dentate gyrus: DG) では細胞数に大きな変化が認められなかったものの、WT と比較して CIRP の発現量が特異的に減少することを見出した (図参照)。

最後に、野生型マウスを用いて、温度変化による RBM3、ならびに CIRP の発現変動を qPCR で解析した。その結果、大脳よりも小脳で RBM3、及び CIRP の発現量が多いことが分かった。また RBM3 発現量の増加は、CS をかけたマウスの小脳で顕著に上昇した。一方、CIRP の発現量は大脳・小脳の両方で、CS のみならず HS でも上昇した。よって、温度変化による RBM3 や CIRP の発現誘導には異なった経路の存在が推測できた。

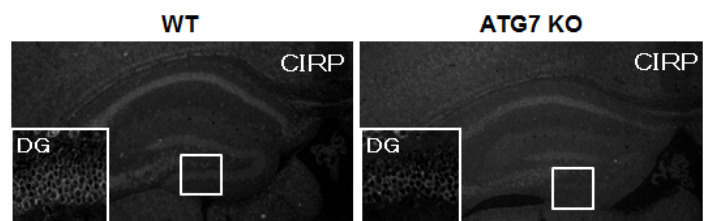


図: WT マウスと ATG7 KO マウスの海馬。ATG7 KO と比べ、WT の DG で CIRP がより多く発現していた。

【考察・今後の展望】

低温環境下では、細胞内の転写・翻訳効率は抑制されることが知られている。細胞、ならびにマウスに CS をかけた後に復温 (rewarming) することで、RBM3 と CIRP の転写・翻訳が促進し、これら CSP の発現量に変化が見られる可能性がある。

今後は、ATG7 KO マウスに様々な温度刺激をかけたときの RBM3 と CIRP の発現量の違いを WT と比べて検証していく。また、温度ショックをかけた WT マウスと ATG7 KO マウスの脳切片を作り、これらの CSP の発現様式の違いを検証する。RBM3 と CIRP の標的 RNA は解明されていないので、これらの標的 RNA を同定し、オートファジーとの関連を明らかにする。

ミクログリア応答を制御する新規候補因子の解析

市村 春嘉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と研究概要】

哺乳類の脳の発達には、胎児期と新生児期では大きく異なった様相を呈する。胎児期では神経幹細胞から数多くの神経細胞が作られ、神経ネットワーク全体の大まかな形ができるのに対し、新生児期では視覚、聴覚、触覚といった外界の刺激を受けてより細かな神経細胞同士の繋がり(シナプス)が形作られていく。新生児期におけるこれら外界からの刺激は正常な脳発達に必要不可欠であり、この刺激を遮蔽すると脳機能に障害が生じる。そして近年、これら外環境刺激と新生児期の脳形成に影響を与えるメディエーターとして、ミクログリアに注目が集まっている。

脳細胞は、神経回路を構成する神経細胞と、それを補助するグリア細胞の2つに大別できる。ミクログリアはこのグリア細胞の一種であり、免疫システムの制御を介して脳内の恒常性維持に寄与することが知られている。新生児期の脳では上記の機能に加え、胎児期に作られた神経細胞のうち、外環境からの刺激が入力されず不要と判断されたシナプスを排除する機能を併せ持つ。興味深いことに、発達障害の患者の脳ではミクログリアの過剰な活性化が観察されており、このようなミクログリアの異常は発達期における神経回路形成の異常と関連があると考えられる。しかし、発達期におけるミクログリア制御の詳細なメカニズムは未だ明らかとなっていない。

本研究の先行研究において、ミクログリア活性を制御する複数の候補因子を同定してきた。本研究では、その中の一つリノール酸に着目し、解析を行った。先行研究から、炎症応答を惹起するリポ多糖(Lipopolysaccharide; LPS)がミクログリアを活性化することが知られている。本研究において、LPS刺激依存的な形態変化の持続時間が、リノール酸処理によって延長されることを見出した。ミクログリアの形態が活性化の状態を判断する上で重要な指標となることから、リノール酸がミクログリア活性を調節する新規因子であることが推測できた。

【材料と方法】

(1) ミクログリアの形態観察

ミクログリア細胞株 BV-2 を 12well dish にそれぞれ 1×10^4 cell/well になるように播種し、 37°C で 1 日培養した。次に、 $100 \mu\text{M}$, $33 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ のリノール酸を添加して 1.5 時間培養し、その後 $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS を添加した。これらの過程において位相差顕微鏡を用いて継続的に写真撮影を行い、得られたデータを ImageJ で解析した。

【結果】

最初に、リノール酸単独でミクログリア細胞株 BV-2 の形態変化に影響を与えるか検討したが、コントロールと大きな差異が認められなかった。このことから、リノール酸単独ではミクログリア応答に影響を与えないことが推測できた。次に、リノール酸処理が基底状態でのミクログリア特性を制御し、LPS 刺激などの炎症性ストレス応答に影響を与えるか検証した。その結果、LPS 投与前にリノール酸で 1.5 時間処理しておく、LPS 刺激による形態変化の持続時間に変化が生じることを見出した。このことから、リノール酸はミクログリア応答の直接的な制御因子ではなく、基底状態におけるミクログリアの活性化状態を調節する新規メディエーターであることが推測できた。

【考察】

通常、ミクログリアの多くは静止型の状態で脳内に留まっているが、炎症性刺激などにより、形態変化とともに活性型の状態へと変化する。本研究成果は、ミクログリアの性状変換にリノール酸が関与する可能性を示唆している。リノール酸は、アラキドン酸経路の最上流に位置する不飽和必須脂肪酸で、過剰摂取は炎症応答を引き起こすことが報告されている。その一方、リノール酸や下流のアラキドン酸の摂取量調節により、自閉症など発達障害の症状が緩和される、という報告もなされている。このことから、新生児期におけるリノール酸摂取量の調節が、発達期におけるミクログリア活性制御ならびに高次脳機能制御に重要な役割を担う可能性が推測できる。

細胞外因子によるミクログリア活性制御機構の解析

岡島 智美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

[概要]

胎児期の脳は、神経幹細胞から神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化し、秩序立った脳形成を行うことが知られている。転写を介したこれら一連のカスケード反応は遺伝子制御による先天的要因が大きい。一方、出生後の脳は、先天的要因のみならず、外環境からの外部刺激が高次脳機能を獲得する上で重要であると考えられている。最近、この一連の反応を制御する因子として、グリア細胞の一つ、ミクログリアの重要性が注目されている。ミクログリアは中枢神経系において免疫機構を担う細胞である。通常、ミクログリアは炎症性の刺激によって自身の形態を変化させ、ターゲットとなる領域へと遊走し、炎症性応答や食食反応を行うことが知られている。また近年、免疫機構のみならず、シナプス形成をはじめとする高次脳機能獲得過程においても重要であることが報告されている。しかし、発達期脳のミクログリア応答を制御する因子やその機構の全容は明らかになっていない。

そこで本研究では、ミクログリア応答を制御する新規因子の同定、また発達期における生理的役割の検証を試みた。その結果、マウスミクログリア細胞株の形態・増殖に作用する培養条件を特定し、その培養液中に含まれるヒポキサンチンが既知のカドヘリンファミリータンパク質の一つ (便宜上、以下 *Cadherin family protein 1* (CFP1) と記す) の発現上昇に寄与していることを見出した。現在、CFP1 の過剰発現系や CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト系においてミクログリアの形態増殖における CFP1 の重要性を解析すると同時に、今回見出した現象が発達期の脳に及ぼす生理的意義についても検証している。

[方法]

(1) ミクログリアの増殖・形態の評価

マウスミクログリア細胞株 BV-2 を高栄養培地と汎用培地で 72 時間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて生細胞数を測定した。同様に 48 時間培養した BV-2 細胞を位相差顕微鏡の明視野で観察し、形態変化を引き起こす培養条件を検証した。

(2) Affymetrix GeneChip Array による遺伝子発現解析

BV-2 細胞を高栄養培地と汎用培地で 24 時間培養し、ISOGENII を用いて total RNA を回収した。その後、Ambion WT Expression Kit と GeneChip WT terminal Labeling and Hybridization Kit を用いてラベルした cDNA を合成し、GeneChip Mouse ST Array にハイブリダイゼーションさせ、シグナルを検出した。その後、Expression Console Software と TAC software を用いて遺伝子発現を解析した。

(3) qRT-PCR

BV-2 細胞を高栄養培地と汎用培地で 24 時間培養し、ISOGENII を用いて total RNA を回収した。その後、ReverTra Ace を用いて逆転写し、作成した cDNA を鋳型に Thunderbird SYBR qPCR Mix を用いて qRT-PCR を行った。

(4) ミクログリア応答を制御する細胞外因子のスクリーニング
GeneChip Array の実験結果で同定した CFP1 の発現量を指標に、CFP1 の発現上昇させる因子を qRT-PCR でスクリーニングした。まず、高栄養培地中のみ含まれる因子を非必須アミノ酸・金属・脂質/ビタミンの 3 つに大別し、別々に汎用培地に添加して qRT-PCR を行った。さらに、組成を細分化して qRT-PCR を行い、CFP1 の発現上昇に影響のある化合物ヒポキサンチンを特定した。

[結果]

ミクログリア応答を制御する新規因子を同定するため、ミクログリア細胞株 BV-2 を用いて、形態増殖を指標とした評価系を構築した。その結果、高栄養培地で培養した時、扁平状の形態を持つミクログリア数が増加し、細胞の増殖効率が減少していた。また高栄養培地で発現変動する遺伝子を GeneChip Array を用いて解析した結果、高栄養培地で培養した際、CFP1 が発現上昇することを明らかにした。さらに、CFP1 の発現上昇を誘導する因子を高栄養培地中からスクリーニングし、ヒポキサンチンの同定に成功した。ヒポキサンチンは ATP や GTP の再合成を行うサルベージ経路の資源として細胞にとって必須の化合物である。特に、脳において ATP/GTP などのプリンヌクレオチドの供給はこのサルベージ経路にかなりの部分が依存する。先行研究から、CFP1 は炎症性応答やヌクレオチド代謝との関連も示唆されており、本研究で見出したヒポキサンチン、CFP1 の新規経路が、ミクログリア応答に寄与していることが考えられた。

[考察・今後の展望]

本研究では、ミクログリア応答を制御する候補因子として、CFP1 とヒポキサンチンの 2 つを同定することに成功した。CFP1 は、胎生期ならびに周産期において、特定の脳領域で発現上昇することが報告されているが、ミクログリアとの関連は未だ報告されていない。ヒポキサンチンは、hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) によるイノシン酸生成の原材料になる化合物で、脳神経系におけるヌクレオチド代謝経路において重要な役割を担う。興味深いことに、この HPRT1 の欠損はレッシュナイハン症候群 (Lesch-Nyhan syndrome; LNS) 発症の原因となる。この疾患はヒポキサンチンの代謝不良によって発達段階から自傷行為をはじめとする重篤な脳障害を引き起こすが、その発症メカニズムについては明らかになっていない。今回のターゲットである CFP1 は HPRT1 との関与が先行研究から示唆されており、現在ミクログリア内における CFP1 と HPRT の関係性について検証を行っている。この関係性の解明によって発達期のミクログリアによる中枢神経系構築のメカニズムの一端を解明できるのではないかと期待している。

ショウジョウバエ概日時計調節遺伝子の発現メカニズムの追究

井口 彰 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

我々動物の記憶や学習、そして行動は、脳を構成する無数の神経細胞によって制御されている。脳の中の神経細胞は、用いる神経伝達物質や脳内における形態などの点で多種多様な種類が存在しており、複雑な脳機能は神経細胞に適切な多様性があることによって実現されている。しかし、発生過程において、個々の神経細胞が特定の機能を獲得する仕組みは未解明の部分が多い。そこで、私はモデル動物として世界中で広く用いられているキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を用いて、脳神経細胞の分化メカニズムの解明を目指している。ヒトやマウスの脳を構成する神経細胞の数が億を超えているのに対し、ショウジョウバエの脳細胞はおよそ 10 万個である。よって、ショウジョウバエは、神経細胞の分化を研究する上で高等脊椎動物に比べてよりシンプルな解析系を提供する。

本実験で私は、ショウジョウバエの概日リズムの調節において必須の役割を果たす Pigment Dispersing Factor (PDF) 陽性神経細胞に着目した。PDF は神経伝達物質であり、ショウジョウバエの概日リズムの形成に最も重要な神経伝達物質であると考えられている [1, 2]。これまでの研究から、*pdf* 遺伝子は脳の 10 万個ある細胞のうちのわずか 16 個であることが知られている [3]。しかし、この極めて限局した *pdf* 遺伝子の発現制御メカニズムは今のところまったく解明されていない。そこで私は、*pdf* 遺伝子の発現に必要なエンハンサー解析を行うことを計画した。*pdf* 遺伝子の発現制御機構が解明されれば、脳神経細胞の分化についての新規メカニズムを解明するのみならず、概日リズムといった行動制御のメカニズムの理解にも繋がる。よって、本研究は、脳と行動を結ぶ重要な神経基盤の解明につながる意義を持つ。

方法

キイロショウジョウバエの系統

本実験では GFP 発現コンストラクトを持つトランスジェニック系統の樹立に当たり、*y v nos- φ c31 attP40* を用いた。

pdf 遺伝子上流領域のクローニング

pdf 遺伝子の転写領域の解析を行うために、*pdf* 遺伝子の開始コドン上流 300bp、250bp、200bp、150bp、そして 100bp の DNA 領域を取得した。まず、*pdf* 遺伝子座周辺のゲノムの塩基配列を FlyBase (<http://flybase.org>) から入手し、それを基に PCR プライマーを設計した。設計したプライマーを用いてゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、*pdf* 遺伝子上流の DNA を増幅した。得られた上流領域の制御下で *GFP* 遺伝子を発現させるために、*GFP* コーディング配列を有し、かつ φ C31 インテグレーションを用いたショウジョウバエゲノムへの挿入が可能な pS3aG ベクター (Addgene #31171) を用いた。先に得た PCR 産物を pS3aG ベクターとライゲーションし、異なる長さの PDF 上流のクローニングを行った。

胚への DNA の顕微注入と系統の樹立

pdf 遺伝子上流領域を持つ pS3aG ベクター DNA を 0.1 ng/ μ l に調製し、*y v nos- φ c31 attP40* の胚に顕微注入した。顕微注入済みの胚から産まれてきた雄を、バランス系である *CyO/Roi* の未交尾メスと交配させることで系統を樹立した。

免疫染色

脳での *GFP* 発現細胞が s-LN ν 細胞 (PDF 陽性細胞) であるかを検討するために、樹立したトランスジェニック系統の成虫を解剖し、脳を摘出した。4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含むリン酸生理食塩水 (PBS) で固定処理を行った後、PBS で PFA を洗い流した。次に、5%ロバ血清を含む PBS でブロッキング処理を行い、抗 PDF 抗体 [4] を用いて一次染色を行った。その後、蛍光色素 Alexa555 で標識した抗マウス抗体を二次抗体として用いることで、PDF タンパク質を可視化した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察と ImageJ による画像解析

脳の観察と写真撮影は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (カールツァイス) を用いて行った。画像解析には ImageJ ソフトウェア [5] を用いた。

結果と考察

私は、*pdf* 遺伝子の開始コドンより上流に存在する 300bp と 200bp のゲノム領域を *GFP* 遺伝子と融合させたトランスジェニック系統を樹立した。このショウジョウバエの脳を解剖して *GFP* のシグナルを確認したところ、いずれの系統においても *GFP* のシグナルが PDF 陽性細胞で確認された。一方で、200bp 支配下の *GFP* シグナルは、300bp 支配下のシグナルに比べ著しく減弱した。以上の結果は、*pdf* 遺伝子の PDF 陽性細胞での発現に必須のエンハンサーはこの 200bp 以内にあるが、発現レベルを調節するエンハンサーは 300bp から 200bp の間に存在することを示唆する。

今後の展望

現在までに *pdf* 上流 300bp と 200bp の元で *GFP* を発現する系統しか作製できていない為、*pdf* 上流 200bp 以下である 150bp、100bp と *GFP* 遺伝子との融合系統の作製を引き続き行っていく予定である。今後、PDF 発現に必須のエンハンサーが絞り込まれた際には、その塩基配列に結合する転写因子の同定を行い、*pdf* 遺伝子の発現調節機構の詳細を明らかにしていきたい。

参考文献

- [1] Renn et al. (1999) *Cell* **99**, 791-802.
- [2] Shafer & Yao (2014) *Curr Opin Insect Sci* **1**, 73-80..
- [3] Helfrich-Förster (2005) *Genes Brain Behav* **4**, 65-76.
- [4] Hanafusa et al. (2013) *PLOS One* **8**: e84495.
- [5] Schneider et al. (2012) *Nat. Methods* **9**, 671-675.

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因子の探索と機能解析

福岡 怜奈 (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から始まり、子から大人へと発生を遂げた後、死を迎えることで終わる。この時間軸に沿った成長過程は、ステロイドホルモンによって厳密に調節されている。昆虫では、昆虫の主要なステロイドホルモンである「エクジステロイド」が適切なタイミングに生合成・分泌されることで、脱皮や変態を誘導する¹。エクジステロイドは、外部から摂取した餌に含まれるコレステロールをもとに前胸腺と呼ばれる内分泌器官で合成されることが知られている。そして、この前胸腺でのエクジステロイド生合成のタイミングは、光・温度・栄養・湿度といった環境条件によって柔軟に変化する²。しかし、外部環境からの情報を統合しながら前胸腺でのエクジステロイド生合成活性を適切に調節するメカニズムには未だに不明な点が多い。

このような中で指導教官である丹羽は、キロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*; 以下ショウジョウバエ) での未同定のエクジステロイド生合成調節因子を発掘するために、カルフォルニア大学バークレー校ショウジョウバエゲノムプロジェクトの網羅的遺伝子発現データベース³を利用した遺伝子探索を行った。このデータベースは、ショウジョウバエにおける 7917 遺伝子の発現パターンを RNA *in situ* hybridization によって調べた結果を、文字情報と画像によって記載している。そして、7917 遺伝子のうち、エクジステロイドを生合成している環状腺 (前胸腺、側心体、アラタ体からなる複合体) と羊漿膜の 2 領域で発現している遺伝子を調べたところ、4 遺伝子に絞り込むことができた。この 4 遺伝子はすべて膜貫通タンパク質をコードしており、何らかの細胞外シグナルを受容する機能を持つことが期待できる。

そこで私は、このショウジョウバエ 4 遺伝子のエクジステロイド生合成における役割を追究する目的で、分子遺伝学的手法を中心とした機能解析を実施した。

材料と方法

(1) ショウジョウバエの飼育と系統

ショウジョウバエは寒天、コーンミール、グルコース、乾燥酵母を煮詰めて混ぜ合わせたものを標準エサとして、25°C、もしくは 17°C で飼育した。今回の実験では、野生型として *y¹w¹¹⁸* あるいは *w¹¹⁸* という系統を用いた。

(2) 候補遺伝子の発現解析

候補遺伝子が前胸腺で発現しているかどうかを RNA *in situ* hybridization 法によって検証した。また、定量逆転写 PCR を用いて、候補遺伝子の各組織における発現量を調べた。

(3) 機能欠損変異個体の作出

候補遺伝子の機能欠損変異個体の作出には、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いた。ガイド RNA 発現ベクターの作製と変異体の樹立方法は先行研究に従った⁴。

(4) 機能欠損変異個体の発生のタイミング測定

候補遺伝子が発生の進行に関与するかどうかを確認するために、CRISPR/Cas9 法によって作出した候補遺伝子機能欠損個体の発

生タイミングを測定した。採卵容器内に成虫を入れ、4 時間後に寒天プレートに産み付けられた受精卵を回収した。25°C で 34 時間飼育後、この受精卵から孵化した 1 齢幼虫 (産卵後 36±2 時間) を回収した。回収した 1 齢幼虫を標準エサに移し入れ、25°C で飼育し、その発生の経過を測定した。なお、コントロールには、候補遺伝子変異のヘテロ接合体を用いた。

結果

3 齢幼虫の脳-前胸腺複合体を用いた *in situ* hybridization による発現解析の結果、4 遺伝子全てが前胸腺で発現していることを確認した。また、4 遺伝子のうちの 1 つ *candidates of genes regulating ecdysteroid biosynthesis-1* (*cgreb-1*; 仮称) に関しては、幼虫の様々な組織における発現量を定量逆転写 PCR によって検討した結果、前胸腺で極めて特異的に発現していることも確認した。

次いで、CRISPR/Cas9 法を用いて、4 遺伝子それぞれのタンパク質読み枠にフレームシフト変異を導入した機能欠損変異体の取得に成功した。これらの機能欠損個体の表現型解析を実施したところ、現在までに、*cgreb-1* 変異体に関しては、コントロール個体と比べて蛹化のタイミングが 1 日程度遅れることを見出した。

考察

候補遺伝子の発現解析と機能欠損変異体の表現型解析の結果から、CGREB-1 が前胸腺を介した発生タイミングの調節に関与することが示唆された。今後は、*cgreb-1* 変異体の蛹化タイミングの遅延がエクジステロイド生合成不全によるものであることを確認する必要がある。そこで、*cgreb-1* 変異体での血中エクジステロイド量を測定すると共に、発生タイミングの表現型が活性型エクジステロイド(20E)の摂食によって回復するかを検討する予定である。

cgreb-1 遺伝子は、DEP (Disheveled/EGL10/Pleckstrin) ドメインをもつ複数回膜貫通型タンパク質をコードすることが予想される。DEP ドメインは細胞内シグナル伝達に関与するドメインであることから⁵、CGREB-1 は何らかの細胞外シグナルを受容することでエクジステロイド生合成を調節すると予想している。CGREB-1 がどのようなシグナルを受容するかを解明も、今後の重要な課題である。

参考文献

1. Niwa, R. & Niwa Y.S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1283-1292 (2014)
2. Niwa, Y. S. & Niwa, R. *Genes Genet. Syst.* **89**, 27-34 (2014)
3. Tomancak, P. *et al. Genome Biol.* **8**, R145 (2007)
4. Kondo, S. & Ueda, R. *Genetics* **195**, 715-721 (2013)
5. Martemyanov, K. A. *et al. J. Neurosci.* **23**, 10175-81 (2003)

生殖幹細胞の増殖を制御する因子の探索—ショウジョウバエを用いた解析—

吉成 祐人 (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

次世代に生命を継承するためには、卵が安定的に供給されることが必要である。卵をつくる大本となる細胞は生殖幹細胞と呼ばれ、この幹細胞の自己増殖と分化のバランスが適切に制御されることが卵の安定的な供給に必須である。生殖幹細胞の自己増殖と分化のバランスを制御する微小環境を「ニッチ」と呼び、ニッチから生殖幹細胞へと送られる局所因子に関する研究がこれまでに多く行われてきた²。一方、多くの動物において、個体を取り巻く周囲の外環境によって卵形成過程が影響を受ける事例が報告されている³。卵形成の出発点が生殖幹細胞であることを考えると、外環境のシグナルはニッチに伝えられ、生殖幹細胞の増殖や分化のバランスを調節することが予想される。しかしながら、外環境が、卵形成過程の中でも生殖幹細胞の増殖や維持に影響を与えるのかについては、現在まで報告が少ない。

このような背景の中で、当研究室の天久らが、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、交尾の刺激が生殖幹細胞の増殖を促すことを発見した。また、その交尾依存的な生殖幹細胞の増殖には、オスの精液中の因子がメスの神経系で受容されることで起こる性ペプチドシグナリングの活性化と、それに引き続く卵巣におけるステロイドホルモン生合成の活性化が必要であることを明らかにした⁴。しかし、交尾刺激の情報がどのように卵巣のニッチへと伝えられているか、その分子メカニズムの全容解明にはほど遠い。

この問題にアプローチするために私は、神経細胞、あるいは卵巣内のニッチ構成細胞や生殖幹細胞で機能する膜受容体タンパク質群に着目した。刺激などの外環境の情報が神経で受容され、最終的に生殖幹細胞へ伝達されるということから、何らかのシグナルを受容する膜受容体が重要な機能を持つと予測できたからである。本研究において私は、キイロショウジョウバエのゲノムにコードされた膜受容体遺伝子 266 種のノックダウンを卵巣内体細胞と神経細胞特異的に行い、交尾前後での生殖幹細胞の数を比較することで、生殖幹細胞の増殖に関わる膜受容体とリガンドを特定することを目指した。

方法

(1) 膜受容体遺伝子ノックダウンの方法

膜受容体遺伝子のノックダウンを組織特異的に行うために、異所的遺伝子発現系である GAL4-UAS システムを用いた。これは、酵母由来の転写因子 GAL4 をショウジョウバエの特定のエンハンサーの制御下で発現させることで、GAL4 結合配列である UAS の下流に配置した遺伝子を誘導させるシステムである。本研究では、神経と卵巣のニッチ特異的 GAL4 ドライバーである *c587-GAL4* システムと、266 種の膜受容体遺伝子それぞれの UAS-RNAi システムをかけ合わせることで、膜受容体遺伝子がノックダウンされたメス個体を得た。

(2) 個体の飼育と交尾・解剖

メス個体は 25°C で飼育した。羽化後 3 日目から 4 日目の間の 24 時間、野生型オス個体と共にプラスチックバイアルに入れ、交

配させたメス個体を「交尾後メス」とした。一方、オス個体を存在させずに同等の時間を経過させたメス個体を「未交尾メス」とした。交尾後メスと未交尾メスのそれぞれを羽化後 4 日目で解剖し、取り出した卵巣を固定した。

(3) 生殖幹細胞とニッチの免疫組織化学染色法

ニッチと生殖幹細胞は免疫組織化学染色によって可視化した。4%パラホルムアルデヒド/PBS で卵巣組織を固定した後、2%仔牛血清アルブミン/PBS でブロッキング処理した。生殖幹細胞とニッチ構成細胞を可視化するために、1 次抗体として抗 1B1 抗体⁵と抗 DE-カドヘリン抗体をそれぞれ用いた⁶。その後、Alexa 蛍光標識 2 次抗体を加え、染色した。

(4) 生殖幹細胞数の計測と評価

1 つの卵巣小管 (卵巣を構成している小さな管) 内いくつの生殖幹細胞が存在するかを、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss AxioPlan) を用いて計測した。計測は、1 種類の膜受容体遺伝子ノックダウンシステムについて、未交尾メスと交尾後メスのそれぞれ 50 卵巣小管ずつに対して行った。マンホイットニーの *U* 検定を用いて交尾前後の生殖幹細胞数に有意差があるかどうかを検定し、交尾依存的な生殖幹細胞の増殖の有無を評価した。

結果・考察

266 種の膜受容体遺伝子それぞれのノックダウンメス個体の交尾前後での生殖幹細胞の数を計測した。その結果、100 種以上の膜受容体ノックダウン個体において、生殖幹細胞の増殖に異常がみられ、その表現型は「交尾後の生殖幹細胞の増殖が起らないもの」と「交尾前に生殖幹細胞が増殖するもの」の 2 つに大別することができた。さらに、ノックダウンによって異常な表現型を示した膜受容体の内、約 30 種が神経ペプチド受容体であった。交尾依存的な生殖幹細胞の増殖が神経系を介することから、これら約 30 種の神経ペプチド受容体が生殖幹細胞の増殖を制御する神経系のシグナリングに関与すると考えられる。また、ノックダウンによって異常な表現型を示した膜受容体の中には、リポタンパク質受容体などの神経ペプチド受容体以外の膜受容体も多数存在した。このことから、生殖幹細胞の増殖には、非神経性の液性因子のシグナルも関わりと考慮される。

本研究によって、生殖幹細胞の増殖の制御にリポタンパク質受容体をはじめとする様々な因子に関わり、中でも多数の神経伝達物質による制御が存在することが初めて示唆された。本研究は、交尾をはじめとする外環境の情報と生殖幹細胞の増殖制御機構とを繋ぐ、新たな経路を明らかにする可能性を秘めている。

参考文献

- Schofield, R. *Blood Cells* **4**, 7-25 (1978).
- Fuller, M. T. & Spradling, A. C. *Science* **316**, 402-404 (2007).
- Davies, S. & Deviche, P. *Horm. Behav.* **66**, 41-55 (2014).
- Ameku, T. & Niwa R. submitted.
- Zaccari, M. & Lipshitz, H. D. *Zygote* **4**, 159-166 (1996).
- Oda, H. et al. *Dev. Biol.* **165**, 716-726 (1994).

赤痢アメーバにおけるグリセロール生合成経路の同定と解析

山岸 美菜 (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

赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)はアメーバ赤痢症を引き起こす寄生原虫である。世界人口の約1%が感染し、年間4~7万人の死者が出る。また、近年日本での感染者数は年々増加しているため、国内でも問題になっている。赤痢アメーバは大腸で腸管に侵入して炎症を引き起こすが、組織侵入をする際に酸化ストレスが加わる。赤痢アメーバは微好気性で酸化ストレスに弱いと考えられるにもかかわらず、それに耐えて組織侵入することができる。そこで、組織侵入に酸化ストレス応答が重要だと考え、赤痢アメーバの酸化ストレスに対する防御機構に注目した。*E. histolytica* は真核生物が一般的に持つ抗酸化防御システムを欠くが、代わりにまだ同定されていない抗酸化防御システムを持つと考えられる。先行研究によって、酸化ストレスが加わると赤痢アメーバの解糖系が抑制され、解糖系から分岐している、グリセロールを作る経路の中間、最終代謝産物が増加することが明らかになった。このことから、酸化ストレス防御にグリセロール代謝経路が重要であるということが示唆された。グリセロール代謝経路の機能解析は寄生虫の酸化ストレス耐性のさらなる理解につながる。また、グリセロール代謝経路は寄生虫の生存への重大なプロセスへ関与する。寄生虫の生存に不可欠な代謝経路は治療や予防薬作製の候補となる。したがって、グリセロール代謝経路が抗アメーバ薬の作製へのターゲットになりうると考えられる。

グリセロール代謝経路は一般的に glycerol-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)と glycerol kinase(GK)という2つのタンパク質が触媒しており、*E. histolytica*にもその候補遺伝子がある。*E. histolytica*のG3PDHとGKのグリセロール合成経路における機能、またこれらの酵素の酸化ストレス下での解糖系からグリセロール経路への流れの調節方法を明らかにすることが重要である。

そこで本研究は酸化ストレス下における *E. histolytica* G3PDH と GK の候補遺伝子の役割を明らかにすることを目的として、2つの候補遺伝子の機能解析を行った。

材料・方法

機能が生化学的に確認されている G3PDH と GK のタンパク質の配列を query として、*E. histolytica* のゲノムデータベース (<http://amoebadb.org/amoeba/>) に対してホモロジー探索をすることで、G3PDH と GK の遺伝子の候補を同定した。

次に、*E. histolytica* の G3PDH と GK の系統解析を行った。系統樹の推測には、RAxML 法、LG + F + G4 モデルを使用した。

次に、*E. histolytica* HM-1:IMSS Cl-6 株を用い、G3PDH または GK 候補タンパク質に HA タグを付加した融合遺伝子を発現する形質転換株を作成した。そして、抗 HA タグ抗体を用いた間接蛍光抗体法および細胞分画法により候補タンパク質の細胞内での局在を観察した。

結果・考察

EHI_099700 および EHI_164850 をそれぞれ *EhG3PDH*、*EhGK* と同定した。G3PDH は FAD dependent oxidoreductase によって触媒される。赤痢アメーバの G3PDH はヒトなどの一般的な G3PDH とは異なり、G3PDH と予測されるドメインの C 末端側に鉄硫黄クラスター、Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase をコードするドメイン、metal-binding ドメインを有する。この形の Fusion タンパク質を持つ生物は fornicates、entamoebids、spilochaetes、actinobacteria のみであった。

E. histolytica G3PDH の、FAD dependent oxidoreductase をコードするドメインと鉄硫黄クラスターを含む N 末端側と、Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase をコードするドメインと metal-binding ドメインを含む C 末端側、GK の系統樹を推測した。N 末端側と C 末端側を別のタンパク質として分けて持つ生物や、どちらかの配列のみを持つ生物がいるため、N 末端側と C 末端側をそれぞれ解析した。その結果推測された最尤系統樹では、N 末端側については、fornicates と、*E. histolytica* を含む entamoebids のものがクレードを作った。そしてその姉妹群として、Cyanobacteria と Green non sulfur bacteria 由来のタンパク質が単系統であった。したがって、N 末端側は Cyanobacteria と Green non sulfur bacteria の共通祖先から fornicates または entamoebids の共通祖先へ水平伝播し、その後さらに fornicates、entamoebids 間で水平伝播したと考えられる。一方で、C 末端側は、*E. histolytica* を含む真核生物は単系統になった。また、firmicutes と α -proteobacteria が姉妹群となったが、サポートするブートストラップ値が低いいため、*E. histolytica* G3PDH の C 末端側の起源については知ることができなかった。また、配列が fusion したポイントは現時点では予測不可能である。GK については、entamoebids 以外の全ての真核生物が単系統となった。Entamoebids については、単系統となり、姉妹群は Mollicutes bacterium であった。サポートするブートストラップ値が低いいため、具体的な生物の特定には至らなかったが、*E. histolytica* GK の起源はバクテリアであることが明らかになった。

IFA により HA-G3PDH と HA-GK は細胞質と細胞膜に存在することが示された。さらに細胞分画により G3PDH と GK は共に主に細胞質部分に存在し、一部細胞膜に結合していることが明らかになった。

G3PDH と GK の機能解析のため、G3PDH と GK の遺伝子発現抑制株を作製した。今後これらの株を用いて、酸化ストレス有無での、遺伝子発現抑制株と遺伝子過剰発現株と野生型の間での、表現型の違いを明らかにする。さらに *EhG3PDH* と *EhGK* の役割を明らかにするために、*E. histolytica* G3PDH と GK のリコンビナントタンパク質をそれぞれ大腸菌で発現させ、精製し、生化学的な性質の詳細を実証する。

参考文献: Afzal Husain et al., PLOS. 2012 (6)

精子における”転写”は、刷り込みメチル化の引き金となるのか？

倉持 大地 (筑波大学 生物学類) 指導教員：谷本 啓司 (筑波大学 生命環境系)

背景

遺伝子の発現制御は、生物にとって必須の仕組みである。遺伝子発現は、塩基配列情報とその結合タンパク質 (転写因子) によって制御されると考えられてきたが、近年、ヒストンやDNAの化学修飾、つまり「エピジェネティックな情報」によっても緻密に制御されることがわかってきた。

エピジェネティックな遺伝子発現制御の1つに「ゲノム刷り込み」と呼ばれる現象がある。ゲノム刷り込みは、哺乳類を含む一部の生物にのみ存在する制御メカニズムであり、遺伝子が由来する親の性の違いによって、その発現のON-OFFが決定する。個々の細胞は、父親由来と母親由来の遺伝子座 (アレル) を持つが、両者の塩基配列は基本的には同一である。このため、ほとんど全ての遺伝子は両アレルから発現する。しかし、ごく一部の遺伝子はどちらかのアレルでのみ発現し、まるで由来する親の性を覚えているかのようにみえることから、このような発現様式を「刷り込み発現」と呼ぶ。

ゲノム刷り込みが観察される遺伝子座のひとつに、*Igf2/H19* 遺伝子座がある (Figure 1)。同遺伝子座には、成長因子をコードする *Igf2* 遺伝子と、non-coding RNA をコードする *H19* 遺伝子が存在し、それぞれ、父親由来アレルと母親由来アレルからのみ発現する。この発現の違いを生み出すのは、*H19* 遺伝子上流に存在する DNA 配列のアレル特異的なメチル化状態の違いであり、同領域を *H19* Imprinting Control Region (*H19*ICR) と呼ぶ。このように、ICR が異なるメチル化状態をとることを「刷り込みメチル化」という。*H19*ICR における父親アレル特異的なメチル化は、精子形成過程で確立し、受精後、体細胞においても維持されることが知られている (Figure 2)。

当研究室では以前、*H19*ICR DNA 断片の刷り込みメチル化に関わる機能を検証するために、通常は刷り込みを受けないヒト β グロビン遺伝子座に同断片を挿入した酵母人工染色体 (YAC) を用いてトランスジェニックマウス (TgM) を作製した (*PNAS* 102:10250-10255, 2005)。同マウスの解析の結果、*H19*ICR 断片のみで、体細胞におけるアレル特異的な DNA のメチル化を確立できることが示された。しかしながら、同 TgM の精子を解析した結果、内在 *H19*ICR とは異なり、導入 *H19*ICR はメチル化されていなかった。つまり、同断片は、体細胞における刷り込みメチル化の確立には十分であるが、精子における刷り込みメチル化を確立することはできないことが明らかとなった。

目的

配偶子形成時における内在 *H19*ICR の刷り込みメチル化の確立メカニズムは未だ明らかになっていない。本研究では、このメカニズムの解明を目的とした。

制御に関わる要素の候補として「転写」に着目した。これは、刷り込み遺伝子座の1つである *Gnas* 遺伝子座において、ICR にまたがる転写が同配列の刷り込みメチル化に必須であることが報告されたからである (*Genes Dev.* 23:105-117, 2009)。さ

らに、他グループによって、*H19*ICR においても、ICR にまたがる、精子特異的な転写が存在することが報告された (*EMBO J.* 31:606-615, 2012)。そこで本研究では、「同領域の精子特異的な転写が、*H19*ICR におけるアレル特異的な DNA メチル化を誘導する」という仮説の検証を行うこととした。

方法

まず、先行報告の通りに *H19*ICR にまたがる転写が存在するののかについての確認をおこなった。同領域の刷り込みメチル化レベルが著しく上昇する受精後 16.5 日胚のマウス精巣、肝臓、腎臓を採取し (後者 2つは対照群)、RNA を抽出した。次に、ランダムプライマーを用いて cDNA の合成を行った。同 cDNA について、*H19*ICR の領域特異的なプライマーにより PCR を行うことで、転写の有無を検証した。

結果

*H19*ICR にまたがる転写が存在することを確認した。

考察

現在、内在 *H19*ICR の上流に polyA 付加シグナルを挿入したマウスを作製中である。解析個体について、転写終結の確認と、同領域の DNA メチル化解析を行うことで、*H19*ICR の刷り込みメチル化における転写の必要性を検証する。

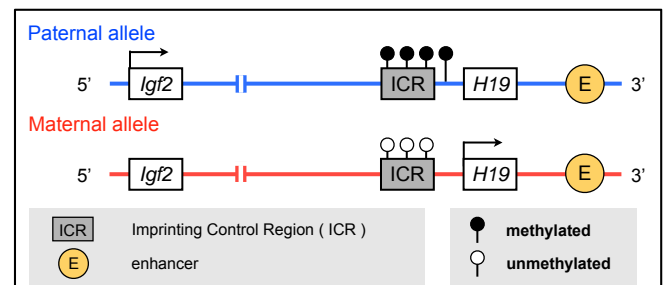


Figure 1: *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み

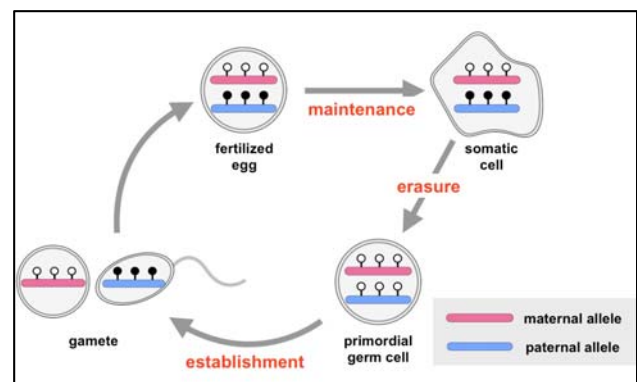


Figure 2: 刷り込みメチル化のサイクル

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* の細胞質ダイニン DYH1 の機能解析

石坂 望生 (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)

背景と目的

微小管細胞骨格とダイニンモーターは、オルガネラや物質の運搬、有糸分裂など、真核生物において様々な現象に働くタンパク質である。本研究で用いたテトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* の精緻な細胞構造は、微小管細胞骨格により支えられるが、微小管—細胞質ダイニン系の機能は不明な点が多い。

テトラヒメナは、体細胞核に相当する大核、及び生殖核としての小核を有する。これらは、細胞分裂時に異なる分裂様式をとるが、いずれの場合も微小管細胞骨格が中心的な役割を果たす。

一方、テトラヒメナは、細胞前方の口部装置から微粒子を細胞内の食胞に取り込み、未消化物を細胞後方の細胞肛門から排出する。その後、食胞膜は分断され、リサイクリング小胞が生じる。それが口部装置に運ばれ、食胞形成に利用されるようである。食胞やリサイクリング小胞の輸送系はほとんど分かっていないが、口部装置や細胞肛門からは、細胞質に微小管が伸びるのが観察される。そのため、この細胞内輸送に細胞質ダイニンの関与が期待される。

テトラヒメナの細胞質ダイニン重鎖をコードする遺伝子は2つあるが、片方は繊毛内輸送にのみ関与する。そのため、残る *DYH1* 遺伝子に着目した。先行研究より、*DYH1-SK* (somatic knockout) 細胞は、食作用の不全や小核分裂時に染色体分離の異常を呈した。この研究では、*DYH1* の完全な破壊ができなかったと報告している。*SK* では、大核の標的遺伝子を直接薬剤マーカー遺伝子と置換するため、細胞増殖に必須な遺伝子を完全に排除することはできない。本研究では、大核分裂や細胞内のオルガネラの配置などにも *DYH1* が働く可能性を考え、その機能の全貌を明らかにするために、*GK* (germline knockout) による完全な遺伝子破壊を試みた。*GK* では、小核の標的遺伝子を薬剤マーカー遺伝子で置換後、その小核から新生される大核を有する細胞を得られるため、完全な遺伝子破壊株の表現型を知ることができる。さらに、先行研究では調べられていない *DYH1* の細胞内局在性について、蛍光タンパク質を用いて解析することにした。

方法

1) *DYH1-GK* 株の作成

小核内の *DYH1* の ORF を、抗生物質パロモマイシンの耐性マーカー遺伝子 (*NEO4*) と相同組換えし、遺伝子破壊した。詳細は割愛するが、最終的に小核内の *DYH1* 遺伝子座を *NEO4* と置換したホモ株から、大核内の *DYH1* を完全に欠失した細胞株 (*DYH1-KO*) を樹立した。

2) *DYH1* の局在解析

大核内の *DYH1* 遺伝子座のストップコドンの直前に、*eGFP* または *mCherry* を挿入した細胞株 (*DYH1-eGFP*、及び *DYH1-mCherry*) を作成し、それぞれを実験に供した。

結果

今回、作製に成功した *DYH1-KO* 株は、コントロールの野生型株と比べ、細胞増殖が著しく遅かった。さらに *DYH1-KO* 株

では、異常な形状の細胞が高頻度で見られた。これらの細胞内には、野生株では見られない顆粒状の構造が充填されていた。さらに DNA 染色の結果、*DYH1-KO* 株では大核や小核の数、及び大核の大きさや形状に異常が見られた。

一方、形状が比較的に野生型細胞に近い *DYH1-KO* 株であっても、その食胞形成能は低かった。口部装置の膜板は動くため、細胞内の膜輸送等に支障がある可能性が考えられた。

さらに *DYH1-KO* 株の微小管の分布を調べた結果、形状が異常な細胞では、表層微小管構造が崩れているのが観察された。また、小胞を取り巻くような異常な細胞質微小管の分布を示す *DYH1-KO* 株も見られた。

次に、*DYH1-eGFP* 株を観察した結果、口部装置を含む細胞表層に等間隔に並ぶ点や、細胞後部にある複数の食胞の一部をドット状に取り囲むように、*DYH1* は局在した。細胞表層の点は、基底小体の配置と関係しているかもしれない。基底小体とは、繊毛の基部にある微小管の重合中心であり、テトラヒメナでは繊毛列線に沿って細胞表層に規則的に配置している。一方、細胞質内の微小管に沿うような *DYH1* の局在や、分裂中の細胞核内にそのシグナルは検出されなかった。

考察

DYH1 の機能欠損下では、表層微小管や細胞質微小管の分布に著しい異常が認められた。テトラヒメナの表層微小管構造は、細胞膜をカゴ状に裏打ちし、基底小体の配置化や細胞の形を保つのに重要と考えられている。一方、細胞質微小管の生理的意義については不明な部分が多いが、他の生物と同様に、オルガネラの細胞内分布の制御や細胞内輸送に働いていると思われる。これまでに、微小管重合中心として基底小体に局在する γ チューブリンの発現を抑制すると、*DYH1-KO* 株と同様に、表層微小管及び細胞質微小管の異常な分布や細胞形態の異常が報告されている。これより、細胞表層に点状に局在した *DYH1* は、基底小体と関連をもち、表層微小管の構築や細胞質微小管の分布の制御に寄与するのが推察された。

今回、分裂核には *DYH1* の局在は検出されなかったが、*DYH1-KO* 株で大核や小核の個数に異常が見られた。大核と小核の分裂様式は異なるが、細胞内での核の位置や分裂する方向性を決めるのに細胞質微小管が関与する可能性がある。両核の表面と細胞表層を連絡する細胞質微小管の正常な分布や働きに *DYH1* が働くと考えられる。現在、*DYH1-KO* 株の分裂期の細胞質微小管の分布について、詳細に観察を進めている。

また、*DYH1* は細胞後端の食胞の周囲に局在した。*DYH1* は、食胞の成熟化や排出などに関係する可能性が考えられる。また、*DYH1-KO* 株の食胞形成能が低いのは、食胞膜の材料となるリサイクリング小胞の供給が遅滞するためと推察される。*DYH1* が口部装置近傍に局在することも、この可能性を示唆する。今後、*DYH1* が集積した食胞の動態観察や、*DYH1-KO* 株のリソソームやリサイクリング小胞を観察し、この考えを検討したい。

クロララクニオン藻に近縁な無色ケルコゾア生物の探索

加藤 雄大 (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

ケルコゾア門に属する海産の単細胞藻類であるクロララクニオン藻類は、緑藻を内部共生者とする二次共生により葉緑体を獲得した生物群である。クロララクニオン藻類はクロロフィル a/b を含む緑色の葉緑体を持ち、葉緑体周縁区画にはヌクレオモルフと呼ばれる構造を持つことが知られている。このヌクレオモルフはクロララクニオン藻類の内部共生者の核の残滓と言われており、このような構造はクロララクニオン藻類以外にはクリプト藻類のみ確認されている。このことからクロララクニオン藻類は二次共生の中間段階にある生物であると考えられ、葉緑体のオルガネラ化やそれに伴う内部共生者の核の退化的進化を研究する上で興味深い生物群であると言える。一方でこれまでの分子系統解析ではクロララクニオン藻類に近縁な環境配列クレードが多く存在することが示されている。これらの未知の系統群に属する生物はクロララクニオン藻類の葉緑体獲得の過程を理解する上で重要であると考えられ、その実体の解明が求められている。本研究ではクロララクニオン藻類に近縁な生物を環境中から発見し、培養株として確立することの第一歩として、特異的プライマーを用いた PCR により環境サンプルからクロララクニオン藻類に近縁な生物の検出を行った。

手法

・特異的プライマーの作成

先行研究で示されているクロララクニオン藻類の周辺の環境 18S rRNA 遺伝子配列をもとにした Blast 検索によりクロララクニオン藻類及びそれらに近縁な環境由来の 18S rRNA 遺伝子配列を収集した。収集した配列を用いて RAxML による分子系統解析を行い、その結果を元に特異的プライマーを作成した。

・環境サンプルからのクロララクニオン藻類に近縁な生物の検出
千葉県袖ヶ浦市長浦港(5月16日)、葛西臨海公園(8月2日、9月16日)、港区港南大橋(9月16日)の3か所において3Lの海水を採集した。各サンプルはまず3 μ m孔のフィルターでろ過した後、さらに0.6 μ m孔のフィルターでろ過した。フィルター上に残った生物からDNAを抽出し、設計した特異的プライマーを用いてPCRを行った。その後増幅されたDNA断片をクローニングし、配列を取得した。得られた配列を用いてRAxMLによる分子系統解析を行った。

結果・考察

Blast 検索の結果、70のクロララクニオン藻類に近縁な環境配列を収集することができた。これらの配列は北極海、太平洋、大西洋など世界中の海域で発見され、また表層海水、深海、熱水噴出孔など多様な環境から採集されたものであった。収集した70の環境配列に対して系統解析を行ったところ、環境配列はクロララクニオン藻に近縁な3つのクレード(近縁な順にクレード1、2、3とする)に分かれた。このうちクレード2は主に100m以深の海

洋や熱水噴出孔から採集された環境配列で構成された。これらの環境配列の系統解析の結果から、クロララクニオン藻に近縁な18S rRNA 遺伝子配列を持つ生物はこれまで考えられていたより系統的に多様であり、様々な環境に生息しているということが示唆された。

系統解析の結果示された3つの環境配列クレードをさらに7つのグループに分け、それぞれのグループに対し特異的プライマーを作成した。長浦港、葛西海浜公園、港南大橋で採集されたサンプルに対して、特異的プライマーを用いたPCRを行ったところ、複数のプライマーペアで明瞭なシングルバンドが確認された。このうち長浦のサンプルを用いたPCRでは、クロララクニオン藻類と最も近縁なクレード1に特異的なプライマーにより増幅されたバンドが確認された。このバンドの配列を取得し、Blast 検索で収集された70の環境配列とともに分子系統解析を行ったところ、クレード1と単系統を形成した。長浦港の他に葛西臨海公園、港南大橋のサンプルでも同じ特異的プライマーにより増幅されたバンドが確認されたことから、東京湾にはクロララクニオン藻類と最も近縁なクレードに所属する生物が広く生息していることが分かった。

今後の展望

今回の研究により、東京湾にはクロララクニオン藻類と最も近縁なクレードに所属する生物が存在していることが明らかになった。このクレードはクロララクニオン藻類の葉緑体獲得の過程を解明する上でとりわけ重要な位置を占めると考えられる。このことから、今後は特にこのクレードに属する生物に焦点を当て、培養株を確立することを目指す。

ヤブレツボカビ類における炭化水素高生産株の探索

鈴木 大智 (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

海産従属栄養性ストラメノパイルであるヤブレツボカビ類はクロレラやドナリエラなどの光合成藻類の倍以上の脂質生産性を持ち、光を必要とせず従属培養が可能なることからオイル産生藻として注目されている。ヤブレツボカビ類の脂質組成の特徴として DHA、EPA などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を多く含むことが挙げられる。

ヤブレツボカビ類は PUFA 以外にも、カロテノイド等のテルペノイド系炭化水素を生産する。カロテノイドは抗酸化剤として食品、化粧品分野で需要がある。

2010 年、ヤブレツボカビ類のオーランチオキトリウムに属する 18w-13a 株は乾燥重量の約 20% に及ぶスクアレンを含有していることが明らかとなった(1)。スクアレンは水素添加して化粧品や医薬品として利用される他、そのまま燃料として用いることができる。これにより、今まで DHA の生産者として認識されてきたヤブレツボカビ類は、バイオ燃料の生産者としても注目されるようになってきた。

18w-13a 株のスクアレン生産性は他のヤブレツボカビ類の数十倍~数百倍に及ぶが、DHA 生産株ほど高密度まで増殖せず、流加培養に適さないという欠点がある。本研究では新たなサンプルから単離株を確立し、TLC による脂質組成の評価を行うことで、ヤブレツボカビ類における新たな炭化水素高生産株を確立することを目的とした。

方法

・培養株の作成

東京湾およびその他複数の地域 (鳥取、高知、和歌山、秋田、青森、北海道) から採取した海水、落ち葉、泥など計 151 サンプルを用いて、松花粉ベイト法によりヤブレツボカビ類と思われる細胞を単離した。単離株は、GTY 寒天培地 (グルコース 2%、トリプトン 1%、イーストエキストラクト 0.5%、30% 人工海水濃度、寒天 1.5%) で維持した。ヤブレツボカビ類の単離株から寒天培地での増殖の良いものを増殖能の高い有望株として選定した。

・単離株の同定

単離株の 18SrDNA の塩基配列を取得し、相同性検索ソフトウェア BLAST により、DNA データベースに記載されている既知の配列情報との相同性検索からヤブレツボカビ類の同定を行った。

・TLC 解析用藻体の培養条件

有望株は GTY 液体培地で前培養として 25°C、100 rpm で 5~7 日間の振とう培養を行ったのち、同様の条件で本培養を行い、藻体を回収した。

・薄層クロマトグラフィー (TLC)

回収した藻体は凍結乾燥により乾燥藻体としたのち、脂質抽出と TLC 解析を行った。溶媒での展開後に 20% 硫酸をスプレーし、温風で加熱して脂質を検出した。

結果と考察

89 サンプルから 857 株の単離を行った。BLAST を行った 185 株のうち、176 株がヤブレツボカビ類であった。また、東京湾の単離株は 7 属のヤブレツボカビ類から構成され、29% が *Oblongichytrium* 属、22% が *Thraustochytrium* 属、17% が *Schizochytrium* 属に分類された。これら 3 属が東京湾のヤブレツボカビ類の大部分を占めると考えられる。

得られた単離株から 129 株の有望株を選び、TLC スクリーニングを行った。23 株の TLC スクリーニングの結果、5 株のスクアレン産生株 (図 1) と 8 株のカロテノイド産生株 (図 2) が得られた。

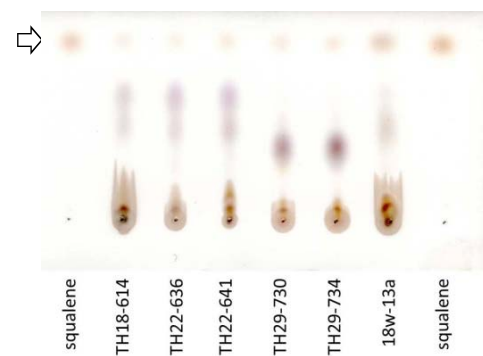


図 1 : スクアレン生産性の TLC スクリーニングの一部。18w-13a 株はスタンダードとして用いた。

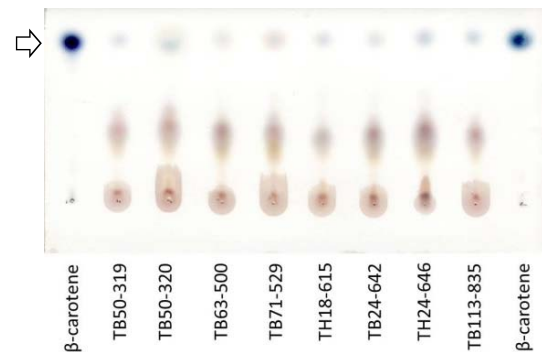


図 2 : カロテノイド生産性の TLC スクリーニングの一部。

研究のまとめと今後の展望

本研究では、多くのヤブレツボカビ類の単離株を得ることができ、その中からいくつかの炭化水素生産能を有する有望株を得た。

得られた有望株についてはスクアレンとカロテノイドの定量を行う予定である。また、流加培養への適応性試験や、DHA などその他脂質のスクリーニングも今後行っていく予定である。

参考文献

- (1) Kaya et al. "Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a accumulates high amounts of squalene" *Biosci, Biotechnol, and biochem*, 75(11), 2246-2248, 2011

ハプト藻 *Chrysochromulina parkeae* の培養株確立と微細構造

塚越 智夏 (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】

一部のシアノバクテリアは光合成だけでなく窒素固定を行い、地球上の窒素循環に大きな役割を果たしている。ソテツやアカウキクサなどの陸上植物と共生し、窒素固定産物を宿主に供給する役割をもつものもある。このような窒素を介した共生関係は、藻類でも知られている。ロパロディア科の一部の珪藻は細胞内に窒素固定シアノバクテリアを共生させており、その内部共生体は楕円体 (spheroid body) と呼ばれる。ハプト藻 *Chrysochromulina parkeae* も窒素固定内部共生体をもつと考えられており、その内部共生体ゲノムは、珪藻の楕円体と同様に窒素固定に必要な遺伝子をもつ一方、光合成や主要な代謝系に関する遺伝子を多く失っている。また、この内部共生体は窒素固定シアノバクテリア UCYN-A の一群に含まれることが示唆されている。UCYN-A は海洋に広く分布し、海洋の窒素固定に大きく貢献しているとして近年注目を集めている生物である。さらに、UCYN-A2 とハプト藻との共生関係が示唆されているが、培養株がないためにこれらの関係については構造的にも機能的にも詳細な研究が行われていない。そこで本研究では、まず *C. parkeae* の培養株を確立し、その微細構造を明らかにすることを目的とした。

【方法】

鳥取県泊港と高知県池ノ浦港を中心に表層海水を 15 回採水した。採取した海水を 8.0 μm フィルターで濾過濃縮したのち、粗培養と単離を行った。培養には ESM, f/2, IMK の 3 種類の培地を使用し、明期 12 時間、暗期 12 時間、18°C の環境で培養した。

外部形態の観察には、光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた。種同定に必要な鱗片の微細構造を観察するために、細胞をホールマウント染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。内部構造の観察には、樹脂包埋した試料から超薄切片を作成し、TEM で観察した。また、DNA の局在を調べるために、DAPI を用いた蛍光顕微鏡観察を行った。

培養株より抽出した DNA を用いて、PCR 法により増幅した 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、最尤法で分子系統樹を作成した。また、先行研究により解読された *C. aff. parkeae* 内部共生体ゲノムのデータから設計した 16S rRNA 遺伝子とニトロゲナーゼサブユニット遺伝子 *nifH* の特異的プライマーを用い、増幅した培養株の DNA から目的遺伝子の増幅を試みた。

【結果と考察】

海水サンプルから ESM 培地で 2 つの培養株確立に成功した (KC1-P2 と TT5-P1)。微細構造観察の結果、4 種類の鱗片を確認し、それらの形態的特徴に基づきこれら 2 株を *C. parkeae* と同定した。さらに、SEM 観察により 4 種類の鱗片の配置様式を新たに明らかにした。

光学顕微鏡観察により KC1-P2 の細胞後部に 1 つの球状の構造が確認できた (図 1 矢印)。DAPI を用いた蛍光顕微鏡観察では、

この構造が DNA をもつことが示された。したがってこの球状の構造は独自のゲノムをもつ内部共生体であると考えられる。

本研究で得られた 2 つの培養株の 18S rRNA 遺伝子の配列は、*C. parkeae* strain Kawachi と非常に高い相同性を示し、UCYN-A2 の宿主と推定される環境配列と同じクレードに含まれた。よって、UCYN-A2 の宿主は *C. parkeae* に近縁な生物であることが示唆された。

しかしながら、継代培養につれて内部共生体が観察できなくなり (図 2)、超薄切片観察でも細胞内に原核生物様の構造は発見できなかった。加えて、内部共生体の 16S rRNA 遺伝子と *nifH* の検出もできなかった。よって、KC1-P2 は培養の途中で内部共生体を失ったと考えられる。これは、窒素豊富な培地で培養し続けたために、窒素固定が不要になったからかもしれない。

細胞縦断面の TEM 写真を図 3 に示す。細胞周縁に 2 個の葉緑体があり、管状クリステのミトコンドリアを持つことが確認できた。細胞前方にはゴルジ体があり、鱗片を含むゴルジ小胞も観察された (図 3 矢印)。他の鱗片を有するハプト藻と同様に、ゴルジ体で鱗片を生産し細胞表面に放出していると考えられる。細胞後方に内部共生体の痕跡は見られず、複数の小胞が見られた。

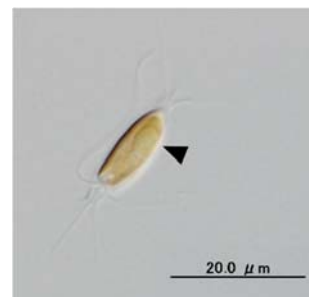


図 1. KC1-P2 (矢印:共生体)

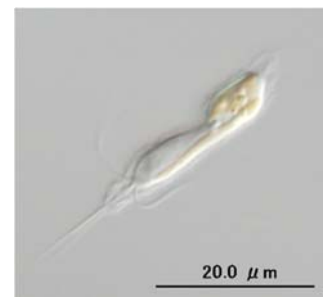


図 2. KC1-P2 (共生体なし)

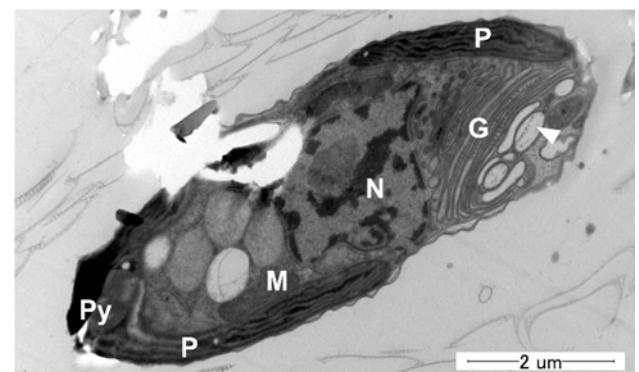


図 3. KC1-P2 の縦断面 G:ゴルジ体、M:ミトコンドリア、N:核、P:葉緑体、Py:ピレノイド、矢印:ゴルジ小胞内の鱗片

【研究のまとめと今後の展望】

今回、*C. parkeae* の新たな培養株の確立に成功した。さらに、SEM と TEM 観察により *C. parkeae* の微細構造に関する新たな知見が得られた。今後は、内部共生体を保持した状態での培養株の維持を目標とし、内部共生体を持つ細胞と持たない細胞の比較を行っていきたい。

塩濃度条件の変化に対するオーランチオキトリウム淡水順化株の脂質合成量の解析

谷 徳美 (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)

研究背景

近年、藻類や微生物を用いて有用物質の生産を目指す研究が盛んである。海水性のラビリンチュラ的一种、*Aurantiochytrium* はトリアシルグリセロールを多量に蓄積し、特に必須脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) が豊富に含まれるため工業的な DHA 生産への利用が期待されている。また特に 18W-13a 株は、高付加価値炭化水素のスクアレンも多く蓄積することが知られている。我々の研究室では、もともと海水性で生育に塩分が必須な 18W-13a 株を低塩濃度条件に順化させることに成功した。この株は、低塩濃度条件で培養すると全脂質は元株以上に蓄積したが、スクアレンはほぼ蓄積しなかった。そこでこの原因を探るため、淡水順化株を異なる海水濃度条件で培養しスクアレンと脂肪酸を定量することで、培地中の海水濃度が油脂の生成にどう影響するかを調べることにした。

方法

Aurantiochytrium sp. 18W-13a の低塩濃度順化株(以下 LSA-1 と呼ぶ)を 3 日間前培養した後、5 日間本培養(102 rpm, 20°C)して毎日サンプルを回収した。海水濃度は 0.016, 1.6, 50% とし、比較のため元株 18W-13a 株(以降野生株と呼ぶ)も海水濃度 50% で同様に培養した。100 ml フラスコで 50 ml の培養液を振盪し、一度に全量を回収し、細胞の凍結重量を測定した。

脂質抽出には乾燥した細胞をすべて用いた。ガラス容器に乾燥細胞、クロロホルム/メタノール(2:1, v/v)、内部標品(スクアレン 1 mg、トリコサン酸 2 mg)を加え、超音波で細胞を破碎し、さらに一晩静置して脂質を抽出した。抽出したサンプルを濾過し、細胞の破片や水溶性タンパク質を取り除くため、9%NaCl 水溶液を 4 ml 加えて攪拌後、水層を除去した。

抽出した脂質溶液を 2 つのガラス容器に分け、濃縮遠心機にかけて溶媒を除いた。一方はヘキサンに溶解し直接ガスクロマトグラフィー (GC) によりスクアレンを定量し、もう一方は HCl-メタノール溶液を加えて 100°C で 1 時間反応し脂肪酸をメチルエステル化して脂肪酸を定量した。

結果と考察

細胞の増殖を示す培地中のバイオマス重量は、3 日目までは低塩濃度条件で LSA-1 の生育がやや遅れたが、その後はどの条件でも大きな差は見られず、5 日目まで増加が続いていた。

全脂肪酸量は、GC により検出された全ての脂肪酸量を合計して算出した。DHA が主要な脂肪酸で、どの条件でも 50-60% を占めたため、DHA の変動の傾向が全脂肪酸量の変動に反映されていた。LSA-1 株は 0.016%, 1.6% の海水条件で、どちらも 4 日目にかけて 100 mg/g 以上まで蓄積したが、50% の海水条件では約 50 mg/g に留まった。野生株では 2 日目以降 80 ~100 mg/g まで蓄積していた。

DHA 量は野生株と LSA-1 株の間でそれほど大きな違いはなかった。0.016%, 1.6% の海水条件では同じような傾向で、

どちらも 4 日目にかけて 50 mg/g 程度まで蓄積された。50% の海水条件では約 30 mg/g に保たれていた。野生株では 3 日目に 40 mg/g まで蓄積され一度落ち着いたが、4 日目から 5 日目にかけて 60 mg/g 近くまで増加した。

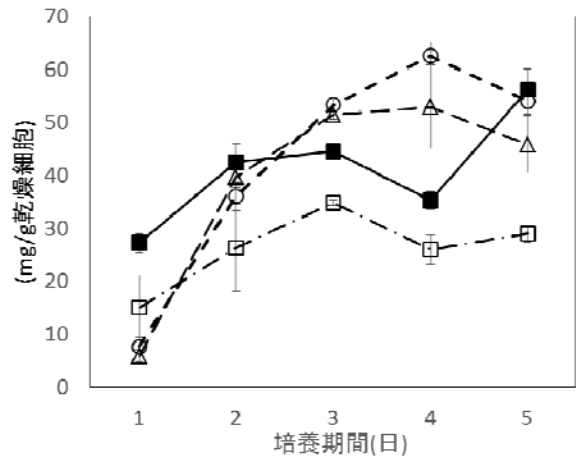


図1. DHA 量の経時変化 △:0.016%, ○:1.6%, □:50%の海水条件で培養したLSA-1 株, ■:50%海水条件で培養した野生株

野生株のスクアレン量は、2 日目にピークとなり、10 mg/ml 前後を推移した。LSA-1 株では、どの条件でも野生株より少なく、特に低塩濃度条件の 0.016% の海水条件ではほぼ蓄積されなかった。50% の海水条件で 3 日目、1.6% の海水条件で 4 日目まで蓄積量が増加し続け、以降は緩やかに減少した。

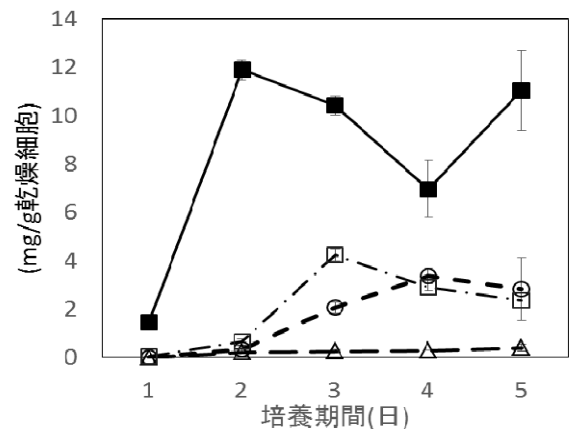


図2. スクアレン量の経時変化 △:0.016%, ○:1.6%, □:50%の海水条件で培養したLSA-1 株, ■:50%海水条件で培養した野生株

LSA-1 株で、野生株に比べてスクアレン合成量が低下し、特に低塩濃度ではそれが顕著であった。一方、全脂肪酸量は低塩濃度条件で培養した LSA-1 株で高かった。これらの結果は、培養の塩濃度条件でスクアレンと脂肪酸(トリグリセリド)の合成が切り替わっている可能性を示している。この仕組みの解明により、脂肪酸・スクアレンの合成能の向上に繋がるのが期待される。

トマト果実成熟過程における果実硬度変化に対する塩ストレスの影響

浦尾 唯 (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】

塩ストレスは浸透圧ストレス、イオン毒性を引き起こし、植物の生育や代謝に支障をきたす場合が多い。しかし、塩ストレス条件の下で栽培したトマトでは、グルコースやフルクトース等の糖類やプロリン、γアミノ酪酸等のアミノ酸の蓄積が起きることで、商品価値の高い果実が生産できることが知られている。その一方で、塩ストレス条件下での栽培は、果実サイズの減少と果実数の減少、そして果実硬度が上昇するデメリットも生じている。この果実硬度の変化には、細胞壁の構造が大きく関わっている。

現在までに本研究室では、トマト果実の成熟・軟化過程において、組織ごとに異なる細胞壁の分解と合成が起こり、それぞれ異なった性質の細胞壁を再構成していることを報告してきた (Takizawa A et al. 2014)。しかしながら、トマト果実の成熟・軟化に対する塩ストレスの影響については、多くの研究が果実全体での反応を対象としており、組織ごとの詳細な研究はされていない。果実に硬度を寄与する細胞壁が、果実軟化において組織ごとに異なる性質の細胞壁を再構成している以上、塩ストレスの影響が組織ごとに異なる可能性は非常に高いと考えられる。

そこで本研究では、塩ストレス条件下におけるトマト果実において、実際に果実硬度が上昇しているのかどうか、そしてその硬度変化を起こしている原因はなにであるのかを、組織ごとに調査することで明らかにすることを目的としている。そのことを通して、塩ストレスによってトマト果実の食感に変化が起こる仕組みの一端が明らかにできることを期待している。

【材料および方法】

1. トマトの水耕栽培および塩ストレス処理

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 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。塩ストレス処理は花が咲き始めた時点で行い、NaCl 濃度の調節は電気伝導率測定器を用いて徐々に濃度を上昇させ最終的に 150 mM で栽培を行った。

2. サンプルング

1 によって育てたトマト果実を成熟段階で 6 ステージ (Immature green, Mature green, Breaker, Turning, Red ripe, Over ripe)、果実の組織を 5 つの組織 (外果皮、中内果皮、隔壁、ローキュラー、種子) に分けて実験を行った。

3. 細胞壁調製

2 によってサンプルングしたトマト果実から、Hyodo H et al. 2013 の方法を用いて細胞壁を調製し、重量を測定した。

4. クチクラ層の観察

各栽培条件で育てた Red ripe のトマトのパラフィン切片を作成し、クチクラ染色用の染色液であるスダン 4 で染色を行った。その後、クチクラ層の形態および厚さを観察した。

5. トマトの力学的性質の測定

各栽培条件で育てた Red ripe のトマト果実について、天秤型食感測定装置を用いて、力学的性質を振動と摩擦係数によって評価した。

【結果および考察】

●細胞壁調製

細胞壁調製にあたり、プロトコルの再検討を行った。その結果、生サンプルを液体窒素で凍結し乳ばち等で粉碎するのではなく、凍結乾燥を行ってから粉碎して調整を行うことにした。

生重量あたりの細胞壁量は、中内果皮では塩ストレス条件で細胞壁量が増加し、その他の組織では栽培条件による細胞壁量に大きな変化はなかった。

●トマトの力学的性質

トマトの硬さを示す食感係数は、コントロール条件に比べて、塩ストレス条件下の果実の方が高く、組織別で見ると果皮組織で非常に顕著な差となった。また、硬さの性質を示す摩擦係数は、コントロール条件に比べて塩ストレス条件下のトマト果実では、約 50% 上昇していた。そのため、塩ストレス条件下のトマト果実は、コントロール条件と比較して、果実内部は軟らかな肉質をしているが果皮組織では硬度が顕著に上昇しており、結果的に果実全体の果実硬度が上昇していることが明らかになった。

●クチクラ層の観察

塩ストレス条件下のトマト果実では、コントロール条件に比べて、外果皮のクチクラ層が厚くなっていた。そのため、塩ストレス条件下のトマト果実で硬度が上昇した原因のひとつが、クチクラ層の厚さの増加であることが示唆された。

本研究室では現在までに、塩ストレス条件下のトマト果実において、細胞壁構成糖の 1 つであるペクチンを脱メチル化する酵素と低分子化する酵素の 2 つの活性が上昇し、ペクチンが分解方向に進んでいることを明らかにしてきた。また、本研究では、塩ストレス条件下のトマト果実は、果皮の硬度が上昇するが、それは皮部分の強度に依存していたこと、生重量あたりの細胞壁量は変化がなかったこと、皮のクチクラ層が厚くなっていたことについて明らかにした。

これらの結果を考察すると、塩ストレス条件下のトマト果実では、外果皮より内側の組織の細胞壁は分解方向に進み、軟化が進む。一方で、クチクラ層は厚くなることで硬度が上昇し、これがフレームとなって果実の形を保持しているといった変化が起きていると考えられる。

以上より、塩ストレス条件下のトマト果実は硬度が上昇と言われているが、実際には組織ごとに軟化の程度は異なり、外部である皮の硬度が上昇するが、内部では逆に軟化は促進されていることが明らかになった。

ペクチン分解酵素過剰発現イネを用いた環境ストレス応答におけるペクチンの機能解析

竹内 春樹 (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】

細胞壁は細胞の最外層に存在し様々な環境ストレスを最初に受ける為、細胞の形の決定や植物体の支持だけでなく、ストレス応答にも関わると考えられているが、どのような機能を有しているのかについての知見は乏しい。細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチンが主成分となっているが、ペクチン含量は双子葉植物が約 40%と豊富であるのに対し、単子葉植物では約 5%しか含んでいない。このため栄養成長段階および環境ストレス応答において単子葉植物ではペクチンは生理的に重要ではないと考えられてきた。しかしながら単子葉植物であるイネにおいても生殖組織や機動細胞にペクチンが局在していることからイネにおいてもペクチンが生理的に重要な機能を持っていることが示唆されている。

これまでの研究においてイネ由来のペクチン分解酵素であるポリガラクトツロナーゼ (*OsPG*) をユビキチンプロモーターにより恒常的に全身で高発現させたイネ (*OsPG-FOX*) では *OsPG* 遺伝子の高発現およびポリガラクトツロナーゼ活性の上昇が確認された。*OsPG-FOX* イネを弱光条件下 (人工気象機内) で生育させると葉身に細胞間隙が観察され、物理的強度も低下していた。ガスクロマトグラフィーの結果から *OsPG-FOX* イネでは葉身においてペクチンの主成分であるガラクトツロン酸量が減少していたが、その他の細胞壁構成糖には有意差が見られなかった。またこの *OsPG-FOX* イネにイネいもち病菌を感染させると軽度の病斑が多数観察される一方で重症化しにくいという傾向が確認された。このことはペクチンがいもち病菌に対する病害抵抗性に関与していることを示唆している。

そこで本研究では *OsPG-FOX* イネを通常の光強度条件 (特定網室内) で生育させ表現型解析を行い、弱光条件での結果と比較することでペクチンの新たな機能について明らかにすることを目的に実験を行った。

【材料】

イネ (*Oryza sativa* 品種: Nipponbare) を用いた。*OsPG1-FOX*、*OsPG1-WT*、*OsPG2-FOX*、*OsPG2-WT* 特定網室 (通常光条件) で生育させ必要に応じてサンプリングを行った。

いもち病菌の噴霧試験にはイネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) を用いた。いもち病菌の胞子を約 1.0×10^5 個/ml の濃度に調製し、これを胞子懸濁液とした。

【方法】

1. 生育の様子を観察および物理的強度の比較
それぞれの光条件でのイネの生育の様子を観察し、葉を折り曲げ物理的強度を WT と比較した。
2. トルイジンブルー染色による葉身の形態観察
成熟葉のテクノビット切片を作製し、トルイジンブルーを用いて染色し生物顕微鏡で形態を観察を行った。
3. 糖定量およびガスクロマトグラフィーによる細胞壁分析

イネの第 4 葉から細胞壁を抽出し、TFA 処理によって TFA 可溶画分と TFA 不溶画分に分離した。各画分で糖定量およびガスクロマトグラフィーによる構成糖分析を行った。

4. いもち病菌に対する病害抵抗性反応の解析
イネをそれぞれの光条件で第 5 葉期まで生育させ、第 4 葉または第 5 葉にいもち病菌の胞子懸濁液をエアスプレーで噴霧し、24 時間暗所で保温後、人工気象機で生育させ 3~5 日後に病斑の観察を行った。また病害抵抗性遺伝子の解析を RT-PCR により行った。

【結果】

1. 生育の様子を観察および物理的強度の比較
どちらの光強度条件でも生育速度などに変化は見られなかった。通常光条件で生育させると、弱光条件で観察された葉身の折れやすい形質は観察されなかった。
2. トルイジンブルー染色による葉身の形態観察
OsPG-FOX イネの葉身の切片のトルイジンブルー染色による形態観察の結果、弱光条件で観察された葉身での細胞間隙は通常光条件では観察されなかった。
3. 糖定量およびガスクロマトグラフィーによる細胞壁分析
通常光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネの細胞壁分析は現在進行中である。
4. いもち病菌に対する病害抵抗性反応の解析
弱光条件で生育させた *OsPG-FOX* では、感染前から病害抵抗性遺伝子が強く発現していることがわかった。また、通常光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネのいもち病菌接種試験を行ったところ、WT と差はなかった。

【考察と今後の展望】

弱光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネでは、*OsPG* の高発現による高いポリガラクトツロナーゼ活性に伴って葉でのペクチン量の減少が観察されたが他の細胞壁多糖に変化は見られなかった。このことから葉身におけるペクチン量の減少が、細胞間隙の増加を引き起こしていると考えられ、さらに細胞間隙の増加が葉の物理的強度の低下を引き起こしていると考えられる。いもち病菌に対する抵抗性については軽度の病斑が増加する一方で重症化しにくいという傾向から、ペクチンが減少することでいもち病菌に侵入されやすくなる一方で、ペクチンが分解されて生じたオリゴサッカライドがエリシター活性を持ち、病害応答関連遺伝子の発現量が恒常的に高かったため、病斑の進行が速やかに阻害された可能性が考えられる。

通常光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネでは細胞間隙は観察されず、葉の物理的強度の低下も観察されなかったことから、光条件で異なる細胞壁構成および病害抵抗性を示すことが予想される。今後は通常光条件での葉の細胞壁解析およびいもち病菌噴霧試験を進め、弱光条件での結果と比較することでイネにおけるペクチンの新たな機能を明らかにしていきたいと考えている。

環境ストレス条件下のトマト果実成熟過程におけるアスコルビン酸細胞壁可溶化機構に関する研究

柳 芙弓 (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】

果実の多くは成熟に伴い栄養分の蓄積と果実が軟らかくなる軟化が同時に起こる。果実軟化には細胞壁の分解が関与している。現在までに果実の成熟・軟化について、果実のモデル植物であるトマトを用いて、特に可食部である果皮の細胞壁分解酵素による多糖の低分子化に着目して研究が行われてきた。しかし、酵素による分解以外にも、細胞壁中のアスコルビン酸 (AsA) が、銅イオンと協調することで発生する活性酸素種による細胞壁分解系が、トマトのゼリー状組織であるローキュラー組織の液化に寄与することが本研究室の和田らによって示されている。AsA は細胞内ではペルオキシダーゼ (APX) による活性酸素除去が主な役割として一般的に知られているが、果実細胞壁中では APX を持たないために、細胞壁の AsA は活性酸素除去を行わない。また、AsA による細胞壁の可溶化は果実成熟過程において、AsA と銅の量により制御され機能していた。一般に、植物の AsA 含量は、様々な環境条件の影響を受けることが知られている。例えば、オオムギ葉の AsA 含量は光強度の増加に伴い上昇することが報告されている (Smirnoff, 2000)。トマト果実においては、塩ストレス条件下で栽培した場合、細胞内の抗酸化酵素 (SOD、APX、MDHAR、DHAR) の活性上昇が起きることが知られている。しかし塩ストレス下で栽培したトマトの AsA 含量の変化は一致した結果が得られていない。例えば、塩ストレス下で栽培したトマトの AsA 含量が上昇する (Petersen et al., 1998)、あるいは変化しない (Krauss et al., 2006; Sgherri et al., 2007; Zushi and Matsuzoe, 2007) ことが報告されている。また、塩ストレス下で栽培したトマトの AsA 含量が、どのようなメカニズムで変化するかは明らかでない。特にトマト果実のモデル品種の 1 つである MicroTom の塩ストレス下における AsA 含量については報告がない。栽培現場においては、塩トマトのローキュラー組織は液化レベルが高いといわれている。また、トマト果実の成熟/軟化過程において、組織ごとに異なる細胞壁の分解と再構成が生じ、また特に外果皮組織におけるペクチン-Ca 架橋の蓄積が特徴的であることが明らかとなっている。Ca 欠乏条件の果実では、果皮において側鎖をもつペクチンの量の減少と果実硬度の上昇が見られたことから、ローキュラー組織における液化にもカルシウムが影響している可能性がある。そこで本研究では、トマト果実成熟過程について、カルシウム欠乏、塩ストレス条件下において AsA 含量が果実の組織ごとにどのように変化するか、また、細胞壁可溶化レベルがどのように変化するかについて調査することで、AsA による細胞壁分解機構のローキュラー液化における役割について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カルシウム欠乏、塩ストレス処理
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。カルシウム欠乏処理は花が咲きそろうた後、塩ストレス処理は花が咲き始めた時点でを行った。
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、中内果皮、ローキュラー組織) に分けて実験を行った。
3. AsA 量の測定
2 によって得られた各サンプルについて RQ フレックスを用いてそれぞれの AsA 含量を測定した。

【結果および考察】

ローキュラー組織の AsA の量について比較を行ったところ、コントロール条件と Ca 欠乏条件の果実の AsA 量に大きな差はなかった。しかし、塩ストレス条件の果実では、Breaker 以降のステージにおいて AsA 量が増加した。特に Red Ripe のゼリー状組織では、コントロールの同ステージと比較して約 2 倍に増加した。AsA による細胞壁の可溶化は、果皮等の組織の軟化には寄与しないが、ゼリー状組織の液化の加速化に貢献していることが示唆された。また、Ca 欠乏条件の果実のローキュラーの液化は、コントロールのものとは変わった様子はなかったが、塩ストレス条件の果実のローキュラーは液化が進行している様子が観察された。そこで、現在、ローキュラー組織の液化の程度を数値化するために、スピノカラムを用いた方法の確立と測定を行っている。

キシロシダーゼ過剰発現イネを用いた重力屈性の偏差成長における細胞壁機能に関する研究

納谷 典明 (筑波大学 生物学類)

指導教員：佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

4億年前の地球において、水中から陸へと植物が進出したとき、浮力のない空気中で、いかに1gの重力に対抗して体を支えるかは、非常に大きな問題であったと考えられる。植物は強固な細胞壁を発達させることによって、この難問を解決してきた。陸上での固着生活を選んだ植物は、効率的に葉に光を受け、根で水を吸収するためには、自分の姿勢を正しく保つための情報源として、重力を利用してきた。その反応システムは、重力に対抗して体を支える「抗重力反応」と、重力を利用して自らの形を整える「重力屈性反応」の2つである。現在までに過重力実験および宇宙での微小重量化で行われた実験により、重力応答には、単子葉イネ科植物では、 β -1,3-1,4-グルカン(MLG)およびキシラン間架橋が重要であることが報告されている。イネの細胞壁のヘミセルロースは、キシログルカンや1,3-1,4- β -D グルカン、キシランにより構成される。特にキシランがセルロース微繊維を架橋し細胞壁の強度に関係していると考えられる。現在までに、本研究においてキシラン分解酵素の過剰発現によって細胞壁改変されたイネ(xylosidase-full length cDNA Overexpressor: xylosidase-FOX)において、葉と茎での細胞壁構成が変化すると同時に、物理的強度や病害応答性が負の方向に変化することが分かっている。特に茎においては、キシランが減るのに対してセルロースが増加していた。そして、重力屈性がコントロールに比べ大きく向上していることが確認されている。MLGは成長に関連した多糖類として多数の報告があるが、キシランに関しては成長が停止した細胞の細胞壁において多くみられる、いわゆる二次細胞壁を代表する多糖類である。それにもかかわらず xylosidase-FOX イネでは重力屈性が向上していたことは興味深い。キシランが、重力屈性における偏差成長において、どのような機能を有しているかを明らかにすることは、成長発達過程における細胞壁機能について、新たな知見を与えるものとなると考えられる。そこで、本研究では、重力屈性能力の向上が見られた xylosidase-FOX イネおよびコントロールの屈曲部位における、キシランをはじめとした種々の細胞壁分布を、免疫組織化学染色によって明らかにすることが本研究の目的である。本研究の作業仮説として、重力屈性による偏差成長の際に、屈曲部の上下で細胞壁の分布や変化が生じていることを期待している。分布や成分の変化があった場合、偏差成長への影響が生じるパターンとして、以下の2点が考えられる。

- ① 下部の細胞壁が特に柔らかくなったことで、下部でより伸長が起こりやすくなった。
- ② 上部の細胞壁が特に固くなったことで、上部で伸長が起こりにくくなり、下部が引っ張られるようにして偏差成長が起こった。

材料と方法

・材料
イネ(*Oryza sativa* 品種:日本晴)を用いた。WT および xylosidase-FOX の第5葉期をインキュベーター内に置き、横たえて偏差成長させたサンプルの屈曲部位を用いた。

・方法

- ① テクノビット切片作成
インキュベーター内において横たえて偏差成長させた、第5葉期のイネの屈曲部位をサンプリングし、テクノビットに包埋し切片を作成した。イネにはケイ素が多く含まれ非常に硬い組織を有するため、ガラスナイフでの切片作成が困難であった。そのため、タングステンナイフを用いて8~10 μ mの厚さで切片を作成した。
- ② 組織染色
作成した切片を、トルイジンブルーを用いて染色を行った。

結果と考察

xylosidase-FOX および WT イネの屈曲部位の組織切片の作成、観察を行った。イネの屈曲部位は、テクノビット試料としては比較的大きなものであるため、固定条件の検討を行った。そして、屈曲部位は、茎に葉鞘が巻きついている状態であるため、適切な角度の屈曲部位を観察するための条件検討を行った。

検討した固定、脱水、包埋条件の方法で、健全な組織像を得ることができた。また、屈曲部位を観察するために、葉鞘を固定時に取り除くことも行ったが、屈曲部位の細胞を傷つけてしまう可能性があったため、包埋時に角度を調整し、周辺の葉鞘は、切片作成時に切片一枚ごとにピンセットで除去する方法により、健全な切片を得ることができた。

今後の展望

屈曲部位における屈曲面が観察可能な切片が得られたため、順次切片作成を行うとともに、組織染色および免疫組織化学染色を現在進めている。染色については、以下の5項目について行い、種々の細胞壁分布を調査する。

- ・LM10(抗 xylan 抗体)
- ・LM11(抗 arabinoxylan 抗体)
- ・MLG(抗 MLG 抗体)
- ・Ruthenium Red(ペクチン染色)
- ・Calcofluor White(セルロース染色)

また今後、ガスクロマトグラフィーによる細胞壁量および細胞壁構成糖分析も行う予定である。

シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合に関する細胞壁酵素に関する研究

服部 優理那 (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】

植物では、接ぎ木や傷害によって茎組織が破壊されると、それを修復するように新たな組織が形成される。シロイヌナズナの花茎では傷害を受けてすぐに髄細胞が分裂し始め、通常 7 日程度で組織の癒合が完了する。

matrix metalloproteinase (MMP) は脊椎動物において細胞外マトリクスの分解、再編に関わっている。また、シロイヌナズナにおいては5つの *MMP* が発見されている。その中でも、*At2-MMP*が組織癒合の後期において、高い発現レベルが見られたため、組織癒合に関与しているのではないかと考えられた。

また、*At2-MMP*の傷害上部・下部での発現レベルの違いに差はなく、ともに増加していた。表現型の解析を行ったところ、*At2-MMP*欠損 mutant では正常な組織癒合が行われず、傷害部で異常な細胞分裂が促進された。

一方、*At2-MMP* の基質となるタンパク質が何であるか調べるため、浸漬培養した植物から分泌されるタンパク質を、プロテオミクス解析を行い、野生型、欠損変異体、過剰発現体を比較したところ、receptor-like protein kinase (*FERONIA*)が過剰発現体でのみ検出された。これらの結果から、傷害から1-3日後に *FERONIA* が細胞分裂を促進し、3-5日後になると、*At2-MMP* が *FERONIA* を分解することで細胞分裂が停止するという作用機構が考えられた。しかし、*FERONIA* 欠損変異体では、傷害を受けた花茎の細胞分裂に変化は見られず、正常に癒合が完了した。そこで、新たに、プロテオミクス解析を行い、野生型、欠損変異体、過剰発現体を比較したところ、5つの receptor like protein kinase 等の制御系遺伝子が検出された。

また、*At2-MMP* には亜鉛結合ドメインがあり、酵素活性には亜鉛を必要とする。以前の研究で亜鉛存在条件、欠乏条件での組織癒合の確認をしたところ亜鉛欠乏条件で異常な組織癒合が確認されたが、追試がなされていなかった。

本研究では、*At2-MMP* の基質となっているタンパク質を同定し、その機能を明らかにすることで、*At2-MMP* による組織癒合の制御機構を解明する。

【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(*Colombia*)の *At2-MMP::GUS*形質転換体、及び欠損 mutant、wild type を用いた。個体は MS 寒天培地に播種し、その後、人口土に植え替えた。

① *FERONIA* 欠損 mutant のフェノタイプの観察

mutant が抽だいして約2週間後に花茎の第1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。

② プロテオミクス解析の結果により同定された5つの遺伝子の発現解析

ABRC で購入した T-DNA 挿入変異体の種子を蒔き、genotyping を行い、個体のホモ選抜を行った。

③ *At2-MMP::GUS* の形質転換、染色

形質転換体が抽だいして約2週間後に花茎の第1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、それぞれの切断部における GUS 染色性の違いを観察した。

④ 亜鉛欠乏条件で育てた個体と *At2-MMP* mutant の比較観察

亜鉛欠乏と存在の両方の条件の MS 培地で wild type を2週間培養した後、同条件の水耕栽培に移行し、抽だいして約2週間後に花茎の第1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。

【結果・考察】

① *FERONIA* 欠損 mutant のフェノタイプの観察

先行研究の結果と同様に、1、2、3、5、7日後どの花茎でも細胞分裂に変化が見られず、正常に癒合が完了した。この結果から、*FERONIA* は組織癒合に関わっていないと考えられた。

② プロテオミクス解析の結果により同定された5つの遺伝子の発現解析

現在、genotyping を進めている。

③ *At2-MMP::GUS* の形質転換、染色

形質転換体が5ライン得られ、傷を付けて5日目に GUS 染色を行ったところ、傷の上下で発現が見られた。

④ 亜鉛欠乏条件で育てた個体と *At2-MMP* 欠損 mutant の比較観察

現在、切片を作製して癒合過程を解析している。

アイスプラント由来 *RBP* 遺伝子の機能解析と耐塩性付与を目的としたジャガイモへの導入

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

【背景・目的】

近年、不適切な灌漑農業により、耕作地として利用できない塩害地が拡大しており、今や世界の灌漑地の 5 分の 1 は塩害地となっている。一方で、世界の人口は増加し続けており、今後さらなる食糧需要が予想される。そのため本研究では、世界四大作物の一つであり、食糧、また工業原料としても需要があり、さらにジーンサイレンシングの影響をあまり受けないとされるジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) にアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) の *RNA-Binding Protein (RBP)* 遺伝子を導入することで、耐塩性を強化し、塩害地でも栽培可能なジャガイモを作出するとともに、*RBP* 遺伝子の機能解析として、*RBP* タンパク質の細胞内局在を特定する。

【材料】

1. 植物材料

ジャガイモは、ヨーロッパで古くから研究材料として用いられ、他品種と比べ比較的高い耐塩性を持つ品種 *Desiree* を使用した。植物材料は、Murashige and Skoog 固形培地上で 25°C、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。

2. 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アイスプラント由来 *RBP* 遺伝子を用いた。*RBP* 遺伝子は、アイスプラントの培養細胞から得られた cDNA を大腸菌に導入し、塩条件下で生存していた菌体から単離された。遺伝子の 1 次配列から葉緑体型 RNA シャペロンとして機能し、耐塩性を付与していると推定される。

3. アグロバクテリウムと誘導フェノール化合物

植物の遺伝子導入において、本研究ではアグロバクテリウムの LBA4404 株を用いた。

アグロバクテリウムの T-DNA 領域が切り出される過程において、フェノール化合物が重要な役割を果たしており、アセトシリンゴンが広く用いられている。しかし本研究では化合物ライブラリーより新規に発見されたクロロキシニルを用いることで、遺伝子組換え効率の向上を図った。

【実験方法】

1. 形質転換体の作出

遺伝子導入は、*RBP* 遺伝子を含むコンストラクトを保有するアグロバクテリウムを葉に感染させることで行なった。感染後は、暗条件下でカルス誘導及びアグロバクテリウムを除菌する培地に静置し、その後、明条件下で再分化体を誘導する培地に移植した。この際、培地に除草剤 *Basta* を加えることで、選抜された再分化体を得た。

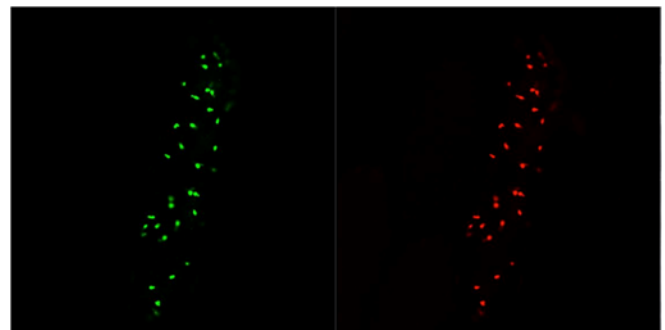
得られた再分化個体から DNA を抽出し、ゲノミック PCR を行うことで遺伝子が導入されていることを確認した。その後、遺伝子の導入が確認された再分化個体についてアグロバクテリウム残存性試験を行なった。アグロバクテリウムが残存していた際は、除菌処理を行ない、アグロバクテリウム除去を再度確認し、確認出来た個体についてはゲノミック PCR を実施した。

2. 耐性評価と発現解析

得られた遺伝子組換え系統について、塩含有培地での培養により、30 日間での腋芽の伸長を非組換え体と比較することで耐塩性を評価する。塩条件については、NT において 0、50、60、70、80、90、100、150 mM の条件で検討し、生育が顕著に減少する 80 mM で実施した。また、サザンブロット解析及び qRT-PCR を行うことで、耐塩性レベル、遺伝子導入数、発現量の間での関連性の検証を行っている。

3. *RBP* 遺伝子の機能解析

RBP 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成し、パーティクルガン法によってタマネギ表皮細胞に遺伝子導入を行うことで、*RBP* タンパク質の細胞内局在解析を行なった。



RBP-GFP タンパク質蛍光 ミトコンドリア染色
図. タマネギ表皮細胞における *RBP*-GFP のタンパク質蛍光

【結果・考察】

現在までに遺伝子組換え体、3 系統を得た。これらの系統では、*RBP* 遺伝子の発現により、非組換え体に比べ耐塩性が強化されていることが期待される (評価中)。また、パーティクルガン法により *RBP*-GFP タンパク質の蛍光図 (上図左) とミトコンドリア染色図 (上図右) が一致したことから、*RBP* タンパク質はミトコンドリアに局在することが明らかとなった。しかし 1 次配列情報では葉緑体型であるため、緑色組織での検証を実施している。現状のデータでは、*RBP* 遺伝子はミトコンドリアで RNA シャペロンの機能を果たし、耐塩性に寄与していると考えられるが緑色組織では葉緑体で機能する可能性も残る。今度は、緑色組織での細胞内局在性を明らかにすると共に、アイスプラント由来 *RBP* の RNA 結合能等を検証することで、生体内での機能を明らかにしていく必要があると考える。

ラン藻由来 $\Delta 9$ desaturase 遺伝子導入ユーカリの隔離ほ場試験による耐冷性評価

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

●背景・目的

ユーカリ属 (*Eucalyptus*) 植物は成長が早く、効率のよいバイオマス生産・CO₂固定が可能な樹木の一つである。こうした特性に加え、萌芽更新ができ植栽のコストを抑えられることや使用用途が幅広いことなどから、現在では世界各地で植林樹として利用されている。しかし、ユーカリは平均生育最適温度が25℃と、栽培可能な地域が低中緯度帯に限られている。

ユーカリ属植物の中でも *E. globulus* は製紙用パルプとしての利用に非常に高い適性をもつ。*E. globulus* の耐冷性を向上させることができれば、より気温の低い地域への植林が可能になり、環境面・産業面ともに大きなメリットが期待される。

膜脂質の不飽和度を上げることは耐冷性付与の主要なアプローチのひとつである。トマトやタバコでは脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入により、膜脂質の不飽和度の上昇、耐冷性の向上が引き起こされたとの報告がある。そこで、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入したユーカリは耐冷性を獲得すると仮説を立て、研究を行った。

当研究室ではラン藻 *Anacystis nidulans* から単離された $\Delta 9$ desaturase (*des9*) 遺伝子を導入した *E. globulus* を2011年より隔離ほ場にて野外栽培試験を行い、冬季の低温障害の観測を実施している。先行研究で *E. globulus* は過去3年間毎年冬季に障害を受けているが、組換え体でその障害が軽減される傾向が見出されている。本研究では、主に2014年度及び2015年度の観測データに基づき、*des9* 遺伝子導入 *E. globulus* 系統、非組換え系統間の耐冷性の比較や樹齢や年間差が耐冷性に与える影響の評価を目的に観測・解析を実施した。

●植物材料

2013年11月に隔離ほ場に植栽された *des9* 導入2系統 (204-10:6個体 及び 144-13:5個体)、非組換え3系統 (No.1:10個

体、Au1:4個体、及び L047:3個体) を主な実験材料とした。

●実験方法: 低温障害の観測及び解析

植栽初年の冬季は、苗帽子によって養生した。翌2014年度、及び2015年度の11月~2月におよそ7~20日毎に FluorPen-FP100 (Photon System Instruments 社製) により葉のクロロフィル量子収量 (QY) を測定し、葉の光合成活性の指標として低温障害の観測に用いた。統計解析には R (ver.3.2.1) を用いた。

●結果・考察

○2014年度 (植栽2年目) の耐冷性評価

茎頂付近の葉4枚のQYを測定した (図1)。12月下旬からQYの急激な低下がみられ、低温による障害を受けていることがわかった。

1月上旬の各系統のQYを比較すると TukeyHSD 検定により組換え系統144-13、204-10、及び非組換え系統No.1と非組換え系統Au1、L047の間に有意に差が認められた ($\alpha < 0.05$) (図3)。組換え系統144-13は2013年度の予備試験でも非組換え系統L047との間で冬季のQYの低下が有意に小さく抑えられており、本結果は *des9* 遺伝子の導入により *E. globulus* に耐冷性が付与されたことを示唆している。

○2015年度 (植栽3年目) の耐冷性評価

樹冠部分 (樹頂から1m程度) の任意の枝を選び、8枚の葉のQYを測定した (図2)。今年度は前年度と比べ冬季の気温が高く、組換え系統、非組換え系統ともに1月上旬時点ではQYの低下、及び耐冷性遺伝子導入による低温障害の差は確認できていない (図2及び4)。また昨年度と植物体の生育ステージが異なることや、測定法の違いも影響している可能性がある。

今後も測定を継続し、今期のデータが揃った段階で統計解析を行い、系統間での耐冷性の差、前述した各要因が耐冷性に与える影響を評価する。

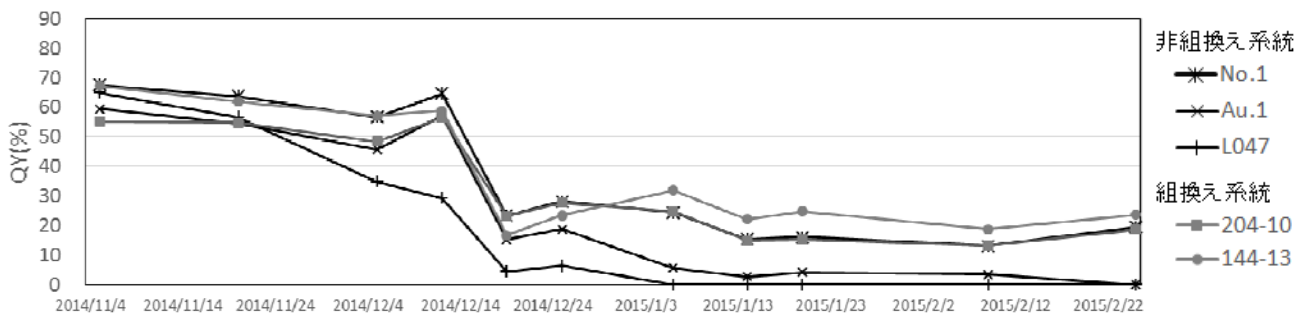


図1. 2014年度QY測定結果

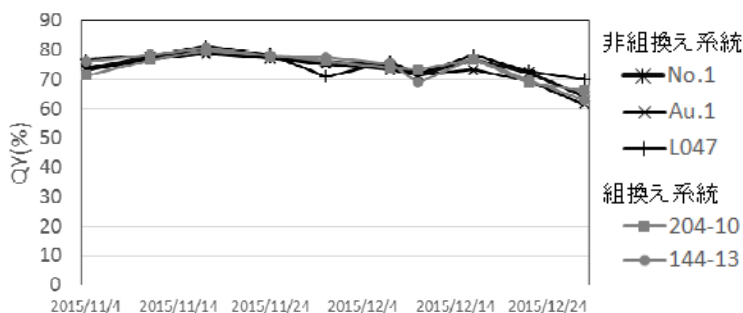


図2. 2015年度QY測定結果

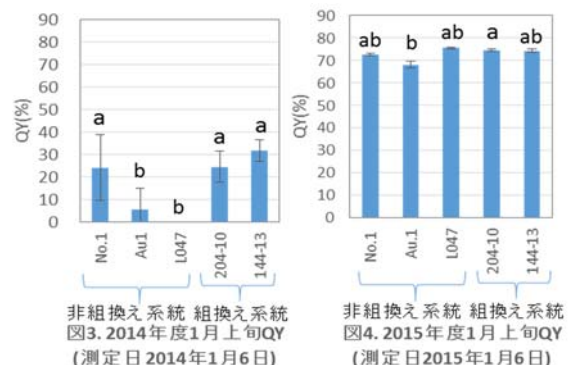


図3. 2014年度1月上旬QY (測定日2014年1月6日)

図4. 2015年度1月上旬QY (測定日2015年1月6日)

マングローブの耐塩性遺伝子を導入したジャガイモの作成と耐性評価

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

【背景・目的】

現在、世界の人口は急激に増加しており 2050 年までに 96 億人に達すると言われている。この人口をまかないうる食料を確保するためには作物の生産量を増加させる必要がある。一方で、一部の地域では気候変動や不適切な灌漑農業等により塩害が発生し利用可能な耕作地が減少している。塩害が発生した耕作地では作物の生育が妨げられる。特に地下部に生産物を作る作物はその影響を強く受けることになる。このような主要作物の例としてジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) が挙げられる。ジャガイモは小麦、米、トウモロコシに並ぶ世界四大作物であり世界で幅広く栽培されていたため、塩害の影響を受けにくい耐塩性ジャガイモを作成することは農業的に有意義である。品種特性を変えず耐塩性ジャガイモを作成する有効な方法の一つに遺伝子組換え技術の利用が挙げられる。先行研究により、耐塩性を付与する遺伝子として知られるマングリン遺伝子をジャガイモに導入し、培養レベルで耐塩性を示す 9 系統の形質転換体が作成された。本研究では、これら 9 系統から実用化に向けた優良系統の選抜を行うため、栽培室における耐塩性評価を行う。また、優良系統の数を増やすため、新たな形質転換体の作成も進めていく。

【材料・方法】

・植物材料

ジャガイモの品種は Desiree を用いた。Desiree はオランダで育成され、ヨーロッパを中心に広く栽培された品種で、古くから研究に用いられている。また比較的耐塩性が高い品種として知られている。これらの植物材料は Murashige and Skoog (MS) 固形培地に 4~8 週間の間隔で継代培養し、培養室で維持した。(25°C、16 時間明期、8 時間暗期)

・導入遺伝子

マングリン遺伝子はマングローブの一種である *Bruguiera sexangulata* の培養細胞から大腸菌に耐塩性を付与する遺伝子として単離された。マングリンは全 256 アミノ酸からタンパク質で、シロイヌナズナやトマトの allene oxide cyclase (AOC) と高い相同性を有している。しかし、マングリンはシロイヌナズナやトマトの AOC とは大きく異なり AOC をコードしておらず、N 末端側にマングリン特有のアミノ酸配列が有している。先行研究により、マングリン遺伝子は、大腸菌、酵母、タバコ、ユウカリで耐塩性を強化することが確認されており、N 末端の配列が耐塩性を付与するために必要な最少機能域である事が明らかとなっている。

【方法】

1. 形質転換体の作成

マングリン遺伝子を保有するアグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* LBA4404 株) にジャガイモの外植片を感染させた。感染後、アグロバクテリウムの遺伝子導入を促進

するための共存培地に暗条件下で 3 日間培養した。その後、除菌培地に外植片を移行させ暗条件下でアグロバクテリウムの除去とカルスの誘導を行った。以降、カルスが形成された外植片から順次、明条件下で再分化を誘導する培地に移行させ、再分化体を得た。

得られた再分化体が形質転換体であるかの確認は、アグロバクテリウムが残存していないか確認した後、再分化体にマングリン遺伝子が導入されているか確認するために DNA を抽出しゲノミック PCR を行った。

2. 耐性評価

MS 固形培地に 4~8 週間培養した植物材料を土壌に順化させ、四角錘ポットで植物体の地上部の長さが 4~6 cm まで成長してから試験を行った。試験は 2 日 1 回塩処理を行い、10 日間の地上部の成長比で評価した。

マングリン形質転換体の耐塩性の評価をするためには試験に使用する塩濃度を決定する必要がある。そこでまずは Non transformant (NT) を用いて塩濃度の条件検討を行った。条件検討では 0 mM、200 mM、300 mM、400 mM、500 mM の塩濃度で処理を行った。塩濃度決定後、マングリン形質転換体の耐塩性を評価した。

【結果・考察】

1. 形質転換体の作成

これまでに約 80 個体の再分化体が得られており、マングリン遺伝子の導入確認を実施している。

2. 耐性評価

NT を用いた塩濃度の条件検討の結果を図に示す。コントロールである NaCl を添加しない場合、植物体は 10 日間で約 1.8 倍の成長がみられた。NaCl 濃度 200 mM でも約 1.3 倍の成長がみられたが 300 mM になるとほぼ成長が停止した。400 mM 以上になると萎れる植物体が認められることから、耐塩性評価に用いる塩濃度を 300 mM とした。現在、先行して作成された 9 系統の形質転換体について、栽培室での耐塩性試験を実施している。

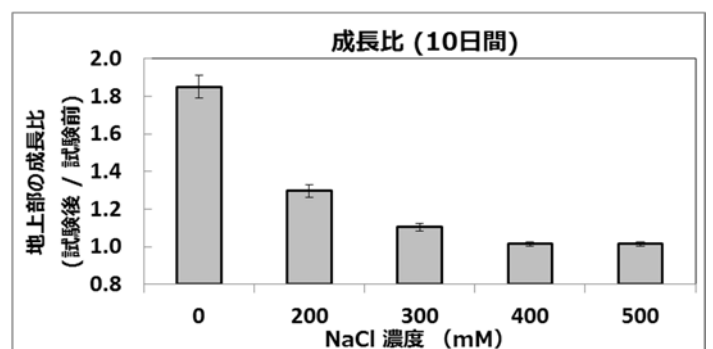


図 各塩濃度に対する NT 地上部の成長比

CRISPR/Cas9 によるアサガオのゲノム編集

小林 安那 (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

ゲノム編集とは、ゲノム中の特定の遺伝子を切断し、任意の配列を置換、挿入、削除する技術である。この技術は、多様な種のゲノムを編集できるため、食品や医療への応用が期待されている。Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated endonuclease 9 (CRISPR/Cas9)は部位特異的ヌクレアーゼであり、ゲノム編集技術に応用されている。CRISPR/Cas9 システムでは、標的遺伝子と相補的な20塩基分の配列を含む single-guide RNA (sgRNA)が標的DNA配列を認識し、バクテリア由来のDNA二本鎖切断酵素のCas9タンパク質がDNAを切断する。切断された二本鎖DNAが修復する際に、塩基の挿入や欠失が起こり、標的遺伝子が破壊される。特異的なsgRNAの設計だけで標的遺伝子を選べるため、従来の技術よりも容易である。そのため、ゲノム編集技術として2013年に報告されて以来、注目を集めている。

アサガオ *Ipomoea nil* はナショナルバイオリソースプロジェクトで整備がすすむ実験植物9種の1つに選定されている。形態形成・花の彩色とパターン・トランスポゾン・光周性花成・重力屈性などの遺伝学・生理学のモデル植物である。既存の形質転換系、EST、BAC と合わせ、今後のゲノム編集技術の確立によりさらなる展開が期待されている。

本研究ではアサガオのゲノム編集にCRISPR/Cas9を用いることができるのかを検証した。標的遺伝子として、その機能や欠失による効果が明らかであるアントシアニン合成酵素遺伝子 *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* と、アサガオにおける機能が未知であるカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子 *carotenoid cleavage dioxygenase (CCD)* を選んだ。

アサガオの花弁や茎の着色はアントシアニンによるものであり、赤や青、紫を示す。アントシアニンの合成経路にDFRが存在し、この変異体 (*I. nil* cv. AK77) は白花、青茎になることが知られている。DFRをゲノム編集で破壊して白色の花弁のアサガオを作出することで、アサガオにおけるゲノム編集の可否を遺伝子型だけでなく表現型としても検証した。

CCDは黄色や橙を示す色素であるカロテノイドの酸化開裂酵素である。先行研究により、アサガオではカロテノイド合成酵素遺伝子の発現量を増加させても花弁に黄色の呈色がないことが報告されており、その原因はカロテノイドの分解や蓄積に問題があるためだと考察されている。本研究ではCRISPR/Cas9によるゲノム編集の応用として、花弁におけるカロテノイド分解を抑制するためにCCDをゲノム編集で破壊する。これにより、アサガオにおけるCCD相同遺伝子の機能を調べるとともに、黄色い花弁をもつアサガオの作出を試みた。

材料・方法

植物材料は *Ipomoea nil* cv. Violet (DFR標的)、*I. nil* cv. AK77 (CCD1, CCD4標的) を用いた。Cas9, sgRNA 発現コンストラクトをアグロバクテリウム法によりアサガオ不定胚へ導入した。sgRNAはDFRでは2種類、CCD1は2種類、CCD4は3種類を設計してそれぞれ導入した。

CRISPR/Cas9のゲノム編集領域に制限酵素サイトを含むように設計した。そのため、本来ならば制限酵素により切断されるゲノムがゲノム編集されていると、切断されなくなる。ゲノム編集領域を含むように設計したプライマーでPCR増幅し、制限酵素処理を行い、電気泳動で切断の有無を確認した。

制限酵素によってゲノム編集が確認されたものに関しては、ウェスタンブロットティングによるCas9タンパク質の発現量の解析と塩基配列のシーケンスを行った。

結果・考察

DFR標的は27本、CCD1標的は3本、CCD4標的は7本を再分化し、順化させた。順化させた個体のゲノムDNAをPCR増幅後、制限酵素処理し電気泳動にかけた。DFR標的において両方切断されていない個体が3系統あった。また、片方のみが制限酵素で切断されない個体が4系統あった。これらのシーケンスによってCRISPR/Cas9の標的領域におけるゲノム編集が確認された。また、ウェスタンブロットティングにおいてもCas9タンパク質の発現が見られた。これらのゲノム編集された系統は予想通り青茎になり、白花を咲かせた。

一方CCD1標的、CCD4標的では、制限酵素処理によるゲノム編集の有無を確認したが、これまでのところ編集された系統は得られていない。DFR標的では、27系統のうち、7系統でゲノム編集されていた。そのためCCD標的に関しては、さらに系統数を増やすことでゲノム編集個体が得られるものと考えている。

結論

本研究では、CRISPR/Cas9によるアサガオのゲノム編集が可能であることを明らかにした。今後、同様の方法で、まだ作出されていない黄色の花弁の個体の完成や他の標的遺伝子の編集が期待される。

謝辞

Cas9, sgRNA 発現ベクターをご提供頂いた国立研究開発法人農業生物資源研究所 土岐精一博士、遠藤真咲博士に深謝する。

GM 作物を用いた食べるワクチンの開発に関する研究

矢澤 美季 (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

ワクチンは治療の難しい感染症などの免疫をつけることができ、多くの感染症の流行を抑えてきた。現在使われている注射型ワクチンでは、注射針による痛みや使い回しによる二次感染、精製・保存・輸送のコストが高い、などの問題点がある。これらの問題はワクチンを必要とする途上国の負担となっている。そこで提案されたのが食べるワクチンである。食べるワクチンは遺伝子組換え技術を用いて作物にワクチン抗原を生産させたものであり、経口摂取することで感染症の予防ができる。また、粘膜性免疫と全身性免疫の両方を活性化させるというメリットもある。

しかし、食べるワクチンにはワクチン抗原タンパク質が消化されるという欠点がある。そこで、消化耐性を持ち、腸管粘膜に届く可能性があるウイルスのキャプシドタンパク質から成るウイルス様中空粒子 (VLP: Virus-Like Particle) をワクチン抗原のキャリアータンパク質として用いることにした。

現在のインフルエンザワクチンは Hemagglutinin (HA) と Neuraminidase (NA) の 2 種類の抗原から作られるが、変異が多いため新型インフルエンザ等には効果が無いとされる。そこで、変異が少ないインフルエンザウイルスの膜タンパク質 Membrane ion channel 2 (M2 タンパク質) を抗原とした。

本研究では、食用植物のトマトとニンジン(ニンジンの遺伝子組み換えにより、HEV (ヒト E 型肝炎ウイルス) の VLP に M2 タンパク質を結合させた融合タンパク質を発現する形質転換体の作成を目的として実験を行った。

材料

導入遺伝子として、HEV 由来の VLP に、リンカータンパク質として HSVtag を介して、インフルエンザ A 型ウイルスの M2 タンパク質の 10 アミノ酸残基を融合させたものを用いた。

マイクロトム (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) では、果実で発現する E8 プロモーターと植物体全体で過剰発現する 35S プロモーターの 2 種類のプロモーターを用いた。また、選抜マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) を用いた。

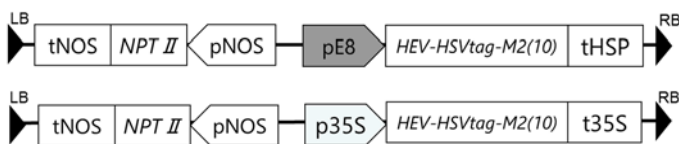


図 1. マイクロトムにおける導入遺伝子のコンストラクト

ニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) では、上記の導入遺伝子の他に、選抜マーカーとしてスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*aadA*) を導入した。*aadA* には遺伝子導入の有無を蛍光観察でも確認できるように、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP*) を融合したものを用いた。

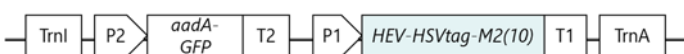


図 2. ニンジンにおける導入遺伝子のコンストラクト

方法・結果

① マイクロトム

- 核ゲノムへの遺伝子導入

遺伝子導入にはアグロバクテリウム法を用いた。無菌播種により得た子葉を切り取り、形質転換したアグロバクテリウムの希釈液に浸して感染させた。

- 形質転換体の選抜培養

感染させた葉片を抗生物質カナマイシン及び除菌剤を含む培地で培養した。カルス誘導培地、シュート誘導培地、発根培地を経て、再生したカナマイシンに耐性を示す個体を形質転換体の候補とした。得られた個体は PCR 解析により導入遺伝子の有無を確認した。

② ニンジン

- 葉緑体ゲノムへの遺伝子導入

遺伝子導入はバイオリスティック法を用いた。ニンジンの胚性カルス (embryogenic callus, EC) 細胞を培地に直径約 2 cm に広げ、プラスミド DNA を付着した金粒子をパーティクルガンにより打ち込んだ。

- 形質転換体の選抜培養

遺伝子導入後の EC 細胞は、抗生物質スペクチノマイシンに対する耐性と GFP による蛍光により選抜した。培地中のスペクチノマイシンの濃度を次第に高めることで、ホモプラズミー (形質転換色素体だけの状態) の EC 細胞が得られるように選抜した。

今後の展望

① マイクロトム

果実を用いた western blotting 等の発現解析により、M2 タンパク質の発現の確認および定量を行い、VLP の形成について確認する。また、倍数性を検定して二倍体の個体を選抜する。

② ニンジン

スペクチノマイシンを含む培地による選抜を継続し、遺伝子導入された EC 細胞を得る。また、GFP 蛍光観察による遺伝子導入の確認を行い、M2 タンパク質の発現解析などを行う。

謝辞

本研究を行うにあたり、VLP 遺伝子を提供くださった医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医学科学研究センター長 保富康宏 博士、導入遺伝子を用意くださった筑波大学 医学医療系 竹内薫 准教授、森川一也 教授、葉緑体形質転換をご指導くださった農業生物資源研究所 田部井豊博士、奥崎文子博士、形質転換ベクター pKMS24 を提供してくださった米国ラトガース大学ワクスマン研究所の Pal Maliga 博士、ニンジンの EC 細胞を提供してくださった理化学研究所 BRC 実験植物開発室室長 小林正智博士に心から感謝申し上げます。

除草剤多剤抵抗性タイヌビエにおける ACCase 阻害剤抵抗性機構の解明

上館 巧嵩 (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】

除草剤は現代農業の雑草防除において必要不可欠なツールとなっているが、同じ除草剤が繰り返し使用されることにより、除草剤に抵抗性を持つ雑草個体が出現し、作物生産上大きな問題となっている。タイヌビエ (*Echinochloa phyllopogon*) は自殖性のイネ科植物であり、水稻栽培における強害雑草である。90年代後半、米国カリフォルニアで、アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤や FOP 骨格型のアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害剤などの除草剤に抵抗性を示す多剤抵抗性型が発見された。これらの除草剤に対する抵抗性は、除草剤の急速な解毒代謝によることが明らかにされている。ALS 阻害剤抵抗性については、除草剤を解毒代謝する2つのシトクロム P450 遺伝子 (*CYP81A12* および *CYP81A21*) の高発現に由来することが明らかにされており、これらの遺伝子の高発現は単一の遺伝因子によって支配されていると推定されている。一方、ACCase 阻害剤抵抗性の分子機構については全く分かっていない。

本研究では、除草剤多剤抵抗性タイヌビエを用いて、抵抗性の獲得が明らかにされている FOP 系除草剤フェノキサプロップ・P-エチルに加え、DIM および DEN 骨格型の ACCase 阻害剤の反応を解析するとともに、これらの除草剤抵抗性の遺伝様式を推定する。また、ALS 阻害剤抵抗性に関連する2つの P450 の ACCase 阻害剤抵抗性への関与について、イネの形質転換体を用いて検証する。

【材料および方法】

タイヌビエは、カリフォルニアにて採取後、3世代自殖を繰り返した感受性 (S) 系統および抵抗性 (R) 系統、およびこれらの交雑後代 F2 集団 (S×R) を供試した。

1. タイヌビエの薬量反応試験

S 系統および R 系統を春日井氏水耕法により14日間栽培し、約2.5葉期に各除草剤6–8濃度の除草剤処理を行った。除草剤処理は、茎葉部を0.01% Tween20 を添加した除草剤溶液に30分間浸漬することで行った。除草剤処理後9日目に茎葉部新鮮重を測定した。新鮮重を対無処理区に変換後、log-logistic 式により回帰し、50%生育阻害薬量 (GR50) を推定した。除草剤には FOP 骨格型としてフェノキサプロップ・P-エチル、ジクロフオップメチル、DIM 骨格型としてトラルコキシジム、DEN 骨格型としてピノキサデンの4種類をそれぞれ実験に使用した。

2. タイヌビエ F2 集団における ACCase 阻害剤抵抗性の分離

S 系統および R 系統それぞれ16個体ならびに F2 160 個体について、除草剤感受性試験を行った。栽培方法及び除草剤処理は1と同様に行った。

3. 形質転換イネカルスの感受性試験

バイナリーベクター pCAMBIA1390 におけるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下流に *CYP81A12* および *CYP81A21*、またネガティブコントロールとして *GFP* をそれぞれ挿入し、発現ベクターを構築した。アグロバクテリウムを介して、イネ完熟種子 (品種: 日本晴) から誘導したカルスに形質転換した。選抜薬剤であるハイグロマイシンにより形質転換体カルスを選抜した後、除草剤を添加した培地に独立の形質転換カルス9個を置床した。3週間後のカルスの増殖量に基づき、除草剤感受性を評価した。

【結果・考察】

1. タイヌビエ薬量反応試験

フェノキサプロップ・P-エチル処理では、S 系統および R 系統の GR50 値の比 (R/S) は13.3 となり、先行研究とほぼ一致した。トラルコキシジム、ピノキサデン処理では、GR50 値の比 (R/S) はそれぞれ19、27 となり、ともにフェノキサプロップ・P-エチルの場合よりも高い値となった。ジクロフオップメチルでは、S 系統の GR50 は4.55 μM と推定されたが、R 系統は最大処理薬量300 μM でもほとんど生育阻害を受けず80%程度の生育量を示した。ジクロフオップメチルの GR50 値の比 (R/S) は少なくとも66倍以上となり、極めて強い抵抗性を示した。以上の結果から、R 系統は化学骨格の異なる ACC 阻害剤に幅広く抵抗性を示すことが明らかになった。

2. タイヌビエ F2 集団における ACCase 阻害剤抵抗性の分離

フェノキサプロップ・P-エチル処理に対する F2 集団の反応は、R 系統型が31個体、S 系統型+中間型が129個体となった。X² 検定の結果、1 遺伝子支配の分離比に適合した (X² 値は2.7、*P*=0.1003)。F2 集団のその他3つの除草剤反応については現在解析中である。

3. 形質転換イネカルス除草剤感受性試験

選抜薬剤ハイグロマイシンに耐性を持つカルスが選抜された。形質転換カルスの ACCase 阻害剤感受性については、現在解析中である。

【今後の展望・予定】

次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 を用いて RNA-Seq 解析を行い、抵抗性系統において高発現している遺伝子を同定するとともに、それらの ACCase 阻害剤抵抗性への関与を検証する。

トウモロコシ幼植物体での β -カリオフィレンによる

生育促進作用におけるオーキシシンとエチレンの関与

竹内 優奈 (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

研究室の先行研究において、新規の植物成長調節剤の開発への応用を目的として、ハーブ類に含まれる植物生育促進活性を持つ揮発性物質の探索が行なわれた。13種類のハーブ類を探索対象として、レタス幼植物体の成長率を調べた結果、ハナハッカとチョウジから放出される揮発性物質が、レタス根部に対して高い生育促進活性を示すことが見出された。GC-MS分析により、 γ -テルピネン、チモール、酢酸エチル、 β -カリオフィレン等の揮発性物質が同定され、この2種に共通して含まれていたのは β -カリオフィレンであった。また、 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生育促進作用を示すことが確認された。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とから、 β -カリオフィレンの生育促進作用には、植物ホルモンであるオーキシシンやエチレンが関与していると推測された。しかしながらその詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、 β -カリオフィレンの生育促進作用に、植物ホルモンであるオーキシシンやエチレンが関与している可能性について検討することを目的とした。

材料

供試植物と使用部位：

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)の根部及び茎葉部レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Legacy)の根部及び茎葉部

方法

1. 植物体への生育促進効果の検討

50 ml バイアル瓶にトウモロコシまたはレタスの発芽種子を3~5粒播種し、所定の濃度に希釈した 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、幼根長と胚軸長、幼根新鮮重、胚軸新鮮重を測定した。

2. エチレンの定量

トウモロコシまたはレタスに実験1と同様に β -カリオフィレン処理を行い、25°C暗条件下で2日間生育させた。根部と茎葉部を1cmずつ採取し10mlバイアル瓶に20本ずつ1日封入し、ガスクロマトグラフ (GC/FID) によって発生したエチレンをヘッドスペース法によって定量した。

3. インドール-3-酢酸 (IAA) の定量

25°C暗条件下で3日間生育させたトウモロコシの根部と茎葉部を分け、80%エタノール中で磨砕した後、濾過した。濾液はエバポレーターで水層まで濃縮し、酒石酸によってpH3.5に調整した。次に等量の石油エーテルで3回洗浄した後、さらに等量のジエチルエーテルで3回分配抽出した。ジエチルエーテル層は減圧濃縮し、100%メタノールにてIAAを溶解した。抽出したIAAは逆相系カラムの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により蛍光検出器を用いて定量した (励起波長：280 nm、蛍光波長：350 nm)。また、回収率は内部標準としてインドールプロピオン酸 (IPA) を用いて算出した。

結果・考察

トウモロコシでは530 $\mu\text{mol/L}$ の β -カリオフィレン処理により幼根長が約140%、幼根新鮮重が約160%に増加し、生育促進効果が見られた。レタスでは147 $\mu\text{mol/L}$ の β -カリオフィレン処理により幼根長が約120%、幼根新鮮重が110%に増加した。トウモロコシはレタスと比較して β -カリオフィレンによる根部の生育促進効果が高かった。エチレンの定量では、トウモロコシ幼植物体においては、 β -カリオフィレン処理によって、茎葉部ではコントロールの約2倍、根部では約1.5倍に増加していた。またレタスにおいては、茎葉部ではコントロールの約1.5倍、根部では約2倍に増加していた。

オーキシシン量の定量では、まずトウモロコシ茎葉部と根部内のIAAが検出可能かどうかの検討を行った。この結果、今回実施した抽出方法によって茎葉部、根部内でのIAAが定量可能であることを確認できた。現在は、 β -カリオフィレンを処理したトウモロコシにおいて、茎葉部、根部それぞれのIAA量の変動について調査中である。

本研究の結果から、 β -カリオフィレンを処理したトウモロコシにおいて、エチレン生合成が促進されることが見出されたが、 β -カリオフィレンによる生育促進作用とエチレンやオーキシシンの関わりについてはさらに調査が必要である。

今後の予定

1. 幼植物体に β -カリオフィレンを処理した後の茎葉部と根部でのIAA量の変動を調べる。
2. β -カリオフィレンによる生育促進作用におけるエチレンとオーキシシンの関与について阻害剤や変異株等を用いて検討する。

種内での遺伝的多様性と温暖化に対する安定性との関係

横田 麻梨子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：鈴木 亮 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

植物群集では、群集内の種多様性が高いほど、攪乱に対する安定性が高くなることが予測されている。これは多様性-安定性仮説と呼ばれる。先行研究では群集での実験は多く行われているが、種内の遺伝的多様性と安定性との関係は調べられていなかった。ゆえに今回、ミヤマハタザオを用いた種内の遺伝的多様性と温暖化に対する安定性との関係を調べることにした。

本研究で用いるミヤマハタザオは、セイヨウミヤマハタザオとハクサンハタザオを親種とするアブラナ科の多年草である。この種は非常に幅広い標高に生息しており、標高 30 m から 3000 m まで分布している。また標高にそって多様な形質が分化しており、例えば高標高では葉に毛が生えることが知られている。このことから、由来する標高によって温暖化に対する応答が異なると考え、本種を用いた温暖化実験を行った。具体的には次の 2 つの予測を検証した：1、遺伝的多様性が高い方が安定性が高い(温暖化と対照でバイオマスの差が小さい)、2、高標高の集団ほど温暖化に弱い。

方法

30 m から 2902 m までの標高に生息する計 27 集団から採取された種子を栽培室で継代栽培したものを使用した。

温暖化区は、園芸用ビニールハウスの側面のみビニールを張った天上開放型温室を設置した。

本研究は多様性実験と基礎生理実験とに分けて行った。

多様性実験には高標高集団(1528 m 以上)8 集団、低標高集団 8 集団の計 16 集団を使用し、それぞれについて温暖化区と対照区を設けた。各処理区内に、1 集団から 8 個体移植する 1 多様性区と、8 集団から 1 個体ずつ移植する 8 多様性区をそれぞれ 8 反復ランダムに設置した。1 反復は 25×25 cm の区画とし、中心から直径 12 cm の円周上に均等に 8 個体を配置した。

基礎生理実験には多様性実験の 16 集団を含む計 27 集団を使用した。温暖化区と対照区を設け、それぞれに各集団 3~6 個体を単体で移植した。

10 月から 11 月に 1 回、ロゼット直径の最大値と最小値を測定し、それを掛け合わせてロゼット面積を求めた。各区画の合計ロゼット面積の対数値をバイオマスの指標とした。温暖化区と対照区で集団と多様性が同じ区画をペアにして、ペアごとにバイオマスの平均と標準偏差を求めた。その平均/標準偏差を安定性の指標とした。

また各区画中央の地上 30 cm と地中 5 cm の地点に温度ロガーを設置し、毎時の気温を記録した。

結果と考察

実験区の気温は、温暖化区の方が地上 30 cm では 0.058℃、地中 5 cm では 0.51℃高くなった。

・多様性実験

高標高では温暖化区、対照区共に 8 多様性区の方が合計ロゼット面積は大きくなり、温暖化区で多様性処理区間の差が大きかった。低標高では温暖化区、対照区共に 8 多様性区の方が値は小さくなり、温暖化区の方が多様性処理区間での差が大きかった。また区画ごとの生存率は、高、低標高共にロゼット面積と同様の結果が得られた。安定性は、高標高、低標高共に 8 多様性区の方が低くなった(図 1)。これらの結果は本研究の予測と反する。低標高集団については、生存率が今回の結果に影響している可能性がある。

・基礎生理実験

温暖化区では高標高由来の個体ほどロゼットサイズは小さくなり、対照区ではわずかに大きくなった(図 2)。これは予測と合致する。

基礎実験の結果から、高標高集団ほど温暖化に弱く、低標高集団ほど菅平の寒冷気候に弱いと考えられる。多様性実験で多様性-安定性仮説に反した原因としては、移植直後の死亡率の高さがその一つと考えられる。移植を行った 5 月が例年稀に見る気温の高さと降水量の少なさであったため、特に温暖化区で死亡率が高かった。その結果、多様な反応を示す 8 多様性区の安定性が低下した可能性がある。

結論

温暖化という環境変動に対しては、種内の遺伝的多様性についての多様性-安定性仮説は必ずしも支持されない可能性があると言える。

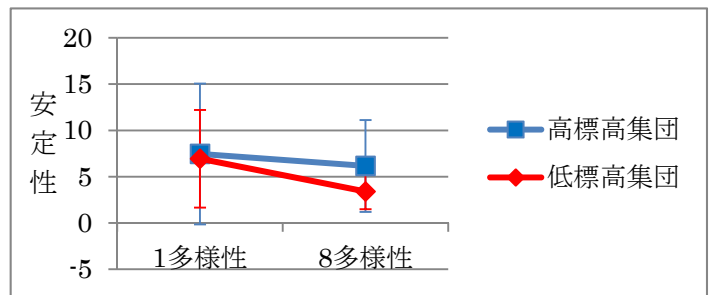


図 1. 安定性

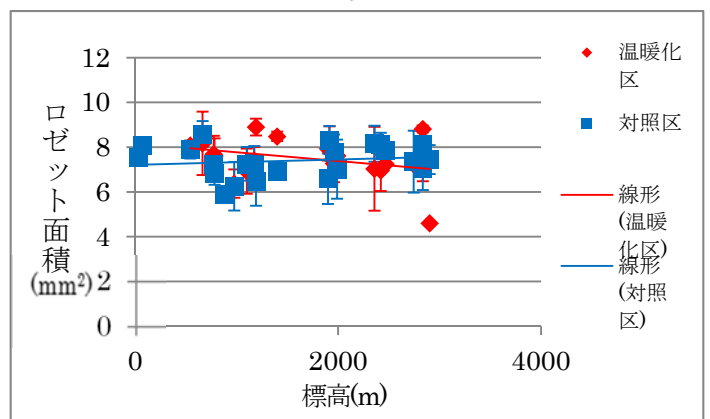


図 2. 基礎生理実験

微生物による植物由来芳香環化合物の代謝に関する研究

草刈 雅和 (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

植物はフラボノイドなどの多種多様な芳香環化合物を生産する。そのような物質の中には抗菌作用、抗酸化作用、抗ガン作用などの疾病の予防や治療への効果が認められ、機能的食品や医薬品などに利用されているものも一部ある。しかし、これらの物質の中には明確な作用機序はもとより、それらの代謝・分解機構がいまだに明らかになっていないものも少なくない。

本研究では、植物由来芳香環化合物を分解する微生物を自然界よりスクリーニングし、芳香環化合物の分解産物や分解経路を解明するとともに、分解に関わる酵素の諸性質解明及び遺伝子を同定することを目的とした。

方法・結果

植物由来芳香環化合物を単一炭素源とした液体培地を用意し、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。菌体の増殖が見られたものについては同一の新しい培地に植え継ぎ集積培養を行った。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それぞれ植え継ぐことで、菌体を単離し、植物由来芳香環化合物を分解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、集菌後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基質である植物由来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、基質の減少量および産物の増加量を確認した。スクリーニングした菌株の中から特に植物由来芳香環化合物に対する分解能が高い菌を選択し以降の実験に用いることとした。

続いて選択した菌から、植物由来芳香環化合物代謝酵素の精製を行うために大量培養における培養条件を検討し、菌体から無細胞抽出液を調製後、各種クロマトグラフィー操作により精製を試みたが、SDS-PAGE上で目的とする酵素を同定するには至らなかった。

今後の予定

芳香環化合物の代謝に関わる酵素をSDS-PAGE上で特定できるように培養条件・精製条件を再検討し、精製後は詳細な酵素学的諸性質を調べる予定である。

ヒラタアブ属が示すためらい行動の適応的意義の解明

鈴木 瑞穂 (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/医学医療系)

序論

ヒラタアブ属のハナアブにおいては、花に着地したり忌避したりする前に、花の前で飛翔しながら前後方向に動く「ためらい行動」を示す種が存在する。ためらい行動の適応的意義は、花の上で訪花昆虫を待ち受けているカニグモのような捕食者に対して、着地時の捕食リスクを減少することだと考えられている (Yokoi & Fujisaki, 2009)。ためらい行動は、前後に1度動いた時に1回行なったと定義されており、ためらい行動の回数は1回から8回まで幅広く、個体間や1回の訪花ごとに異なることがわかっている。一方で、ためらい行動を示さない個体も確認される。しかしながら、ためらい行動の回数の変化に対する、雌雄差や個体の体サイズ、採餌時間、個体の経験の違いによる影響は調べられていない。また、ハナアブでは、ためらい行動によって着地時の捕食リスクを減少させているのであれば、花へ飛来した個体がカニグモからの攻撃を受けた場合、その後の訪花では花を避ける割合が増え、ためらい回数は多くなると考えられる。本研究では、ミナミヒメヒラタアブを用いて、雌雄差や個体の体サイズ、採餌時間がためらい行動の回数に与える影響について調べた。次に、捕食者の存在しない生息地において、ためらい行動が捕食者との遭遇経験によって変化するかどうかを調べた。

方法

実験Ⅰ ためらい行動の回数変化に関わる要因

2015年7月に、長野県白馬村のヒメジョオン群落に1m×1mのコドラートを設置した。次に、コドラートに入ったミナミヒメヒラタアブについて、最初に着地したヒメジョオンの花序の前で示したためらい行動の回数と採餌時間を調べ、その個体の雌雄、乾重量を計測した。

実験Ⅱ 個体の経験がためらい行動の回数に与える影響

2014年7月にカニグモのいないヒメジョオン群落に1m×1mのコドラートを設置し、コドラート内での訪花で着地した場合にミナミヒメヒラタアブが示したためらい行動の回数を調べた。次に、ためらい行動を行なわない個体に対してピンセットで人為的に攻撃を加え、攻撃後に訪れた花の前で示したためらい行動の回数と、その花に着地したかどうかを記録した。

結果

実験Ⅰ

花に着地する前に示した雌のためらい回数は1.13±1.02回、雄のためらい回数は1.00±1.56回で、雌雄間に違いはなかった。採餌時間は雄で16.88±11.72秒、雌で48.19±64.62秒で、乾重量は雄で1.90±0.67mg、雌で1.67±0.54mgで、ためらい回数との関係はなかった。

実験Ⅱ

カニグモのいない生息地では、ほとんどの個体はためらい行動を行なっていなかった (図1)。またピンセットによる人為的な

攻撃の後でも、ためらい行動の回数は変化しなかった (図2)。しかしながら、攻撃を受けた場合に、次に訪れた花を避ける個体が増えた (図3)。

考察

ためらい行動の回数は、雌雄や体サイズ、採餌時間に影響を受けず、それぞれの個体における捕食者との遭遇経験によって決まると考えられる。本研究よりミナミヒメヒラタアブは捕食者からの攻撃を感知して訪花行動を変化させるが、ためらい行動は、捕食者からの攻撃を受けてもすぐには解発されないということが示唆された。

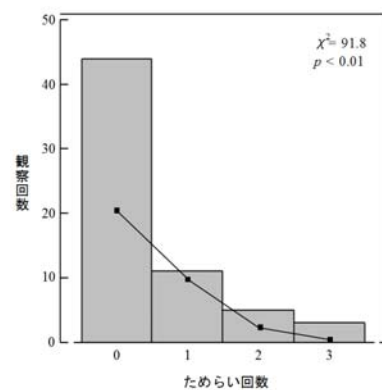


図1. 着地時のためらい回数

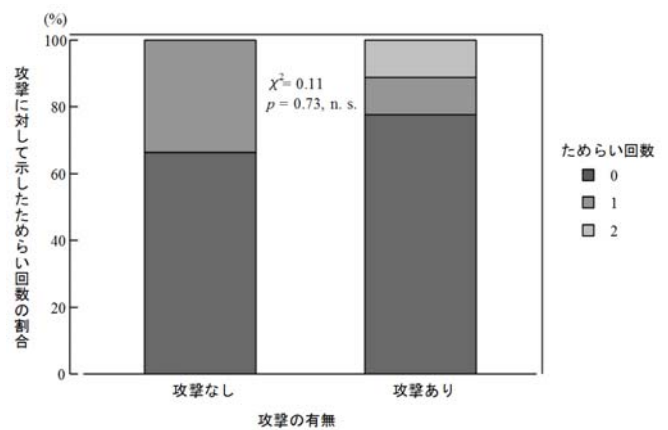


図2. 攻撃後に花に着地した時のためらい回数

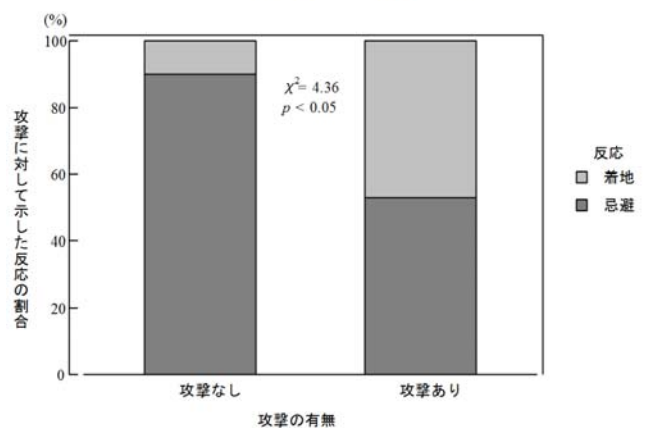


図3. 攻撃に対するミナミヒメヒラタアブの反応

見たとミスマッチな受粉様式：ツリガネニンジンにおける夜行性ガ類にたよった花粉媒介

船本 大智（筑波大学 生物学類） 指導教員：大橋 一晴（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

動物に花粉を運んでもらう花は、色・かたち・香りなど形質の多様性に富んでいる。一方で、同じグループの花粉媒介者に花粉媒介される花同士は、系統的に離れた分類群の間でも、よく似た花形質の組合せをもつことがある。こうした花形質の類似は「送粉シンドローム」と呼ばれ、特定の花粉媒介者への適応として起きた収斂進化の産物と考えられている (Proctor 1996)。例えば、ハナバチに適応した花 (ハナバチ媒花) は、青や紫色で下向きの花をもつことが多く、ガに適応した花 (ガ媒花) の多くは、白色で甘い香りを放ち、細長い花筒をもつと言われている。

ツリガネニンジン *Adenophora triphylla* var. *japonica* が咲かせる青色で下向きの花は、従来の送粉シンドロームの概念に基づけば、典型的なハナバチ媒花と考えられる。しかし、ツリガネニンジンの花粉媒介者は、文献により記述が異なり、よくわかっていない。例えば、田中 (1997) はハナバチやセセリチョウなどの昼行性昆虫がツリガネニンジンの花粉媒介者であるとしている。一方で、ツリガネニンジンには昼間の訪花者がほとんどなく、主な訪花者は夜行性ガ類という報告もある (池ノ上 2010)。

本研究では、こうした先行研究の食い違いを解決するために、ツリガネニンジンの野生集団において、1) 昼と夜の訪花者の種類と数、2) 昼と夜の訪花者の受粉への貢献度、3) 開花と蜜分泌のパターンを調べた。もし、夜間の訪花者だけが受粉に貢献していれば、開花と蜜分泌は夜間に起こるであろう。また、昼間の訪花者だけが受粉に貢献していれば、開花と蜜分泌は昼間に起こると予想される。あるいは、昼夜の訪花者がどちらも受粉に貢献している場合は、昼夜を通じて蜜分泌が起こると予想される。

方法

長野県上田市菅平高原のツリガネニンジン野生集団で、以下の調査を行った。

1) 訪花者の観察 (2014・2015年)

昼夜にわたり訪花者のグループと訪問頻度を記録した。

2) 昼と夜の訪花者の結実への貢献度 (2015年)

任意のつぼみに袋をかけて訪花者を防ぎ、開花後、a) 夜間の袋がけ (昼にのみ訪花させる)、b) 昼間の袋がけ (夜にのみ訪花させる)、c) 袋がけをしない (昼と夜に訪花させる)、d) 昼も夜も袋がけ (全く訪花させない)、e) 無処理、のいずれかの処理を施した。ツリガネニジンは自家和合性である (Tanaka 2007)。よって a) から c) では除雄処理を施し、同花内で起こる自家受粉を防いだ。

3) 花形質 (2014年)

1時間おきの調査で、開花 (雄性期の開始) 時刻、雌性期の開始時刻を記録した。また袋がけによって昆虫の吸蜜を防いだ花で、蜜分泌速度 (4時間あたり糖生産量) の経時変化を開花後から24時間後までの間で調べた。

結果

1) 昼間にはハナアブ、セセリチョウ、ハエ、ハナバチなどが、夜間には、日没後をピークとしてヤガやノメイガが訪花した。昼間の訪花者による訪問頻度は、夜間の訪花者よりも高かった。
2) i) 夜間にのみ訪花させた花では、昼間にのみ訪花させた花よりも結実率が高く、ii) 夜間にのみ訪花させた花の結実率は、昼と夜の両方に訪花させた花と同程度であり、iii) 昼間にのみ訪花させた花の結実率は、全く訪花させなかった花と同程度だった。
3) 開花 (雄性期の開始) は、日没後に集中して起きた。開花から1日または2日後の夕方から夜に雄性期が終了し、以後は雌性期が数日間続いた。蜜の分泌はほぼ夜間にのみ起こっていた。

考察

従来の報告通り、ツリガネニンジンの花には、昼はさまざまな昆虫が、夜はガ類が訪れていた。しかし、昼の訪花者は訪問頻度の割に花粉媒介にはほとんど貢献せず、受粉はもっぱら夜に訪れるガ類によって行われることがわかった。昼の訪花者の貢献が低い主な原因としては、夜間に大半の花粉が花から持ち出されてしまい、昼間には花粉がほとんど残っていないことが考えられる。

今回初めて明らかになった、日没後に集中した開花・雌性期の開始、夜間にのみ起こる蜜分泌といった花形質の特徴は、夜行性のガ類が主に花粉媒介に貢献していた、という上記の結果と整合する。つまりツリガネニンジンは、ガ類の活動が盛んな夜間に蜜を分泌し生殖器官を成熟させる一方で、受粉に貢献しない昼の訪花者には蜜を与えないという、かなり明白なガ媒花であった。

結論

ツリガネニンジンは、青色で下向きといった、ハナバチ媒を想起させる見たとは裏腹に、夜行性ガ類に依存した意外な花粉媒介様式をもっていた。夜に集中した開花や蜜分泌のパターンは、本種がガに適応した花であることを強く示唆する。青色で下向きの花をもつガ媒花は、これまでほとんど報告例がない。

従来の送粉シンドロームの考え方では、色やかたちなど見たとの花形質や訪花の有無だけが優先されがちである。しかし、本研究の発見をふまえれば、花と訪花者の関係を正しく理解するためには、開花や蜜分泌のパターンなどの隠れた花形質や、それぞれの訪花者の受粉への貢献度の定量的評価が重要だと言える。



図：ツリガネニンジンに訪花するヤガの1種

セスジアカムカデ中のアピコンプレクサ寄生虫のリボソーム RNA 系統解析

宮田凌佑 (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

アピコンプレクサ門は寄生性原生動物から構成される系統群であり、マラリア原虫やトキソプラズマといったヒトや家畜の病原性寄生虫を含む。アピコンプレクサ門の共通祖先は光合成能を持つ真核藻だったと考えられ、これまで研究されたアピコンプレクサ寄生虫のほとんどの種が光合成能を失った色素体(アピコプラスト)を細胞内に保持している。しかし、真核藻からどのような過程を経て現在のアピコンプレクサ寄生虫に進化したのか、それとともに色素体がどのような進化を経て非光合成化したのか、その詳細はいまだ明らかになっていない。この問題を解明するには、まずアピコンプレクサ寄生虫間の頑健な系統関係を解明する必要がある。

アピコンプレクサ門に属するグレガリナは、系統的に広範な無脊椎動物に寄生する。先行研究による 18S rDNA 配列に基づく系統解析では、グレガリナはアピコンプレクサクレード中で早期に分岐したことが示唆された。従って、これまで研究されてきたアピコンプレクサ寄生虫同様にグレガリナも非光合成性色素体を保持するならば、これまで研究されてきたアピコプラストよりも祖先的形質を保持している可能性がある。しかし、18S rDNA 配列に基づく系統解析には、アピコンプレクサクレード中でのグレガリナの系統的な位置を確定するだけの進化的情報が不足している。そこで、80 遺伝子程度の配列データに基づく系統解析によりグレガリナの系統的な位置を確定することを最終目標とし、本研究ではグレガリナの遺伝子転写物の塩基配列を網羅的に決定するトランスクリプトーム解析の実施を目指した。

グレガリナには海産の無脊椎動物に寄生する種と、陸上の節足動物に寄生する種が知られている。陸上の節足動物は海産無脊椎動物よりも入手が容易であるため、本研究では陸上の節足動物に寄生するグレガリナ(陸生グレガリナ)、特に筑波大学構内で容易に採集できるセスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus* の消化管中の寄生虫を研究対象とした。

本発表では、セスジアカムカデ寄生虫がアピコンプレクサ門に属することを確認するために、まず 18S rDNA 遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行った。

材料、方法

1. 18S rDNA 配列の取得

9月中旬から10月下旬にかけて筑波大学構内にてセスジアカムカデの採集を行った。冷凍麻酔を行った後解剖し、消化管を取り出した。寄生虫が確認された消化管から、パスツールピペットを用いて寄生虫細胞を単離した。その後、セスジアカムカデの組織等のコンタミネーションを除くため、蒸留水によって寄生虫細胞を洗浄した。洗浄した寄生虫1細胞をテンプレートとし、PCRによって18S rDNA配列の増幅を試みた。PCRのプライマーには、既知の陸生グレガリナ18S rDNA配列に特異的なプライマーを設計し、実験に用いた。増幅産物をクローニングし、その後

塩基配列を決定した。決定した塩基配列をクエリとしてNCBIのデータベースに対しBLAST検索を行った。

2. 取得した18S rDNAを用いた系統解析

NCBIのデータベースから、既知のグレガリナの18S rDNA配列を収集した。さらに、先行研究(Wakeman et al. 2013; Janouškovec et al. 2015)でアピコンプレクサ寄生虫と相同性を示した環境配列を加えた。これらGenbankデータベースから取得した配列と、本研究で取得した配列を含むアライメントをMAFFTによって作成し(合計140配列×835ポジション)、RAxMLを用いて最尤法による系統解析を行った。塩基置換モデルには、座位間での置換速度差をガンマ分布により補正したGTRモデルを用いた。系統解析では、10個の初期樹形から樹形探索を行うことで最尤系統樹を得た。さらに、推測された最尤系統樹の信頼性を評価するため、100個のリサンプリングデータに基づくブートストラップ解析を行った。

結果、考察

22個体のセスジアカムカデの解剖を行ったところ、4個体の消化管に多数の寄生虫が観察された。これらの寄生虫のうち26細胞を単離し、それぞれを鋳型にPCRを行った結果、合計1206塩基長のDNA断片の増幅に成功した。このrDNA配列は、アピコンプレクサ寄生虫であるクリトスポリジウムやアピコンプレクサ門に近縁なコルポデラの18S rDNA配列に高い相同性を示したが、塩基配列が完全に一致する配列はGenBankデータベース中に存在しなかった。つづいてムカデ寄生虫配列について系統解析を行い、既知のアピコンプレクサ寄生虫配列とクレードを形成することを確認した。ただし、今回決定したムカデ寄生虫配列は、既知の陸生グレガリナ配列を含め、特定の配列やサブクレードへの強い近縁性は検出できなかった。以上の結果から、セスジアカムカデ寄生虫はアピコンプレクサ門に属するが、これまで研究されてきた陸生グレガリナとは近縁でないと結論づけた。

現在、セスジアカムカデ中のアピコンプレクサ寄生虫から全RNAを抽出し、トランスクリプトーム解析の準備を行っている。今後、トランスクリプトームデータを基盤とした~80遺伝子配列データに基づく系統解析を行い、この寄生虫と他のアピコンプレクサ寄生虫との系統関係を頑健に推測する。また系統解析と並行し、トランスクリプトームデータ中に退化色素体で機能するタンパク質遺伝子の探索を行う予定である。

不完全さび菌 *Uredo iyoensis* の系統位置の推定と夏胞子の二形性についての検討

山下 祐紀子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岡根 泉 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

さび菌は菌界の担子菌門のうちサビキン亜門に分類され、維管束植物上で生体栄養性の寄生生活を行う菌類である。種数は7000種以上が知られており、最大5つの孢子世代を生活環の中で形成する。だが、中には生活環の一部しか確認されていない種や、無性世代で生活環を全うする種も存在し、それらは不完全さび菌とよばれている。最近の分子系統解析の手法の発展により、不完全さび菌についても分子情報を利用した生活環の解明および分子系統学的位置の推定の必要性が求められている。

不完全さび菌の一種である *Uredo iyoensis* は、スミレ属の植物に寄生しているが、その生活環は夏孢子世代しか発見されておらず、その系統的位置は明らかになっていない。また孢子が二形性であることが知られているが、発芽試験や接種実験は現在成功例がなく、その同根性は明らかになっていない。

本研究では、*U. iyoensis* の系統位置の推定を行い、夏胞子の二形性について分類学的検討を行うことを目的とし、形態観察によって識別した標本サンプルから得られた DNA 塩基配列に基づく系統解析を行うとともに、夏胞子の発芽試験、接種実験を試みた。

材料と方法

分子系統解析供試標本 (*U. iyoensis* と同定されたもの) : 筑波大学寄生菌学研究室標本庫 (TSH) 所蔵標本 10 点; 茨城大学教育学部菌学標本庫 (IBA) 所蔵標本 24 点; YT0925 (筑波大学川上演習林で採集); YT1030 (筑波山で採集)

接種試験供試菌: YT0925 が由来するタチツボスミレ上に形成された夏孢子

接種試験供試植物: タチツボスミレ (筑波山で採集)

発芽試験: 2 枚のシャーレに濾紙を敷き蒸留水で湿らせ、直径および高さが 15mm のガラスリングを各 2 個ずつ置いた。カバーガラスに蒸留水を滴下し、そこにタチツボスミレから掻き取った夏胞子を散布し、その面を下に向けて各ガラスリング上に置いた。それらを 15°C と 23°C の室内に別々に置き、2 日ごとに光学顕微鏡で胞子の発芽の有無を 2 週間観察した。それを 2 反復行った。

接種実験: 5mm 角に切った濾紙を蒸留水で濡らし、上記と同様の夏胞子を散布し、無病徴のタチツボスミレ 2 株の葉の両面に貼り付けた。蒸留水を十分に噴霧したポリバケツの中に接種したタチツボスミレを入れ、23°C の室内に 2 日間置き、その後生育チャンパーに移し観察を行った。被接種植物個体数は 2 株である。夏孢子無散布の濾紙を接種したものをコントロールとした。

形態観察: 夏胞子の形態観察・形態測定のために各標本の一孢子堆から掻き取った胞子のプレパラートを作製し、また、夏孢子堆の側糸の有無を観察するため孢子堆切片のプレパラートを作製し、光学顕微鏡で観察した。

分子系統解析: 供試標本上の一孢子堆由来の夏胞子 (形態タイプを識別済み; 図 1 参照) から DNA を抽出し、28S D1/D2 rDNA 領域の塩基配列を決定し、近隣接合法 (NJ 法) による解析を行った。解析には Aime(2006)、Maier et al(2003)、Maier et al(2007) の既知種の登録配列データを加えて行った。

結果と考察

発芽試験および接種試験: 微突形 (mucronate, M タイプ; 図 1) と判別された新鮮な夏胞子を用いた発芽試験の結果、2 週間の継続観察においても発芽は認められなかった。また、接種実験 (1 反復のみ) では 2 週間以上経過しても夏孢子堆の出現は認められなかった。本菌の夏胞子の発芽試験はこれまでも試みられているが発芽は観察されていない。これらの形態の異なる夏胞子の機能解明のためにも、今後は発芽誘導の条件検討が必要である。

形態観察: 供試標本 36 点中、32 点で楕円形 (elliptic, E タイプ)、4 標本において M タイプの夏胞子が観察された (図 1)。胞子の大きさは Ono (1980) による記載の範囲内であり、また、いずれの標本においても孢子堆中に側糸は観察されず、*U. iyoensis* の形態的特徴と有意な差異は認められなかった。

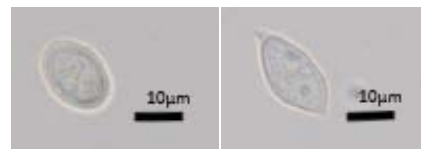


図 1 *U. iyoensis* の形の異なる 2 タイプの夏胞子: elliptic(左 IBA8445)と mucronate(右 YT0925)

分子系統解析: *U. iyoensis* と同定された標本由来の配列データは大きく 2 つの系統群に分かれた。多くのデータを含む系統群 (図 2A) は、*Puccinia* や *Uromyces* 属菌等と姉妹群を形成し、系統的に *Pucciniaceae* に所属するさび菌であると推定された。この系統群は E タイプおよび M タイプの胞子由来する配列データが入れ子状となった。他方の系統群 (図 2B) は *U. alpestris* の登録配列データ (AF426212) を包含し、*Pragmidium*、*Kuehneola* 属菌と姉妹群を形成した。この系統群においても E タイプおよび M タイプの胞子由来する配列データが入れ子状となった。

以上の結果から、*U. iyoensis* は *Pucciniaceae* に所属するさび菌であり、本種における夏胞子の二形性は同種内における変異であると示唆された。また、形態的特徴が類似し宿主も共通する *U. alpestris* が *U. iyoensis* と系統的に大きく異なる種であることが示唆され、両種の形態および分子系統学的な精査が必要である。

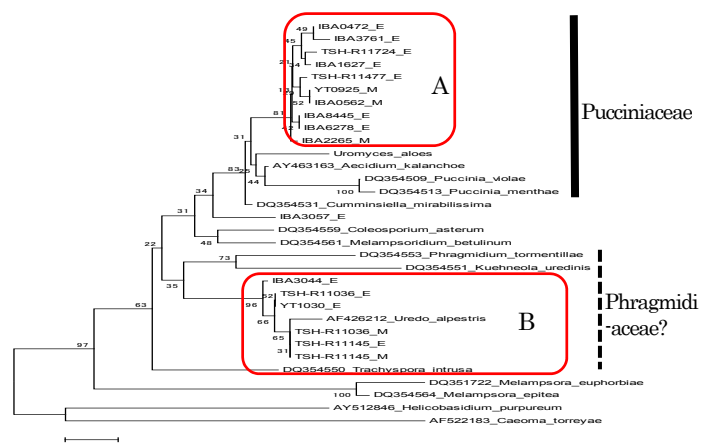


図 2 NJ 法による系統樹。E は elliptic タイプ、M は mucronate タイプの胞子由来であることを示す。数値はブートストラップ値を示す。なお、本系統樹では選ばれた 17 標本のデータおよび DNA バンクからの取得データを示した

ショウジョウバエの痛覚受容シグナルに関わる神経ペプチドの探索

柏原 秋穂 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

痛覚受容システムは、組織傷害を起こすような刺激(痛覚刺激)を受容する機構であり、動物が危険から身を守るために必須の機能である。しかし一方で、痛覚受容システムの過剰な活動は動物の生存に不利に働く。ヒトにおいては、痛覚受容は痛みの知覚を引き起こす。従って痛覚受容システムの理解は、動物の感覚応答機構を理解するうえでも、そしてヒトにおけるよりよい痛みのコントロールを目指すうえでも、重要な課題である。これまでに、疼痛疾患患者や哺乳類モデルの研究などから、痛覚受容の分子機構について多くの知見が得られてきた。しかし、その全容は未だ明らかになっていない。本研究は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をモデルに用いて、神経ペプチドによる痛覚受容システムの機能調節メカニズムを詳細に解明していくことを目的としている。

神経ペプチドは神経から分泌される短鎖のアミノ酸で、神経伝達物質やホルモンとして、動物の睡眠や摂食行動といった様々な生理機能の調節に関わる。哺乳類モデルの研究から、痛覚受容に関与する神経ペプチドも既に複数同定されている。しかし、哺乳類の複雑な体制や神経ペプチドの生体内機能の多様さ、複雑さから、痛覚受容システムにおける神経ペプチドの作用機序の理解はあまり進んでいない。ショウジョウバエは体制もシンプルであり、優れた遺伝学的実験法が多く利用できる。また先行研究から、ショウジョウバエと哺乳類の間で痛覚受容に関わる分子が進化的に保存されていることがわかってきている(Milinkeviciute et al., 2012)。神経ペプチドとその受容体の構造も進化的に良く保存されており(Nassel and Winther, 2010)、ショウジョウバエは痛覚を調節する神経ペプチドの作用機序を研究するうえで非常に有効なモデルになると考えられる。

ショウジョウバエには 45 個の神経ペプチド遺伝子が存在すると推定されているが(Nassel and Winther, 2010)、そのほとんどについて痛覚受容システムの機能調節に関わるかどうかは調べられていない。そこで本研究では、神経ペプチド遺伝子の欠失変異体を利用し、まず痛覚受容シグナルの調節に関わる可能性の高い神経ペプチド遺伝子の探索を行った。

材料・方法

・神経ペプチド遺伝子欠失変異体系統

国立遺伝学研究所の近藤周助教によって CRISPR/Cas9 法を用いて作成された、27 の神経ペプチド遺伝子に対する 44 の欠失変異体系統を利用した。対照群には遺伝的背景が同じコントロール系統(y^w^{1118} または $y^2cho^2v^1$ 系統)を用いた。変異体系統のうち 8 系統はホモ接合体では致死であったため、コントロール系統とのヘテロ接合体を用いて実験を行った。

・熱刺激アッセイ

ショウジョウバエの幼虫は、組織傷害を起こすような熱刺激や機械刺激などの痛覚刺激に対して、特徴的な横転回避応答を示す。(図) (Tracey et al., 2003)。この横転回避応答は痛覚刺激に特異的

にみられることから、痛覚受容の明確な指標として利用できる。本研究では、後期三齢幼虫の腹部側面を熱刺激プローブにより刺激し、幼虫が横転回避応答を示すまでの時間を計測し、熱痛覚受容感度の指標とした。すべての実験は室温 25 °C の恒温室で行った。

・一次スクリーニングと再テスト

各神経ペプチド変異体系統に熱刺激アッセイを実施し($n=30$)、対照群の系統と比較して熱刺激に対する応答が速い系統を痛覚過敏系統、遅い系統を痛覚鈍麻系統の候補として選出した。その後、選出した系統について、系統名を伏せた状態で再度実験を行い、再現性の確認をした($n=100$)。

結果

これまでのスクリーニングの結果、痛覚過敏系統が 5 遺伝子 5 系統、痛覚鈍麻系統が 7 遺伝子 9 系統見出されている。見出された神経ペプチド遺伝子の多くが、これまでに痛覚への関与が報告されていないものや、その作用機序が不明なものであった。詳細は発表会で報告する。

今後の展望

スクリーニングから、これまでに痛覚受容シグナル調節での機能がよくわかっていない神経ペプチド遺伝子を多数見出すことができた。これらの神経ペプチド遺伝子の欠失がどのように痛覚受容の過敏や鈍麻を引き起こすか、そのメカニズムは現時点では不明である。今後はショウジョウバエで利用できる遺伝学的実験ツールを駆使し、見出した神経ペプチドの痛覚受容システムにおける作用機序の解明を目指したい。

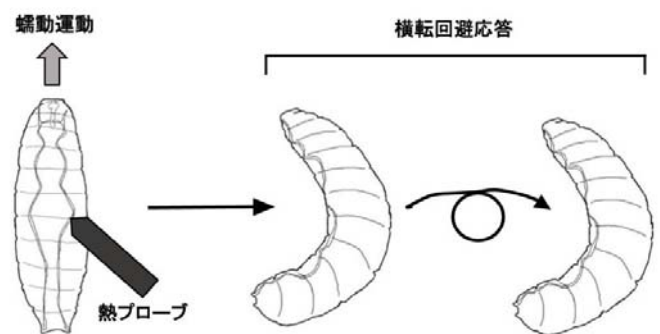


図. 幼虫の横転回避応答

新規カルシウムレポーターCaMPARI を使用したショウジョウバエ報酬神経系の解析

佐藤 智士 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

[背景・目的]

報酬系はそれ自体が外界からの刺激を判断し、行動を決定する要因である一方で記憶の形成にもかかわり、このメカニズムを解明することは神経科学の重要な課題である。ショウジョウバエは冗長性のない単純な神経系を持ちながら高度な認知能力を持ち、報酬・罰といった無条件刺激(US)を匂いなどの条件刺激(CS)と関連付けて学習する古典的条件付けによる連合学習が可能であり、また優れた遺伝的操作・解析手法を適応することが可能なため、近年、記憶が細胞・回路レベルでどのように形成されているかについて盛んに研究されており、同時に報酬系についても解析されている。

しかしながら従来神経活動の解析に用いられてきた、電気生理学的手法やカルシウムイメージングでは、神経活動を調べる際に個体の行動を制限しなくてはならない事や、シグナルや活動電位が短時間で消失してしまう事、あらかじめターゲットとする神経細胞を絞りこむ必要がある事などによって、広範囲にわたる解析や新たな回路、神経活動の探索が困難である事などといった問題点があった。

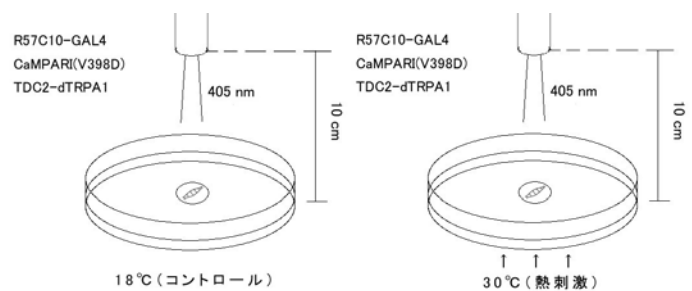
最近この問題を解決するために *Janelia research campus* によって CaMPARI が開発された^[1]。CaMPARI はイシサングの持つ蛍光タンパク質、EosFP を利用した新規カルシウムレポーターであり、発現後は緑色蛍光タンパクとして機能するが、紫外線を吸光することにより、カルシウム濃度に依存した速度で赤色蛍光を発色する構造へと不可逆的に変化する(Photo conversion, PC)。そのため解析したい自由行動中の個体に UV を照射することにより、CaMPARI は *in vivo* で PC を起こす。この際の緑色から赤色へ蛍光の変化量は UV の照射時間とカルシウム濃度に依存し、これを定量することによって、CaMPARI を発現している細胞内のカルシウム濃度、すなわち活動レベルに対応する値を測定することが出来る。この PC は不可逆的なため、一度に多くの神経細胞の活動を記録し、その後免疫染色といった手法と組み合わせることで細胞種を後から推定することが可能である。この性質により従来の方法では発見することの難しかった神経回路や神経活動を解析することが出来る。

この手法により成虫よりもより冗長性が少なく解析のしやすい幼虫の脳を用いて、報酬系の活動が関与する回路や神経活動を CaMPARI により解析することを目的とし、GAL4-UAS システムによる CaMPARI の特定の細胞集団での発現と、熱感受性イオンチャンネル(dTrpA1)が報酬刺激を伝えるオクトパミン作動性ニューロンで発現するトランスジェニックを用いた熱遺伝学的手法を組み合わせることで解析を行っている。

[材料・方法]

まずは CaMPARI が機能していることを確かめ、解析に適した条件を検討するために、オクトパミン作動性ニューロンで dTrpA1 を発現する TDC2-dTrpA1 をもつ系統と、CaMPARI と pan-neuronal ドライバーである R57C10-GAL4 を持つ系統

を掛け合わせることによって、熱刺激により報酬系が活性化し、全神経で CaMPARI を発現する幼虫を用意した。幼虫を一匹ずつコントロールである 18 °C もしくは dTrpA1 が十分に開口する温度である 30 °C のアガープレート上に置き、中枢神経系まで温度を伝えるために 5 分間放置した後、自由運動中の幼虫に 10 cm の高さから UV (405 nm レーザー 100 mW) を 0 秒, 10 秒, 20 秒, 30 秒, 60 秒, 180 秒間照射した。



その後幼虫を解剖、脳のサンプルを作成し共焦点顕微鏡により観察した。

[結果・考察]

UV 照射によって PC が起きていることを確認することが出来た。神経活動を異なる条件下で比較するためには、同細胞の個体間での PC 率の比率が重要であると考えられる。

[今後の展望]

条件の異なるサンプル間で神経活動に差がある事を正確に確かめるためには画像解析や統計処理を行う必要があるため、今後はサンプル数を増やすとともに、他の GAL4 ドライバーを利用したり、抗体染色を利用したりすることで PC 率に差異のある細胞種を特定していく予定である。また、さらには報酬系だけでなく、嗅覚情報の処理や、嗅覚刺激と報酬刺激による連合学習の際の神経活動の解析を行っていく予定である。

[参考文献]

[1] Fosque *et al.* (2015) Labeling of active neural circuits in vivo with designed calcium integrators. *Science* Vol. 347 no. 6223 99. 755-760 DOI: 10.1126/science.1260922

ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク遺伝子 *DISC1* と脆弱 X 症候群遺伝子 *FMR1* との遺伝学的相互作用の解析

相馬 朱里 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

統合失調症は、人口のおよそ 1% が発症する精神疾患であり、妄想や幻覚などの陽性症状、意欲や思考力の低下などの陰性症状、認知機能障害を呈する。一卵性双生児の研究などから、発症には環境的要因と共に遺伝的要因が大きく関与することが示されているが、具体的な発症メカニズムは明らかにされていない。

DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*) は統合失調症のリスク遺伝子のひとつであり、スコットランドの精神疾患が頻発する家系の研究から見出された。染色体異常により *DISC1* の一部が欠失することで、統合失調症や双極性障害など多くの精神疾患のリスクが高まると考えられている。また *DISC1* タンパク質は、神経発生の過程において複数のタンパク質と相互作用することが分かっている。

当研究室では、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いて *DISC1* 遺伝子の機能解析を行ってきた。ショウジョウバエは *DISC1* の相同遺伝子を持っていないが、*DISC1* と相互作用する多くの遺伝子がヒトとの間で保存されていることが分かっている。また、ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部(NMJ) は、統合失調症で機能低下すると考えられている神経回路と共通の神経伝達物質を用いており、モデルとして妥当であると考えられる。過去の研究では、*DISC1* を強制発現させた幼虫 NMJ の神経の形態解析の結果、シナプスの面積が減少していた。一方で、脆弱 X 症候群のリスク遺伝子である *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) のハエ相同遺伝子 *dfmr1* が、*DISC1* と相互作用する遺伝子の一つであることが示唆されているが、具体的な分子メカニズムは未明である。

本研究は、異なる 2 種類の遺伝的バックグラウンドにおいて、過去の研究で用いられたものとは別の種類の *dfmr1* 変異体に *DISC1* を強制発現させ、幼虫の NMJ における神経発生への影響を調べる。これにより、*DISC1* と *dfmr1* との相互作用性について更なる確証を得ることで、統合失調症の発症過程における複雑な遺伝学的メカニズムを明らかにすることを目的とする。

材料・方法

1. ハエのバランス化

dfmr1 変異体

- *dfmr1^{B55}* (CS)/ TM6B
- *dfmr1^{B55}* (*yw*)/ TM6B

control

- *w*(CS10)
- CS(Shimoda)
- *yw*(Shimoda)

上記の 5 つの各系統の♂に、それぞれ次♀を交配した。

♀ *w*; Sp/ CyO *Act-GFP*; Pr Dr/ TM6B *ubi-GFP*

2. *dfmr1* 変異体と *DISC1* 系統の交配・採卵

1 の交配によって得られた♂に、*DISC1* を強制的に発現できる♀を交配し、採卵を行った。

DISC1 強制発現

♂ *w*⁻; +/ CyO *Act-GFP*; +or *dfmr1^{B55}* TM6B *ubi-GFP*

♀ *w*; UAS-*DISC1*(CS10)6-6; *tubPGAL4*/ TM6B *ubi-GFP*

Control

♂ *w*⁻; +/ CyO *Act-GFP*; +or *dfmr1^{B55}* TM6B *ubi-GFP*

♀ *w*; UAS-*DISC1*(CS10)6-6; +/ TM6B *ubi-GFP*

3. 抗体染色

2 の採卵から 120 時間後の 3 齢幼虫の内、変異型 *dfmr1* と *DISC1* が同時発現している個体を選び、解剖した。

→ *w*; +/ UAS-*DISC1*(CS10)6-6; +or *tubPGAL4*/ +or *dfmr1^{B55}*
解剖した個体は、神経細胞特異的な抗体およびシナプス特異的な抗体で染色した。

4. NMJ の形態解析

3 で得たサンプルの NMJ を共焦点顕微鏡で撮影した。Image-J を用いて画像解析を行い、シナプス面積、シナプス数、軸索分岐数を測定した。

結果・考察

2016 年 1 月時点で *w*(CS10) コントロールについて染色を行ったが、染色に問題が生じたため十分な解析ができていない。調製した抗体に問題があると考えられることから、抗体を再調製し再度染色・解析を行う予定である。

今後の予定

本研究では幼虫の NMJ を用いて *DISC1* と *dfmr1* の相互作用性を調べた。この後は成虫の脳において、特定の神経細胞の形態変化について解析を行い、中枢神経系における両遺伝子の相互作用性を検証する予定である。

人工飼養ミツバチ(*Apis mellifera*)の幼虫における初期カースト分化関連遺伝子の発現解析

奥成 潤 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 誠一 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

ミツバチは集団で1つのコロニーを形成して生活を営む社会性昆虫であり、カーストによって仕事の分業を行なう。女王蜂は主に産卵に従事し、働き蜂は営巣や育児を担当する。これら2つのカーストの分化は生まれ持ったゲノム情報ではなく、幼虫前期(孵化後1~3日)に与えられる餌の質によって、3日齢までにエビジェネティックに決定する。初期にワーカーゼリー、蜂蜜や花粉を与えられたときは働き蜂として、高栄養なローヤルゼリーを与えられたときには女王蜂として分化発生が進む。一方でショウジョウバエの栄養感受伝達経路として知られる insulin/insulin-like signaling system (IIS)や target of rapamycin (TOR) がこのミツバチの栄養の違いによるカースト分化にも機能していることが明らかにされている。また近年では、カースト分化に特異的に関与する物質としてロイヤラクチンが同定され、それに伴い新たな経路 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の関与が報告されている。しかしながら EGFR は、IIS 経路や TOR 経路との関連性について不明な点も多く、いまだ完全なカースト分化経路の解明には至っていない。

ミツバチの人工飼養を試みた研究において、本来女王蜂幼虫のみ与えられるローヤルゼリーを含む人工飼料で育てられた幼虫から羽化した成虫個体は、女王蜂とは形質が異なり、女王蜂と働き蜂の表現型を部分的に備え持つ個体となった。

そこで本研究では女王蜂、働き蜂、人工飼養ミツバチの三種の幼虫を用いて、ミツバチのカースト分化関連遺伝子の発現をカースト分化が決定した直後となる4齢幼虫期に比較し、ミツバチのカースト分化経路を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

ミツバチのサンプリング

働き蜂幼虫

女王蜂を卵採集用ケージに入れて産卵させた。孵化後、幼虫は巣内の働き蜂によって給餌させた。

女王蜂幼虫

女王蜂を卵採集用ケージに入れて産卵させた。卵は孵化後6時間以内にケージから取り出し、あらかじめ女王蜂を除外したコロニーに設置した王台(女王蜂幼虫育成用の巣穴)へ移し、働き蜂に給餌させた。

人工飼養幼虫

女王蜂を卵採集用ケージに入れて産卵させた。卵は孵化後6時間以内にケージから取り出し、グルコース、フルクトース、酵母エキス、ローヤルゼリーからなる培地で満たしたシャーレに移し、インキュベーター内で34.5°C、湿度95%の条件で育て、毎日新規の餌に交換した。

これらの幼虫は、カースト分化の決定直後となる孵化後96時間の4齢幼虫期にサンプリングし、-80°Cで凍結保存した。

遺伝子発現解析

幼虫全体から mRNA を抽出し、cDNA の合成を行った。real time RT-PCR では *actin1* をリファレンスとして IIS 経路遺伝子 (*AmILP-1*, *AmILP-2*, *InR-1*, *IRS*) および TOR 経路遺伝子 (*PDK1*, *amAKT*, *amFOXO*, *amTOR*, *amp60*, *amp110*) の発現解析を行った。

結果・考察

人工飼養ミツバチのカースト分化関連遺伝子の発現は、働き蜂や女王蜂と比べて *PDK1* を除くすべての遺伝子で顕著に低い発現を示した(図1)。また女王蜂の4齢幼虫は *PDK1* と *AmILP-1* の発現量が働き蜂より高くなることが Wheeler et al. (2006, 2013)の研究により明らかにされている。そのため人工飼養ミツバチの形態形成では *PDK1* と *AmILP-1* の発現が関与している可能性がある。

今後の展望

今後の研究では、人工飼養ミツバチを用いた *ILP-1* の過剰発現、または *PDK-1* の発現抑制による形質への影響の観察や、4日齢前後のカースト分化関連遺伝子について発現解析を行うことでカースト分化経路の探索を行っていききたい。

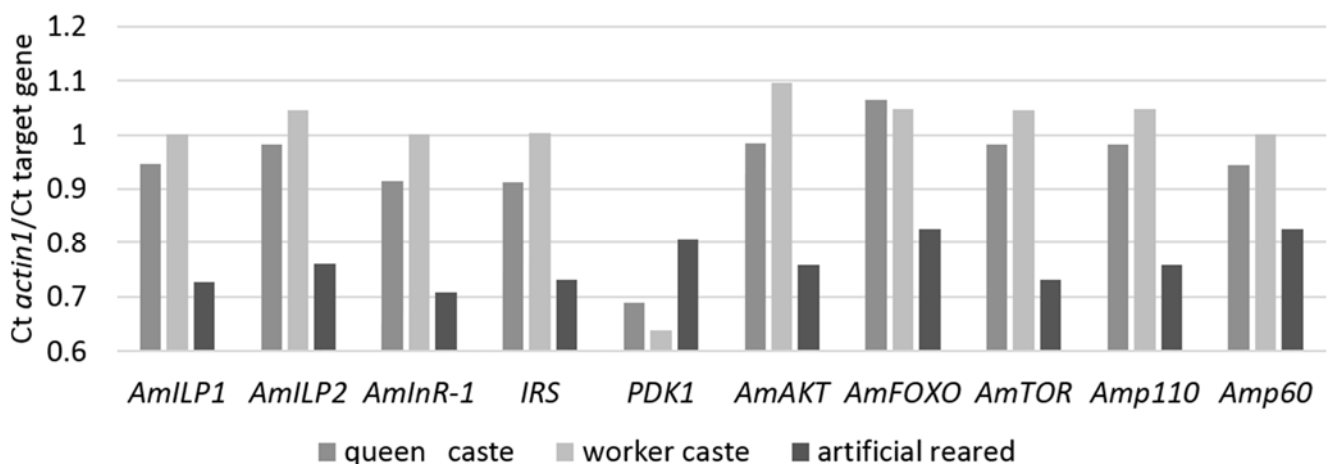


図1. IIS 経路および TOR 経路のカースト分化関連遺伝子群発現

細胞性免疫に関わるアワヨトウレクチンの機能解析

石原 輝人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 誠一 (筑波大学 生命環境系)

1. 背景・目的

昆虫の自然免疫は細胞性免疫と液性免疫に大別できる。細胞性免疫には、異物のサイズの違いに応じた使い分けが存在しており、寄生性昆虫のような大型異物を多数の血球による囲い込みにより排除する包囲化と細菌のような小型異物を直接血球細胞に取り込み排除する貪食に分けられる。

免疫応答の対象異物の認識は異物表面の分子を認識するパターン認識受容体 (PRR) によって行われると言われている。アワヨトウ (*Mythimna separata*) を用いた先行研究において、貪食もしくは、包囲化の時に発現しているレクチン遺伝子 (*CTL1*, *CTL5*) が Subtraction 法によって発見された。レクチンはある特定の糖鎖を認識して結合するタンパク質であり、動物だけでなく植物にも存在しており、昆虫では PRR として働くと考えられている。上述したように、PRR は異物表面の分子パターンの認識を担うと考えられていることから、サイズのような三次元的構造の認識は不可能であるといえる。そこで、異物サイズの違いに基づく細胞性免疫の制御機構を明らかにすることを本研究の目的とし、二種類のレクチンのより詳細な遺伝子発現解析及び機能解析を行った。

2. 材料・方法

供試昆虫

アワヨトウは筑波大学応用動物昆虫学研究室内で継代飼育してきたものを用いた。飼育室内の温度は 25°C に保ち、光条件は明期 16 時間、暗期 8 時間で飼育した。実験には最終齢 (6 齢) になって 3 日経過した幼虫を用いた。

Real time RT-PCR

血球細胞に対して大型と小型の同成分でできたビーズを準備した。アワヨトウ幼虫にそれらを注射した後、血球を回収して、遺伝子発現定量を行った。コントロールとして生理食塩水を注射した処理区と無処理区を作成した。

組換えタンパク質発現・精製

GSTtag を付加したレクチン遺伝子を大腸菌 (BL21 株) に導入し、Overnight express で遺伝子発現の誘導を行った。GST とグルタチオンセファロースビーズの親和性を利用して目的のレクチンタンパク質を分離した。その後、プロテアーゼによって GSTtag 部分を切断し、目的タンパク質を精製した。

貪食試験

カルチャーディッシュにおいて血球と小型ビーズを混合したものにレクチンを加えた処理区とコントロールとして BSA を加えた処理区を準備した。混合して 30 分後の 1 個の血球細胞中に含まれるビーズの数を数えた。

包囲化試験

カルチャーディッシュにおいて血球と大型ビーズを混合したものにレクチンを加えた処理区とコントロールとして BSA を加えた処理区を準備した。混合して 30 分後と 60 分後の包囲化の進行具合を比較した。

包囲化に以下のような段階を設定して該当するビーズに対する包囲化を評価した。

- Adhesion : 血球細胞が接しているように見えるビーズ
- Level 1 : 血球細胞がわずかに変形して付着しているビーズ
- Level 2 : 血球細胞が扁平になり、付着しているビーズ
- No adhesion : 血球細胞の付着のないビーズ

3. 結果・考察

Real time RT-PCR の結果、無処理区、生理食塩水を注射した処理区、大型のビーズを注射した処理区で *CTL1* 遺伝子の発現量が高く、小型のビーズを注射した処理区で発現量が低くなっていた。一方、*CTL5* 遺伝子は、小型のビーズを注射した処理区でその他の処理区に比べて高い発現量を示した。

小型ビーズの貪食をコントロールの BSA と比較したところ、*CTL1* を加えた処理区では 1 個の血球細胞あたりに含まれるビーズの数が減少した。一方、*CTL5* を加えた処理区ではその数が増加した。

包囲化試験を行ったところ、*CTL1* を加えた処理区では他の処理区よりも以下の図 1 の矢印のように変形してビーズに付着している細胞が多く見られた。



図 1, ビーズと付着した血球細胞

以上の結果から、*CTL1* は包囲化対象となる大型のビーズで高い発現量を示し、包囲化を促進して貪食を抑制する。逆に、*CTL5* は貪食対象となる小型のビーズで高い発現量を示し、貪食を促進させると考えられた。したがって、アワヨトウには *CTL1* と *CTL5* の二種類のレクチンタンパク質を介した表面分子パターンによらない細胞性免疫を制御する未知の系が存在することが示唆された。

形成メカニズムの比較からヤツメウナギと顎口類の脊椎骨の相同性を探る

網本 壮一郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

1. 背景・目的

脊椎骨は脊椎動物を特徴づける重要な形質であり、背側正中で各脊椎骨が連なった脊柱が体の支持を行っている。脊椎骨の獲得によって脊椎動物は複雑で大型の体と高い運動能力を持つことができるようになり、捕食者として進化的に成功することが出来た。このように脊椎動物にとって重要な特徴である脊椎骨であるが、その初期進化に関しては知見が少ない。

脊椎動物は顎を持った顎口類と、より原始的で顎を持たない無顎類に大きく分けられる。ヤツメウナギは無顎類に属し、初期の脊椎動物の特徴を多く保持していると考えられている。ヤツメウナギの脊椎骨は顎口類の脊椎骨と異なり硬骨ではなく軟骨であり、神経管の左右に弓状構造が不連続に並んでいるだけである (Fig.1)。さらに、幼生の時期は脊椎骨を持たず変態期に脊椎骨が形成される。このようにヤツメウナギの脊椎骨は成分も形状も形成時期も顎口類のものとは大きく異なっており、脊椎骨の初期進化を探るためにはこれらの相同性を検証することが不可欠である。

本研究ではヤツメウナギの発生過程において体節形成期と変態期での脊椎骨形成関連遺伝子の発現パターンを調べ、形成メカニズムの比較からヤツメウナギと顎口類の脊椎骨の相同性を検証することを目的とした。

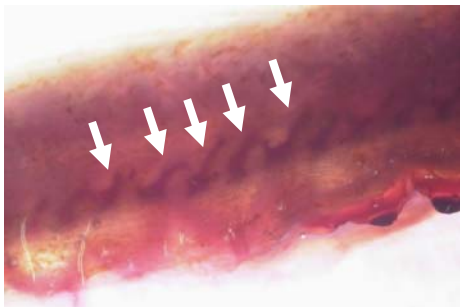


Fig.1 ヤツメウナギのワイゲルト染色。白矢印が脊椎骨²⁾。

2. 材料・方法

胚発生期の観察においてはカワヤツメ *Lethenteron japonicum* を人工授精させ、15 °Cのインキュベーターで必要なステージになるまで生育した。

変態期のカワヤツメは採集が困難であるため変態期の観察は近縁種のスナヤツメ *Lethenteron reissneri* の変態期を用いた。2015年10月に富山県山崎川で採集した変態期前のスナヤツメのアンモシート幼生を15 °Cの水温で変態するまで飼育した。

○*in situ* hybridization

先行研究を参考に *in situ* hybridization を行い、発現している遺伝子を検出した¹⁾。

○凍結切片

PBS 中で保存していた胚を OCT Compound に置換し、クリオスタットで凍結切片を作成した。目的に応じてカワヤツメの体節形成期の胚は *in situ* hybridization 後に切片化し、変態期のスナヤツメは切片化した後に *in situ* hybridization を行った。

○ワイゲルト染色

固定後メタノール中で保存しておいた成体のスナヤツメをエタノールに置換後ワイゲルト液で3日間染色した。染色したサンプルをPBSへと置換し、10% KOH で処理したのち30%飽和四ホウ酸ナトリウム1%トリプシン溶液で透明化した。

3. 結果・考察

○体節形成期での脊椎骨関連遺伝子の発現パターン

顎口類では体節中胚葉の脊索側領域である硬節の細胞が脊索・神経管の周囲に遊離し脊椎骨が形成される。ヤツメウナギでは硬節の存在が確認されておらず、少なくとも硬節のマーカ―遺伝子の一つである *Pax9* はこの時期には体節で発現していないことが報告されている¹⁾。そこで、本研究ではその他の硬節マーカ―遺伝子である *Pax1*、硬節から派生する *syndetome* のマーカ―遺伝子である *Scx*、それらの発現を上流で制御している *Shh*、*Shh* のレセプター遺伝子の *Gli* の発現パターンをカワヤツメの体節形成期の st.25 の胚で検証した。

また、顎口類の体節では表皮側から順に真皮や結合組織に分化する皮節、筋肉に分化する筋節、腱や靭帯に分化する *syndetome*、脊椎骨に分化する硬節の4層構造を形成する。先行研究からヤツメウナギでは st.23 において顎口類の硬節で発現する *FColl1* が体節表皮側で、顎口類の筋節で発現する *MA2* が体節脊索側でそれぞれ発現し、st.25 で *FColl1* の発現領域が体節脊索側にも拡大し *MA2* の発現領域を取り囲むという現象が報告されている²⁾。これは顎口類の体節形成では見られない現象であり、これが *Shh* シグナルに依存しているかどうかを検証するために *Shh* 阻害剤を投与した阻害胚での遺伝子発現パターンを調べた。

○変態期での脊椎骨関連遺伝子の発現パターン

前述の通り、ヤツメウナギの脊椎骨は顎口類と異なり幼生では存在せず、変態期に形成される。そこで、変態期での脊椎骨形成が顎口類の脊椎骨形成と同じメカニズムで行われているのかを検証するため顎口類の脊椎骨形成関連遺伝子の発現パターンを検証した。先行研究から眼が出現する変態期 st.1 で神経管と脊索の周囲に間葉細胞が凝集し、眼が拡大し口が伸長する変態期 st.2 で脊椎骨が形成されることが報告されている²⁾。そこで、変態期 st.2 での脊椎骨形成関連遺伝子の *Pax1*、*Pax9*、*Bapx*、腱のマーカ―遺伝子の *Scx*、それらを上流で制御している *Shh* の発現パターンを切片 *in situ* hybridization で検証した。

各結果・考察に関しては発表会にて報告する。

参考文献

- 1) Ogasawara *et al.* (2000) *Dev Biol* 223, 399-410
- 2) 原田敬士(2012)

『ヤツメウナギの脊椎骨形成に関する進化発生学的研究』
筑波大学院生命環境科学研究科生物科学専攻
修士(理学)学位論文

ワレカラ類における付属肢の発生学的研究—第 3,4 胸肢の喪失と再獲得—

梶野 瑞貴 (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】

進化的に変化・消失した形質は、その系統において祖先状態に戻ることはないと考えられてきた[1]。しかし近年の分子系統解析によって「形質の先祖返り」と考えられるような現象が起きたことを支持する結果が複数の分類群において得られている[2,3,4]。一方でこれらの「形質の先祖返り」が発生学的に実証された例は少なく、その遺伝的・発生学的基盤は大部分が未解明である。

ワレカラ亜目は端脚目に属する海産甲殻類である。分子系統解析の結果からヨコエビ亜目の一群から派生した単系統群であることが支持されているが[5]、ワレカラ亜目の体制はヨコエビ亜目とは大きく異なる。ワレカラ亜目においてはヨコエビ亜目で発達している第 4/5 胸節の歩脚が著しく退化しており、その位置に発達した鰓が露出している、またワレカラにおける腹部は付属肢を持たない痕跡的な 1 節のみであり、第 4/5 胸節の歩脚同様著しく退化している (下図)。

ワレカラ亜目に属するムカシワレカラ科は他のワレカラとは大きく異なる特徴を有する。ムカシワレカラ科に属するものは第 4/5 胸節に発達した歩脚を持つ。かつてこのグループは形態的特徴に基づき、他のワレカラ亜目とは異なる起源を持つことが提唱されたが[6]、分子系統解析の結果ではそのいずれも支持させず、ムカシワレカラ科はワレカラ亜目の内群であることが強く支持されている[5]。このことから第 4/5 胸節の歩脚はワレカラ亜目の共通祖先で消失し、ムカシワレカラ科において再獲得されたことが示唆される。

甲殻類をはじめとする節足動物では付属肢形態など体節の identity が *Hox* 遺伝子の発現領域に大きく影響されることが知られている[7]。そこで本研究ではワレカラ類で第 4/5 胸節の歩脚がどのような遺伝的基盤により消失したのか、さらにはムカシワレカラ科の第 4/5 胸節の歩脚は再獲得形質であるのかを解明することを目的に、*Hox* 遺伝子や付属肢形成に関与していることが知られている遺伝子の発現領域解析を行い、ムカシワレカラ科と他のワレカラ類間での発生形態の比較を試みた。

【材料・方法】

ワレカラ亜目の典型的な体制を示すものとしてワレカラ科に属するトゲワレカラ (*Caprella scaura*) を材料に選び、遺伝子発現領域を解析、比較することで第 4/5 胸節の付属肢の形成に関与している遺伝子の探求を試みた。またトゲワレカラとムカシワレカラ科間で発生の比較を行うため、発生に関する知見がないムカシワレカラ科における発生の記載を試みた。ムカシワレカラ科の採集はドレッジで行う必要があるため、三崎臨海実験所にて採集記録があるムカシワレカラ (*Protomima imitatrix*) を材料に選んだ。胚は採集した母体が抱卵していたものを固定し、実験に用いた。

① サンプルング

・4~7 月にかけて神奈川県横浜市本牧漁港および山下公園にて、ロープや浮きに付着していたトゲワレカラを採集した。

・6 月、11 月にそれぞれ三崎、下田にて行われた JAMBIO 沿岸生物合同調査にてドレッジによりムカシワレカラを採集した

② 遺伝子発現解析

トゲワレカラの体節形成期~pre-hatch の胚から total RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を行った。得られたトランスクリプトームデータをもとに primer を設計し、トゲワレカラの cDNA から各遺伝子を単離。単離された DNA 鎖を鋳型とするプローブを作成し、*in situ hybridization* によってトゲワレカラの発生段階における遺伝子の発現領域の可視化を試みた。

【結果・考察】

① 三崎では水深 100 m 付近、下田では水深 170~200 m 付近のドレッジでムカシワレカラが採集された。三崎では 2 頭の抱卵個体が、下田でも産卵間近のメスが採集されたことから周年発生していると考えられる。

② *Antp*, *Ubx*, *abdA*, *AbdB* を単離しプローブを作成した、*in situ hybridization* の結果及び考察は口頭で発表する。

【今後の展望】

今後は遺伝子の機能解析を進めるとともに、細胞レベルの発生形態を解析・比較することにより、ムカシワレカラの第 4/5 胸節の歩脚とトゲワレカラの鰓の相同性を検証することを試みる。

【参考文献】

- [1] L. Dollo (1893) BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ BELGE DE GÉOLOGIE 8:164-166
- [2] Collin R, Miglietta MP (2008) Trends Ecol Evol 23:602-609
- [3] JJ Wien (2011) Evolution 65:1283-1296
- [4] Whiting MF, Bradlar S, Maxwell T (2003) Nature 421:264-267
- [5] A. Ito, MN. Aoki, K. Yahata, H. Wada (2011) Dev Genes Evol 221:133-140
- [6] Takeuchi I (1993) J Nat Hist 27:947-964
- [7] Michalis Averof, Nipam H. Patel (1997) Nature 388:682-686

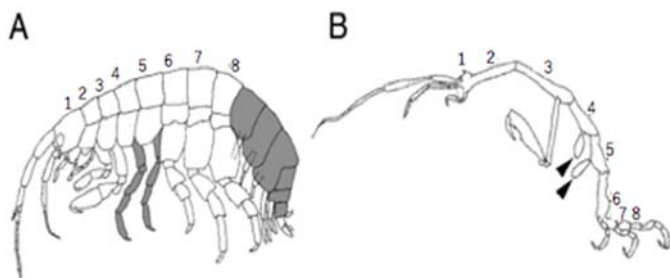


図: ヨコエビ(A)とワレカラ(B)の体制の概略、ワレカラではヨコエビの図で塗りつぶされた第 4/5 胸節の歩脚と腹部が退化している。第 4/5 胸節には鰓が露出する (矢尻) (Ito *et al.* 2011 を改変)

ヒトデのブラキオラリア腕に関する進化発生学的研究

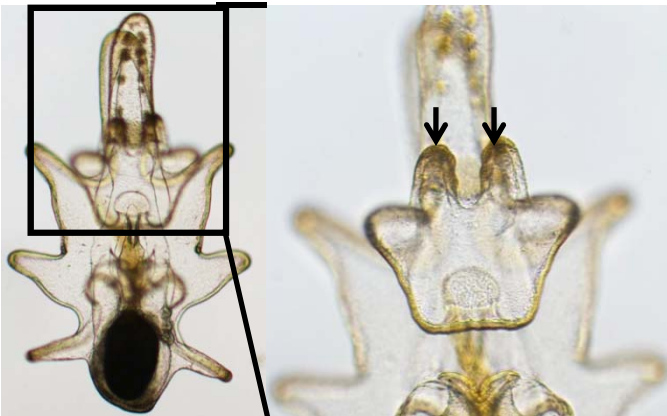
仁戸部 真生 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

多くの海産無脊椎動物のプランクトン幼生は変態を経て底生の成体へと形を変える。その中でも変態時に海底への付着が必要な種では、幼生は様々な付着構造を用いて海底に接着する。棘皮動物門ヒトデ綱の幼生に見られるブラキオラリア腕は、このような接着構造の1つである。ブラキオラリア腕は上皮の突起に体腔が陥入した構造であり、ヒトデ綱において新奇に獲得された形質である(図)。また、採餌型幼生のブラキオラリア腕は採餌無しでは形成されないと考えられている。しかし、ヒトデ綱の中にはモミジガイ(*Astropecten scoparius*)のようにブラキオラリア腕を持たない幼生も存在しており、近年の分子系統解析の結果はモミジガイが二次的にブラキオラリア腕を失ったことを示唆している。

そこで、本研究ではヒトデの新奇形質であるブラキオラリア腕がどのように獲得され二次的に失われたのかを明らかにする。そのために、イトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*)の幼生でブラキオラリア腕の形成過程を観察しモミジガイ幼生と比較する。加えて、採餌型であるイトマキヒトデ幼生において餌の有無でブラキオラリア腕の形成や体腔の発達にどのような違いが見られるのかを観察した。また、ブラキオラリア腕に関しては知見が少なくその形成時に発現する遺伝子が不明である。このため卒業研究では、イトマキヒトデとモミジガイの幼生の遺伝子発現を比較するためにイトマキヒトデのブラキオラリア腕で発現する遺伝子を探索した。



イトマキヒトデのブラキオラリア幼生(左)とブラキオラリア腕の拡大図(右)

材料・方法

1. 採集と発生

イトマキヒトデ(採集地:茨城県大洗、千葉県館山、青森県浅虫)とモミジガイ(採集地:千葉県館山、静岡県下田)を採集し、人工授精によりイトマキヒトデ幼生とモミジガイ幼生を得た。

2. ブラキオラリア腕形成と細胞分裂

ブラキオラリア腕形成のメカニズムを知るために、イトマキヒトデ幼生とモミジガイ幼生において前体腔の成長を観察した。加

えて、餌を与えた幼生と与えなかった幼生で成長がどう異なるかを観察した。また、イトマキヒトデ幼生の体腔においてリン酸化ヒストン H3 抗体で細胞分裂中の細胞を検出し、YOYO-1 を用いて幼生の核を染色、核の数や核間の距離を共焦点顕微鏡で観察した。

3. ブラキオラリア腕で発現している遺伝子の探索

ブラキオラリア腕形成時に発現している遺伝子を探索するために、イトマキヒトデ幼生において候補となる遺伝子(以前に体腔で発現が見られていた *twist*)の *in situ hybridization* を行った。

結果・考察

ブラキオラリア腕形成に着目してイトマキヒトデとモミジガイの発生を比較した結果、イトマキヒトデでは左右の前体腔が融合した後三叉状になり前方へ伸張するのに対し、モミジガイではイトマキヒトデに比べて体腔の前方への成長が遅く変態直前に前体腔の左右が融合することどまった。

また、餌を与えないで飼育したイトマキヒトデの幼生では、ブラキオラリア腕が形成されない事を確認した。このとき、餌を与えた幼生のように前体腔が三叉状になることは無かったが、前体腔が左右で融合しその後前方へ伸張することは確認した。つまり、餌を与えなかったイトマキヒトデ幼生とモミジガイ幼生では前体腔の到達する位置が異なった。このため、モミジガイ幼生はブラキオラリア腕形成プロセスのうち餌に依存したものを失ったというだけではないと考えられる。

ブラキオラリア腕形成に伴う体腔の伸張が細胞分裂によるものかをリン酸化ヒストン H3 抗体を用いて確認した結果、ビピンナリア幼生の体腔において細胞分裂が起きていることが確認された。しかし、前体腔の先端へのシグナルの偏りは今回の実験では観察できなかった。このため、体腔における細胞分裂は体腔の伸張に関与しているものの、細胞分裂だけによって体腔が伸張しているわけではないと考えられる。よって、ブラキオラリア腕形成時の体腔伸張には細胞分裂だけでなく他の要因も関与していると予想される。

in situ hybridization の結果、*twist* が後期ブラキオラリア幼生のブラキオラリア腕で発現していた。このことから *twist* はブラキオラリア腕の形成に関与していると考えられる。

今後の展望

今後もブラキオラリア腕で発現する遺伝子を探索しつつ、モミジガイとの発現の比較のため、両種の発生の対応について把握していく。

ブラキオラリア腕の形成に関しては、アクチン繊維を染色するファロイジン等を用いて体腔の細胞成長を観察し、体腔伸張の要因を明らかにしたい。

南西諸島および台湾のウスモンアメバチ属 *Leptophion* の分類学的研究

清水 壮 (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】

ウスモンアメバチ属 *Leptophion* は膜翅目ヒメバチ科アメバチ亜科に属する寄生蜂の一群で、東洋区、オーストラリア区、オセアニア区から 30 種が知られている (Gauld 1977; Gauld & Mitchell 1981). 灯火に飛来することが知られているものの、生態的知見は乏しい (Gauld 1985; Gauld & Mitchell 1981). 本属は、特にスダ棚の島嶼域に高い種多様性が知られる南方系のグループであり、その他の地域での種多様性は低いと考えられてきた (Gauld 1985). そのような中、筆者は南西諸島および台湾から本属の正体不明の複数種を確認した. 本研究では、日本産および台湾産の本属の分類学的検討を行うとともに、南西諸島から台湾にかけての島嶼域における種多様性、台湾産種の季節消長、分布を議論した.

【材料・方法】

本研究では、台湾の行政院農業委員会農業試験所、日本の農業環境技術研究所および北海道大学総合博物館に収蔵されている日本産標本 3 個体、台湾産標本 72 個体の合計 75 個体の標本を検討した.

形態の観察は、ニコン社製の双眼実体顕微鏡 SMZ1500 により行い、写真は同社製のデジタル一眼レフカメラ D90 により撮影した. 写真の深度合成は Combine ZP, 写真および図版の編集はマイクロソフト社のペイント, Adobe 社製の Photoshop[®] と Illustrator[®] で行った.

【結果】

全標本を形態種に分類した結果、南西諸島 (屋久島と奄美大島) から 2 種 (図 1A, B), 台湾から 3 種 (図 1C-E) の計 5 種の存在が確認された.

日本産 2 種を既知種全種の記載や標本と比較した結果、いずれも未記載種であったため、Shimizu & Watanabe (2015) においてヒメウスモンアメバチ *L. purvus* (図 1A) およびオオウスモンアメバチ *L. septentrionis* (図 1B) として記載を行った.

台湾産 3 種を既知種全種の記載や標本と比較した結果、2 種は台湾から既に記録がある *L. maculipennis* (図 1C), *L. radiatus* (図 1E) と同定されたが、残る 1 種は未記載種 *Leptophion* sp. (図 1D) であることが確認され、新種記載論文を *Zootaxa* 誌に投稿中である (未記載種は *L. giganteus* の種名で記載予定).

【考察】

本研究により南西諸島および台湾から 5 種が確認され、その内 3 種は未記載種であった. これらの未記載種の発見は、東洋区北部にも高い種多様性が存在することを示唆するものである. さらにオオウスモンアメバチは屋久島から得られており、これは旧北区における本属の初の記録であった.

台湾産 3 種について標本のラベルデータをもとに季節消長を比較した (図 2). *L. maculipennis* と *Leptophion* sp. は 10–3 月、

L. radiatus は 7–9 月にピークがあることが分かる. この季節消長の差異は各種の適応気候や適応標高などの適応環境の差異によるものと考えられ、*L. radiatus* が高標高地、*Leptophion* sp. が中標高地、*L. maculipennis* が低標高地の気候に適応した結果であると考えられる. 実際、*L. radiatus* は標高 2,100 m 以上、*Leptophion* sp. は標高 1,200–1,630 m、*L. maculipennis* は標高 850–1,200 m で採集されている. これは *L. radiatus* が東洋区北部のネパールなどの内地に広く分布すること、*L. maculipennis* が熱帯地域の島嶼域などに広く分布することと矛盾しない.

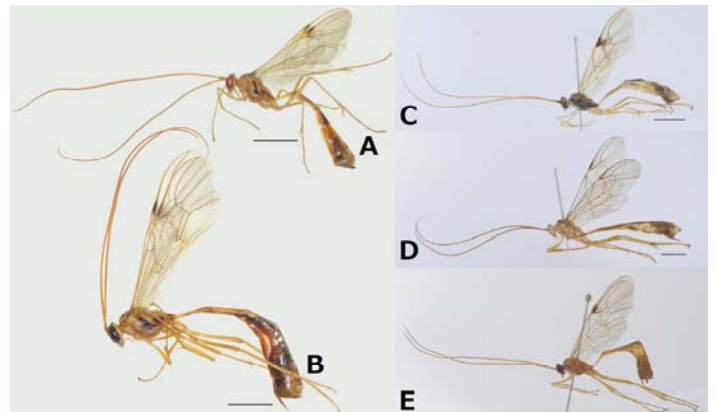


図 1. 日本産 (A, B) および台湾産 (C-E) ウスモンアメバチ属.

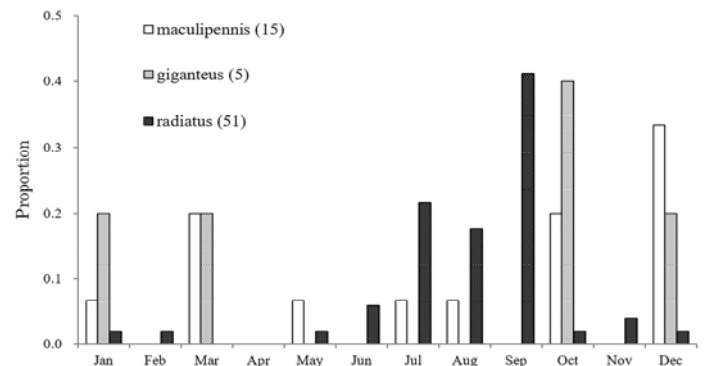


図 2. 台湾産種の季節消長.

【謝辞】

本稿の校閲と助言をして頂いた神奈川県博の渡辺恭平博士と神戸大学の前藤薫博士に深く感謝する.

【参考文献】

- Gauld, I.D. (1977) *Australian Journal of Zoology (Supplementary Series)*, **49**: 1–112.
 Gauld, I.D. (1985) *Bulletin of the British Museum of Natural History (Entomological Division)*, **51**: 61–185.
 Gauld, I.D. & P.A. Mitchell (1981) *The Taxonomy, Distribution and Host Preferences of Indo-Papuan Parasitic Wasps of the Subfamily Ophioninae*. CAB: Slough. Commonwealth Institute of Entomology, London, 611 pp.
 Shimizu, S. & K. Watanabe (2015) *Zootaxa*, **4000**: 111–122.

唇脚類における卵巣の比較形態学的研究

関口 桂菜 (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

唇脚類 (ムカデ類) は、節足動物門多足亜門を構成する 1 綱で、ゲジ目、ナガズイシムカデ目、イシムカデ目、オオムカデ目、ジムカデ目の 5 目から成り、日本にはナガズイシムカデ目を除く 4 目が産する。近年、Miyachi and Yahata (2012) はアカムカデ類 (オオムカデ目) の卵巣構造と卵形成様式について組織学および微細構造学的な特徴を明らかにした。その報告の中で、アカムカデ類においては、胴部の全長近くにおよぶ細長い袋状の卵巣の中で、個々に濾胞上皮に包まれた卵母細胞は、その濾胞上皮の一部で腹側の卵巣上皮に接着していることが記述されている。一方、Herbaut (1974) はイシムカデ目の 1 種の卵形成に関する論文の中で、詳しい位置については記述はないが、濾胞上皮に包まれた卵母細胞が卵巣の左右に列をなして卵巣上皮に接着していると述べている。また、Knoll (1974) はゲジ目の 1 種の胚子発生に関する論文の中で、文章による記述はないものの、濾胞上皮に包まれた卵母細胞が卵巣上皮の背側に接着していると解釈できる図を掲載している。これらの報告は、唇脚類の卵巣において、卵母細胞が濾胞上皮に包まれ、その濾胞上皮の一部で卵巣上皮の特定の領域に接着していることを示している点では一致しているが、卵巣中での卵母細胞の接着する位置については、分類群ごとに異なる特徴をもつ可能性を示唆している。

卵巣は左右相称動物に共通して見られる基本的な器官のひとつであり、次世代の産生につながる卵子を形成する重要な働きを担う器官であることから、系統の異なる動物群の間においても比較可能な相同器官と考えられ、比較形態学的検討の有効な対象のひとつである。特に節足動物においては、卵巣構造の特徴の差異が高次分類体系をよく反映している例が知られている (e.g. King and Büning, 1985; Makioka, 1988)。前述の文献調査から唇脚類に存在すると推測される卵巣中での卵母細胞の配置の差異は、進化の歴史の中で各分類群が分岐する過程で、過去の共通祖先の卵巣構造をもとに分類群ごとに独自の変容を遂げた結果として生じたと考えられ、その中には唇脚類の高次系統関係を反映した特徴が見られる可能性がある。

本研究では、唇脚類の高次分類群ごとの卵巣中での卵母細胞の配置の特徴を明らかにすることを目的とし、日本産唇脚類 4 目を対象として、組織学的手法を用いた観察を行うとともに、比較形態学的検討を行った。

材料と方法

本研究では、日本産唇脚類 4 目を網羅するために、ゲジ目のゲジ *Thereuonema tuberculata*、イシムカデ目のイッスムカデ *Bothropolys asperatus*、オオムカデ目のセスジアムカデ *Scolopocryptops rubiginosus*、およびジムカデ目の 1 種を材料として用いた。それぞれの種は、2015 年 10 月から 2016 年 1 月にかけて、茨城県つくば市、桜川市、石岡市において採集し、成体の雌個体を観察のための試料とした。

試料は、頭部や尾部ならびに付属肢など不要な部分を切除し、胴部を数分割して固定した。固定には Bouin 氏液または FAA 液を用いた。エタノール-*n*-ブタノール系列を用いて脱水および透徹し、パラフィンに包埋した。厚さ 5 μm の連続切片を作成した後、ヘマトキシリン-エオシン染色を施し、生物顕微鏡を用いて観察を行った。

結果と考察

発表では、日本産唇脚類の 4 目それぞれの卵巣の特徴を述べるとともに、唇脚類の系統関係 (ゲジ目 (ナガズイシムカデ目 (イシムカデ目 (オオムカデ目 + ジムカデ目))) に照らして考察を行う。また、他の多足類の 1 綱、倍脚綱 (ヤスデ綱) にみられる同様の知見との比較を行い、両者の類似について指摘する。

Experimental Analysis of Effects of Ocean Acidification on Coastal Phytoplankton Community

CHANG KAI YUAN (筑波大学 生物学類)

指導教員：濱 健夫 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

The continuous development of industry caused many environmental problems on the Earth. Nowadays, ocean acidification due to absorption of atmospheric CO₂ has become a serious global environmental issue and its effects on the marine ecosystems should be observed [1]. Phytoplankton, as a significant primary producer on the earth, is closely related to biogeochemical cycles of bioelements such as carbon nitrogen and phosphorus [2].

Materials and Methods

Change in phytoplankton composition was elucidated by using outdoor culture vessels under acidified and normal conditions in this study. The experiment was continued for 15 days after addition of inorganic nutrient (KNO₃, KH₂PO₄, Na₂SiO₃·9H₂O). Samples were taken for 10 times during the experiment and phytoplankton composition was measured through flow-cytometric analysis and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

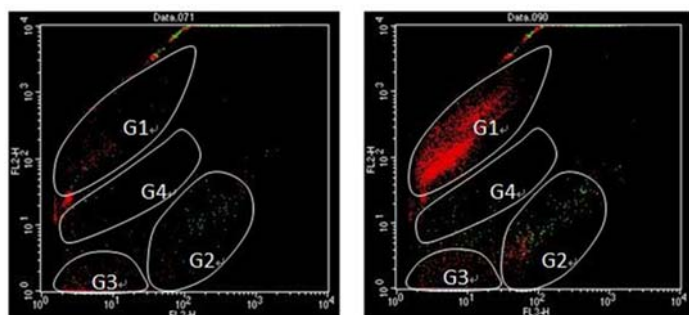


Fig. 1 Flow cytometric analysis of phytoplankton community on day 15 under the normal condition (left) and the acidified condition (right)

Results and Discussion

The increase in the concentration of Cyanobacteria cell numbers and corresponding zeaxanthin pigment under acidified condition were found in the latter part of the experiment (Fig 1). According to the size estimation by flow cytometry, Cyanobacteria was composed of picoplankton with cell size less than 2 μm which assumed to be *Synechococcus* sp. The increase in *Synechococcus* group responding to the addition of nutrients under acidified environment has not been observed so far and this is the first observation. One possible reason of the increase in picoplankton under acidified environment is that high pCO₂ is favorable for picoplankton due to the ability to diffuse inorganic carbon readily within their small cells with less energetic cost. The change in phytoplankton composition dominated with picoplankton in the future ocean will lead to global change since dominance of picoplankton decrease the vertical transport of organic carbon from surface to bottom. Since this vertical transportation of carbon has a significant role to isolate carbon from the Earth's surface to deep ocean, the decline in the efficiency of carbon isolation likely implies that ocean acidification will be positive feedback to global warming [3, 4].

References

- [1] IPCC (2013) <http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/>
- [2] Lalli C, Parsons, T (1995) *Biological Oceanography: An Introduction*, Second Edition, Butterworth-Heinemann.
- [3] John A. Raven and Andrew ikf. Johnston (1991) *Mechanisms of inorganic-carbon acquisition in marine phytoplankton and their implications for the use of other resources.*
- [4] Schulz, Kai Georg; Bellerby, Richard GJ; Brussaard, Corina; Bűdenbender, Jan; Czerny, Jan; Engel, Anja; Fischer, Matthias; Koch-Klavsen, Stephanie; Krug, Sebastian; Lischka, Silke; Ludwig, Andrea; Meyerhűofer, Michael; Nondal, G; Silyakova, Anna; Stuhr, A; Riebesell, Ulf (2013): *Temporal biomass dynamics of an Arctic plankton bloom.*
doi:10.1594/PANGAEA.815226

Thermal performance of the temperate coral *Porites heronensis*: significance for its future distribution

山崎 航 (筑波大学 生物学類)

指導教員 : Sylvain Agostini (筑波大学 生命環境系)

Introduction

A northward shift of hermatypic corals distribution due to the increase in seawater temperature under climate change has been observed in Japan, with further shift predicted in the future. However, the factors limiting the northern distribution of corals and how these affect their physiologies are not well understood.

Most hermatypic corals thrive in tropical or subtropical regions. The main factor limiting their distribution is considered to be the lowest annual seawater temperature. Therefore, it is important to study the physiological response to temperature change of hermatypic corals living in the vicinity of the northern distribution limit.

The present study investigates the thermal performance of a temperate hermatypic coral, *Porites heronensis* and its significance for its ecology and distribution under present and future sea surface temperature.

Materials & Methods

Colonies of *P. heronensis* were collected in the Nabeta Bay, Shimoda City, Shizuoka Prefecture in March and September 2015. Colonies were fractionated in small fragments and the exposed skeletons were covered with marine epoxy. The corals were allowed to recover and acclimate in a stock aquarium for at least one month with running natural seawater, a temperature of 19°C, and a 12h light cycle under metal halide lamp.

Six corals fragments per temperature treatment were randomly moved to an experimental aquarium (same conditions as the stock aquarium, except for the temperature). The seawater temperature was changed 1°C per day from 19°C to the different target temperatures (12, 15, 19, 23, 26, and 29°C). The corals were then incubated for 14 days under the target temperature.

On day 0, 7, and 14, seawater flow was stopped and metabolism (photosynthesis, respiration, and calcification) was measured through incubation. Photosystem II efficiency (Fv/Fm) and buoyancy weight were also measured on these days. On day 14, the corals were sacrificed, their tissues removed from the skeleton using an airjet, and homogenized. Chlorophyll *a* concentration, zooxanthellae density, host protein contents, and coral surface were measured. Daily growth was assessed using the increase in buoyancy weight during total incubation.

Significance of the variation of the measured parameters among the temperature treatments were assessed using ANOVA. If a significant difference was found, thermal

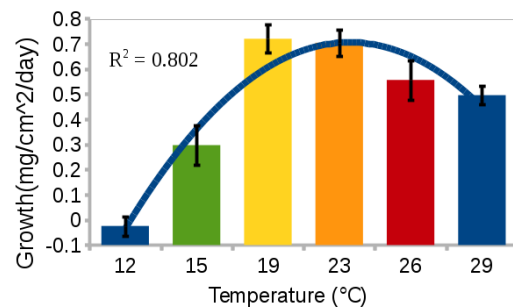
performance curves for each parameters were determined by polynomial regression.

Results

On day 14, net photosynthesis rates, respiration rates, zooxanthellae densities and chlorophyll *a* concentrations were the highest under 19°C. The growth rates also reached a maximum at 19°C, with a slight decrease from 19 to 29°C, and a more drastic towards 12°C. The host tissue proteins contents had similar levels in all treatments.

All coral replicates in the 29°C treatment showed bleaching symptoms: decreased zooxanthellae density, decreased Fv/Fm and negative net photosynthesis rates on day 14. Under 12°C, corals severely bleached during the temperature adjustment period and died within the 14 days incubation.

The thermal performance curve obtained by polynomial regression of the growth rates at the different temperatures, showed a maximum around 21°C.



Discussion

The optimal temperature for the growth of the coral *P. heronensis* was showed to be around 21°C. This temperature is slightly higher than 19°C, the annual average sea surface temperature (SST) observed in Nabeta Bay.

The results obtained showed that the annual lowest SST in Nabeta Bay, 12°C, could limit the growth of *P. heronensis* with bleaching or even high mortality occurring during winter. This result highlights the important role of the annual lowest SST in limiting the northern distribution of corals.

Increased seawater temperature due to climate change could decrease bleaching occurrence and mortality during winter, resulting in an increase in the population of *P. heronensis* in Nabeta Bay. It could also allow a poleward shift of the northern limit of its distribution. The corals showed signs of bleaching at 29°C. The annual maximum temperature in Nabeta Bay being 26°C, a future increase of more than 3°C could lead to possible bleaching during summer even in high latitudes, such as Shimoda City.

γ-tubulin 特異的阻害剤 gatastatin の抗腫瘍活性検討

恵比須 春菜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

微小管作用薬はがん細胞の細胞周期進行を分裂期で停止させ、細胞死を誘導することから抗がん剤として用いられている。しかしながら、paclitaxel や vinblastine などの既存の微小管作用薬は、間期の微小管に対しても作用して微小管ネットワークを破壊するため、時として末梢神経痛を始めとする副作用を引き起こす。このため副作用の少ない分裂期特異的阻害剤が求められている。

我々は中心体に局在し、微小管核形成時に足場としてはたらいしているγ-tubulin¹⁾ (Fig. 1) に対する特異的阻害剤 gatastatin (Fig. 2) を見出し、論文等で報告してきた。²⁾ 既存の微小管阻害剤とは異なり、gatastatin は間期細胞の微小管ネットワークを破壊せずに、細胞分裂期の二極紡錘体形成を阻害することから、副作用の少ない分裂期特異的作用薬である可能性が期待される。そこで、gatastatin の細胞増殖阻害活性とその阻害機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

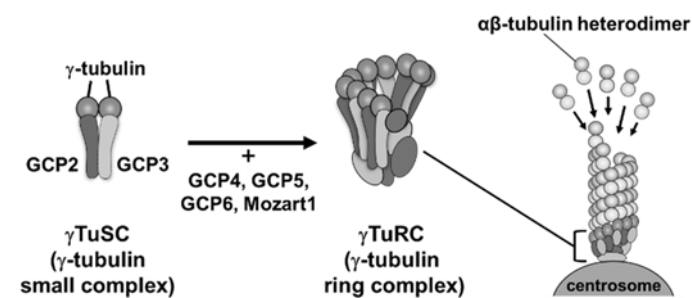


Fig. 1 γ-tubulin

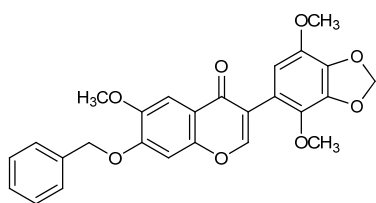


Fig. 2 Gatastatin の構造

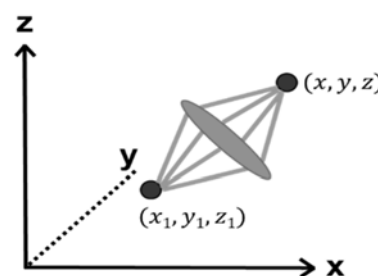
方法

1. 細胞周期解析 (FACS analysis)

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa (3.0 x 10⁴ cells/ml) を 24 時間薬剤処理した後、70%エタノールで固定を行った。1 時間後、PI 染色液 (0.1% sodium citrate, 0.2% Nonidet P-40, 71.1 μM propidium iodide) を加え、DNA を染色した。細胞周期分布を CyFlow® PA (PARTEC) を用いて測定した後、Multicycle AV (Phoenix Flow System) を用いて G1、S、G2/M 期細胞の割合を算出した。

2. 紡錘体形態観察・中心体間距離の計測

HeLa 細胞 (3.0 x 10⁴ cells/ml) を 24 時間薬剤処理した後、70%エタノールで固定した。10 分後、α-tubulin、中心体、及び DNA を、それぞれ抗α-tubulin 抗体 (Santa Cruz, DM1A)、抗 pericentrin 抗体 (Abcam, ab4448)、DAPI で染色し、観察した。さらに、中心体の座標を計測しその距離を算出した (Fig. 3)。



$$\text{中心体間距離} = \sqrt{(x - x_1)^2 + (y - y_1)^2 + (z - z_1)^2}$$

Fig. 3 Pole-pole distance

3. Western Blotting

HeLa 細胞 (3.0 x 10⁴ cells/ml) を 24 時間薬剤処理した後、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% Tween20, 1% glycerol, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail) に細胞を懸濁し、氷上で 15 分静置した。遠心 (15,000 rpm, 3 min) 後、上清に 1/3 量の 4 x SDS sample buffer を加え、煮ることでサンプルとした。

サンプルを電気泳動後、PVDF 膜に 1 時間転写し、5%スキムミルクで blocking を行った。各種アポトーシスマーカーの抗体を用いて western blot を行い、アポトーシスの検出を行った。

結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

参考文献

- 1) Tien-chen L. *et al.*, Targeting of γ-tubulin complexes to microtubule organizing center: conservation and divergence, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 5 (2015)
- 2) Chinen T. *et al.*, The γ-tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle, *Nat. Commun.*, **6**, 8722 (2015)

海産生物由来抗ウイルス活性物質 eudistomin C の作用機構解析

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

背景・目的

カリブ海産のホヤ *Eudistoma olivaceum* から単離された eudistomin C (EudiC)(Fig. 1) は、強い抗ウイルス活性や抗腫瘍活性を示すことが報告されている¹⁻³⁾。しかしその細胞毒性から抗ウイルス剤としての開発は進んでおらず、標的分子や作用機構は不明のままである。EudiC の標的分子や作用機構の解明は、EudiC の抗ウイルス活性と細胞毒性を分離し、抗ウイルス剤としての開発につながるるとともに、新たな薬剤標的分子の発見や、薬剤と標的分子との相互作用や結合様式の解明を通じて新たな薬剤開発基盤となることが期待される。

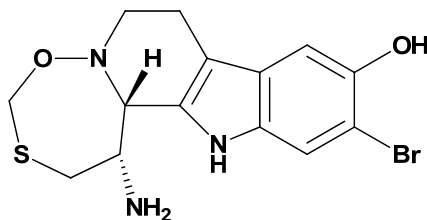


Fig. 1 Eudistomin C (EudiC) の構造

そこで当研究室では EudiC の作用機構の解明、及び標的分子の同定を目指している。標的分子の同定には、遺伝学的手法や Affinity Probe を用いた手法などがある。遺伝学的手法を用いた標的分子同定は、薬剤耐性変異株の単離から始まり、変異遺伝子の同定後、変異遺伝子がコードするタンパク質が薬剤標的分子であるかを様々な手法により検討する。一方、Affinity Probe を用いた手法では、リンカー誘導体や RI ラベル体を使って直接相互作用している結合分子を取得し、そのタンパク質を同定後、標的分子であるか検討する。先行研究では遺伝学的アプローチを進め、多剤超感受性酵母⁴⁾を用いて EudiC 耐性変異株の取得に成功するとともに(Fig. 2)、耐性遺伝子の解析が進められている。

今回、私はもう一つの手法である Affinity Probe を用いた手法により、EudiC 標的分子の同定を試みた。

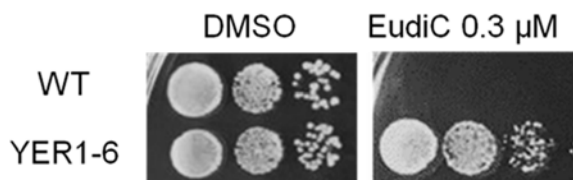


Fig. 2 EudiC 優性耐性変異株の取得

野生株 WT は EudiC を含む寒天培地で生育できないが、EudiC 特異的優性変異株 YER1-6 は EudiC 耐性を示し、生育する。

方法

1. EudiC—結合分子複合体の解析

出芽酵母の細胞抽出液に、ビオチンで標識化した EudiC (ビオチン化 EudiC) またはコントロールとしてビオチン部分のみの linker を添加し、2 時間反応させた。その後ストレプトアビジンビーズを 30 分処理し、遠心によりビオチン化 EudiC 結合タンパク質を回収した。

2. EudiC 結合分子の性質検討

細胞中の EudiC 結合タンパク質の性質を調べるため、分子の大きさや密度によってタンパク質や複合体などを分離することができるスクロース濃度勾配遠心法を用いた。10%~50%のスクロース濃度勾配を形成した遠心チューブに出芽酵母細胞抽出液を重層し、40,000 rpm, 4 °C, 2 時間超遠心を行った。沈降係数ごとに分離した各画分から、1 の手法で EudiC 結合分子の存在する画分を検討した。

結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

謝辞

プローブを合成していただいた、名古屋大学大学院 福山透 特任教授、横山聡 准教授に深く感謝します。

参考文献

- 1) Rinehart Jr., K. L. *et al.*, Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1524-1526 (1984)
- 2) Rinehart Jr., K. L. *et al.*, Eudistomins A-Q, β -carboline from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3378-3387 (1987)
- 3) Lake, R. J. *et al.*, Eudistomins From the New Zealand Ascidian *Ritterella sigillinoides*, *Aust. J. Chem.*, **42**, 1201-1206 (1989)
- 4) Chinen T., Ota Y. *et al.*, Construction of Multidrug Sensitive Yeast with High Sporulation Efficiency, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)

微生物由来可逆的 tight junction 開口物質作用機構解析

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

背景および目的

上皮細胞間接着構造の一つである tight junction (TJ) は、上皮細胞同士を強く接着させることで細胞間を介した異物や病原菌の侵入を防ぐバリア機能を担っていると同時に、バイオ医薬品など高分子物質の通過障壁となっている (Fig. 1)。このため、バイオ医薬品をはじめとする高分子薬剤の投与は、注射や点滴といった侵襲的な投薬方法に頼らざるを得ない。仮に TJ を短時間可逆的に開口することができれば、経口や経皮など患者の負担が少ない投薬が可能になり、患者の生活の質 (QOL; Quality of life) 向上が期待できると考えられる。

トウガラシ辛味成分である capsaicin が腸管上皮細胞層モデル Caco-2 細胞の TJ を可逆的に開口させることが、筑波大学の磯田教授らより報告されている¹⁾。当研究室では同じく腸管上皮細胞層モデルである MDCKII 細胞を用いて、capsaicin の可逆的 TJ 開口作用機構を解析し、TJ 開口には細胞内への Ca^{2+} 流入を引き金とした cofilin の一時的な脱リン酸化と actin の局在変化、及び TJ 構成タンパク質 occludin の減少が重要であること、一方、TJ 開口には actin の再局在化のみが必要であり、occludin 量の回復は必要ないことを報告してきた²⁾。これらの結果から、 Ca^{2+} 流入からの一連の反応による可逆的 TJ 開口機構を明らかにすることができたと考えられる。しかしながら、capsaicin は痛みや辛味のシグナルを伝える TRPV1 受容体のリガンドであるため、臨床へ応用するには課題が多い。以上のような背景の下、当研究室では新規可逆的 TJ 開口物質のスクリーニングを行い、これまで複数の候補化合物を見出している。今回それらの作用機構を capsaicin の作用機構と比較し解析を行った。

材料および方法

単層形成させた MDCKII 細胞層にスクリーニングで得られた新規の TJ 開口候補化合物を 0、10、30、60、120、および 180 分処理した後、SDS sample buffer によって回収した。各サンプルを SDS-PAGE を行い、Western blot により各処理時間における TJ タンパク質 (Claudin-1、occludin)、および TJ 関連タンパク質 (actin、cofilin) の量や修飾変化を検討した。

結果および今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) Junkyu Han, Hiroko Isoda, and Takaaki Maekawa. "Analysis of the mechanism of the tight-junctional permeability increase by capsaicin treatment on the intestinal Caco-2 cells" *Cytotechnology*, **36**, 155-161 (2001)
- 2) Tomoko Shiobara, Takeo Usui, Junkyu Han, Hiroko Isoda, and Yoko Nagumo "The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin" *PLoS ONE*, **8**, e79954 (2013)

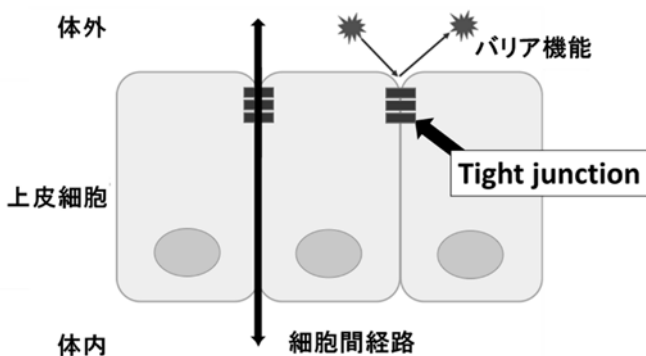


Figure.1 上皮細胞模式図