



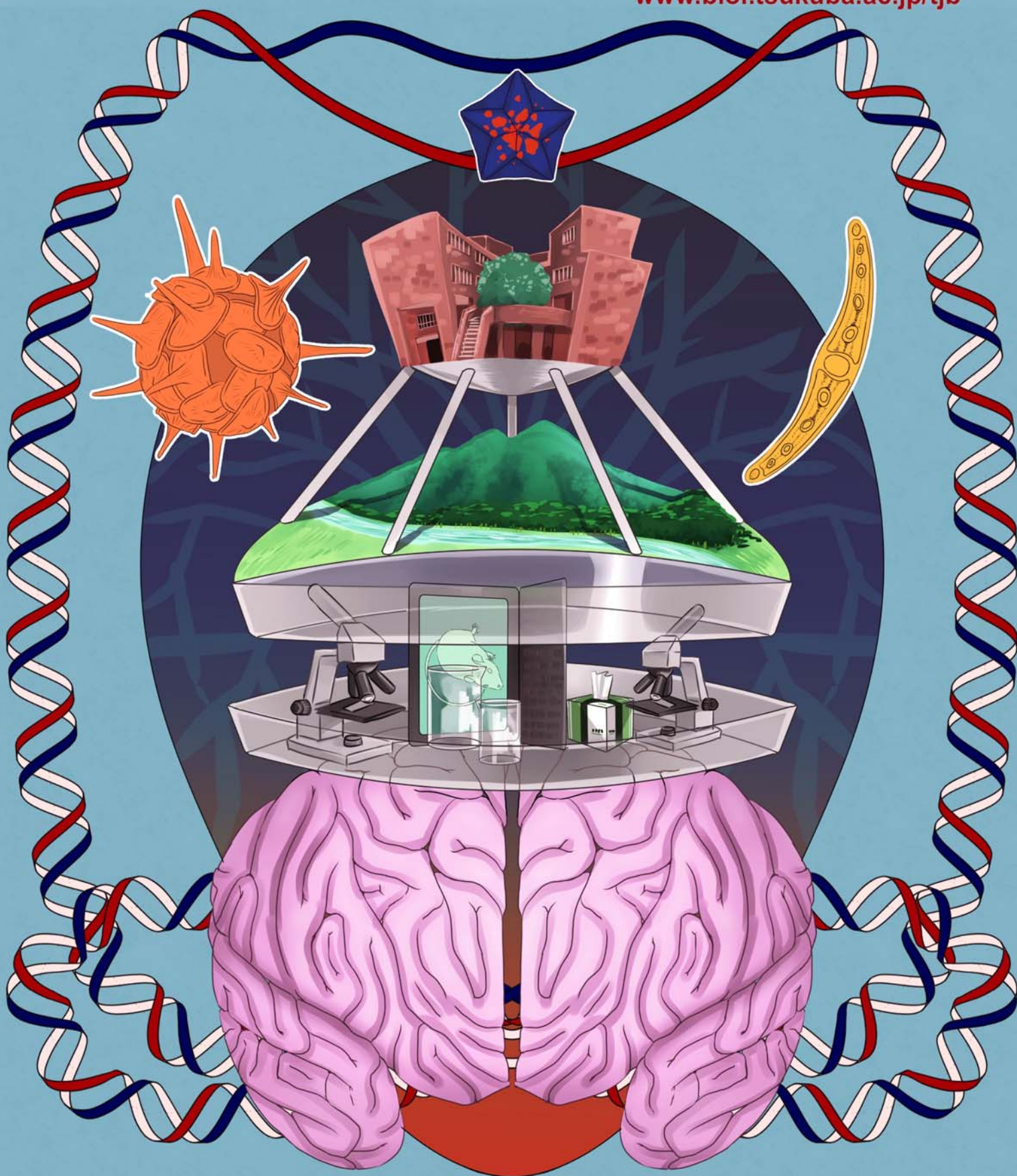
生物学類

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.16 No.1 January 2017

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.16 No.1 January 2017

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

平成 28 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 29 年 2 月 17 日

**筑波大学
生物学類**

第一会場 2B411 教室

9:40 – 9:55	小林 沙羅	ウイルスポリメラーゼを標的とした新規抗インフルエンザ薬の作用機序解析	2
9:55 – 10:10	高木 亮輔	AMPK と TORC1 による小胞体ストレス応答制御機構	3
10:10 – 10:25	玉置 隼也	ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 変異ゼブラフィッシュを用いた血球細胞運命決定メカニズムの探求	4
10:25 – 10:40	鈴木 陸	糖鎖合成関連分子 <i>Cosmc</i> ノックアウトマウスを用いた新規ムチン型糖鎖機能の探索	5
10:40 – 10:55	橋本 沙也加	ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ <i>Sulf1/Sulf2</i> ダブルノックアウトマウスにおける反屈束の形成異常の解析	6
11:10 – 11:25	佐藤 悠樹	細胞外メタロプロテアーゼ ADAM ファミリー分子の脳内における分布	7
11:25 – 11:40	安垣 進之助	うつ病発症に対する人為的レム睡眠操作の影響の解析	8
11:40 – 11:55	杉崎 真	新規トランススプライシング機構を有する遺伝子の検索ツール開発と評価	9
11:55 – 12:10	矢野 更紗	脳内オートファジー異常が引き起こす微小核の形成メカニズムと生理的意義	10
12:10 – 12:25	濱野 直樹	酸化ストレスに対するプロテアソーム制御因子の応答	11
13:15 – 13:30	武井 優芽	収縮環の収縮メカニズムの可視化	12
13:30 – 13:45	水橋 彩	テトラヒメナの飢餓応答とアクチンの働き	13
13:45 – 14:00	村井 彩郁	絨毛虫テトラヒメナのサイクリン依存性キナーゼの同定と細胞機能の解析	14
14:00 – 14:15	北園 和泉	細胞壁異常陥入を引き起こす分裂酵母 <i>Spa2</i> の機能解析	15
14:15 – 14:30	前原 拓弥	テトラヒメナの 13 種類の新奇ミオシン ; MyTH4 ドメインおよび FERM ドメインを持つミオシンの局在解析	16
14:30 – 14:45	平 正史	モデルマウスを用いた多型突然変異型 mtDNA に関する基礎研究	17
15:00 – 15:15	小林 晃平	ミトコンドリア DNA へのランダムな突然変異の蓄積が呼吸欠損を誘導する理由	18
15:15 – 15:30	上田 千恵子	ミトコンドリア機能異常における脂肪組織の基礎病理	19
15:30 – 15:45	石崎 光理	突然変異型 mtDNA が骨格筋タンパク質の合成・分解に及ぼす影響の解析	20
15:45 – 16:00	小倉 佳奈	突然変異型 mtDNA 導入細胞を用いたミトコンドリア・ダイナミクス因子の解析	21
16:00 – 16:15	福田 恭子	ミトコンドリア DNA の突然変異がウイルス感染ストレス応答に及ぼす影響の解析	22

第二会場 2B412 教室

9:40 – 9:55	渡邊 隆寛	ショウジョウバエ始原生殖細胞において性特異的発現を示す遺伝子の同定	23
9:55 – 10:10	酒巻 由梨奈	ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存技術の開発	24
10:10 – 10:25	石崎 優木	ショウジョウバエの始原生殖細胞における性特異的な遺伝子発現制御機構の解析	25
10:25 – 10:40	添島 香苗	ショウジョウバエの始原生殖細胞におけるポリコームグループ遺伝子の発現解析	26
10:40 – 10:55	島寄 健瑛	網膜の瘢痕再生転換因子探索に向けたトランスジェニックイモリの作製	27
11:10 – 11:25	阿部 将之	線虫 <i>C. elegans</i> に対する米ケフィランの生理活性機能の解析	28
11:25 – 11:40	村井 隼弥	線虫のストレス耐性に対するアイスプラント抽出物の生理作用解析	29
11:40 – 11:55	須藤 華織	香り成分による線虫 <i>C.elegans</i> のストレス耐性の解析	30
11:55 – 12:10	田中 智行	ウシガエルにおける視細胞の電気生理学的解析	31
12:10 – 12:25	田中 千智	イモリ松果体における光受容タンパク質の局在	32
13:15 – 13:30	佐久間 貴之	イモリ嗅細胞における揮発性匂い物質とアミノ酸応答の電気生理学的解析	33
13:30 – 13:45	丹羽 文太郎	アカハライモリの陸上・水中飼育における嗅覚応答性変化の解析	34
13:45 – 14:00	平良 恵大	ゾウリムシの刺激応答性に対する光の効果：光条件の定量的検討	35
14:00 – 14:15	萩原 和輝	ゾウリムシの H^+ に対する行動反応：順応 pH と集合 pH の関係	36
14:15 – 14:30	大川 奈都美	外界の圧力変化に対するゾウリムシの行動反応	37
14:30 – 14:45	坪川 淳俊	ゾウリムシの機械刺激に対する行動反応：刺激の違いと行動反応の関係	38
15:00 – 15:15	上山 拓己	ヘテロクロマチン領域内遺伝子の発現を制御する転写因子 Ouija board の活性調節メカニズム	39
15:15 – 15:30	木村 滯	含窒素ヘテロ環化合物の微生物による分解に関する研究	40
15:30 – 15:45	関口 尚樹	Terpendole E の KSP 阻害機構解析	41
15:45 – 16:00	蝦名 渉平	γ -テルピネンの植物生育促進作用の検討と β -カリオフィレンとの作用性比較	42
16:00 – 16:15	斎藤 龍平	(S)-(+)-カルボンの植物生育抑制作用におけるキシログルカンエンドトランスグルコシダーゼ/ヒドロラーゼ(XTH)および活性酸素の関与の検討	43
16:15 – 16:30	永井 輝一	タイヌビエ CYP81A 遺伝子の除草剤代謝機能の解析	44

第三会場 2C404 教室

9:40 – 9:55	細田 胡桃	カニ類における自切位置の再検討	45
9:55 – 10:10	栗林 茉理乃	真正クモ類における歩脚基部の構造について	46
10:10 – 10:25	岡田 朋之	多足類の骨格構造の観察への試料透明化法の適用の試み	47
10:25 – 10:40	山川 隼平	イトマキヒトデにおける五放射相称の発生機構について	48
10:40 – 10:55	角田 淳平	冠輪動物(Spiralia)特異的なホメオボックス遺伝子群の二枚貝における発現解析	49
11:10 – 11:25	田中 直歩	糸状不完全菌 <i>Aenigmatospora</i> の謎 ("enigma") に迫る —キシヤヤスデを介する生活史の解明—	50
11:25 – 11:40	奥西 宏太	日本産 <i>Allomyces</i> の分類学的研究	51
11:40 – 11:55	須藤 悠太郎	スミレ属植物を宿主とする不完全サビキン <i>Uredo</i> 属菌の系統分類学的検討	52
11:55 – 12:10	青谷 樹里	ヤブレツボカビ類細胞の浮遊性と凝集性～水産養殖用初期餌料に向けて～	53
12:10 – 12:25	渡邊 晃太郎	新規無色鞭毛虫 SRT310 株はマリモナス目（ケルコゾア）の再検討を促す	54
13:15 – 13:30	チョンスンホ	ハプト藻 <i>Chrysochromulina</i> sp.に対する海洋酸性化の影響	55
13:30 – 13:45	佐伯 瑛	海洋表層における蛍光性溶存態有機物の動態に関する実験的解析	56
13:45 – 14:00	岩澤 絵梨	大型藻類起源溶存態有機物の微生物学的・光化学的分解過程	57
14:00 – 14:15	中田 貴子	樹形・葉の形質の変化からみた林冠構成種の若齢期における光環境に対する応答	58
14:15 – 14:30	有水 理菜	ススキ草原の野焼きが土壌呼吸速度と地上部バイオマスに与える影響	59
14:30 – 14:45	笹森 猛夫	三宅島の火口周辺における特異な微地形がススキの生育に与える影響	60
15:00 – 15:15	山川 宇宙	神奈川県相模川水系のカワアナゴ <i>Eleotris oxycephala</i> 集団に対する温排水の影響	61
15:15 – 15:30	高野 美幸	花の向きは訪花者相の‘フィルター’として機能しうるか？ ～操作実験による採餌行動の比較	62
15:30 – 15:45	坂本 昂佑	外来キク科植物における在来昆虫の訪花目的と送粉量	63
15:45 – 16:00	我孫子 尚斗	ムラサキツメクサ群落におけるヒゲナガハナバチ類の訪花行動	64
16:00 – 16:15	井戸川 直人	蟄居型コロニー創設を行なう女王アリの資源配分	65
16:15 – 16:30	Andrew Masami Soewandi	Phenotypic Evaluation of Strawberry (<i>Fragaria ananassa</i>) under Auxins and Cytokinins in vitro Culture	66

第四会場 2C410 教室

9:40 – 9:55	鈴木 靖章	イネの発達過程におけるペクチン制御機構の機能解析	67
9:55 – 10:10	宮越 茜里	環境ストレス条件下における早期トマト果実の形態と細胞壁構造の変化	68
10:10 – 10:25	山田 佳央理	環境ストレス条件下のトマト果実発達過程における種子とローキュラーの変化	69
10:25 – 10:40	細川 花栄	果実成熟過程におけるペクチン制御機構に対する塩ストレスの影響	70
10:40 – 10:55	大場 裕介	シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合における原形質連絡カローズ結合タンパク質の関わり	71
11:10 – 11:25	長山 照樹	細胞壁改変イネを用いた AI 耐性に関与する細胞壁成分の探索-	72
11:25 – 11:40	木村 郷子	細胞壁キシラン分解物によるイネいもち病感染応答機構	73
11:40 – 11:55	ガニエ 拓也	I have GA, I have a GPU. Uh...~R における並列計算による遺伝的アルゴリズムの高速化~	74
11:55 – 12:10	八木 浩樹	鷺の巣は。	75
12:10 – 12:25	三田 堂人	Ikimon GO	76
13:15 – 13:30	鷺塚 滯	アサガオの花成誘導機構における microRNA 標的遺伝子の機能解析	77
13:30 – 13:45	伊藤 有梨	ウイルス様粒子を用いた遺伝子組換え作物による食べるワクチンの開発に関する研究	78
13:45 – 14:00	高岡 美予	花粉症治療に向けたスギ花粉アレルゲンの大量発現系に関する研究	79
14:00 – 14:15	堀 雄希	デリバリー技術の適応によるゲノム編集トマト作出に関する研究	80
14:15 – 14:30	林 奈々美	<i>Δ9 desaturase</i> 遺伝子導入ユーカリの隔離圃場における不飽和脂肪酸産生量と耐冷性の相関性の検証	81
14:30 – 14:45	眞玉橋 將央	サツマイモ <i>β-amylase</i> 遺伝子の多様性解析	82
15:00 – 15:15	小林 孝太郎	シアノバクテリアの光呼吸経路の改変によるグリコール酸の合成に関する研究	83
15:15 – 15:30	竹島 蒔人	5 種のアルケノン産生ハプト藻の貯蔵物質への炭素分配様式の解析	84
15:30 – 15:45	Li Jung Hi	Optimization of the environmental factors for the growth and biomass production of the green alga, <i>Monoraphidium neglectum</i>	85
15:45 – 16:00	岩崎 素英	黄色アメーバ状藻類 1 新種の分類学的研究	86
16:00 – 16:15	印南 椋矢	緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の性転換株における性特異的な接合装置の空間配置	87
16:15 – 16:30	Karen Sanford	Behavioral Genetics of Pain Sensation in Fruit Flies	88

平成 28 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

小林 沙羅

桑原 ひかる

佐々木 悠子

關 岳陽

高瀬 由布果

竹山 優花

田中 千聡

町野 弘明

向峯 遼

山本 鷹之

脇田 一樹

表紙画

細田 胡桃

表紙画の解説：

制約を受けながらも、認識すること考えること、実際に手を動かすこと、そして自分を取り巻く生物たち、そういったものを基礎にして研究が行われている、というのをイメージしてインドの宇宙図を参考に書きました。後ろの卵の中にある木は、系統樹でもあり枝分かれして広がる生物学全体でもあります。走る亀裂は違っていても、中の真理を見るためヒビを増やして殻を破っていくことが研究なのではと思います。

平成 28 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあって

小林 沙羅（筑波大学 生物学類 4 年）

4 年前の入学式。新しい環境への希望と不安でいっぱいだった胸中が、つい昨日のことのように思い出されます。田舎育ちだった私は、つくばの豊かな自然に少しほっとしたものです。たくさんの動植物に触れながら、同級生と共に生物学を学びました。そうするうちあっという間に大学生活の 1 年が終わりを迎え、いざ足を運んだ卒研発表会でしたが、ほとんど理解できなかったのが正直なところ。自分の知識の少なさ、また生物学の深さ、広さを痛感させられました。

3 年生になると、今度は運営側として卒研発表会に臨むことになりました。先輩方に心おきなく一年の集大成を披露してもらおうと、スタッフ代表として準備、運営に奔走しました。慰労会で卒業生のほっとした顔を見て、自分もやっと肩の力が抜けたのを覚えています。たくさんの同期や後輩の皆さんの協力のおかげで、先輩方の晴れの舞台を無事終えることができました。

4 年生になり、いよいよ自分が発表する立場となりました。配属する研究室が決まり、自分のテーマに打ち込んできましたが、自分の知識の乏しさを突きつけられる毎日です。皆で同じ授業を受けていた頃とは違って、互いに顔を合わせる機会も少なくなりましたが、それぞれが自分の研究に懸命に取り組んできたことと思います。発表会ではその努力の証と共に、一回り成長した卒業生の姿をご覧いただけることでしょう。

後輩の皆さんにとって、この発表会は自分の将来について考えるよい機会です。研究内容や発表の姿勢を見て、1 年後、2 年後の自分の理想像を想像してみてください。また、どんな些細なことでも積極的に質問してみてください。小さなことにも疑問を持つという姿勢は皆さんの卒業研究にもきっと役に立つと思います。

最後になりますが、忙しい中卒研発表会の準備・運営をしてくださった 2、3 年生の皆さん、本当にありがとうございました。そして、4 年間授業や実験、卒業研究等を通してご指導いただきました先生方に心より感謝申し上げます。

ある日旅行からつくばに戻ってくると、「帰ってきたな」と思っている自分に気がつきました。4 年という歳月のうちにすっかりここに馴染んでいたようです。振り返れば、豊かな自然のうつろいを肌で感じながら月日を重ねることができました。そのように過ごした 4 年間だからこそ、つくばがもう一つのふるさとのように感じられるのでしょう。教科書からだけでなく、周囲の生き物からも生物学を学べたことをとても幸せに思います。

Communicated by Kenji Miura, Received November 15th, 2016.

ウイルスポリメラーゼを標的とした新規抗インフルエンザ薬の作用機序解析

小林 沙羅（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ヒトで呼吸器疾患を引き起こす病原体で、その感染によって世界で毎年 25～50 万人の死亡者が報告されている。さらに数十年に一度新型ウイルスが出現し、パンデミックと呼ばれる世界的な大流行を引き起こしてきた。

感染の拡大や症状の重症化を防ぐため、これまでワクチンや抗インフルエンザ薬の開発が進められてきたが、新型ウイルスの出現時期やその型を予測することは難しく、ワクチンでは新型ウイルスに対処することができない。さらに、複製酵素であるウイルスポリメラーゼによってウイルスゲノムが変異するため、タミフルなど既存の抗インフルエンザ薬に対する耐性株の出現が問題となっている。このような背景から新型ウイルスにも効果があり、耐性株が出にくい創薬設計が求められている。そこで本研究では、ウイルス株間で高度に保存され、耐性変異獲得の原因となるウイルスポリメラーゼを標的とすることで、全てのウイルス株に作用し、変異を抑制できる抗ウイルス薬の創出を試みた。

インフルエンザウイルスのポリメラーゼは RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり、異なる型間でも 90～95% のアミノ酸配列が保存されている。ウイルスポリメラーゼは PB1 に PA と PB2 がそれぞれ結合して複合体を形成し、PB1 と PA の複合体形成部位はウイルスゲノム上のプロモーター配列への結合に関与する。このプロモーター結合部位を標的とする化合物を分子動力学計算により *in silico* でスクリーニングしたところ、抗ウイルス活性を持つ化合物として No.293 を同定した。

本研究では No.293 の作用機序を解析するため、標的部位のアミノ酸を置換した変異体を作成し、ポリメラーゼ活性や複合体形成能を評価した。また、タミフル存在下と No.293 存在下でそれぞれウイルスを継代し、耐性株の出現頻度を調べた。

【材料と方法】

1. 変異体の作製

PB1 の①Asp27 を Ala に、②Pro28、Pro29、Try30 をそれぞれ Thr、Thr、Ser に、③His32 を Phe に置換した発現プラスミドを作製した。

2. PB1 変異体タンパク質の発現

作製したそれぞれの変異体と PA 及び、PB2 を発現するプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションした。所定の時間で細胞を回収し、細胞抽出液を調製後、各ウイルスタンパク質に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。

3. PB1 変異体の複合体形成能の評価

抗 FLAG 抗体を用いて、PB1、PA、及び Flag-PB2 を過剰発現した細胞抽出液からウイルスポリメラーゼ複合体を免疫沈降し、各ウイルスタンパク質に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。

4. PB1 変異体のポリメラーゼ活性の評価

作製した PB1 変異体と PA、PB2、及び NP を発現するプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションした。また、ウイルス NS 遺伝子の翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子に置換したウイルスゲノムを発現するプラスミドも同時にトランスフェクションした。その後、ウイルスポリメラーゼによって発現したルシフェラーゼ量をレポーターアッセイで検出し、ウイルスポリメラーゼの活性を評価した。

5. 薬剤耐性株出現頻度の評価

2.0×10^5 cells/dish となるよう MDCK 細胞を播種し、細胞接着後に A/Panama/2007/99 株を MOI=0.001 で感染させた。感染 1 時間後に細胞を洗浄し、細胞培養液にそれぞれタミフルと No.293 を添加し培養した。ほとんどすべての細胞で細胞変性が見られた時点で培養上清を回収した。上記と同様の感染実験を繰り返し、継代したウイルスを用いて、タミフルまたは No.293 存在下でプラークアッセイを行なうことにより、薬剤耐性株の出現頻度を評価した。

【結果と考察】

レポーターアッセイの結果、各 PB1 変異体ではポリメラーゼ活性が失われていることが示された。

またプラークアッセイの結果、タミフル存在下で培養したウイルスについて、第一世代からタミフル耐性株の出現が見られた。一方、No.293 存在下で培養したウイルスについては第一世代では耐性株は見られなかった。

尚、詳細な結果については発表会にて報告する。

AMPK と TORC1 による小胞体ストレス応答機構

高木 亮輔（筑波大学 生物学類）

指導教員：入江 賢児（筑波大学 医学医療系）

背景・目的

小胞体は、翻訳されたタンパク質に正しい折り畳みや修飾を施す細胞小器官である。小胞体に変性タンパク質が蓄積すると（小胞体ストレス）、細胞は小胞体ストレス応答経路を活性化し、小胞体ストレスを軽減する。この小胞体ストレス応答経路は真核生物で高度に保存されている。哺乳動物細胞では、IRE1、PERK、ATF6 経路が知られている一方、出芽酵母では Ire1 経路のみが存在する^[1]。小胞体膜貫通型である Ire1 タンパク質は、小胞体内腔の変性タンパク質の蓄積を感知して活性化し、細胞質で *HAC1* mRNA のスプライシングを促進する。スプライシングされた *HAC1* mRNA から翻訳された Hac1 タンパク質は転写因子であり、核へ移行して小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現を誘導する。Ire1-Hac1 経路の活性化は、一時的であれば細胞の恒常性維持に寄与するが、持続的な活性化は細胞に対して毒性を示す^[2]。したがって、Ire1-Hac1 経路の適切な制御が細胞の恒常性維持にとって重要である。

我々の研究室では、出芽酵母 AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）オルソログである Snf1 タンパク質が、Ire1-Hac1 経路を負に制御することを見出してきた^[3]。しかしながら、Snf1 AMPK の下流で機能する因子は分かっておらず、Snf1 AMPK による詳細な Ire1-Hac1 経路制御機構は未だ明らかになっていない。Snf1 AMPK の下流因子の一つとして、Target Of Rapamycin Complex 1 (TORC1) が知られている。TORC1 は Rapamycin 感受性のプロテインキナーゼであり、栄養状態や種々のストレスに応答して細胞成長を制御する因子である。これまでに、グルコース飢餓状態では、Snf1 AMPK が TORC1 活性を抑制することが報告されている^[4]。そこで本研究では、小胞体ストレス応答において Snf1 AMPK の下流で TORC1 が Ire1-Hac1 経路を制御するか検討した。

方法

1. サンプルング

菌株を YPD 培地に植菌し、一晩前培養した。OD を計測し、菌体量を調整して新たな YPD 培地 60 ml に植菌し、4 時間本培養した。Dithiothreitol (DTT: 小胞体ストレスを誘導する薬剤) 添加直前を 0 時間としてサンプルングし、最終濃度 4 μ M となるように DTT を添加して、その後 1.5 時間毎に 7.5 時間までサンプルングした。

2. Ire1-Hac1 経路の活性解析

HAC1 mRNA スプライシングレベルを指標とし、Ire1-Hac1 経路の活性を解析した。サンプルングした菌体について、Isogen、RNeasy を用いて、RNA を抽出、精製した。各サンプルの RNA 濃度を測定して 100 ng/ μ l に希釈し、逆転写反応で cDNA を合成した。イントロンを挟むように設定したプライマーを用いて、PCR 反応で *HAC1* 領域を増幅したのち、アガロースゲル電気泳動した。LAS-4000 による画像解析で、増幅した *HAC1* 断片を検出し、*HAC1* mRNA スプライシングレベルを定量した。

3. Sfp1 細胞内局在の観察

YPD 培地で本培養し、サンプルングした菌体を SD 培地で洗ったのち、蛍光顕微鏡で GFP 蛍光を観察した。

結果

1. TORC と Sfp1 は Ire1-Hac1 経路を正に制御する

野生株で小胞体ストレスを誘導すると、Ire1-Hac1 経路の活性は上昇し、誘導後 1.5~3 時間をピークに徐々に低下する。野生株に TORC1 活性の阻害にはたらく Rapamycin を処理すると、Ire1-Hac1 経路の活性は Rapamycin を処理しない場合と比較して急速に低下した。また、TORC1 の構成因子である Tor1 ないし Tco89 をコードする遺伝子の破壊株においても、Rapamycin 処理と同様の結果がみられた。したがって、TORC1 が Ire1-Hac1 経路を正に制御することが示唆された。

次に、TORC1 の下流因子の同定を試みた。TORC1 の標的因子の一つとして知られる Sfp1 タンパク質は、リボソームタンパク質の発現やリボソーム生合成を制御する転写因子である。Sfp1 は TORC1 にリン酸化されることで核に移行し、脱リン酸化されると核外に移行する^[5]。そこで、*sfp1* 破壊株において小胞体ストレスを誘導したところ、Ire1-Hac1 経路の活性は野生株と比較して急速に低下した。したがって、Sfp1 が TORC1 の下流で Ire1-Hac1 経路を正に制御することが示唆された。

2. Snf1 AMPK は Sfp1 核移行を負に制御する

続いて、小胞体ストレス応答において Snf1 AMPK と TORC1 が Sfp1 を制御しているか検討するため、C 末端に GFP タグを挿入した内在 *SFP1* (*SFP1-GFP*) を有する株で、Sfp1 の細胞内局在を観察した。小胞体ストレスのない状態では、Sfp1 は核に局在していた。それに対して小胞体ストレスを誘導すると、先行研究の通り^[6]、Sfp1 は核外に移行した。次いで、Sfp1 局在に対する Snf1 AMPK の効果を検討した。Snf1 活性型株である *reg1* 破壊株では、Rapamycin 処理した場合と同様に、Sfp1 は小胞体ストレス誘導前から核外に局在した。このことから、Snf1 AMPK は TORC1 活性を阻害することで、Sfp1 核移行を負に制御することが示唆された。

考察

小胞体ストレス応答において Snf1 AMPK の下流で TORC1 と Sfp1 が機能することが示唆された。TORC1 は Sfp1 を介して Ire1-Hac1 経路を活性化し、Snf1 AMPK は TORC1 活性を抑制して Ire1-Hac1 経路を負に制御することが推測される。

参考文献

- [1] P. Walter and D. Ron, *Science* 334, 1081-1086 (2012)
- [2] T. Mizuno *et al.*, *PLoS Genet.* 11, e1005491 (2015)
- [3] J. E. Hughes Hallett *et al.*, *eLife* 4, e09181 (2015)
- [4] H. Lempiainen *et al.*, *Mol. Cell* 33, 704-716 (2009)
- [5] R. M. Marion *et al.*, *PNAS* 101, 14315-14322 (2004)

ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 変異ゼブラフィッシュを用いた血球運命メカニズムの探求

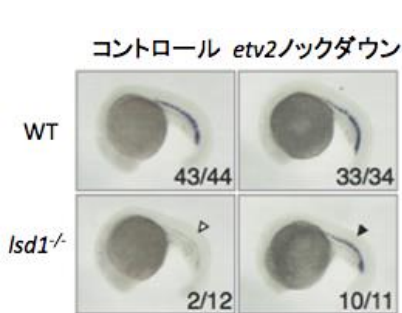
玉置 隼也 (筑波大学 生物学類)

指導教員：小林 麻己人 (筑波大学 医学医療系)

[背景・目的]

単一の遺伝情報しか持たない多分化能細胞でも、エピジェネティクス制御により、異なる性質をもつさまざまな細胞に分化することができる。好例が造血幹細胞で、この細胞は全ての種類の血球細胞へと分化できるが、その理由は生涯を通じてエピジェネティクス制御が行われ続けるからである。私の研究室では、エピジェネティクス制御因子の一つである LSD1 遺伝子の突然変異ゼブラフィッシュを単離・系統化し、これを用いて LSD1 が血球運命決定に重要であることを発見した。本研究の目的は、造血幹細胞におけるゼブラフィッシュ LSD1 の機能を明らかにすることである。

LSD1 は、ヒストン H3 の 4 番目のリジン (K4) を脱メチル化する酵素である。研究室の先輩である竹内らは、胚型造血において、LSD1 変異ゼブラフィッシュが赤血球及び骨髓球細胞の発生遅延を起こすことを見つけ、その原因が、*etv2* という遺伝子の発現亢進によると明らかにした。*etv2* の発現が強くなることにより、血球細胞になるべき細胞がヘマンジオブラストという血球・血管内皮共通前駆細胞で留まる (Takeuchi *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2015)。LSD1 はプロモーター付近に存在するヒストン H3 の K4 を脱メチル化し、遺伝子発現の抑制を促すと考えられているが、竹内らは、ゼブラフィッシュ LSD1 が *etv2* 遺伝子プロモーター付近のヒストン H3K4 を脱メチル化することを実証した。血球分化における *etv2* 発現抑制の重要性は、*etv2* 遺伝子のノックダウンにより、LSD1 変異ゼブラフィッシュの表現型である赤血球及び骨髓球細胞の発生遅延が回復することで証明された。



(図 1) 赤血球マーカー遺伝子を用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。LSD1 変異ゼブラフィッシュで減少する赤血球マーカー遺伝子の発現 (▶) が *etv2* 遺伝子のノックダウンにより回復する (▶□)

(Takeuchi *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2015)。

本研究で私が取り組んだのは胚型造血ではなく、成体型造血である。哺乳類などと同じように、ゼブラフィッシュにおいても、成体では全ての血球細胞は造血幹細胞から作られる。竹内らの準備的解析で、LSD1 変異ゼブラフィッシュが成体型造血においても異常をもつことが示唆されていたが、どの分化段階において、どのように異常が起こっているのかはほとんど調べられていなかった。そこで本研究では、まず、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法で、造血幹細胞や各種血球細胞特異的なマーカー遺伝子の発現を詳細に

調べるとともに、造血幹細胞などの血球系列細胞が特異的に GFP 発光するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を用いて、LSD1 変異体がどのような血球分化異常を示しているかを明らかにする。次に、この血球分化異常が LSD1 のどの作用点により生じるのかを明らかにするために、*etv2* を含む、LSD1 の標的候補遺伝子の遺伝子破壊系統の作製・解析を試みる、という戦略を立てた。これらの解析を通じて、造血幹細胞を中心とする成体型造血における LSD1 の生理機能の解明を行うことにした。

[実験材料・実験方法]

エンブリオの用意：

LSD1 遺伝子のホモ変異体を得るためにヘテロ変異体の雌雄を交配した。得られたエンブリオは必要な発生段階まで育てた後、必要に応じて 4 % PFA で固定した。

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法：

各種マーカー遺伝子の発現を可視化するのに使われた。

DIG でラベルされた RNA プローブを使用し、70°C で一晩ハイブリダイゼーションした。その後、抗 DIG 抗体の検出には BM purple を使用した。

遺伝子型決定：

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法などで解析されたエンブリオを顕微鏡下で撮影したのち、DNA 抽出を行い、LSD1 遺伝子の変異が存在する領域を PCR により増幅し WT の DNA 断片のみを選択的に切断する制限酵素を用いて遺伝子型を決定した。

[結果・考察]

結果は卒業研究発表会にて発表する。

[展望]

今後、2つのことを行っていこうと考えている。1つ目は本研究を継続して行い、目的である造血幹細胞におけるゼブラフィッシュ LSD1 の機能を明らかにすることである。特に、LSD1 の作用点を探すことは、今回、十分に行うことができなかったもので、重点的に行っていきたい。2つ目に行いたいことは、より広い視野で研究するというものである。LSD1 以外にも、造血細胞からの血球分化に関わっている遺伝子は多く見つかっている。本研究で得られた知識や成果を生かして、今後は、他のエピジェネティクスに関わる遺伝子がゼブラフィッシュの造血幹細胞でどのように機能しているのかを明らかにしていきたい。

[引用文献]

LSD1/KDM1A promotes hematopoietic commitment of hemangioblast through downregulation of Etv2. Takeuchi *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2015

糖鎖合成関連分子 *Cosmc* ノックアウトマウスを用いた新規ムチン型糖鎖機能の探索

鈴木 陸 (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】

糖鎖はタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、生体内の多くの膜貫通・分泌タンパク質は糖鎖修飾を受けている。多様な構造が知られている糖鎖の中でもタンパク質のセリンまたはスレオニン (Ser/Thr) 残基に酸素原子を介して糖鎖が結合している構造を *O*-型糖鎖と呼び、その糖鎖の一つ目の単糖が *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。

ムチン型糖鎖の生合成は複数の糖転移酵素の連続した反応によって行われる。ムチン型糖鎖の基本的な構造である Core 1 構造は Ser/Thr 残基に結合した GalNAc にガラクトース (Gal) が結合した構造である。この Gal の付加反応は糖転移酵素である Core 1 合成酵素 (C1galt1) によって行われる。C1galt1 は Core 1 構造合成を触媒する唯一の酵素であり、その機能には C1galt1 特異的分子シャペロン (core 1 synthase specific molecular chaperone, *Cosmc*) が必須である。そのため、C1galt1 または *Cosmc* のどちらか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 欠損マウスと *Cosmc* 欠損マウスは同様の表現型を示し、胎性致死となることが報告されている。このことはムチン型糖鎖が生体の機能に重要な役割を持っていることを示している。しかし、ムチン型糖鎖の生体レベルでの機能については、ほとんどわかっていない。

C1galt1 または *Cosmc* を欠損したマウスは胎性致死になってしまうことがムチン型糖鎖の機能解析を困難にしている要因の一つである。そのため、本研究では CAG プロモーター制御下のタモキシフェン誘導型 Cre ドライバーマウスを使用することで生後時期特異的に全身で *Cosmc* を欠損させたマウス (KO マウス) を作製し、ムチン型糖鎖の新規機能の探索を試みた。

【材料・方法】

・マウス

タモキシフェン誘導型 *Cosmc* 欠損マウス (オス: CAG-CreERT²:*Cosmc*^{fl/y}; メス: CAG-CreERT²:*Cosmc*^{fl/fl}; KO マウス) は、Cre リコンビナーゼを誘導するため 6 週齢のマウスにタモキシフェン (75 mg/kg) を 5 日間連続で腹腔内注射し、注射 5 日目を誘導 0 日目とした。また、Cre(-) のマウスに同様の処理を行いコントロールとした。

・体重、臓器重量と血算

タモキシフェン誘導 10 日目のマウスを解剖し、各種臓器及び末梢血を採取した。各種臓器は重量を測定後、ホルマリン固定し組織学的解析のためにパラフィンブロックを作製した。末梢血は血算の測定に用いた。

・血漿臨床化学検査

脾臓の炎症を評価するため血漿中のアミラーゼ活性を測定した。また、腎機能を評価するため血漿中のクレアチニン濃度を測定した。

・ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色

パラフィンブロックを薄切し HE 染色による組織形態を観察した。

・レクチン染色

Cosmc の欠損による糖鎖抗原の変化を解析するため、糖鎖を認識するタンパク質であるレクチンを用いて組織染色を行った。レクチンは Core 1 構造の前駆構造である GalNAc-Ser/Thr を認識する HPA レクチンを使用した。

【結果】

・体重、臓器重量と血算

KO マウスでは体重が減少した。臓器重量では、コントロールに比べ胸腺、脾臓、脂肪組織が減少し、腎臓では増加が観察された。血算では血小板数がコントロールの 10 分の 1 程度まで減少した。また、白血球数、赤血球数の減少も確認された。

・血漿解析

KO マウスの血漿中アミラーゼ活性はコントロールの 2 倍ほどに増加しており KO マウスが膵炎を起こしていることが示唆された。また、血漿中クレアチニン濃度は KO マウスで増加しており腎臓の過機能が低下していることが示唆された。

・HE 染色

脾臓では脾外分泌細胞の萎縮が認められた。また、白色脂肪組織で脂肪滴が小さくなっていることが確認された。腎臓では蛋白円柱が認められた。

・レクチン染色

脾臓、腎臓、脂肪組織を用いてレクチン染色を行った。いずれの組織においても KO マウスではコントロールに比べ HPA のシグナルが強かった。*Cosmc* の欠損により、糖鎖構造が変化したことが確認された。

【考察と今後の予定】

以上の結果よりムチン型糖鎖が胸腺、脾臓、脂肪組織、腎臓の機能に重要な役割を持っていることが示唆された。また、血小板減少については巨核球の終末分化に起因することがすでに報告されているが白血球、赤血球数減少については報告がない。しかし、上記のように様々な表現型が観察されているため、どの表現型が *Cosmc* の欠損を直接反映したものであるか判断するのは難しい。今後も本研究に用いたマウスを使用し表現型を探索していく。また、脂肪組織特異的ノックアウトマウス、脾臓特異的ノックアウトマウスを現在作製中でありこれらの組織において *Cosmc* 欠損の直接的な影響を評価していく予定である。

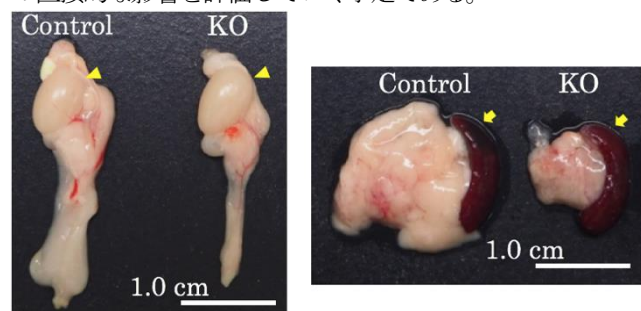


図1, タモキシフェン誘導 10 日目における脂肪組織 (左) と脾臓 (右)。左: 精巢 (矢頭) に付着している白色脂肪組織。右: 脾臓 (矢印) に付着している脾臓。

へパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1/Sulf2* ダブルノックアウトマウス

における反屈束の形成異常の解析

橋本 沙也加 (筑波大学 生物学類)

指導教員：榎 正幸 (筑波大学 医学医療系)

1. 背景と目的

へパラン硫酸プロテオグリカンとはコアタンパクとへパラン硫酸糖鎖から構成される糖タンパクで、細胞表面と細胞外マトリックスに存在し、細胞の分化、増殖、移動に関わる。へパラン硫酸はグルクロン酸またはイズロン酸と *N*-アセチルグルコサミンの二糖単位の繰り返しから成り、2位、6位、*N*位が硫酸化され得る。硫酸基は、シグナル分子との相互作用に重要であり、硫酸化パターンの変化によりシグナル伝達に変化する。

へパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1/Sulf2* は、細胞外でへパラン硫酸の 6-*O*硫酸を分解する脱硫酸酵素であり、硫酸化パターンを変化させて細胞外シグナルを調節する。*Sulf1/Sulf2* ダブルノックアウトマウスでは皮質脊髄路に異常がみられることが明らかになっているが、他の神経線維の走行異常については調べられていない。

手綱核は背側視床に位置する左右一対の神経核であり、前脳と中脳、後脳を繋ぐ中継核として働く。ドパミン、セロトニン系の調節機能を有し、情動と感覚を統合する役割を持つ。手綱核は内側手綱核と外側手綱核から成り、内側手綱核の神経細胞は、反屈束と呼ばれる神経束を介して中脳後部の腹側正中にある脚間核へと投射する (図 1)。内側手綱核の腹側部神経細胞は脚間核中央部へ、背側部神経細胞は脚間核側方部へと投射する (図 2)。反屈束は胎生 9.5 日に伸長し始め、胎生 11.5 日に最初の軸索が腹側正中部に到達する。胎生 13.5 日には繊維が尾側方向へ屈曲し、数回正中中交差しながら脚間核を取り巻いてコイル状の構造を形成する。

本研究では、*Sulf1/Sulf2* ノックアウトマウスにおける反屈束の走行を免疫組織化学と三次元的再構成を用いて明らかにすることを目的とした。

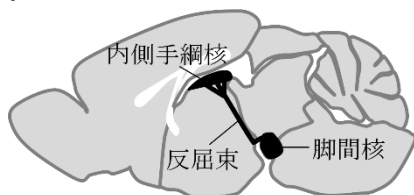


図 1. 成体マウス脳矢状断の模式図

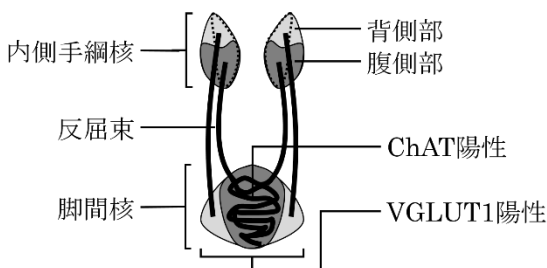


図 2. 反屈束の投射

2. 方法

まず成体マウスにおける反屈束の走行を調べるため、野生型、*Sulf1* または *Sulf2* の単独ノックアウト、ダブルノックアウトのマウスを用いて実験を行った。マウスを深麻酔後 4%パラホルム

アルデヒド (PFA) /リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流固定し、脳を取り出して 4%PFA/PBS により 4℃で一晩後固定した。脳を洗浄後、30%ショ糖/PBS に 4℃で一晩浸漬し、O.C.T. コンパウンドに包埋し凍結した。クリオスタットにて厚さ 50 μ m、冠状断の切片を作製した。

内側手綱核の腹側部に発現する ChAT (choline acetyltransferase) と内側部に発現する VGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1) をマーカーとして免疫組織化学を行った。ChAT については内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため 3% H_2O_2 /80%メタノール/20% DMSO (ジメチルスルホキシド) で 30 分処理し、250 倍希釈した抗 ChAT 抗体と室温で一晩反応させた。洗浄後、1000 倍希釈したビオチン化二次抗体と室温で 2 時間反応させた。感度増幅のため、ABC キットを用いてアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体と 30 分反応させた。3, 3'-Diaminobenzidine (DAB) と 10 分反応後、切片をスライドグラスに貼り付け、Fluoromount G で封入した。切片を明視野顕微鏡と CCD カメラで撮影し、コンピューター上で AutoAligner と Imaris を用いた三次元的再構成を行った。VGLUT1 については ChAT と同様に 3% H_2O_2 /80%メタノール/20% DMSO で処理後、500 倍希釈の抗 VGLUT1 抗体、1000 倍希釈の Cy3 蛍光標識二次抗体を用いて免疫組織化学を行い、顕微鏡で観察した。

次に、発生過程の反屈束に異常が生じているかを調べるために、反屈束の繊維が脚間核へと到達した時期である胎生 15.5 日胚を用いて実験を行った。新鮮凍結胚を用いて、クリオスタットにて厚さ 10 μ m、冠状断の凍結切片を作製した。脚間核背内側部に発現する NKX6.1 (NK6 homeobox 1) と脚間核前部・脚間核中央部に発現する PAX7 (paired box 7) を脚間核のマーカー、ROBO3 (roundabout 3) を反屈束のマーカーとして、VGLUT1 と同様に免疫組織化学を行った。PAX7 と NKX6.1 に対して Cy3 標識二次抗体を、ROBO3 に対して Alexa488 蛍光標識二次抗体を用いて蛍光二重染色した。

3. 結果と考察

Sulf1 または *Sulf2* の単独ノックアウト成体マウスでは反屈束の走行異常はみられなかったが、*Sulf1/Sulf2* ダブルノックアウトマウスでは、ChAT 陽性繊維と VGLUT1 陽性繊維の両方で走行異常が観察された。野生型では、反屈束が中脳腹側正中部の脳表に達した後、後方へ向かって伸長し、脚間核に投射する。ダブルノックアウトマウスでは、脚間核の吻側端において一部の軸索が脳表に沿って側方へと異常に伸長していた。脚間核の後部では野生型と同様にコイル状の構造がみられたが、投射先 (脚間核) の形が背腹方向にやや扁平であった。反屈束が脚間核に達する胎生 15.5 日胚においても、ダブルノックアウトの反屈束に異常がみられた。詳細な表現型については現在解析中である。今後は胎生 15.5 日より前の胚を解析し、反屈束の走行異常が生じていく過程を調べる予定である。

マトリックスメタロプロテアーゼのマウス脳内における発現分布

佐藤 悠樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：富所康志 (筑波大学医学医療系)

【背景と目的】

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) は、細胞外プロテアーゼの一種であり、コラーゲンやプロテオグリカンといった細胞外マトリックスの分解を行うことで知られている。このMMPに属するADAMTS (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type-1 motifs) ファミリー分子は、disintegrin 様ドメインおよびトロンボスポンジン 1 型モチーフをもつ分泌型タンパクであり、高等脊椎動物で数多く同定されている (ヒトで現在 19 個、マウスで現在 19 個)。ADAMTS ファミリー分子は、そのトロンボスポンジン 1 型モチーフを介して、プロテオグリカンと結合することが知られている。ADAMTS-1,4,5,8,9 ならびに 15 は、プロテオグリカンの 1 つであるアグリカンに結合したのち、それを切断する活性を有する [1]。一方で、ADAMTS-4,5 は、アグリカン切断するほか、バーシカン・プレビカンといったプロテオグリカンにも結合し、これらを切断する [1]。ADAMTS-4,5 によるプレビカンの切断は神経系における生理機能、特に神経可塑性と脳腫瘍浸潤との関連が示唆されている [2,3]。さらに、ADAMTS-1,4,8,9 の脳内発現が脳虚血で増加することや、ADAMTS-1 の脳内発現がアルツハイマー病やダウン症患者で増加することから、ADAMTS ファミリー分子が神経変性疾患に広く関連していることが予想される [4]。

ADAMTS ファミリー分子の 1 つである ADAMTS-16 は、ヒトの胎児期において、肺・腎臓・卵巣といった器官にその発現が見られる [5]。特に、軟骨肉腫において過剰な発現が観察されるなど、特定の癌組織に発現がみられるため、癌治療における新規マーカーもしくはターゲット分子としての期待が集まっている [6]。その一方で、成体脳でも ADAMTS-16 は発現しているが [5]、中枢神経系におけるその機能は未だ明らかとなっていない。

そこで、本研究では、ADAMTS-16 の中枢神経系における機能解析を目指し、マウス脳におけるその発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて詳細に検討し、基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法】

プローブの作製

ADAMTS-16 の mRNA から 1000 bp の長さの配列をプローブの配列として選出した。次に、その配列部分を RT-PCR で増幅し、増幅した遺伝子断片をプラスミドベクターにクローニングした。シーケンス解析で正しい配列がクローニングされていることを確認したのち、ベクターを制限酵素で切断し鋳型 DNA を作製した。続いて、この鋳型を用いて *in vitro* 転写を行い、ジゴキシンゲニン (DIG) で標識した RNA プローブ (センスプローブ・アンチセンスプローブ) を調製した。

in situ ハイブリダイゼーション法

胎生 13.5 日目のマウス胚および成体マウスから脳を取り出し、Tissue-Tek O.C.T.コンパウンドで包埋・急速凍結したのち、30

μm 厚の冠状断の切片を作製した。ハイブリダイゼーション前処理として、4%パラフォルムアルデヒド/0.1 M phosphate buffer で 10 分間固定後、100%メタノールで 1 時間脱水操作を行い、続いてトリエタノールアミンによるアセチレーション処理を 10 分間行った。その後、50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション液で 500 ng/ml の濃度に希釈した DIG 標識 RNA プローブを用いて、72°C で 18 時間、切片に対してハイブリダイゼーションを行った。

翌日、72°C の standard saline citrate で 30 分間ずつ 3 回、切片を洗浄したのち、blocking reagent で 1 時間ブロッキングを行った。次に、10,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体をかけ、4 °C で 2 日間反応させた。そののち、nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を用いて、切片を発色させた。

画像比較

in situ ハイブリダイゼーション法で染色した切片を写真撮影したのち、The Mouse Brain (Academic Press) および Developing Mouse Brain (CRC Press) を参照して画像比較を行い、ADAMTS-16 の脳内における発現部位の特定を行った。

【結果と考察】

画像比較の結果、成体脳で ADAMTS-16 の顕著な発現が観察された部位は、内側手綱核、中心傍核、視床背内側核、後内側扁桃皮質、視床室傍核、背側扁桃体外側核、歯状回顆粒細胞であった。このことから、ADAMTS16 は大脳辺縁系において、海馬と扁桃体を軸とした機能的部位に存在することがわかる。また、歯状回や海馬台、アンモン角にも部分的に発現がみられることから、ADAMTS16 は臭いや痛みといった感覚刺激から想起された情動を記憶する際に働いているのかもしれない。

次に 13.5 日胚の脳では、顕著な発現が観察された部位は外側嗅索であり、次いで海馬、海馬神経上皮、延髄網様体であった。また、嗅球や梨状葉皮質、内側縦束などにも発現が観察されていることから、ADAMTS16 は胎生期の嗅覚、視覚、眼球運動の発達に関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

- [1] Stanton H et al. Biochim Biophys Acta 1812: 1616-1629, 2011.
- [2] Dimitrie K et al. PLoS One 7: e7793, 2012.
- [3] Held-weindt J et al. Int J Cancer 118: 55-61, 2006.
- [4] Gottschall PE et al. Matrix Biol 44-46: 70-76, 2015.
- [5] Santiago C et al. Gene 282: 49-62, 2002.
- [6] Alison K S et al. Matrix Biol 28: 416-424, 2009.

うつ病発症に対する人為的レム睡眠操作の影響の解析

安垣進之助（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

うつ病は、意欲・興味の低下、不安や絶望感などの症状を特徴とする精神障害の一種であり、その原因には遺伝的要因とストレスなどの環境的要因がある。また、うつ病の初期症状のひとつとして睡眠障害がみられることが知られており、実際に、うつ病患者は睡眠に何らかの変化が生じることが報告されている。ヒトの睡眠はレム（急速眼球運動）睡眠とノンレム睡眠に大別され、私たちは一晩のうちにレム睡眠とノンレム睡眠、短い覚醒を繰り返している。うつ病患者における睡眠障害ではこのうちレム睡眠に変化が生じることが多く、具体的にはレム潜時（入眠後、レム睡眠に入るまでの時間）の低下や、最初に現れるレム睡眠の持続時間の増加などが挙げられる。しかし、有意な差はみられないとする研究結果や、全く逆の研究結果が報告された例もあり、これからさらなる議論が必要とされている。うつ病の治療には主に抗うつ薬が用いられるが、現在一般的に使用されている抗うつ薬にはレム睡眠の割合を減少させてしまう側面がある。そのため、うつ病の予防やその救済には新規のアプローチが求められている。一方で、この抗うつ薬にみられる特徴を逆手にとって、うつ病においてレム睡眠はむしろマイナス因子としてはたらいっており、レム睡眠の割合を減少させることがうつ病の改善につながるとする主張もある。このように、うつ病発症とレム睡眠との関連については、相反する2つの仮説が真っ向から対立している。

レム睡眠は、脳機能の発達にも深く関与していると考えられている。睡眠全体に占めるレム睡眠の割合は新生児期に多く加齢とともに減少すること、自閉症や注意欠陥・多動性障害（ADHD）などの発達障害ではしばしばレム睡眠の減少を伴うことがその好例である。先に挙げたうつ病も、レム睡眠の異常による脳機能の低下から引き起こされている可能性がある。このことから、レム睡眠と疾患との関連を検討することで発症メカニズムの理解と治療法の開発につながることを期待される。

これらの議論に終止符を打つべく、うつ病モデルマウスに対してレム睡眠を持続的に増加させ、うつ病発症に対する人為的レム睡眠操作の影響を解析しようと試みた。これに先立ち、行動実験によってうつ様状態と評価できる妥当性を有するモデルマウスを作製すること、そして、人為的睡眠操作によりレム睡眠を持続的に増加させることが必要であった。当研究室では、レム睡眠を担う神経細胞を同定しており、人為的に睡眠操作ができるよう開発されたトランスジェニックマウスにDREADD（標的となる神経細胞に人工的にデザインしたGタンパク質共役受容体を発現させ、そのリガンドを腹腔内投与することで一時的に活性化する）を用いることで、レム睡眠を一過的に増加させる手法を確立している（柏木ら、未発表）。しかし、従来のDREADDではリガンドであるclozapine-N-oxide (CNO) の投与が腹腔内注射という手法に限られているため、標的となる神経細胞の長期的な活性化ができないという欠点がある。レム睡眠を持続的に増加させるためには、この欠点を克服しなければならない。そこで、本研究では、ストレス負荷によりマウスのうつ病モデルを作製する

とともに、DREADDを用いながら長期的に神経細胞を活性化しレム睡眠を持続的に増加させる手法の確立を目指した。

方法

(1) うつ病モデルマウスの作製

マウスは野生型 C57BL/6J 系統を用い、ストレス負荷として拘束水浸ストレスを課した。マウスをプラスチック製 50 ml 遠心チューブに拘束して胸部まで水に浸し、2 時間静置した。このストレス負荷を 21 日間にわたって行ったのち、自発活動性と不安様行動、うつ様行動、無快感症状について評価した。評価には、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路、強制水泳テスト、尾懸垂テスト、ショ糖嗜好性テストの 5 つを用いた。また、毎日のストレス負荷時に体重計量も行った。

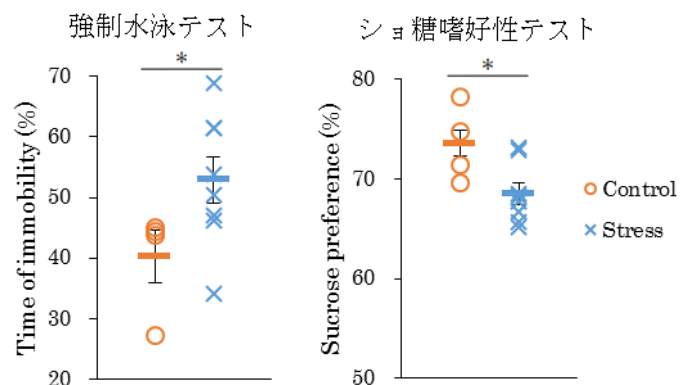
(2) 神経細胞の長期的活性化によるレム睡眠の持続的増加

リガンドである CNO の長期的投与のため、小型の埋め込み型ポンプを用いた。このポンプは、一定の流量で長期的に薬剤を注入することができる。人工的にデザインした G タンパク質共役受容体である hM3Dq を発現させた Dpg-Cre マウスの頭部に脳波および筋電位測定用の電極を取り付け、腹腔内に CNO を含むポンプを埋め込んだのちに脳波と筋電位を記録した。記録された脳波と筋電図は 10 秒ずつのエポックで区切り、レム睡眠、ノンレム睡眠、覚醒の 3 つの状態に振り分けた。

結果と考察

(1) うつ病モデルマウスの作製

ストレス負荷を与えたマウス群において、強制水泳テストではうつ様行動の評価指標である不動時間の増加が、ショ糖嗜好性テストでは無快感症状の評価指標であるショ糖嗜好性の低下がみられた（下図）。これにより、うつ病モデルマウスの作製に成功したと考えられる。



* $P < 0.05$ (Mann-Whitney U -test)

(2) レム睡眠の持続的増加

詳細な結果については発表会にて提示する。

新規トランススプライシング機構を有する遺伝子の検索ツール開発と評価

杉崎 真 (筑波大学 生物学類)

指導教員：橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

《背景》

寄生性の真核生物 *Giardia intestinalis* では、特殊なトランススプライシングによって成熟 mRNA を生成する遺伝子が報告されている。このスプライシングでは、ゲノム上で非常に離れた領域から独立に転写されたエキソンが、付随する分割型イントロン (SPLit INTRON: splintron) を介して結合することで mRNA が成熟する (図 1)。これまでに他生物で splintron の報告はなく、*G. intestinalis* においても 3 遺伝子 (Dynein Heavy Chain, heat shock protein 90, p68 helicase) が報告されるに止まっている。Splinttron が *G. intestinalis* 独自の機構かどうかは疑問の余地があるが、splinttron をゲノムワイドに検出する方法はこれまでなかった。本研究の究極的な目的は、他生物での splinttron の探索・解析を通じて、この機構の成立に至る進化的背景を解明し、真核生物のゲノム進化における新たな知見を得ることである。

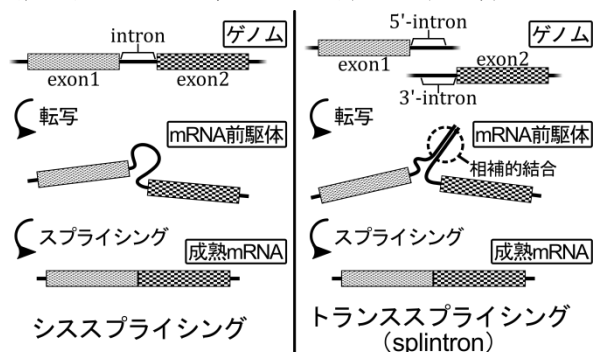


図1

本研究では、*G. intestinalis* をテストデータとし、対象生物のゲノム及びトランスクリプトーム・データを元に splintron をゲノムワイドに検索するツールを開発し、既知の splintron を検出できるかどうか評価した。さらに、*G. intestinalis* 以外の生物でツールの実用性を検討するため、*G. intestinalis* の属する Fornicata 生物群で、系統的に *G. intestinalis* より早期に分岐する自由生活性生物 *Kipferlia bialata* のゲノム及びトランスクリプトームを用い、ツールの結果に対する実験的検証を行った。

《手法》

《ツールの開発》

目標とするツールの動作は、トランスクリプトーム上で一つの成熟 mRNA を構成する塩基配列がゲノム上の非常に離れた領域に由来することを確認した場合、その領域を splintron をもつ遺伝子の候補として検出し、さらに候補としての優位性をスコアリングすることである。これらの動作に必要な、ゲノム配列に対するトランスクリプトーム・データのマッピングには既存のツールである Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いた。開発したツールは、*G. intestinalis* で splintron のもつ 3 つのタンパク質遺伝子に含まれる 8 領域を検出し、且つより高いスコアを付けるアルゴリズムを採用し、図 2 の式によってスコア (S) を算出した。*G. intestinalis* のデータは、公開されているゲノム・データ (GiardiaDB; <http://giardiadb.org/giardiadb/>)、及び所属

研究室で Illumina Hi-Seq の paired-end reads によって取得したトランスクリプトーム・データを用いた。

$$S = 1 - \frac{N_A + N_B - (n_A + n_B)}{n_A + n_B}$$

A : pair が非常に離れた領域にマップされる read が集中した領域
B : A にマップされる read の pair が最も多くマップされた領域
 N_A : A にマップされた read の総数
 N_B : B にマップされた read の総数
 n_A : A にマップされた read のうち pair が B にマップされる read の総数
 n_B : B にマップされた read のうち pair が A にマップされる read の総数

図 2

《*Kipferlia bialata* を対象とした解析》

K. bialata のゲノム、トランスクリプトーム・データは所属研究室の先行研究によるデータを用いた。さらに、ツールの実行で高いスコアを得た、splinttron の存在が予想される領域について RT-PCR 実験を行い、離れたゲノム領域に由来する転写産物が実際に一つの成熟 mRNA を構成するか、実験的に検証した。

《結果・考察》

《*Giardia intestinalis* のデータを用いたツール開発》

G. intestinalis の配列データセットからツールによって検出された 30 領域のうち、splinttron をもつ 3 遺伝子 (Dynein Heavy Chain, heat shock protein 90, p68 helicase) に含まれる 8 領域すべてが確認された。各々の領域は 1, 2, 5, 6, 7, 8, 15, 16 番目に高いスコアとなった。また、残る 22 領域は variant-specific surface protein、或いは ankyrin repeat domain を含むキナーゼとして同定されており、ゲノム内で類似した配列が多数存在するため、塩基配列の類似性によるランダムなマッピングの結果、誤って推定されたと考えられる。一方で、splinttron をもつ領域と同程度の高スコアで推定された領域については、新規の splinttron の可能性があるため今後実験的検証が必要である。

《*Kipferlia bialata* を用いた評価・検証》

K. bialata の配列データセットに対し、3853 領域の splinttron 候補が検出された。そのうちスコアが特に高い 280 領域の中から、偽陽性の可能性が高い領域を手動で除外し、残る 8 領域についてトランススプライシングの有無を確認する RT-PCR 実験の候補とした。8 領域それぞれのスプライシングによる結合を仮定し、得られた 4 種の塩基配列について BLAST による相同性検索を行った結果、cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, protein KTI12, glutamine amidotransferase, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase との相同性が示唆された。分割されたエキソンの一方に forward プライマーを、もう一方に reverse プライマーを設計し RT-PCR 実験を行った結果、予想長の PCR 産物が得られ、塩基配列決定により目的の配列であることを確認した。以上から本研究で開発したツールが、splinttron を *G. intestinalis* 以外の生物においても検出可能であると評価した。また、実際に他の生物でこの機構の存在を確認したことにより、生物種間で splinttron の特性を比較する議論が可能となった。今後は、広範な真核生物のデータを用いた検出・検証を進め、さらなる知見を得ることを目指す。

脳内オートファジー異常が引き起こす微小核の形成メカニズムと生理的意義

矢野 更紗 (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)

【背景と目的】

オートファジーとは、オートファゴソームと呼ばれる扁平膜で細胞質成分を取り込み、リソソームで分解を行う主要な代謝制御機構の一つである。近年、オートファゴソーム形成に必須のタンパク質として、Autophagy-related protein が複数同定されている。中でも Autophagy-related protein 7 (Atg7) は、オートファジーの誘導経路の上流因子として知られている。先行研究では、Atg7^{flax/lox};NestinCre (神経幹細胞特異的 ATG 7 KO) マウスの脳で、重篤な神経細胞の脱落や異常タンパク質の蓄積が起ることが報告されている。このことから、脳の正常な機能にはオートファジーが必須の分子機構であることが考えられる。しかしながら、オートファジー機構の異常が脳内恒常性維持を破綻させるメカニズムの全貌は明らかになっていない。

私は、オートファジーがどのように脳内恒常性維持に寄与するか解析していく過程で、偶然にも神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウス脳の細胞に微小核が蓄積していることを初めて発見した。微小核とは、正常な核とは別に存在する小型の核様構造体であり、染色体異常の指標の 1 つとされている。しかしながら、脳神経系における微小核の形成メカニズムや生理的意義は解明されていない。そこで、本研究では、神経系オートファジー異常により蓄積する微小核の形成メカニズムを解析するとともに、脳内恒常性制御に対する生理的意義を考察することを目的とした。

【方法】

(1) マウスおよび細胞培養

神経幹細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (NestinCre マウス) と ATG7^{flax/lox} マウスを交配し、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスを産出した。細胞は、野生型 ICR マウス胎児 (E13.5) から単離した大脳皮質神経細胞、マウスミクログリア細胞株 BV2 を用いた。

(2) 組織免疫染色

P16 の WT、ATG7 KO マウスの脳を摘出し、パラフィンで包埋した。5 μm の厚さで切片を作製し、抗 NeuN 抗体 (1:1000, Millipore)、抗 Iba1 抗体 (1:1000, Wako)、抗 GFAP 抗体 (1:1000, SIGMA) を用いて、神経細胞、ミクログリア、アストロサイトの染色を行った。核は Hoechst33342 (1:2000, Invitrogen) を用いて染色した。

(3) 細胞免疫染色

細胞を播種したカバーガラスを 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/リン酸生理食塩水 (PBS) に浸し、室温で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、5% BSA/0.4% Triton X-100/PBS でブロッキングした。一次抗体として抗 Iba1 抗体 (1:1000, Wako) を用いて反応させた。核の染色は Hoechst33342 (1:2000, Invitrogen) を用いた。

(4) 微小核形成メカニズムの解析

初代培養神経細胞の培地にオートファジーリソソーム系阻害剤である BafilomycinA1 (300 nM)、コントロールとして PBS を

添加した。2 時間培養した後、PBS で洗浄し、その後 新しい培地を入れ、3 時間培養し、その培地上清をミクログリア細胞株 BV2 の培地と置換した。神経細胞の条件培地で BV2 を 6 時間培養した後、細胞を固定し、免疫染色した。蛍光顕微鏡の 40 倍の対物レンズを用いて、5 視野以上を無作為に選び、微小核を有する細胞数の定量を行った。

【結果・考察】

神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスの脳で微小核が観察されたことから、脳内のどの細胞に微小核が蓄積するか神経幹細胞特異的 ATG7 KO、野生型マウス脳を用いて解析した。その結果、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスにおいて、微小核はオートファジーが機能しない神経細胞、アストロサイトに多く蓄積していた。一方、ミクログリアは胎生期に卵黄嚢に発生した原始骨髄前駆細胞を起源とするため、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスのミクログリアではオートファジーが正常に機能していることが考えられる。しかしながら、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスのミクログリアにおいても微小核の蓄積が観察された。これらの結果から、脳内オートファジー経路には、細胞自律的ならびに非自律的に微小核蓄積を抑制するメカニズムがあることが考えられた。

つぎに、神経系のオートファジー異常によるミクログリア微小核の形成メカニズムを検証するため、『オートファジー異常な神経幹細胞由来の細胞から分泌された因子がミクログリアの微小核形成を誘導する』という仮説を設定した。この仮説を検証するため、オートファジー阻害剤処理をした初代培養神経細胞の培地上清で BV2 細胞を刺激し、微小核を有する細胞数を定量した。その結果、条件培地による刺激がミクログリア微小核の形成を誘導することが示唆された。また、微小核形成誘導因子として、当研究室の先行研究で同定した、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスの脳で発現上昇する細胞外分泌タンパク質 Chemokine (C-C motif) ligand 3 (Ccl3) に着目した。Ccl3 リコンビナントタンパク質を BV2 細胞に添加し、微小核を有する細胞数の変化を検証したところ、Ccl3 処理によってミクログリアの微小核形成が誘導された。このことから、Ccl3 がミクログリアの微小核形成を誘導する因子の有力な候補であることが示唆された。

本研究により、オートファジーが破綻した神経系細胞はミクログリアに非自律的な作用を及ぼし、微小核形成を誘導することが明らかになった。予備的ながら、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスの脳において、活性型ミクログリアマーカーである Iba1 が発現するミクログリアの数が多く、脳内炎症性反応が亢進することを確認している。ミクログリアは、時期並びに領域ごとに性質が変化していく不均一な細胞集団であること、また、微小核は、ゲノム不安定性の指標のみならず、ゲノム再構成にも寄与することが報告されている。今後は神経系のオートファジー異常が引き起こす微小核の形成とミクログリア活性化との関連を明らかにし、ミクログリア不均一性がもたらす脳内恒常性の調節機構を解明していきたい。

酸化ストレスに対するプロテアソーム制御因子の応答

濱野直樹（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◆

タンパク質は自身の役目を終えたり変性したりすると細胞にとって不要となり、その多くがプロテアソームによって分解される。プロテアソームは巨大な酵素複合体であり、特に 26S プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を ATP 依存的に分解していることが知られている。この 26S プロテアソームとは 20S プロテアソームと 19S 制御因子によって構成されており、プロテアーゼ活性を持つ 20S プロテアソームの片端または両端にユビキチン鎖を認識する 19S 制御因子が会合している。

プロテアソームには 19S 制御因子以外にも PA28 α β ヘテロ複合体や PA28 γ ホモ複合体、PA200 などのプロテアソーム制御因子が存在し、それらも 20S プロテアソームと結合することができる。20S プロテアソームと結合したそれぞれの制御因子には特異的な働きが報告されている。

細胞質に存在する PA28 α β ヘテロ複合体はサイトカイン IFN γ に応答し、20S プロテアソームとの結合が誘導されることが報告されている。また 20S プロテアソームのペプチダーゼ活性を促進することも知られている。細胞の核内に存在する PA28 γ ホモ複合体については p53 の制御を行っていること、そして酸化ストレス下において発現が増加することなどが報告されている。PA200 についても 20S プロテアソームのペプチダーゼ活性を促進させるという研究報告がある。

プロテアソーム制御因子は細胞内で 20S プロテアソームと結合、乖離を繰り返している。しかしその現象の誘導や抑制が何によって引き起こされているのか、及びそれぞれのプロテアソーム制御因子が細胞にどのような影響を与えているのかに関してはいまだ不明瞭な点が残っている。

マウス胎児線維芽細胞（MEF 細胞）に H₂O₂ 処理を行うと、細胞内の 26S プロテアソームが 19S 制御因子と 20S プロテアソームに乖離するという現象が先行研究で確認された。また、プロテアソームのペプチダーゼ活性が半分ほどにまで落ちることも報告されている。

酸化ストレス下では 26S プロテアソームが乖離するにも関わらず、ペプチダーゼ活性は完全に失われていない。その原因として、26S プロテアソーム以外のプロテアソームの形成が誘導されているという可能性が考えられる。

本研究では酸化ストレス下において PA200、PA28 α β ヘテロ複合体、PA28 γ ホモ複合体がどのようにプロテアソームの活性に関わってくるのかを解明することを目的とし、野生型のマウスやプロテアソーム制御因子をノックアウトしたマウスから作製した MEF 細胞に H₂O₂ 処理を行い、プロテアソーム機能を解析した。

◆方法・材料◆

●酸化ストレス応答とタンパク質抽出

野生型及びプロテアソーム制御因子ノックアウトMEF細胞を使用した。MEF細胞をD-MEM High Glucoseで1日間培養し、その後H₂O₂ 200 μ Mを含む培地で20分間培養した。コントロールにはH₂Oを用いた。その後細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、細胞溶解バッファー（50 mM Tris-HCl、0.5% NP-40、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、2 mM ATP）で45分間溶解した。細胞溶解液を15,000 rpmで20分間遠心し、その上清を細胞粗抽出液とした。細胞粗抽出液のタンパク質濃度測定はBradford Assayにより行った。

●グリセロール密度勾配遠心

タンパク質量1 mgの細胞粗抽出液を10%-40%グリセロール密度勾配（25 mM Tris-HCl、10%-40%グリセロール、5 mM MgCl₂、2 mM ATP、1 mM DTT）を用いて25,000 rpmで22時間遠心し分画した。分画後のサンプルはフラクションコレクターによって回収した。

●Western Blotting

各分画10 μ lまたは細胞粗抽出液5 μ gをSDS-Sample buffer と混ぜボイルしたのち、SDSポリアクリルアミド電気泳動した。ゲルをメンブレンに転写した後、5%スキムミルクでブロッキングした。メンブレンを5%BSA-TBST/一次抗体に晒し一晩4°Cで振盪後TBS-Tで洗浄した。一次抗体はanti-Rpt1（19Sプロテアソームのサブユニット）、anti- β 5（20Sプロテアソームのサブユニット）、anti-PA28 α 、anti-PA28 γ 、anti-PA200を用いた。2.5%スキムミルク/Horseradish Peroxidase標識二次抗体に一時間晒した後、ECL Reagentを用いて発光させX線フィルムで現像を行った。

●ペプチダーゼ活性測定

Suc-LLVY-AMC を蛍光基質としてペプチダーゼの活性を測定した。サンプルはフラクションコレクターによって分画したものをを用いた。10 μ lのサンプルを終濃度（100 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 μ M Suc-LLVY）の反応溶液 100 μ l で 37 度、50 分間と 90 分間反応させた。蛍光を励起波長 355 nm、蛍光波長 460 nm で測定し酵素の反応速度を求めた。

◆結果・考察◆

現在解析中

収縮環の収縮メカニズムの可視化

武井 優芽 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞の分裂は、生体の維持に必須の生命現象である。この過程は、染色体の分離と、それに続く細胞質分裂からなる。細胞質分裂では、収縮環が細胞の赤道面に形成され、収縮環の径が小さくなるのに伴い分裂溝が入り、最終的に二つの娘細胞に分かれる。収縮環は、主に繊維状アクチンと、ミオシンから構成されるが、その超微細構造を詳細に捉えた観察例はない。さらに、細胞質分裂はアクチン・ミオシンの収縮活性により進むと考えられているが、それらの動的構造変化は不明である。その理由は、電子顕微鏡レベルでの収縮環の微細構造や構造変化の過程は、培養細胞を含めてほとんどの生物で観察が難しかったからである。最近、上条と加藤らは超解像顕微鏡を用いて、培養細胞の収縮環におけるアクチンと、ミオシンの微細構造をナノメートル精度で観察し、新たな収縮環の形成機構モデルを構築した。(上条と加藤ら、投稿中)

収縮環には、主に非筋タイプミオシン II が存在する。このミオシンの調節軽鎖 (MRLC) の Ser19 が、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) によりリン酸化される (1pMRLC) と、ミオシン重鎖 (MHC) が集合して、Bipolar filament となる。この Bipolar filament が、アクチンと共に収縮環を形成する。

この 1pMRLC の、Thr18 がさらに AuroraB キナーゼによりリン酸化されると、二重リン酸化状態になる (2pMRLC)。この 2pMRLC は、1pMRLC と細胞内分布が異なる (細谷ら、2013)。即ち、2pMRLC は収縮環表層だけでなく、収縮環のミッドゾーンにも局在する。2pMRLC と紡錘体の微小管との関係が想起されるが、報告がなく、高分解能での観察もされていない。

本研究は、超解像顕微鏡を用いて、数十 nm の分解能での収縮環の可視化解析を目指した。まず、その準備段階として、試料の作製と観察技法を習得しつつ、未だ役割が不明瞭な 2pMRLC と紡錘体微小管の関係について、共焦点顕微鏡あるいは、疑似超解像顕微鏡で可視化解析を行った。

また、収縮環の形成メカニズムを調べるため、*in vitro* の実験系の構築を目標として、タンパク質精製を進めた。

【方法】

1) 固定標本の作成と顕微鏡観察

カバーガラス上に培養したブタの腎上皮由来の LLC-PK1 細胞を、4% パラホルムアルデヒドで固定し、ブロッキング処理後、間接蛍光抗体法に供した。1pMRLC の抗体は上条教授 (東北医科大学) より、2pMRLC の抗体は細谷教授 (広島大) より提供を受けた。微小管は市販のチューブリン抗体、アクチン繊維は蛍光ファロイジン、核は DAPI を用いて染色した。処理した細胞を、スライドガラスにマウントして、観察用標本とした。観察には、共焦点顕微鏡 (Nikon A1) を用いた。3 次元立体的な配置を明確にするために、100-300 nm のステップで、xy 平面の z-stack 画像を連続的に取得した。さらにデコンボリューション処理により分解能を 150 nm 程度に高め (疑似超解像)、3 次元構築を行った。

できあがった立体像を、任意の断面で切り出し、各タンパク質の 3 次元配置を検討した。

2) タンパク質の精製

収縮環形成の *in vitro* モデルを構築するため、アクチン、アクチン核化・重合促進因子 mDia1、アクチン調節タンパク質 profilin1 を精製した。アクチンは、ニトリ骨格筋のアセトンパウダーから抽出・精製した。mDia1 は大腸菌に GST 融合型タンパク質を発現し、その抽出液をグルタチオンセファロースとインキュベートし、目的のタンパク質を精製した。同様に、大腸菌に 6×His 融合型 profilin1 を発現し、その抽出液を Ni-NTA レジンとインキュベートし、目的のタンパク質を精製した。以上の精製物は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で確認した。

【結果・考察】

1) 2pMRLC の観察について

2pMRLC の局在を共焦点顕微鏡で確認した結果、収縮環のアクチンが存在する領域、収縮環よりも内側のアクチンの存在しない領域 (ミッドゾーン)、及び星状体近傍の蛍光強度の大きいスポットに検出され、さらにごくわずかに細胞質に分布していた。これらの局在は、細谷らの共焦点顕微鏡観察と一致した。

さらに、収縮環領域の 2pMRLC の分布を、疑似超解像 (分解能: 150 nm) で記録し、2pMRLC とアクチン、及び微小管の関係を 3 次元の画像で検討した。その結果、2pMRLC は、アクチンとは全体の 30.01% ± 3.02% (n=13) が共局在し、微小管とは全体の 23.68% ± 3.22% (n=11) が共局在することがわかった。一方、1pMRLC は、アクチンと共局在し、微小管との共局在は見られなかった。以上の結果は、1pMRLC は二重リン酸化の制御を受け、アクチン系と微小管系を行き来すると考えれば説明がつく。

MRLC 自体は、アクチンや微小管との結合部位を持たない。即ち、アクチンと共局在する時は MHC と複合体を作り、微小管と共局在する時は、別のタンパク質を介在すると思われる。これまでに報告がある AuroraB キナーゼやセントラルスピンドリンの分布 (三嶋、2006) が、今回観察した 2pMRLC の分布とよく似ており、これらが 2pMRLC と複合体を作る可能性がある。今後、さらに超解像顕微鏡 (SIM、及び STED) の観察を重ね、細胞質分裂におけるミオシンの役割を詳細に解明したい。

2) タンパク質の精製について

上条と加藤らが提唱した新たな収縮環の形成メカニズムを検討するため、本研究で精製したタンパク質を用いて、今後、次のように *in vitro* の実験系構築を目指す。第一段階として、mDia1 からアクチン繊維を放射状に伸長する。次に、そのアクチン繊維上をミオシンが滑ることを確認する。第二段階では、マイクロパターンニングにより、ガラス上のアクチン繊維が環状に並ぶように、mDia1 の配置や量の条件、そして収縮環モデルが収縮するミオシンの活性条件や濃度を検討する。

テトラヒメナの飢餓応答とアクチンの働き

水橋 彩 (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

テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* は、繊毛虫類の一種であり、細胞長が約 50 μm 、幅 30 μm の米粒のような形状をしている。その細胞表層には、多数の繊毛が規則正しく生えて繊毛列を成している。繊毛運動によりテトラヒメナは水中を遊泳し、細胞前方にある口部装置からバクテリアなどの微粒子を食胞に取り込み、栄養源にする。テトラヒメナの食胞形成には、アクチン細胞骨格が重要である。例えば、アクチン重合阻害剤 Latrunculin-A (Lat-A) を添加すると、テトラヒメナは食胞形成ができない。しかし興味深いことに、数時間経つと食胞形成能を回復する。本研究室の清水らは、アクチンをコードする主要な *ACT1* 遺伝子とは別に、Lat-A 処理後に *ACT2* 遺伝子の発現量が一過的に増加することを発見し、この現象に重要なことを示した。特筆すべきことは、*act2* 遺伝子破壊細胞 (*act2* KO) は Lat-A 耐性能を獲得できない。さらに清水らは、*act2* KO 細胞を栄養培地中から Tris 緩衝液に移すと、Lat-A 存在下で、野生型細胞よりも急速に細胞のサイズが矮小化するのを発見した。このことは、アクチンが貧栄養条件下で、細胞の形態維持に重要なことを示唆している。自然環境下で、テトラヒメナは栄養源の枯渇に曝されることもあるだろう。また、飢餓状態に入ることが、有性生殖に重要な条件でもある。しかし、これまで飢餓状態に置かれたテトラヒメナの生理変化や、アクチン細胞骨格の細胞内の分布や役割については、ほとんど研究されていない。

酵母や動物などでは、飢餓条件下で細胞内のタンパク質を再利用するために、オートファジーが活性化される。この現象では、まずユビキチン様タンパク質 Atg8 が隔離膜を形成し、細胞質やオルガネラなどを囲い込む。次に、その結果生じるオートファゴソームがリソソームと融合する。そして、その中でタンパク質などが分解されることで、細胞は栄養を得る。なお、この機構は細胞が栄養源の枯渇に耐え、生存の機会を高めるだけでなく、栄養条件下でも起こるのが知られている。例えば、細胞内の不要物を分解することで、細胞の恒常性の維持に重要であり、また病原性バクテリアやウイルスに対する免疫応答にも働く。

テトラヒメナのオートファジーは、細胞の有性生殖時に、選択的な細胞核の分解に働くことが唯一報告されている (Yao et al., 2012)。この研究では、2 つの Atg8 ホモログ (Atg8-2 と Atg8-65) が同様に働くことを示した。さらに、詳細なデータは示されていないが、*atg8-65* 遺伝子破壊株でのみ、飢餓条件下で生存率が低くなることが指摘されていた。

そこで私は、テトラヒメナの飢餓応答とアクチンの働きについて、Atg8-65 をマーカーに用いて研究することにした。

方法

・ *GFP-Atg8-65* 株の作成と観察

大核内の *ATG8-65* 遺伝子座の開始コドンの直前に、

eGFP を挿入した細胞株 (*GFP-Atg8-65*) を作成した。その局在観察に際し、*GFP-Atg8-65* 株を培養している SPP 培地にカドミウムを加えて発現誘導した。その後必要に応じて、これらの細胞をメタノールで処理して固定し、観察に供した。飢餓状態は、細胞を Tris 緩衝液に移して誘導した。

・ 貧栄養条件下での細胞数と細胞長の計測

SPP 培地で対数増殖期まで培養した細胞を、手回し遠心機で回収し、Tris 緩衝液に移した。Lat-A と、コントロールとしてその溶媒 DMSO を同量加えて、細胞を処理した。細胞数は血球計算盤により、細胞長は画像解析ソフト Image J を用いて計測した。

結果・考察

テトラヒメナのゲノムには、Atg8 をコードする遺伝子が 3 つある。先行研究で、その内の *Atg8-65* が飢餓状態での細胞の生存に重要なことが示唆された。そこで、私はテトラヒメナの遺伝子発現情報データベースを調べた。その結果、飢餓条件下での *ATG8-65* の発現誘導は一過的であり、数時間後には発現量が低下してしまう。一方、アクチンの発現量を調べると、主要な *ACT1* は飢餓誘導直後に発現量が大きく減少していた。逆に *ACT2* は普段発現が極めて低いものの、飢餓誘導直後に、一過的に発現量が増加するのが分かった。これより、*ACT2* や *ATG8-65* の発現が、細胞の飢餓応答の開始と何らかの関係があると考えた。

次に、清水らの先行研究の結果を確認するために、Lat-A を添加した Tris 緩衝液で、野生型株と *act2* KO 株を培養した。その結果、*act2* KO 株において、顕著な細胞サイズの縮小化が確認できた。しかし、先行研究では定性的な観察しか行われなかったため、細胞の大きさを測定し、定量的な解析を進めている。さらに、細胞の核 DNA やミトコンドリアなどの性状が、これらの細胞でどのように変化するか調べる予定である。

飢餓条件下でのテトラヒメナのオートファジーの様子を可視化する目的で、*eGFP-Atg8-65* 発現株を作成し、観察した。その結果、栄養培地で増殖しているテトラヒメナにおいて、細胞質全体に蛍光シグナルがみられ、さらに複数の極めて小さな点状の構造が観察できた。現在、飢餓条件下において、*eGFP-Atg8-65* の輝点の数や形状が、どのように変化するか観察を進めている。さらに、Atg8-65 の細胞内分布とアクチンの役割について、調べる計画である。具体的には、飢餓条件下に置かれた細胞内のアクチン細胞骨格の局在性の観察や、Lat-A の添加によって Atg8-65 の輝点の数や形状がどのように影響を受けるのか調べる。その結果、アクチン細胞骨格とオートファジーとの機能関係が、明らかになると期待される。

織毛虫テトラヒメナのサイクリン依存性キナーゼの同定と細胞機能の解析

村井 彩郁 (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

サイクリンと結合し活性化されるサイクリン依存性キナーゼ CDK は細胞周期の中心的な制御因子で、その機能は酵母や動物細胞でよく研究されてきた。近年、複数の CDK のホモログの存在が明らかになり、それらが調和して細胞周期を巧妙に制御するのが分かった。またそれ以外に、CDK が細胞内外のシグナル応答に伴う転写調節にも関与することが報告されている。

本研究で用いた織毛虫テトラヒメナは、形状と機能が異なる大核と小核をもつ。それぞれの核の染色体複製、及び分配の様式やタイミングは異なる。しかし、それらの核が同一細胞内で適切に維持されるしくみは不明である。またテトラヒメナの細胞表層には、多数の基底小体が整然と並び、それらは細胞の成長に伴い複製されるが、その制御機構はよく分かっていない。基底小体関連のオルガネラである動物細胞の中心体や酵母の SPB の複製は、CDK による細胞周期の進行と深い結びつきがある。テトラヒメナの CDK が、以上の現象をどのように制御しているか、私は興味を抱いた。

ゲノムが解読されているテトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* には、CDK をコードする遺伝子が 11 個存在すると報告されている (Eisen et al, 2006)。しかし、私が確認したところ、実際には 10 個しか存在していなかった。また既に、その内の 1 つである *Tt* CDK1 は単離・解析されているが、*Tt thermophila* にはそれ以外にも、発現量の高い複数の CDK らしきタンパクの存在が指摘されている (Zhan et al, 2002)。これらの知見を踏まえ、テトラヒメナが発現する CDK のうち、主要な働きを担うものを特定し、その機能を調べることにした。

方法

1) CDK ホモログのアミノ酸配列の比較と系統樹の作成

テトラヒメナゲノムデータベースを利用して、*Tt thermophila* の CDK をコードする遺伝子をピックアップした。全 10 種の *Tt* CDKs の推定アミノ酸配列について、ヒトや酵母等の CDK と共に、系統樹を ClustalW を用いて描いた。さらに *Tt* CDKs の PSTAIRE モチーフの配列を比較し、Zhan らの先行研究で優先的に発現する 35 kDa に相当する CDK を推定した。

2) CDK1A と CDK1B の局在解析

テトラヒメナの遺伝子産物を緑色蛍光蛋白質 eGFP で標識するための遺伝子カセットを用いて、カドミウムイオン存在下で、CDK1A 及び CDK1B の N 末側に eGFP を連結した蛋白質を発現する細胞株 (eGFP-CDK1A、及び eGFP-CDK1B) を作成した。これらの生細胞について、蛍光シグナルを顕微鏡で観察した後、メタノール固定後もその局在が残ることを確認した。細胞の画像は、必要に応じて DAPI 染色を加え、取得した。

結果

テトラヒメナ、ヒト、酵母等の CDK の分子系統樹を作成した。その結果、細胞周期制御に最も中心的に働くヒトの CDK1

及び出芽酵母の Cdc28p と、テトラヒメナの THERM_01035490 がコードする CDK のみが同じクラスターを形成した。またその姉妹群には、ヒトの CDK5 や出芽酵母の Pho85p のように限られた条件下で細胞周期の制御に関わるものや、テトラヒメナの THERM_01207660 がコードする CDK がみられた。一方、先行研究の *Tt* CDK1 (THERM_00411810) は、それらと別のクラスターに含まれた。

細胞周期を制御する主要な CDK には、PSTAIRE モチーフが存在する。この配列を含む周辺の 16 アミノ酸を抗原として作成されたモノクローナル抗体 (抗 PSTAIRE 抗体) は、テトラヒメナ抽出液中の 35 kDa のバンドを強く認識し、*Tt* CDK1 と推定される 37 kDa のバンドをわずかに認識する (Zhan et al, 2000)。そこで、テトラヒメナ CDK について PSTAIRE の周辺配列を比較し、この抗体が結合すると推定できたものは、THERM_01035490 と THERM_01207660 であった。これらの推定分子量は、THERM_01035490 は 36.4 kDa、THERM_01207660 は 35.4 kDa で、どちらも *Tt* CDK1 の推定分子量 37.3 kDa よりも小さく、上述の 35 kDa の候補となりうる。さらに、テトラヒメナの遺伝子発現量データベースを確認したところ、それらの遺伝子が対数増殖期に比較的に発現量が高いことがわかった。以上より、THERM_01035490 と THERM_01207660 の 2 つの遺伝子が、テトラヒメナの細胞分裂に関与する CDK だと推察し、前者を CDK1A、後者を CDK1B と命名し、局在解析を行った。

その結果、eGFP-CDK1A 株は、分裂期の細胞表層に縦縞の強い蛍光を呈した。一方、間期細胞の表層には、ドット状や薄い縦縞が見られることがあったが、同様の縦縞の強い蛍光は観察できなかった。また、eGFP-CDK1B 株の蛍光観察や、PSTAIRE 抗体を用いた免疫染色を施した細胞については、細胞周期を通して、その細胞表層にドット状や薄い縦縞の蛍光が観察できたが、eGFP-CDK1A 株に見られたような縦縞の強いシグナルは認められなかった。なお、いずれの観察でも、現在までに大核内や小核内には蛍光シグナルは認められていない。

考察

アミノ酸配列の比較解析や発現量の情報から、CDK1A と CDK1B が主要な細胞周期制御因子である可能性が示唆された。特に CDK1A は、大核分裂期に細胞表層に強い縦縞の分布を呈した。現時点では、この局在が何を意味しているかは不明だが、基底小体の複製と何らかの関連性があるのかもしれない。例えば、CDK1A が一過的に CDK1B や *Tt* CDK1 に作用し、その後、それらが基底小体の複製や分離を制御する可能性が考えられる。一方、大核及び小核には、CDK1A や CDK1B は検出されていないため、別の CDK ホモログがテトラヒメナの核内で大事な役割を担っている可能性がある。今後、CDK1A や CDK1B の機能阻害実験や、特異性の高い CDK 阻害剤を用いて、基底小体の複製や核分裂への影響を調べるのが大切だと思われる。

細胞壁異常陥入を引き起こす分裂酵母 Spa2 の機能解析

北園 和泉 (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〉

多くの細胞はその機能を発揮するために特有の形状をとり、また成長して分裂する際には、大きくその形態が変化する。これらの過程では、細胞膜、及び細胞膜内外のタンパク質や糖鎖などの生体物質の再編成が生じる。本研究で着目した Spa2 は、出芽酵母で最初に発見された極性決定に関わるポリリソーム複合体の主要構成タンパク質である。しかし、その機能は出芽酵母以外の生物では、ほとんど調べられていなかった。Spa2 は、N 末端側に SHD-I ドメインと Coiled-coil (CC) ドメイン、そして C 末端側に SHD-V ドメインを有し、これらの領域が他のタンパク質と連携して、細胞の極性決定に関与すると考えられる。本研究の先行研究により、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のその相同遺伝子 *spa2⁺* を過剰発現すると、細胞壁が細胞内部に陥入する異常な構造が作られることが発見されている。この異常陥入は、細胞質分裂時の隔壁形成に通じるものがある。そこで私は、過剰発現した Spa2 が細胞膜の変形や細胞壁合成にどのように作用するのか、そのしくみを調べた。

〈方法〉

分裂酵母 *S. pombe* のロイシン栄養要求性株 *leu1-32* を、pREP1 をベースとした発現プラスミドを用いて形質転換した。得られた形質転換体を、チアミン存在下で、25°C で前培養した。その後、培地からチアミンを除去し、*nmt1* プロモータの下流にある *spa2⁺* とその変異型遺伝子の過剰発現を誘導した。細胞壁は、カルコフルオールホワイト (CW) で染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

一連の点変異や欠失変異の導入は、inverse PCR 法を用いて行った。

〈結果〉

主に2つの方法で、Spa2 の作用発現機序を探った。1つは Spa2 と相互作用する因子に着目したものである。もう一方は、変異型遺伝子を作成し、その過剰発現の影響を調べることで、Spa2 の機能ドメインを明らかにすることである。以下に、順を追って説明する。

1) Cdc15 との関係について

分裂酵母の細胞質分裂に必須なタンパク質 Cdc15 は、脂質二重膜の変形を引き起こす F-BAR ドメインを N 末端側に、そして C 末端側には SH3 ドメインをもつ。一昨年、Cdc15 の SH3 ドメインに結合するタンパク質を網羅的に調べた論文が発表され、その中に Spa2 が含まれていた。そこで私は、過剰発現した Spa2 が Cdc15 を呼び寄せて、その F-BAR ドメインを介して脂質二重膜の変形を促し、細胞壁の異常陥入を形成する可能性を考えた。これを検証する目的で、Spa2 を過剰発現した細胞において、Cdc15-GFP の局在を調べた。その結果、過剰発現誘導後 18 時間位から、細胞壁の異常陥入が生じている部位に、Cdc15-GFP が局在するのが観察された。次に、この局在変化が Spa2 と Cdc15 の相互作用によるものが検討するため、それらの相互作用に重要な Spa2 の 191 番目のプロリン残基をアラニン残基と置換した。そして、Spa2^{P191A} 過剰発現細胞における Cdc15-GFP の局在を調べた。その結果、野生型遺伝子の半分程度の頻度で細胞壁の異常陥入は起きたものの、そこには Cdc15-GFP の集積は認められなかった。さらに、Cdc15 の機能が低下した温度感受性変異株 *cdc15-140* に、Spa2 を

過剰発現したが、細胞壁の異常陥入の形成が認められた。以上の結果、Cdc15 は、Spa2 の過剰産生に伴う細胞壁の異常陥入構造の形成に関与している可能性はあるものの、その存在は必須でないことが示された。つまり、Spa2 は Cdc15 と結合しなくても、別の因子に働きかけることで、脂質膜の変形や細胞壁合成を促進できると推察した。

2) Spa2 の機能ドメインの解析

各種トランケートを作成して過剰発現実験を行い、細胞壁の異常陥入構造の形成誘導に必要な Spa2 のドメインを体系的に調べた。その結果、SHD-I ドメインが、細胞壁の異常陥入の形成に必須なことが分かった。しかし、SHD-I ドメインのみの過剰発現では異常陥入が見られなかったため、それ以外の部分も大切な役割を担うと考えられた。このことは、SHD-I ドメインと CC ドメインからなるトランケートを過剰発現すると、細胞壁の異常陥入が生じることから支持される。しかし、CC ドメインだけを欠失した Spa2 を過剰発現した場合でも、細胞壁の異常陥入は起こる。そのため、細胞内で SHD-I ドメインが機能を発揮するには、CC ドメインで Spa2 が自己会合するか、あるいは特に目立ったモチーフなどはみられない分子の中央領域で別のタンパク質と相互作用することが必要だと推察した。

また、Spa2 の過剰発現に伴い、細胞増殖が抑制される。これまでは、細胞壁の異常陥入の形成が、細胞成長を阻害すると考えていた。しかし、今回の Spa2 のトランケートの一連の実験から、SHD-V ドメインが、細胞増殖の抑制に必要な且つ十分な領域であることが判明した。即ち、SHD-V ドメインのみの過剰発現した場合、細胞増殖は抑制されたが、細胞壁の異常陥入は形成されなかった。

〈考察〉

本研究の結果、Spa2 は SHD-I を介して細胞膜の変形や細胞壁合成の促進等を促すと考えられた。また SHD-V ドメインは、これとは別に細胞増殖に重要な因子と相互作用する可能性がある。今後、これらのドメインに結合するタンパク質を同定するなどして、それらの細胞内機能を解明することが大切だろう。

一方、上述したように、SHD-I と SHD-V の間に存在する領域が、Spa2 自身の自己会合や、あるいは他のタンパク質と結合することも、Spa2 の過剰発現による細胞壁の異常陥入構造の形成に重要であることが分かった。この現象に、Cdc15 が必須でなかったことから、SHD-I と SHD-V の間にある領域の役割には重複性がみられるのかもしれない。この機能の重複性は、実験結果を解釈する上では混乱をまねきやすいが、細胞内のタンパク質の働きにおいては極めて大切な性質である。つまり、鍵となるタンパク質が複数の因子と相互作用することで、より巧妙な細胞内機能を発揮でき、そのシステムに頑強性が賦与されるからである。今後、Spa2 と機能関連性が指摘されている Fic1 や Bud6 などのタンパク質についても、Spa2 過剰発現時の挙動を調べ、その存在が細胞壁の異常陥入構造の形成に必要なことが大切だろう。その結果、細胞の形態変化や細胞質分裂時にみられる細胞膜と細胞壁等の生体物質の再編成機構に働く因子の機能を、体系的に解き明かすことができると思われる。

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

ミオシンの局在解析

前原 拓弥（筑波大学 生物学類）

指導教員：沼田 治（筑波大学 生命環境系）

背景及び目的

アクチン細胞骨格の分子モーターであるミオシンは、筋収縮や細胞質分裂、小胞輸送、その他にも様々な細胞現象において働き、真核生物の生命現象を支える重要なタンパク質である。一般的に、ミオシンは重鎖と軽鎖から構成される。ATP を加水分解して、力を発生するミオシン重鎖については、これまでに30種類以上もの分子種が報告されている。その構造は、頭部、頸部、尾部の3つの部位に大別される。特に尾部には、ミオシン重鎖間で構造的な多様性がある。そこには、個々のミオシンの細胞機能や局在性と密接に関係するドメインがみられる場合が多い。従って、ミオシンの働きと尾部の構造的な特徴は直結すると考えられている。

これまでに、動物細胞や菌類、緑色植物のミオシンについては研究が進み、その細胞機能の理解が進んでいる。一方、それ以外の生物群のミオシンの細胞機能は、ほとんど調べられていない。本研究では、繊毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* から13種類のミオシン重鎖遺伝子を単離し、その尾部の特徴から3つのグループに大別できることを提唱してきた。それらは、MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つサブクラスⅠ、RCC1 ドメインを持つサブクラスⅡ、そして Coiled-coil ドメインを持つサブクラスⅢである。それらの中で私が着目したのは、サブクラスⅠのミオシンである。その理由は、MyTH4 ドメインや FERM ドメインを有するミオシン重鎖の遺伝子は、動物細胞や菌類、粘菌にしか存在しないからである。例外的にテトラヒメナ属は、パイコンタでおそらく唯一、このタイプのミオシンをもつ生物である。それでは、テトラヒメナは、どのように分子進化的にサブクラスⅠミオシンを獲得したのか、またそれらの細胞機能は何か、多いに興味を抱いた。なお、既にテトラヒメナの MYO1 は食胞輸送に働くことが報告されているが、その他のサブクラスⅠミオシンの機能解析は行われていない。そこで、一次配列の相同性や発現量を比較したデータを基に、テトラヒメナの代表的なサブクラスⅠミオシンを選び、それらの細胞内局在性を調べた。

方法

1) MyTH4/FERM ドメインを有するミオシン重鎖の系統解析
ゲノムデータベースが利用可能な繊毛虫4属について、ミオシン重鎖のアミノ酸配列を網羅的に取得した。得られた配列を BLAST 検索し、機能ドメインの有無を調べた。また、テトラヒメナ属4種のサブクラスⅠミオシン、及びヒトなどの動物の MyTH4/FERM ドメインを持つミオシンのアミノ酸配列について、ClustalW を利用して系統樹を作成した。

2) ミオシンの局在解析

1) の解析から、各サブファミリーの中で発現量が比較的高い MYO4、MYO5、MYO7、及び MYO8 について、蛍光タンパ

ク質 EGFP を用いて、遺伝子産物の局在を調べた。

結果

テトラヒメナ属4種、ゾウリムシ、オキシトリカ、イクチオフチリウス等の繊毛虫類について、ミオシン重鎖をコードする遺伝子を調べた。その結果、テトラヒメナ以外の繊毛虫には MyTH4 ドメインや FERM ドメインを有するミオシンをコードする遺伝子は認められなかった。この結果は、繊毛虫の多くがこれらのミオシン遺伝子を失ったのか、あるいはテトラヒメナ属だけがその祖先遺伝子を獲得できたことを示唆する。

さらに、MyTH4 及び FERM ドメインを持つミオシンの系統樹を作成した結果、頭部、MyTH4、FERM のいずれの領域についても、テトラヒメナ属のミオシンは、動物のミオシンとは異なる単一のクレードを形成した。これら3種類の系統樹から、*T. thermophila* の MYO6、MYO8、MYO9 には高い類縁性が見られた。同様に、MYO4 と MYO5 も類縁関係にあると判断した。一方、MYO1、MYO2、及び MYO7 は、テトラヒメナ属の他種のサブクラスⅠミオシンと共に低い類縁性を示すため、テトラヒメナ属間で機能が保存されている可能性がある。

以上の系統解析の結果と、遺伝子発現量の情報を基に、細胞内局在性を調べるミオシンを選択した。その結果、EGFP-MYO5 や EGFP-MYO8 は、口部装置近傍に粒子状にあるように見られた。一方、MYO7 については EGFP 融合遺伝子の導入には成功したが、現時点では明確な局在性が得られていない。今後、より多くのミオシン重鎖遺伝子が導入遺伝子に置換された細胞株を選別し、観察する予定である。

考察

本研究により、テトラヒメナ属の MyTH4/FERM ドメインを有するサブクラスⅠミオシンは、繊毛虫に広く分布しているのではなく、非常に珍しいものであることが分かった。テトラヒメナでは活発に食胞形成やリソソーム等の輸送を行うため、これらのミオシンが働いているのかもしれない。先行研究で、MYO1 が食胞輸送に関係するのが知られている。さらに今回の局在解析で、MYO5 や MYO8 は口部装置近傍で食胞形成や、細胞内での物質輸送に関与している可能性が示唆された。今後は、これらのミオシンの局在を詳細に調べ、さらに遺伝子破壊による影響を調べることで、サブクラスⅠミオシンがテトラヒメナに存在する細胞学的意義が具体的に理解できるだろう。また将来、テトラヒメナ属の姉妹系統にある繊毛虫のゲノム情報がさらに多数利用できるようになれば、MyTH4/FERM を有するミオシンが獲得された進化的な経緯を推察できるかもしれない。

モデルマウスを用いた多型突然変異型 mtDNA に関する基礎研究

平 正史 (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呼吸により産生する細胞小器官であり、細胞核に存在する核 DNA とは異なる独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を有している。mtDNA は環状二本鎖構造をしており、呼吸酵素複合体を形成するために必須な 13 種の構造遺伝子とそれらを翻訳するのに必要な 22 種の tRNA、2 種の rRNA がコードされている。ミトコンドリアの呼吸酵素複合体は mtDNA の遺伝子だけでなく、核 DNA の遺伝子にもコードされているため、ミトコンドリアの機能は核 DNA と mtDNA による二重支配によって制御されている。

mtDNA に生じた突然変異は、病原性突然変異と多型突然変異の 2 種類に分類される。病原性突然変異はミトコンドリアの呼吸機能低下を引き起こし、ミトコンドリア病などの疾患を誘導する。これに対し、多型突然変異はミトコンドリアの呼吸機能に影響を及ぼさず、野生型と変わらない表現型を示すと考えられている。

しかし、mtDNA の多型突然変異が特定の疾患の罹患率と関連していることを示唆する報告がある。例えば、ヒトハプログループと疾患発症頻度に関する先行研究である。ハプログループとは、ヒト集団を mtDNA の多型突然変異のタイプで分類したグループのことである。ハプログループ間で疾患発症頻度を検証した疫学的な研究では、ハプログループごとに特定の疾患の発症頻度が異なっており、mtDNA の多型突然変異が病態と何らかの因果関係を示す可能性があることが示唆された。このように疫学的な研究により多型突然変異が生体に影響を及ぼす可能性については報告はされているものの、この関係を実験的に証明したという報告はほとんどない。

この関係について実験的に調べるために、野生型とされている C57BL/6J (B6) 系統と、同種異系統にあたる NZB/BINJ (NZB) 系統のマウスを利用しようと考えた。B6 系統と NZB 系統の mtDNA の配列間には 91 箇所の相違があり、そのうち 13 箇所においてアミノ酸置換を伴う非同義変異が存在するが、これらの変異箇所はヒトにおいて報告されている病原性突然変異に相当する場所ではないことが知られている。

所属研究室の先行研究において、mtDNA の違いによる影響のみを比較するために、核 DNA を B6 系統由来に統一し、mtDNA が B6 系統由来あるいは NZB 系統由来で異なる培養細胞を用いて、そのミトコンドリア呼吸機能と細胞増殖能を調べたところ、それらの培養細胞間で有意な差が認められなかったことが報告されている。このことから、少なくともこの先行研究に用いられた培養細胞においては、NZB 系統の mtDNA は病原性を発揮しない多型突然変異に相当することが示された。

多型突然変異はミトコンドリアの呼吸機能に影響を及ぼさないと上述したが、生物の進化を探索するための指標として利用される以外にはほとんど注目されてこなかったため、多型突然変異が生

体に及ぼす影響については、その有無も含めてほとんど検証されていない。

そこで本研究では、培養細胞においてミトコンドリア呼吸機能に影響を及ぼさなかった mtDNA の多型突然変異が生体に及ぼす影響をマウス個体レベルで検証することで、多型突然変異とミトコンドリア呼吸機能の生体における関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】

所属研究室では、mtDNA が母性遺伝する性質を利用した戻し交配によって、核 DNA が B6 系統に限りなく近く mtDNA が NZB 系統である多型マウス (B6mtNZB) が既に樹立されている。核 DNA と mtDNA がともに B6 系統である野生型マウス (B6mtB6) をコントロール群とし、B6mtNZB マウスを実験群として、両者の間にミトコンドリアの呼吸機能をはじめとする幾つかの表現型について何らかの違いが観察できるか否かを検証した。通常の飼育条件下では影響がなくても、代謝的な負荷を加えることによって表現型に違いが生じる可能性を考慮し、B6mtB6 マウスと B6mtNZB マウスをそれぞれ通常食 (ND) を与える群と高脂肪食 (HFD) を与える群に分け、約 21 ヶ月齢で比較解析を行った (下記表参照)。

使用したマウス実験群

マウス	投与食
B6mtB6	ND
B6mtNZB	ND
B6mtB6	HFD
B6mtNZB	HFD

表現型について

上記 4 群のマウスについて、体重、定常時血糖値、定常時乳酸値、空腹時血糖値、空腹時乳酸値を測定した。これらの測定項目は、糖代謝に異常がある場合に变化すると想定される項目群である。また、臓器におけるミトコンドリアの呼吸機能を検証する目的で、マウス個体を解剖し、心臓および腎臓、骨格筋の組織切片を用いて、COX/SDH 染色を実施した。この染色法は、ミトコンドリアの呼吸機能に応じて組織を染め分けることができるものである。さらに、解剖時、複数の個体において肝臓にがんが観察された。これらのがんについて、その大きさを定量し、比較した。

【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 DNA へのランダムな突然変異の蓄積が呼吸欠損を誘導する理由

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

背景・目的

細胞小器官の一種であるミトコンドリアは、外膜および内膜からなる二重膜構造を有しており、内膜上に存在する呼吸酵素複合体 I～V による酸化的リン酸化反応によって生命活動に必要な ATP の大部分を産生している。また、核 DNA とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) を細胞あたり数百～数千コピー有している。哺乳類の mtDNA には複合体 II を除くその他の複合体を構成する一部の構造遺伝子と、その翻訳に必要な rRNA および tRNA がコードされている。つまり、複合体 II は核 DNA によってコードされたサブユニットのみで構成されている一方で、複合体 I, III, IV, V は核 DNA と mtDNA の二重支配を受けている。したがって、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誘導する。

mtDNA 唯一のポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ γ (PolG) には複製機能と校正機能が備わっているが、その校正機能のみを欠損したマウス (mtDNA mutator mice) においては、mtDNA の複製を繰り返す度に後天的にランダムな突然変異が生じる。そのため、加齢に伴って mtDNA に多様な突然変異が蓄積していく。興味深いことに、mtDNA mutator mice では ATP 産生の低下を特徴とする呼吸欠損が誘導されることが報告されているが、その機構は明らかにされていないばかりでなく、後述する所属研究室における先行研究との相違点が存在する。

所属研究室では、ミトコンドリアが融合と分裂を介して mtDNA や遺伝子産物を交換することで、ミトコンドリアの機能を正常に保つはたらき（ミトコンドリア間相互作用）を証明している。このミトコンドリア間相互作用により、mtDNA に同一の病原性突然変異が優位に蓄積しない限りは、ミトコンドリア呼吸機能低下は引き起こされない。また、所属研究室において樹立された野生型 mtDNA と大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) を共に含有する病態モデルマウスにおいては、ミトコンドリア間相互作用により、 Δ mtDNA が 70～80% 以上蓄積してはじめてミトコンドリア呼吸機能低下が誘導される。このことからミトコンドリア呼吸機能低下の誘導には閾値効果が存在する。

ミトコンドリア間相互作用を考慮すると、mtDNA mutator mice においては、たとえ mtDNA にランダムな突然変異が蓄積したとしても同一の変異を有していない異なる変異型 mtDNA から遺伝子産物が供給されるため、ミトコンドリア呼吸機能は正常に保たれることが予想される。また、閾値効果を考慮すると、ミトコンドリア呼吸機能低下を誘導するのに十分な程度に同一の突然変異が蓄積するとは考えられない。それにもかかわらず、mtDNA mutator mice では mtDNA へのランダムな突然変異の蓄積によって呼吸欠損が誘導されるのである。

現在、mtDNA mutator mice において呼吸欠損が誘導される原因としては、複合体の形成が異常となり、その結果として複合体の形成と分解のターンオーバーが早まるという仮説が提唱されている。そこで、本研究においては呼吸酵素複合体およびそれを構成するサブユニットに着目し、mtDNA mutator mice および同マ

ウス由来の mtDNA を有する培養細胞を用いて、mtDNA へのランダムな突然変異が呼吸欠損を誘導する理由を解明することを目的とした。

材料

○mtDNA mutator mice (10 ヶ月齢) における凍結心臓

○培養細胞

- ・B82mtB6: ρ^0 B82 細胞 (mtDNA を完全に欠損) に C57BL/6 (B6) 系統マウスの野生型 mtDNA を導入した細胞。
- ・B82mtPolG^{mut/mut}: ρ^0 B82 細胞に 10 ヶ月齢における mtDNA mutator mice の mtDNA を導入した細胞。10 ヶ月の間に蓄積した多様な変異型 mtDNA を含有しているが、B82 の核背景を有しているため校正機能の欠損はなく、培養の繰り返しによる mtDNA への突然変異の頻度は増加しない。

方法・結果

培養細胞において呼吸酵素複合体の存在量を確認するために、Clear Native-PAGE (CN-PAGE) を行った。この手法は強力な変性剤である SDS を用いた SDS-PAGE とは異なり、変性作用の小さい界面活性剤を用いることで、呼吸酵素複合体をサブユニットへ解離させることなく各複合体を分離することができる。この実験の結果、B82mtB6 と比較すると、B82mtPolG^{mut/mut} においてはいくつかの複合体の大幅な減少あるいは消失が認められた。

次に、総タンパク質でのウェスタンブロッティングによって、培養細胞における SdhA (複合体 II を構成するサブユニット、核 DNA コード) および Cox4 (複合体 IV を構成するサブユニット、核 DNA コード) の発現量を調べた。その結果、B82mtB6 と比較して、B82mtPolG^{mut/mut} の SdhA の発現量は同等であったが、Cox4 の発現量は顕著に減少していた。同様の現象が mtDNA mutator mice (10 ヶ月齢) の凍結心臓においても観察された。

考察

CN-PAGE の結果から、培養細胞においては呼吸酵素複合体の形成異常が呼吸欠損を誘導することが示唆された。また、ウェスタンブロッティングの結果から、SdhA および Cox4 はどちらも核 DNA にコードされているにもかかわらず、異なる挙動を示すことが確認された。これらのサブユニットで異なるのは、複合体 II が核 DNA にコードされたサブユニットのみで構成され、複合体 IV が核 DNA および mtDNA の両方にコードされたサブユニットで構成されるという点である。

このことから、mtDNA へのランダムな突然変異の蓄積が mtDNA にコードされたサブユニットの異常を誘導し、その結果として複合体の安定性を低下させていることが示唆された。

ミトコンドリア機能異常における脂肪組織の基礎病理

上田 千恵子 (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

ミトコンドリアは外膜と内膜の二重の生体膜によって構成される細胞小器官であり、内膜の内側にあたるマトリクスには独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞あたり数百〜数千コピー含有されている。ミトコンドリアの主な機能は酸化リン酸化反応によって生体内に必要な大部分の ATP を産生することである。また、ミトコンドリアの内膜に存在する脱共役タンパク質 (uncoupling protein, UCP) は ATP 産生に寄与する酸化リン酸化反応を脱共役させる。その結果、脂肪酸やグルコースの酸化分解で生じたエネルギーは直接熱へと変換され、糖脂質代謝及び体温の恒常性に貢献する。

UCP ファミリーとして、熱産生部位である褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) に特異的に発現する UCP1 のほかに、白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) や骨格筋など全身に幅広く存在する UCP2 などが知られている。BAT はミトコンドリアを豊富に含有するため、ミトコンドリアのシトクロムの色により褐色を呈しており、身体の限られた部位に、それもごくわずかしかな存在しない。ミトコンドリア内膜に存在する UCP1 は交感神経が分泌するノルアドレナリンにより活性化され、遊離脂肪酸を熱に変化させる。このため、BAT の機能は、単に体温調節のための発熱だけでなく、脂肪を熱として散逸するエネルギー消費をも担っていることになる。このような脂肪代謝が破綻すると、肥満や生活習慣病が誘発されることが知られている。現在、肥満や生活習慣病の管理・治療のターゲットとして BAT や WAT の生理機能やそれらの連携などが注目されているが、未だに不明な点が多く残されている。

興味深いことに、WAT に存在する白色脂肪細胞は、寒冷刺激や $\beta 3$ アドレナリン受容体アゴニストの投与により、白色から淡い褐色に変化し、UCP1 を発現して熱産生するようになることが知られている (この変化は褐色化と呼ばれている)。逆に、BAT は、肥満や加齢によって褐色脂肪細胞内に脂肪滴が蓄積し、褐色から白色に変化し、熱産生能が低下することが知られている (この過程は白色化と呼ばれている)。このような BAT 及び WAT の機能的な可塑性 (褐色化と白色化) は熱産生や糖脂質の代謝に大きな影響を及ぼすと予想されている。そこで本研究は、BAT 及び WAT の機能的な可塑性にミトコンドリアの機能が重要であることを作業仮説として、ミトコンドリアのエネルギー産生不全が BAT 及び WAT の機能および細胞特性にどのような影響を与えるかを調べることにした。

方法

本研究では、ミトコンドリア機能異常を呈する BAT 及び WAT を以下に挙げる 3 種のモデルマウス群から得ることとした。

- 1) mito-mice Δ : 大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) と野生型 mtDNA を共に有するマウスであり、 Δ mtDNA の蓄積によってミトコンドリアのエネルギー産生不全が誘導され

る。本研究では Δ mtDNA を 0%~89.8% 含有するマウスを用いた。

- 2) db/db mtND6^M : 糖尿病を発症する核ゲノム背景 (db/db) を有し、mtDNA の *ND6* 遺伝子に点突然変異を有した変異型 mtDNA (mtND6^M) のみを全身性に有するマウスであり、軽度のミトコンドリアのエネルギー産生不全と活性酸素種の漏出が誘導される。糖尿病を発症しない核ゲノム背景 (db/+) を有し、mtND6^M を含有するマウスをコントロールとして用いた。

- 3) db/db mtCOI^M : 糖尿病を発症する核ゲノム背景 (db/db) を有し、mtDNA の *COI* 遺伝子に点突然変異を有した変異型 mtDNA (mtCOI^M) のみを全身性に有するマウスであり、軽度のミトコンドリアのエネルギー産生不全が誘導される。糖尿病を発症しない核ゲノム背景 (db/+) を有し、mtCOI^M を含有するマウスをコントロールとして用いた。

*また、2) と 3) のモデルマウス群において、糖尿病を発症する核ゲノム背景 (db/db) を有し、野生型 mtDNA のみを含有するマウス (db/db mtWT) と、糖尿病を発症しない核ゲノム背景 (db/+) を有し、野生型 mtDNA のみを含有するマウス (db/+ mtWT) を、正常コントロールとしてそれぞれ用いた。

本実験では、マウス群の体重と体温を測定し、熱産生機能及び抗肥満機能を評価した。次に、肩甲骨上の BAT 及び生殖腺周囲にある WAT を摘出し、パラフィンに包埋した。その後、パラフィン切片を作製し、HE 染色と UCP1 抗体を用いた免疫染色を行い、BAT 及び WAT を構成する褐色脂肪細胞ならびに白色脂肪細胞の機能形態学的な変化を観察した。

結果

詳細な結果については発表会にて報告予定である。

突然変異型 mtDNA が骨格筋タンパク質の分解・合成に及ぼす影響の解析

石崎光理（筑波大学 生物学類）

指導教員：石川香（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

骨格筋を構成する筋繊維ではタンパク質の分解・合成が絶えず繰り返されており、これらを制御しているタンパク質分解経路及び合成経路のバランスによって筋繊維径が規定される。骨格筋タンパク質分解経路としては主にユビキチンプロテアソーム系及びオートファジーが知られている。一方、骨格筋タンパク質合成経路としては主にインスリンシグナル伝達経路が知られている。また、がんや飢餓、寝たきりといった状況下では、骨格筋タンパク質分解経路の促進によって骨格筋繊維の萎縮が観察される。一方、運動時には、骨格筋タンパク質合成経路の促進によって骨格筋繊維の肥大が認められる。

細胞小器官の一つであるミトコンドリアは、核とは異なる独自の DNA（ミトコンドリア DNA : mtDNA）を有しており、酸化的リン酸化によって生命活動に必要なエネルギーである ATP の大部分を産生している。mtDNA 分子は、環状二本鎖の構造をしており、細胞あたりに数百～数千コピー含有されている。哺乳類の mtDNA にはミトコンドリア内の呼吸酵素複合体を構成する 13 種のタンパク質の構造遺伝子と、それらの翻訳に必要な 2 種の rRNA、22 種の tRNA がコードされている。そのため、病原性突然変異の生じた mtDNA が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多様な病態が誘発されることが報告されている。

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) を野生型 mtDNA と共に含有するマウス (mito-mice Δ) では、ミトコンドリア呼吸機能低下に起因する心伝導障害や腎不全など、全身性の多様な病態が誘導される。また、近年 Δ mtDNA が 80% 以上の割合で蓄積した mito-mice Δ において、大腿四頭筋で骨格筋繊維の萎縮が引き起こされることを報告した。前述のように筋繊維径はタンパク質の分解・合成によって規定されるが、mito-mice Δ の大腿四頭筋で観察された骨格筋繊維の萎縮の機構は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、mito-mice Δ における大腿四頭筋のタンパク質分解・合成経路の挙動を解析することで、ミトコンドリア呼吸機能不全によって誘導される筋萎縮の分子機構を解明することを目的とした。

方法

Δ mtDNA を 80% 以上有し病態を発症する mito-mice Δ 及び比較群として野生型マウスを使用した。両群の大腿四頭筋から抽出した RNA 及びタンパク質を用いて、qRT-PCR 法及び Western blotting 法により、タンパク質合成・分解に関わる遺伝子及びタンパク質の発現量を比較した。

結果

Δ mtDNA を高率に有する mito-mice Δ の大腿四頭筋において、骨格筋構成タンパク質を分解する時に特異的にはたらくことが

判っているユビキチンプロテアソーム E3 リガーゼ遺伝子及び、筋肥大抑制因子として知られるマイオスタチン遺伝子の発現量が有意に増加していることが確認された。また、AMP/ATP 比の増加に依存してタンパク質分解シグナルを促進し、タンパク質合成シグナルを抑制するリン酸化 AMPK の増加が確認された。一方、オートファジー関連遺伝子の発現量において増加傾向は確認されたが、有意な差は認められなかった。

考察・展望

本研究において、 Δ mtDNA が一定以上の割合で蓄積した mito-mice Δ における大腿四頭筋の骨格筋萎縮は、ユビキチンプロテアソーム系及びマイオスタチンによってタンパク質分解が亢進し、タンパク質合成が抑制されることで引き起こされていることが示唆された。さらに、リン酸化 AMPK の増加が明らかになったことから、 Δ mtDNA の蓄積がミトコンドリアの呼吸機能低下を引き起こし、AMPK の活性化を介してユビキチンプロテアソーム E3 リガーゼ遺伝子及びマイオスタチン遺伝子の発現量を増加させていることが示唆された。また、AMPK の活性化は、オートファジーを誘導することで知られている。オートファジー関連遺伝子については、現時点では発現量に有意差は認められていないが、mito-mice Δ において増加傾向が確認されているため、今後さらに詳細な検証を行う予定である。

突然変異型 mtDNA 導入細胞を用いたミトコンドリア・ダイナミクス因子の解析

小倉佳奈（筑波大学 生物学類）

指導教員：石川 香（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

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リン酸化反応を行い、生体内で必要とされるエネルギーの大部分を産生する細胞内小器官である。

ミトコンドリアは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) を有している。mtDNA には、ATP 産生を行う呼吸酵素複合体の遺伝子を構成する 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。また呼吸酵素複合体は核ゲノムにもコードされていることから、ミトコンドリアの呼吸機能は両方のゲノムによる二重支配を受けていることが知られている。

細胞内の個々のミトコンドリアは融合と分裂を頻繁に繰り返しながら、その形態をダイナミックに変化させている（ミトコンドリア・ダイナミクス）。ミトコンドリア分裂の実行因子として Drp1 が機能しており、機能不全に陥ったミトコンドリアを孤立させ、ターンオーバーを促進すると考えられている。一方で Mfn1/2 によるミトコンドリア融合を介して内容物（mtDNA や遺伝子産物）の交換が行われ、細胞へのダメージを平均化し、ミトコンドリアの機能が維持され则认为られている（ミトコンドリア間相互作用）。このようにミトコンドリア・ダイナミクスはミトコンドリアの品質管理において重要な役割を果たし、細胞の生存維持に寄与している。

ミトコンドリア・ダイナミクスと同様に細胞のミトコンドリア機能を正常に保つ上で重要な機構として、シャペロンタンパク質によるミトコンドリアへのタンパク質の輸送と Folding がある。核 DNA にはミトコンドリアで機能することが明らかとなっている 1000 種を超えるタンパク質がコードされており、これらが正常に機能するためにはシャペロンのはたらきが不可欠である。ミトコンドリアには幾つかのシャペロンタンパク質が局在しているが、そのうち Grp75 は細胞質からミトコンドリア内へのタンパク質輸送に機能し、その働きは Tid1 によって補助されている。HSP60 はミトコンドリア内へ輸送されたタンパク質の Folding を行う。

このように、ミトコンドリア・ダイナミクスとシャペロンタンパク質の働きは、それぞれミトコンドリアが正常な機能を維持する上で必要不可欠であると考えられる。しかし、mtDNA の欠損や mtDNA への病原性突然変異の蓄積などによりミトコンドリアに機能異常が起きるような条件下において、これらの因子がどのような役割を担っているかという点についてはほとんど解析されていない。そこでミトコンドリアの機能異常に対して、ミトコンドリア・ダイナミクス因子やシャペロンタンパク質の発現量がどのように変化するかを調べることを通じて、それらの因子の役割を考察することを目的として、実験を行った。

【材料・方法】

所属研究室で樹立された以下の①～⑤に示す細胞株を用いて、ミトコンドリア・ダイナミクス因子やシャペロンタンパク質の発現量をウェスタン・ブロッティング法により定量した。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。

②B82mtΔ：4696 bp の大規模欠失を有する mtDNA (ΔmtDNA) と野生型 mtDNA の両方を含有し、ΔmtDNA の含有率が病原性発現の閾値を超えると著しい呼吸機能異常が誘導される。

③B82mtA11：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) を有する mtDNA のみを含有し、複合体 I の活性低下と活性酸素種 (ROS) の増加が認められる。

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することで、mtDNA にランダムな突然変異が蓄積されるようになったマウスの mtDNA を細胞融合により導入した細胞株で、著しい呼吸機能異常が誘導される。

⑤p⁰B82：ミトコンドリアは存在しているが、mtDNA を完全に欠損したマウス細胞株。好気呼吸による ATP 産生は不可能であるが、解糖系によって、生存のためのエネルギーを賄っている。

【結果・考察】

＜ミトコンドリア・ダイナミクス因子について＞

B82mtB6 と B82mtΔ を比較すると、ΔmtDNA の割合が高くなるにつれて、Drp1 の活性型とされる pS616-Drp1 と Mfn1/2 の発現がいずれも増加した。このことは、ミトコンドリアの分裂と融合が共に活性化されていることを示唆しており、ΔmtDNA の蓄積に対して呼吸機能を維持しようとする防御反応である可能性が考えられる。しかし B82mtΔ を除くその他の細胞株においては、pS616-Drp1 の発現量に有意差はなかった。即ち、突然変異の種類の違いは、ミトコンドリア・ダイナミクスに異なる影響を与えたと考えられる。

＜シャペロンタンパク質について＞

細胞株間で Hsp60 に有意差はなかったが、Tid1 に着目すると、B82mtPolG^{mut/mut} および p⁰B82 といった呼吸機能が著しく低下している細胞株において、Tid1-S の発現が高くなると観察された。Tid1-S は抗アポトーシス因子としても知られていることから、今回観察された変化は細胞の生存を維持しようとする防御反応である可能性が考えられる。

【展望】

本研究では、いくつかのタンパク質が呼吸機能の維持や細胞生存に貢献していると考えられた。そこで、それらをノックダウンすることで、ミトコンドリアの呼吸機能や生存率にどのような影響を及ぼすのかを解析したい。さらに分裂または融合因子を過剰発現させることで、呼吸機能が回復する可能性も検証したい。

ミトコンドリア DNA の突然変異がウイルス感染ストレス応答に及ぼす影響の解析

福田恭子（筑波大学 生物学類）

指導教員：石川 香（筑波大学 生命環境系）

【背景】

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化によって生体内で必要とされる ATP の大部分の産生を担う細胞小器官である。その内部には、核とは独立した独自のゲノムとしてミトコンドリア DNA (mtDNA) を細胞あたり数百～数千コピー有しており、呼吸酵素複合体のサブユニットの遺伝子や、それらを翻訳するために必要な tRNA、rRNA がコードされている。近年、ミトコンドリアが ATP 合成のみでなく、多くの生命現象に深く関わっていることが明らかにされつつあり、そのうちのひとつとして注目を集めている現象が、ウイルス感染に対する細胞の炎症応答プロセスである。

ウイルスが細胞に感染すると、Nod-like receptors (NLRs) ファミリータンパクの一つである NLRP3 が活性化し、幾つかのタンパク質と複合体を形成してインフラマソームが形成される。インフラマソームは Caspase 1 の活性化やサイトカインの分泌を介して、感染細胞に Pyroptosis と呼ばれる炎症性のプログラム細胞死を誘導することが判っている。このインフラマソームの活性化プロセスに、ミトコンドリアの膜電位やミトコンドリアから産生される活性酸素種 (ROS) が関与している可能性が指摘されているが、実際にミトコンドリアの機能がどのようにインフラマソームの活性化プロセスに関わっているのか、詳しいことはほとんど解明されていない。一方で、ウイルス感染細胞ではミトコンドリアからのシトクロム *c* 放出を介した Apoptosis も誘導されることが知られているが、そこに至るまでの詳細な応答経路も判っていない。このように、ウイルス感染細胞が引き起こす 2 つのタイプの細胞死については、いずれもミトコンドリアが関わっていることが示唆されているが、その詳細はほとんど明らかにされていないのが現状である。

所属研究室では、mtDNA に病原性突然変異を有することでミトコンドリアの呼吸機能が低下したり、ROS 産生が増加したりするマウス培養細胞が樹立されている。これらの細胞におけるウイルス感染応答を、野生型 mtDNA を有する細胞の応答と比較することは、ミトコンドリアの機能がウイルス感染応答にどのように関わっているのかを解析する上で、非常に有効な手段であると考えられる。

【目的】

mtDNA に病原性突然変異を有するマウス培養細胞を用いて、ウイルス感染応答におけるミトコンドリアの役割を検証する。

【材料と方法】

同一の核背景に、異なる mtDNA を有するマウス繊維芽細胞由来の培養細胞株として、所属研究室で樹立された以下の 3 種類の細胞を実験に用いた。

- ①B82mtB6 : C57BL/6 (B6) マウスに由来する、野生型 mtDNA のみを有する。
- ②B82mtND6^M : mtDNA にコードされた呼吸酵素複合体 I のサブユニットである ND6 遺伝子に G13997A 点突然変異を有し、

複合体 I の活性低下と、ROS の過剰産生が認められる。

- ③B82mtΔ : mtDNA 上に 4696 bp の大規模欠失を有する欠失型 mtDNA (ΔmtDNA) と野生型 mtDNA の両方を含有しており、ΔmtDNA の割合が高くなると、呼吸機能の低下が誘導される。

これらの細胞に対し、インフルエンザウイルス株 PR8 を感染させ、下記の項目を検証した。

1) ウイルス感染率の検証

感染後の細胞に対し、ウイルスに特異的なタンパク質である Nucleoprotein (NP) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、感染が成立した細胞の割合を検討した。

2) 誘導される細胞死の種類の検証

2) - 1 阻害剤による検討

ウイルス感染により誘導される細胞死が、mtDNA の種類によって異なるかどうかを確認するために、Apoptosis に必須の Caspase 3 または、Pyroptosis に必須の Caspase 1 に対する阻害剤を添加した条件における細胞死を、トリパンブルー染色法によって継続的に計測した。同時に、阻害剤を添加しない条件での総細胞死数も計測し、細胞死誘導率も確認した。

2) - 2 直接的な定量による検討

2) - 1 の方法では、阻害剤の効果が十分に得られない場合には正確に Apoptosis と Pyroptosis の割合を検討することが難しくなる。そこで、Apoptosis と Pyroptosis にそれぞれ特異的に関与する分子をラベル化して観察することにより、どちらのタイプの細胞死が起きているかをより直接的に観察した。Apoptosis 特異的な分子として活性化 Caspase 3 に特異的な抗体を用いた。また、Pyroptosis 特異的な分子として Caspase 1 の活性化に必須のアダプター分子である Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) を GFP と融合した遺伝子を発現させ、インフラマソームの形成効率を観察した。

【結果】

- 1) の検討の結果、各細胞に対するウイルスの感染率は、野生型 mtDNA を有する B82mtB6 と比較して B82mtND6^M や B82mtΔ では同等であった。

- 2) の検討より、総細胞死数は変異型 mtDNA を有する細胞において増加傾向が見られた。

これらの結果は、mtDNA に病原性突然変異が存在すると、細胞のウイルスに対するストレス応答性が変化する可能性を示唆している。より詳細な結果については、発表会にて報告する。

ショウジョウバエ始原生殖細胞において性特異的発現を示す遺伝子の同定

渡邊 隆寛（筑波大学 生物学類） 指導教員：小林 悟（筑波大学 TARA センター）

【背景・目的】

有性生殖をおこなう動物では、個体の形態や機能にオスとメスの性差が生じ、それぞれ精子や卵という生殖細胞が作られる。いくつかの動物種において、個体（体細胞）の性決定機構は明らかになっているが、生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞の性決定機構に関しては不明な点が多い。そのような動物の中でもよく研究されているショウジョウバエでは、体細胞とは異なる機構によって、始原生殖細胞の性が決定することが知られている。たとえば、オスの始原生殖細胞では、*Phf7* と呼ばれる遺伝子が発現し、オス化に関わる。一方、メスの始原生殖細胞では *Sxl* と呼ばれる遺伝子が発現しメス化に関わる。しかし、この2種類の遺伝子以外にも始原生殖細胞の性決定に関わる遺伝子が存在すると予想されている。このような遺伝子を明らかにするためには、始原生殖細胞において性特異的発現する遺伝子を同定すること、その機能を解析し始原生殖細胞の性決定に関わるかを明らかにすることが必要である。

本研究では、その第1段階として、ショウジョウバエの始原生殖細胞において性特異的発現（あるいは性差を示す発現）がみられる遺伝子を同定することを試みた。本研究室では、胚発生後期の胚からセルソーターを用いて単離したメス及びオスの始原生殖細胞のトランスクリプトームを RNA-seq 法で解析した先行研究のデータが利用できる。そこで、このデータを利用して、始原生殖細胞で発現している遺伝子のうち、雌雄の始原生殖細胞での発現量の差が2倍以上ある遺伝子に着目した。オスと比較して、メスの始原生殖細胞での発現比が最も高かった遺伝子として、CR40469 を選択した。この遺伝子は、タンパク質に翻訳されない Long non-coding RNA をコードしている。最近、Long non-coding RNA は遺伝子発現調節に関わることが明らかになりつつあり、ショウジョウバエの体細胞では性特異的な遺伝子発現調節に Long non-coding RNA が関与していることが知られている。一方、メスと比較してオスの始原生殖細胞において高発現する Long non-coding RNA をコードする遺伝子として、CR43967 に注目した。本研究では、これらの遺伝子のオス・メス始原生殖細胞における発現を解析した。

【材料・方法】

野生型のショウジョウバエの胚（ステージ1-16）から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。それをテンプレートとし、PCR により、CR40469 と CR43967 に特異的な断片（それぞれ 204kbp、209kbp）を増幅し、pGEM-T Easy ベクタープラスミドにクローニングを行った。プラスミドから RNA ポリメラーゼプロモーターを含む遺伝子断片を PCR で増幅し、それをテンプレートとして、*in vitro* 転写により、ジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたアンチセンスとセンスプローブを合成した。

CR40469 と CR43967 に対するアンチセンスプローブとセンスプローブを用いて、産卵後 0～16 時間の胚に対して *in situ* hybridization を行った。

上記遺伝子発現を解析するための胚として、メスの始原生殖細胞では、GFP と Ds-Red を発現し、オス始原生殖細胞では、GFP のみを発現する系統を用いた。

【結果】

現在 CR40469 と CR43967 のアンチセンス及びセンスプローブを用いて、*in situ* hybridization を行なっている。現在までに、少なくとも CR40469 RNA が、オスと比較してメスの始原生殖細胞で高発現することを示唆する予備的な結果が得られている。卒業研究発表会までには CR40469 および CR43967 RNA の始原生殖細胞における発現解析を行う予定である。

ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存技術の開発

酒巻 由梨奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 悟 (筑波大学 TARA センター)

背景・目的

様々な生命現象において遺伝子の機能を解析するためには、突然変異系統や強制発現系統が重要なツールとなる。これらの系統を遺伝資源として保存し、後世に残すことは、基礎研究の発展だけでなく、育種などの産業面においても重要である。

多くのモデル生物では、遺伝資源を安全に長期間保存する技術として凍結保存が使われている。凍結保存の場合、継代維持に要する時間や労力が削減できる上、長期に渡って継代を続ける間に起こる、自然突然変異の蓄積による表現型の変化を防止できるからである。

しかしながら、ショウジョウバエでは、未だ遺伝資源を凍結保存する技術が確立されておらず、10万を超える数の系統が継代飼育によって維持されているという現状がある。したがって、ショウジョウバエの系統を凍結保存する技術の開発は、ショウジョウバエを用いる研究分野において解決すべき喫緊の課題である。

ショウジョウバエの凍結保存に関する先行研究として、胚を凍結し、融解した後に発生させ子孫を得たという報告が2報あるが^{1,2}、いずれも追試が成功しておらず、実用化には至っていない。これは、凍結に適した胚の発生ステージが狭く限定されていて条件設定が難しいことや、後述するように胚は氷晶の形成なしに凍結するサンプルとして大きすぎることが原因だと考えられている。

一般に、サンプルを凍結し融解する際には、内部に氷晶を作らずに温度を下げ、上げる必要がある。氷晶ができてしまうと、細胞や組織がダメージを受け、破壊されてしまうからである。このとき、サンプルのサイズが大きいと、氷晶の生成を防ぐのがより困難となる。ショウジョウバエの胚の大きさは短径約0.2 mm、長径約0.5 mmであり、すでに凍結保存法が確立しているマウスの受精卵(直径約0.1 mm)と比較してもかなり大きい。先行研究について追試が成功していないのは、このように大きなサイズの胚を氷晶の形成なしに凍結する(発生ステージなどの)条件の設定が非常に難しいためと考えられる。

そこで当研究室では、胚に代わるサンプルとして、より小さい始原生殖細胞に着目した。始原生殖細胞は卵や精子のもとになる細胞であり、ショウジョウバエでは、胚から始原生殖細胞を取り出し、別の胚に移植し、子孫を得る技術が確立している^{3,4}。したがって、始原生殖細胞を凍結し、保存することができれば、系統を維持することが可能になる。当研究室で始原生殖細胞の凍結および移植を予備的に試みたところ、子孫を得ることに成功した。

本研究では、この予備的な成果をもとにして、この技術を実用化に近づけることを目的として、以下の実験を行った。

1. 当研究室の先行研究の追試を行う。
2. 凍結条件などを再検討し、凍結始原生殖細胞から高効率で子孫を得る方法を開発する。

方法

まず、マイクロマニピュレーターを用いて、donor (始原生殖細胞の供与体) の胚から始原生殖細胞をガラスキャピラリーに吸い

出し、集めた。donor の胚から得た始原生殖細胞を氷晶防止剤(凍結する際に細胞内で氷晶が生成するのを防ぐ目的で用いる)と混合したのち、凍結させた。

融解後、これらの始原生殖細胞を host (宿主) の胚の後極に移植し、これを P 個体とした。この P 個体中において、donor 由来の始原生殖細胞が正常に発生する割合を以下のように調べた。

- ① donor 由来の始原生殖細胞が胚の生殖巣に入る割合
- ② 成虫まで発生させた P 個体から、donor 由来の子孫を得られる割合

本研究では、donor として *EGFP-vasa* 系統(生殖系列で EGFP を発現する *EGFP-vasa* 遺伝子および眼の赤色素合成に必要な *w* 遺伝子を持つ系統)を用い、host として *yw* 系統(*EGFP-vasa* 遺伝子と *w* 遺伝子を欠いた系統)を用いた。始原生殖細胞が卵や精子になるためには、始原生殖細胞が胚の後極から移動し、生殖巣に入ることが必須である。host 胚の中では donor 由来の始原生殖細胞のみが GFP を発現するため、donor 由来の始原生殖細胞が生殖巣に移動しているか否かを観察できる(①の実験)。また、donor 始原生殖細胞由来の子孫は *w* 遺伝子を持つため、赤目の個体として識別できる(②の実験)。

結果・考察

凍結および融解を行わず、移植のみを行ったコントロール群と同様に、凍結および融解の後に移植を行った実験群においても、始原生殖細胞が胚の生殖巣に取り込まれていることが観察された。このことは、生殖巣への移動能に異常をきたすことなく、始原生殖細胞の凍結および融解処理を行うことが可能であることを示唆している。

またその後、移植した胚を親まで発生させ、その子孫を得たところ、コントロール群と比較して、実験群でも同程度の割合で donor 由来の子孫が得られた。以上の結果は、追試が成功したことを示している。

今後の展望

凍結保存技術の実用化に向け、操作を簡便化し汎用性を高めるため、host に不妊系統の利用を試みる。たとえば、*ovo^D* (発生過程で生殖細胞を消失する変異系統) や *oskar* (生殖細胞をつくらない変異系統) などの不妊系統を host として用い、凍結融解した始原生殖細胞の移植をした場合、得られる子孫がすべて donor 由来となるため、子孫を選別する過程を省略することができる。この場合、マーカーを持たない系統を donor として扱うことも可能となる。

参考文献

1. Steponkus et al. *Nature* 345, 170-172 (1990).
2. Mazur and Mahowald et al. *Science* 258, 1932-1935 (1992).
3. Kobayashi et al. *Nature* 380, 708-711 (1996).
4. Mukai et al. *MOD* 124, 570-583 (2007).

ショウジョウバエの始原生殖細胞における性特異的な遺伝子発現制御機構の解析

石崎 優木 (筑波大学 生物学類)

指導教員：小林 悟 (筑波大学 TARA センター)

背景・目的

個体 (体細胞) の性決定機構に関してはいくつかの動物種で明らかになりつつあるが、生殖細胞の性決定機構は不明な点が多い。生殖細胞の性決定に関して解析が進んでいるショウジョウバエでは、*Phf7* 遺伝子が始原生殖細胞のオス化に、*Sxl* 遺伝子が始原生殖細胞のメス化に関与することが報告されている。オスでは生殖巣の体細胞からの非自律的 (non-autonomous) なシグナルにより始原生殖細胞において *Phf7* の発現が誘導され (図1)、メスでは *Sxl* 遺伝子が始原生殖細胞において自律的 (autonomous) な機構によって活性化することが知られている。本研究では、メスの始原生殖細胞において、生殖巣の体細胞の非自律的な働きにより *Phf7* タンパク質の発現、すなわちオス化が阻害されていることを示唆する結果を初めて得たので報告する。

胚発生過程において、始原生殖細胞は、胚後極から生殖巣へと移動し、生殖巣を構成する体細胞と接する (gonad PGC)。一方、一部の始原生殖細胞は、生殖巣に取り込まれずに生殖巣外に残され (lost PGC)、生殖巣を構成する体細胞と接することはない。本研究の先行研究において、メスの gonad PGC および lost PGC では *Phf7* RNA は発現しているにもかかわらず、gonad PGC では lost PGC と比較して *Phf7* タンパク質の発現が著しく低いレベルにあることが観察されていた。この結果は、メスにおいて生殖巣体細胞からの働きによって *Phf7* mRNA から *Phf7* タンパク質の翻訳過程が阻害されることを示唆している (図1)。しかし、この観察は予備的であり、観察数が不十分であったため、本研究では観察数を増やして、結論を得ることを目的とした。

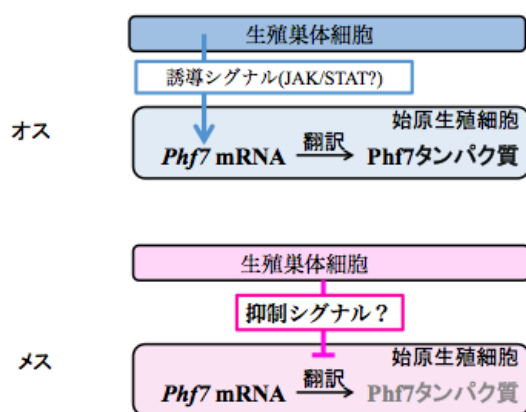


図1 ショウジョウバエの始原生殖細胞における性特異的な遺伝子発現制御機構
詳細は本文参照

材料・方法

1) *Phf7* mRNA の発現解析

Phf7 mRNA の発現は、*in situ* ハイブリダイゼーションにより検出した。この時、オスとメスを区別して観察するために、メス始原生殖細胞でのみ Ds-Red (Redstinger) を発現する胚を用い

た。採卵から 17 時間後に固定を行い、後期胚 (ステージ 16-17) の胚を観察の対象とした。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、gonad PGC および lost PGC において *Phf7* mRNA を発現している細胞数をカウントした。

2) *Phf7* タンパク質の発現解析

Phf7 遺伝子領域に HA タグが挿入されている系統 (*Phf7HA* 系統) を用いて、抗 HA 抗体の免疫組織学的染色により *Phf7* タンパク質を検出した。この時、メス特異的に発現する *Sxl* タンパク質を同時に免疫組織学的染色することで、オスとメスを区別した。観察の対象として、ステージ 16-17 の胚を用いた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、gonad PGC および lost PGC において *Phf7* のタンパク質を発現している細胞数をカウントした。

結果・考察

オス・メスの gonad PGC および lost PGC における *Phf7* mRNA と *Phf7* タンパク質の発現を比較した。その結果、先行研究と同様に、メスの gonad PGC および lost PGC では、*Phf7* mRNA は発現しているにもかかわらず、gonad PGC では lost PGC と比較して *Phf7* タンパク質の発現が著しく低いレベルにあることが観察された (図2)。一方、オスの gonad PGC および lost PGC では、*Phf7* mRNA と *Phf7* タンパク質は共に発現していることも明らかとなった (図2)。このことから、メスの gonad PGC における *Phf7* タンパク質の産生は、生殖巣体細胞の働きにより抑制されることが強く示唆される。すなわち、オスだけでなくメスにおいても、非自律的な制御が始原生殖細胞の性決定機構に関与することを初めて示唆した点で意義が大きい。今後は、始原生殖細胞のトランスクリプトームのデータをもとに、メスの生殖巣体細胞から産生される *Phf7* タンパク質の産生を抑制する「抑制シグナル」について明らかにしたい。

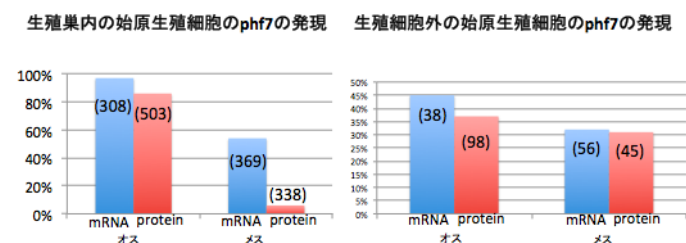


図2 生殖巣内外の始原生殖細胞における *Phf7* mRNA と *Phf7* タンパク質の発現
グラフの縦軸はRNAあるいはタンパク質を発現している始原生殖細胞の割合を示す。括弧内に観察した細胞の総数を示す。

ショウジョウバエの始原生殖細胞におけるポリコームグループ遺伝子の発現解析

添島 香苗（筑波大学 生物学類） 指導教員：小林 悟（筑波大学 TARA センター）

背景と目的

ショウジョウバエ卵の後端には、極細胞質と呼ばれる特殊な細胞質が局在しており、この細胞質を取り込んだ細胞（始原生殖細胞）のみが生殖細胞に分化できる。極細胞質中には、体細胞分化を抑制するとともに、生殖細胞への分化を誘導する因子（母性因子）が含まれることが知られている。たとえば、極細胞質に局在する母性 *pgc* RNA から翻訳される母性 Pgc ペプチドは、体細胞分化に関わる遺伝子の転写を抑制する働きを持つ。また、極細胞質に含まれる母性 *ovo* RNA から産生される母性 Ovo タンパク質は、生殖細胞で高発現する遺伝子の転写を活性化するとともに、体細胞性遺伝子の転写抑制をおこなう。しかし、これら母性タンパク質の始原生殖細胞における発現は、発生の初期に限られていることから、これらタンパク質に代わって体細胞性遺伝子の発現抑制状態を維持する別の機構が存在すると考えられる。

本研究では、転写抑制状態の維持に働くエピジェネティックな機構である、ポリコームグループ（PcG）というタンパク質群に着目した。PcG は 2 種類のタンパク質複合体、PRC2 と PRC1 で構成される。PRC2 あるいはこれら 2 つの複合体が順次働くことにより、クロマチンの構造を変化させ、特定の遺伝子の転写を抑制する。ショウジョウバエでは PRC2 のコアとなるタンパク質をコードする 5 遺伝子（*E(z)*, *Su(z)12*, *esc*, *escl*, *Caf1-55*）と PRC1 の 4 遺伝子（*Pc*, *ph-p*, *Psc*, *Sce*）が同定されている。これら遺伝子群は、線虫の生殖細胞の形成に関与することが報告されているが、ショウジョウバエを含め、他のモデル生物の生殖細胞形成における PcG の機能は明らかになっていない。

本研究では、ショウジョウバエの始原生殖細胞における体細胞性遺伝子の転写抑制状態の維持に PcG が関与するのかを明らかにするための第 1 段階として、PRC2・PRC1 を構成するタンパク質をコードする遺伝子群が始原生殖細胞中で揃って発現する時期を特定することを試みた。

方法

・ *in situ* hybridization

産卵後 0～16 時間のショウジョウバエの胚で、digoxigenin (DIG) で標識したプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。プローブの検出にはヒツジ抗 DIG-抗体を用い、Nitroblue Tetrazolium / 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) 発色で RNA の発現を観察した。

結果

表 1 に示すように、PRC2 を構成する 5 遺伝子の *in situ* hybridization では、*escl* を除く 4 遺伝子（*E(z)*, *Su(z)12*, *esc*, *Caf1-55*）は、卵嚢期（ステージ 1～2）に胚全体で発現が見られたが、胞胚期（ステージ 4～5）では始原生殖細胞における発現は見られなかった。だが、胚発生後期（ステージ 14 以降）になると *E(z)*, *Su(z)12*, *Caf1-55* の発現が再び見られるようになった。

PRC1 を構成する 4 遺伝子の *in situ* でも類似した結果が得られた。*ph-p* 以外の 3 遺伝子（*Pc*, *Psc*, *Sce*）は初期に胚全体で発現し、中期には始原生殖細胞での発現が見られなくなったが、後期にかけては *Pc*, *ph-p*, *Sce* の発現が始原生殖細胞で再び上昇した。

PRC2

遺伝子	st. 1～2	st. 4～5	st. 9～10	st. 14	st. 15	st. 16	st. 17
<i>E(z)</i>	+	-	±	±	+	±	-
<i>Su(z)12</i>	+	-	-	±	±	±	±
<i>esc</i>	+	-	±	-	-	-	-
<i>escl</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caf1-55</i>	+	-	±	±	+	+	+

PRC1

遺伝子	st. 1～2	st. 4～5	st. 9～10	st. 14～16
<i>Pc</i>	+	-	±	±
<i>ph-p</i>	-	-	±	±
<i>Psc</i>	+	-	±	-
<i>Sce</i>	+	-	±	±

表 1、PRC 1 及び 2 を構成するタンパク質をコードする遺伝子群の始原生殖細胞における発現。+は発現あり、±は非常に弱く検出、-は発現検出不可を示す。st.1～2 に関しては胚全体での発現を示す。

考察と展望

本研究で、ショウジョウバエの始原生殖細胞における PcG 遺伝子群の発現は、胚発生の後期にかけて（ステージ 14 以降）上昇することが明らかとなった。今後は、始原生殖細胞において、RNA 干渉法（RNAi）を用いて PcG の働きを阻害することにより、PcG が体細胞性遺伝子の発現抑制状態の維持に機能しているか否かを検証していきたいと考えている。

PcG をコードする遺伝子群、特に PRC2 をコードする遺伝子群は、モデル生物間で保存されていることが知られている。ショウジョウバエの生殖細胞における PcG の機能を明らかにすることにより、動物に共通する生殖細胞の発生機構の解明につなげていきたい。

網膜の瘢痕再生転換因子探索に向けたトランスジェニックイモリの作製

島 崎 健 瑛 (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)

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。網膜は、眼球内に存在する中枢神経組織で、光受容細胞（視細胞）を含む神経性網膜（neural retina: NR）と、NR と脈絡膜血管層と間にあり NR の生理機能を支持する網膜色素上皮（retinal pigment epithelium: RPE）からなる。

一般に、NR の損傷や RPE の変性は様々な網膜疾患および失明の原因である。ヒトでは、NR が損傷すると、RPE 細胞が基底膜から脱離・遊走し、NR の損傷箇所を覆う増殖膜（epi/sub-retinal membrane）、いわゆる「瘢痕」を形成する。増殖膜は、発達すると収縮し網膜剥離を進行させるため、失明の原因となる（増殖性硝子体網膜症）。この一連の過程で、RPE 細胞は上皮の性質を失うとともに多能性を獲得し、増殖し、最終的に筋線維芽細胞に分化する。一方、高い再生能力で知られるイモリ（有尾両生類イモリ科の一群）は、眼球から NR をすべて失っても RPE から完全な網膜を再生することができる。成体イモリの RPE 細胞は、ヒトと同様に、NR の損傷に伴って上皮の性質を失うとともに多能性を獲得する（この細胞を RPESC と呼ぶ）が、ヒトとは異なり、RPESCs は 2 集団に分離し、それぞれ基底膜に沿って内外 2 層の前駆細胞層を形成し、これらは最終的に NR と RPE 自身をそれぞれ再生する。

最近、私が所属する研究室では、成体イモリの RPESCs に新規に発現する転写因子 Pax6 の発現をノックダウンすると、RPE 細胞は網膜を再生できなくなり、代わりに筋線維芽細胞に分化し、増殖膜様の構造体を形成することを明らかにした[1]。このことは、Pax6 が RPESC の運命を増殖膜（瘢痕）形成から網膜再生に切り換える重要な役割を担っていることを示している。また、イモリの卓越した網膜再生能力が、増殖性硝子体網膜症のような外傷性網膜疾患と共通のメカニズムを土台として進化した、とする新たな仮説に導く。もし、RPESC における Pax6 の役割が明らかになれば、イモリの網膜再生能力の進化過程が理解できるだけでなく、ヒトの増殖性網膜疾患を治療し網膜再生に転換させる研究に繋がるかもしれない。

そこで本研究では、成体イモリ RPESCs における Pax6 の機能を解析するためのトランスジェニックイモリの作製・量産に取り組んだ。詳しい方法と結果は、発表会場で報告する。

[参考文献]

- [1] Casco-Robles, M.M. et al. (2016) Turning the fate of reprogramming cells from retinal disorder to regeneration by Pax6 in newts. Scientific Reports 6:33761.

線虫 *C. elegans* に対する米ケフィランの熱ストレス耐性向上作用の解析

阿部 将之（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に着目し、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。

また、機能性食品の米ケフィランにはケフィランに加えデキストリンが含有されていることが、米ケフィランからデキストリンを取り除いたケフィラン単体についても、同様に線虫に対する生理作用解析を通して長寿遺伝子への働きを調べた。

【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。また長寿遺伝子であるとされる *daf-16* 欠損型の変異体を用いて同様の実験を行った。

(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、24 時間後の線虫のスラッシング運動回数を測定した。

【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。
また、*daf-16* 欠損変異体においても寿命の延伸が確認された。
- (2)、(3)は現在進行中であり、結果及び考察は発表会にて口頭で発表する。

【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を示すことが示唆された。寿命延長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。一方、*daf-16* 欠損変異体でも寿命の延伸がやや認められたことから、ケフィランは *daf-16* を介さない経路で寿命の延伸に作用した可能性も考えられる。

今後は、ケフィランと *daf-16* の関連について検証を繰り返すとともに、ケフィランそのものの生理作用を探るため、ケフィラン単体投与による生理作用の解析を行っていく予定である。

線虫のストレス耐性に対するアイスプラント抽出物の生理作用解析

村井 隼弥（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、野菜などに含まれる植物由来の生理活性物質であるファイトケミカルの生活習慣病の予防や改善、抗老化に効果的であるとして注目を集めている。

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は南アフリカ原産の植物で、耐塩性が高く、塩ストレス下では塩類を塩囊細胞に蓄積させる塩生植物である。またアイスプラントは、血糖値を低下させるピニトールや、脂肪の蓄積を抑制するミオイノシトールを含むことが知られており、抗肥満や抗糖尿病などの機能性食品としても期待されている。本研究の先行研究において、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞株に対してアイスプラント抽出物が分化関連遺伝子の発現抑制と脂肪合成・脂肪蓄積の抑制に関わることが明らかにされている。

本研究では、このアイスプラントの生理作用について、線虫を用いて解析を行った。

【材料・方法】

・モデル生物

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

・同調処理

実験に使用する線虫は、成虫の表皮を NaClO 処理によって破碎し、得られた卵を生理食塩水 S-basal で 18 時間培養し、発生段階の揃った幼虫を得た。

・アイスプラントの抽出

アイスプラントを凍結乾燥させ、乳鉢ですりつぶし、得られた粉末を dDW で抽出した。

・D-Pinitol / myo-Inositol

前述したような効果が知られているため、ポジティブコントロールとして用いた。

・実験方法

(1) 脂肪蓄積量の測定

同調処理により得られた幼虫を 78 時間培養し、アイスプラント抽出物/D-Pinitol, myo-Inositol を添加し 18 時間培養した。その後、線虫を Nile-Red 試薬で染色し、蛍光顕微鏡で撮影した画像を画像解析ソフト ImageJ を用いて解析した。

(2) 熱ストレス耐性試験（運動性の回復）

同調処理により得られた幼虫を 78 時間培養し、アイスプラント抽出物/D-Pinitol, myo-Inositol を添加し 18 時間培養した。その後、線虫を無菌 NGM プレートに移し、35℃で 4 時間培養し再度 OP プレートに移し、0, 12, 24 時間後に線虫のスラッシング運動の回数を測定した。

(3) 熱ストレス耐性試験（生存率）

同調処理により得られた幼虫を 78 時間培養し、アイスプラント抽出物/D-Pinitol, myo-Inositol を添加し 18 時間培養した。その後、線虫を無菌 NGM プレートに移し、37℃で飼育して 4, 6, 8 時間後の生存率を測定した。

(4) ミトコンドリア染色

同調処理により得られた幼虫を 78 時間培養し、アイスプラント抽出物/D-Pinitol, myo-Inositol, MitoTracker Green/Orange を添加し 18 時間培養した。その後蛍光顕微鏡で撮影した画像を画像解析ソフト ImageJ を用いて、ミトコンドリアの膜電位と量について解析した。

(5) 酸化ストレス耐性試験

同調処理により得られた幼虫を 78 時間培養し、アイスプラント抽出物/D-Pinitol, myo-Inositol を添加し 18 時間培養した。その後、線虫を 0.1 % H₂O₂ に移し 1 時間毎に生存率を測定した。

(6) 寿命測定

同調処理により得られた幼虫を 4 日間培養した。その後 2~3 日毎に試料の添加と生存個体数の測定を行った。

【結果】

- (1) マウス前駆脂肪細胞における先行研究の結果に反して、線虫ではアイスプラント抽出物投与による脂肪蓄積の抑制は起こらず、むしろ脂肪蓄積が促進された。
- (2) アイスプラントの投与による線虫の熱ストレス耐性（運動性）への変化は見られなかった。
- (3) 現在実施中である。
- (4) 膜電位については安定した結果が得られていないが、ミトコンドリア量については、アイスプラントの投与によって増加した。
- (5), (6) 現在実施中である。

【今後の展望】

本研究は機能性食品と成り得るものの一次的なスクリーニングであるため、今後は各種ストレス耐性や寿命延伸を司る遺伝子の変異体を用いた解析及び関連遺伝子の発現解析など作用機序の解明を行い、さらにはマウスを用いた *in vivo* での生理作用解析を行う予定である。

香り成分による線虫 *C.elegans* のストレス耐性の解析

須藤 華織（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]

アロマオイル（エッセンシャルオイル）とは、植物の花や葉、木部、果皮、樹皮、根、種子から抽出した天然の液体のことで、その植物の香り成分が凝縮されて含まれている。この植物の力を人体に取り入れる自然療法としてアロマセラピーが知られている。近年では女性を中心に、家庭で芳香浴やアロマクラフトという形で楽しんだり、ヨガと組み合わせたりと、アロマオイルの人気は高い。一方、インドやスリランカでは古くから民間医療に使われている。このように、伝統的に、あるいは体感で、香りによる「リラックス効果」や「リフレッシュ効果」などがうたわれているが、その生理作用や作用機序を科学的に示した研究はまだ多くはない。そこで私は、アロマセラピーに広く用いられる 10 種類のアロマオイルの生理作用を解析し、その中の 1 つの機能成分についてさらに詳細な生理作用を解析した。

[方法]

<モデル生物>

本研究では線虫 *C.elegans* 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。飼育は 20℃で行った。

<香りサンプル>

日本アロマ環境協会検定 2 級エッセンシャルオイル（生活の木）、1S-(-)- α -pinene（東京化成工業）、1R-(+)- α -pinene（同）、3-methyl-1-butanol（和光純薬工業）を用いた。

<同調処理>

発生段階をそろえるため、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 溶液で培養した。その後、幼虫を OP プレートで 72 時間飼育した。

（1）走化性の測定

同調処理後 96 時間を OP プレート上で飼育した線虫を、プレートの中心から 3cm の 4 点に 5 匹ずつ移した。中心に香りサンプルを置き、一時間後に中心に近づいた線虫の数を測定した。

（2）熱ストレス耐性（運動性）

線虫を同調処理後 72 時間 OP プレート上で飼育し、その後裏蓋に香り物質を塗布したプレート上で 24 時間飼育した。その線虫を無菌培地に移した後、35℃の熱ストレスを 4 時間与えた。熱ストレス直後と、さらに 20℃で 6 時間飼育した後の計 2 回、線虫の thrashing 運動（15 秒間）の回数を測定した。

（3）熱ストレス耐性（生存率）

線虫を同調処理後 72 時間 OP プレート上で飼育し、その後裏蓋に香り物質を塗布したプレート上で 24 時間飼育した。次いで、OP50 を塗布したアンピシリンプレートに移し、35℃の熱ストレスを与えた。10 時間目から 18 時間目まで、2 時間おきに生存個体数を測定した。

（4）脂肪蓄積量の測定

線虫を同調処理後 72 時間 OP プレートで飼育し、その後、裏蓋に香り物質を塗布したプレート上で 48 時間飼育した。この線虫を Nile-red で染色し、8%エタノールにより固定後、蛍光顕微鏡で観察した。

（5）寿命測定

同調処理後 96 時間を OP プレート上で飼育した線虫を DNA 合成阻害剤 FudR で処理し、不妊にしてから 2 日毎に生存個体数を測定した。

[結果]

（1）線虫は 3-methyl-1-butanol には誘引されたが、1S-(-)- α -pinene、1R-(+)- α -pinene の場合は用いたすべての濃度で忌避した。

（2）熱ストレスを与えた後の運動性の回復率は、ジュニパーオイル、ペパーミントオイル、ユーカリオイルでコントロールに比べて高かった。また、1S-(-)- α -pinene においても大幅に回復した。

（3）アロマオイル 9 種において、生存率の大きな変化はみられなかった。そこで、運動性で回復がみられた 3 種類のアロマオイルについてさらに詳しく調べたところ、ジュニパーオイルにより生存率が高まる傾向がみられた。

（4）脂肪蓄積量は、1S-(-)- α -pinene により減少したが、1R-(+)- α -pinene により増加した。

（5）寿命は、1S-(-)- α -pinene により延伸した。

[考察]

ジュニパーオイルに含まれる機能成分として主要なものが 1S-(-)- α -pinene である。また、線虫に対するジュニパーオイルの生理作用と 1S-(-)- α -pinene の生理作用が類似しているため、表現形に現れたジュニパーオイルの効果は 1S-(-)- α -pinene の効果によるものと考えられる。さらに、1S-(-)- α -pinene により熱ストレス耐性の上昇および脂肪蓄積量の減少、また寿命の延伸が確認されたことから、ジュニパーオイルの香りには、健康的に運動性を増加させ脂質代謝を促進する効果があると考えられる。本研究により、香り成分が、肥満を原因とする生活習慣病の予防と健康寿命の延伸に役立つ可能性があることが示唆された。

ウシガエルにおける視細胞の電気生理学的解析

田中 智行 (筑波大学 生物学類)

指導教員：櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境系)

導入

視覚は生物が環境中の光の空間的情報を知覚する手段として重要な感覚で、摂食行動や逃避など様々な行動に不可欠である。視覚における光受容を担うのは網膜の視細胞であり、脊椎動物では大きく分けて暗所視に関わる桿体視細胞と明所視・色覚に関わる錐体視細胞がある。ヒトを含めて脊椎動物の桿体細胞は緑色感受性の赤桿体 1 種類であるが、一部の両生類では赤桿体細胞に加えて緑桿体細胞の 2 種類が存在する事が知られている。赤桿体は他の脊椎動物の桿体細胞と同様に光を受容する視物質としてロドプシンをもち、緑色の光を最も吸収する。一方で緑桿体は、視物質として、青色感受性錐体オプシンをもっているが、その光感受性は赤桿体と同様に高い。このことから、これら 2 種類の桿体は、暗所での色弁別を担う可能性が示唆されているが、それを裏付ける生理学的な証拠は得られていない。

本研究は、暗所における色弁別を担う細胞を調べる為に、緑桿体が比較的多く存在しているウシガエルの網膜神経細胞から電気生理学的に光応答を取得することを目指した。まず、ウシガエル網膜における緑桿体細胞の数と分布を免疫染色法を用いて詳細に調べた。また、吸引電極法により両桿体視細胞の基本的な光応答特性を調べるために、膜電流の応答を測定した。

材料と方法

実験には業者より購入した成体のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を性別の区別なく用いた。

ホールマウント免疫染色では、ウシガエルの眼球から網膜を単離し、4%パラホルムアルデヒドで固定しブロッッキングを行なった後、一次抗体として抗ロドプシン抗体および抗青錐体抗体を用い、二重染色を行った。染色した網膜組織は、蛍光倒立顕微鏡を用いて網膜の背腹・前後軸において領域を設定し、赤桿体・緑桿体の単位面積当たりの細胞数を数えた。

電気生理学的な測定には吸引電極法により視細胞外節の膜電流を測定した。実験前は暗環境に動物を一晩おいたのち、赤色照明下で低温麻酔した個体を解剖し眼球の摘出を行った。これ以降は暗条件下で実験を行なった。次に、網膜を単離し、カミソリ刃で物理的に細かく分断したのち顕微鏡のステージ上の測定チャンバーへ移した。チャンバーの溶液は酸素ガスでバブリングした Amphibian Ringer (NaCl 110 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1.6 mM, CaCl₂ 1.0 mM, Hepes 5 mM, Glucose 10 mM, EDTA 0.02 mM, BSA 0.1 g/L, pH 7.8) で灌流した。光刺激には白色 LED 光源と Neutral Density フィルターおよび 440, 480, 520, 560, 620, 660 nm の各干渉フィルターを用いた。暗条件下での操作は暗視ゴーグル、測定チャンバー内の観察には赤外線カメラを使用した。吸引用の電極は内径 8~10 μm となるようにガラスキャピラリーから作成した。測定は室温で行い、増幅器で測定した電流は 20 Hz のローパスフィルターに通し、1 kHz でサンプリングを行なった。

結果と考察

・免疫染色

図 1 は、ウシガエル前部における、染色例である。赤桿体に対して緑桿体の割合は 5.7~14.9% であり観察した網膜の箇所により若干の変動がみられた。なお単位面積あたりの細胞数に顕著な差は見られなかった。緑桿体の割合の最小値は腹側の網膜領域で、そして最高値は背側であった。それに対して、前後軸での明確な差は認められなかった。この結果からは、同様の傾向が網膜全体にわたり背腹軸に沿った密度勾配を形成している可能性が考えられる。

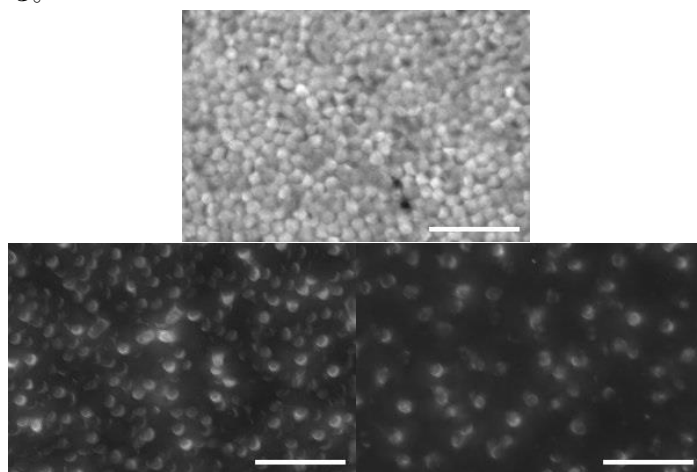


図 1. ウシガエル網膜前部における同一箇所の染色例
上:微分干渉像、左下:抗ロドプシン、右下:抗青錐体抗体
スケールバーは 50 μm

・電気生理学

吸引電極法により光刺激に対する視細胞外節の膜電流を測定した。測定中のシール抵抗は 1 M Ω のオーダーであった。応答の測定値は最大で約 20 pA であった。これら各応答の振幅から各波長の光感度を求めた。応答の測定に成功した細胞 ($n = 10$) はいずれも 480~520 nm の光刺激に対する感度が最も高かったことから、測定した細胞はいずれも赤桿体であったと考えられる。

今後の展望

今回の研究では、電気生理学的手法により、ウシガエル赤桿体の作用スペクトルを取得することに成功したが、当初の目的である緑桿体の測定にはまだ至っていない。今後は、緑桿体での同様の測定・解析を行なうべく、細胞の単離法や測定条件の最適化を行いたい。具体的には試行回数を増やすとともに吸引電極法に用いたプロトコールと同様の条件下で染色を行い緑桿体が残存しているか確認する。また、2 種類の桿体視細胞からの入力において反対の応答を示す網膜神経節細胞を調べるべく、パッチクランプ法を用いて光応答の測定も現在行なっている。

イモリ松果体における光受容タンパク質の局在

田中 千智 (筑波大学 生物学類)

指導教員：櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

松果体は脊椎動物がもつ内分泌器官である。概日リズムに関係するメラトニンを分泌する役割だけでなく、哺乳類以外の脊椎動物は松果体で光を受容して光周性の調節に利用していると考えられている。また、両生類では松果体が偏光や地磁気の向きの感知に関わることも指摘されている。

アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の松果体は第三脳室の背側にある無色で扁平な器官で、内腔には視細胞の光受容部 (外節) が存在する。その光受容細胞は網膜の視細胞と同様に繊毛型光受容細胞で、他の生物と比較してイモリでは網膜の視細胞に近い形態をしている。先行研究において、様々な光受容に関連するタンパク質の発現が松果体で報告されているが、両生類の松果体における知見は少ない。本研究ではイモリ松果体に発現する光受容タンパク質の種類と、その局在を明らかにすることを目的に、イモリ松果体組織において免疫組織化学染色を行った。

【材料と方法】

1. 免疫組織化学染色

成体のアカハライモリから脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド/PB で固定し、10%正常ヤギ血清/PBST でブロッキング後、一次抗体に抗オプシン抗体・抗 G タンパク質抗体を用いて、ホールマウント免疫染色を行った。また、細胞核を染めるために DAPI で処理した。蛍光観察は、倒立型蛍光顕微鏡で Z 軸方向 (図 1) に連続 XY 平面像を撮影し、深度の異なる画像を取得した。その連続画像にデコンボリューション処理 (Olympus cellSense) することで、焦点が合っていない部分に起因する光の広がりを取り除いた。

2. 蛍光画像の解析

1. で取得した連続画像を用いて蛍光の座標を cellSense で数値化し、松果体の視細胞外節に発現する光受容タンパク質の蛍光部位の長さや方向を解析した。

【結果】

1. 免疫組織化学染色

今までイモリの脳においてホールマウント免疫染色が確立していなかったため、まず実験条件を検討し染色法の最適化を行った。続いて、確立した染色法をもとに松果体に発現する光受容タンパク質と光受容関連タンパク質の局在を調べた。

免疫染色の結果では、松果体組織特異的に発現するタンパク質が同定された。これまで、松果体は無色のため周囲の組織と識別困難であったが、蛍光観察で得た情報を元に、無染色条件下で松果体を再現性よく摘出する方法を確立した。

2. 抗赤錐体オプシン抗体蛍光部の解析

松果体で抗赤錐体オプシン抗体によって蛍光が観察できる棒状部位は 62 本確認された。その長さは $15 \pm 5 \mu\text{m}$ となった。次に、画像から棒状蛍光の向きを角度 $-18 \sim 162^\circ$ の範囲で算出した。松果体内腔の容積は小さいため、視細胞の外節と考えられる、ほとんどの棒状蛍光は曲がっていた。そのため、一つの外節に対し複数の点を取り小さな直線に分割する作業を、62 本全てに対して

行った後、それを XY ベクトル、YZ ベクトル、ZX ベクトルそれぞれに関して 180° を五等分した範囲に振り分けて長さを足し合わせた (図 2)。その結果、YZ ベクトルでは約 40% が $-18 \sim 18^\circ$ に向いており、ZX ベクトルでは約 47% が $90 \sim 126^\circ$ に向いていた。つまり、外節は XY 平面方向に向く傾向を示すことが分かった。

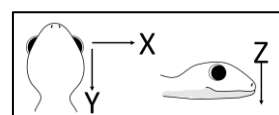


図 1 イモリ頭部と XYZ 軸

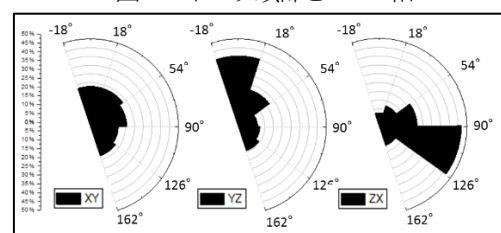


図 2 抗赤錐体オプシン棒状蛍光部位の方向

【考察】

1. イモリ松果体に存在する光受容タンパク質の種類

本研究では赤錐体オプシン、ロドプシンの強い蛍光が松果体で観察され、その蛍光は網膜の視細胞外節で確認される蛍光と似ていた。以上より、松果体では網膜と同様な光受容タンパク質が機能しており、概日リズムの調節に利用している可能性が示唆される。

2. 赤錐体オプシンの方向性の解析

蛍光画像を解析し得られた抗赤錐体オプシン抗体で染色された部位の長さや分布は電子顕微鏡観察による松果体視細胞光受容部の先行研究の知見とよい一致を示す。また、その研究では松果体視細胞は網膜の錐体細胞に近い構造を持つことが指摘されている。赤錐体オプシンは錐体細胞が持つオプシンであることと総合すると、本研究で観察された棒状の抗赤錐体オプシン抗体の蛍光は松果体視細胞の外節であると考えられる。

松果体光受容部は XY 平面方向に多く分布するという観察結果が得られた。従って、網膜の視細胞においては光の入射は、視細胞の外節の軸に平行であるが、松果体においては垂直であると考えられる。環境中から松果体に入射する光は主に Z 軸方向からと考えられるため、光の受容面積を広くし、頭蓋に入射した光を効率的に受容することに貢献すると考えられる。また、視細胞の外節の軸に垂直方向に入射した光受容に関しては、偏光特異性が報告されている。このことは、松果体の視細胞が偏光感知を担う可能性を示唆している。

【今後の展望】

両生類は細胞が大きくタフなため、電気生理学的手法を用いた研究に適した生物である。また、本研究より松果体を摘出する手法を確立した。そのため、電気生理学的手法を用いて、松果体の生理的特性とその役割を今後明らかにしたい。現在その準備として適切な松果体細胞解離方法の条件検討を行っている。

イモリ嗅細胞における揮発性匂い物質とアミノ酸応答の電気生理学的解析

佐久間 貴之 (筑波大学 生物学類)

指導教員：櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境系)

導入

嗅覚は、外界の化学物質を受容し「匂い」として知覚する化学感覚であり、摂食行動や逃避行動、生殖行動といった、個の生存と種の存続に関わる活動において重要な役割を果たしている。

脊椎動物の嗅覚系において、外界の化学物質は、鼻腔中の嗅上皮の粘液に溶解込み、嗅上皮中の嗅細胞で受容される。その後、細胞内シグナル伝達経路を経てチャネルの開閉が起き、電流が流れることで、匂い刺激が電気信号へと変換される。

脊椎動物が受容する化学物質は、数十万もの種類が存在すると言われており、嗅覚系ではこれら膨大な種類の化学物質を受容、識別している。鼻腔中で受容されるこれらの化学物質は、揮発性匂い物質と、水溶性物質であるアミノ酸に大きく分けられる。一般的に、陸上生活を行う哺乳類などでは空気中の揮発性匂い物質を、水中生活を行う魚類などは水溶性物質（アミノ酸など）を受容している。陸上でも水中でも生活する両生類であるアカハライモリでは、これら両方の化学物質を受容する嗅細胞が存在することが先行研究で示唆されているが、アミノ酸の受容における嗅細胞でのシグナル伝達機構の詳細はまだわかっていない。そこで、本研究では、イモリ嗅細胞でのアミノ酸受容による応答電流の測定と、シグナル伝達機構の解明を目的とし、ホールセルパッチクランプ法により、単離した嗅細胞の揮発性匂い物質及びアミノ酸への特性について電気生理学的解析を行った。

材料と方法

・実験動物

業者から購入したアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を雌雄の区別なく使用した。

・嗅細胞の単離

まず、低温麻酔したイモリを断頭し、2 価陽イオン (Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) フリーリングル液で満たした解剖皿上に固定した。実体顕微鏡下で、ハサミを使用し鼻孔から切り込みをいれ、嗅上皮を露出させた後、それを摘出した。摘出した嗅上皮は細かい切片にし、0.1 % コラゲナーゼ / 2 価陽イオンフリーリングル液中に移して 35 °C で 5 分間インキュベートした。その後、リングル液で 3 回リンスをし、コラゲナーゼ溶液を取り除いた。そして、パスツールピペットで 30~50 回程ピペッティングすることで嗅細胞を単離し、細胞を含んだ溶液を観察用のディッシュに移した。しばらく放置して細胞を底に定着させた後、ディッシュをリングル液で満たし、それを倒立顕微鏡のステージに設置した。なお、観察用のディッシュは予めコンカナバリン A でコーティングしたものをを用いた。

・ホールセル穿孔パッチクランプ法

嗅細胞からの電気シグナルの記録は、ホールセル穿孔パッチクランプ法を用いて顕微鏡下で行った。パッチクランプ用ガラス電極は電極プラー (Sutter instrument、P-97) を用いて作製し、電極抵抗が 8~15 Ω ほどの電極を使用した。

ホールセルパッチクランプ法では、電極内に K^+ 電極内溶液を充填した。その後、顕微鏡をのぞきながら電極の先端を嗅細胞に近づけ、陰圧を与えて細胞膜と電極を密着させ、膜抵抗値がギガオーム以上になった状態 (ギガシール) で陰圧とパルスを与え、細胞膜に穴を開けてホールセルを形成した。

穿孔パッチクランプ法では、電極内に K^+ 電極内溶液と β -エスシンを混ぜて充填した。その後、同様の手順でギガシールにし、 β -エスシンが細胞膜にイオン透過性の高い小孔を形成することを利用してホールセルを形成した。これらのパッチクランプ法では、細胞全体を流れる電流の測定が可能である。

- 1) ホールセルを形成した後、-70 mV から +70 mV まで 10 mV ステップの脱分極パルスを与え電流を記録し、匂い刺激がない状態でのイモリ単離嗅細胞の電気的特性を調べた。
- 2) ステップ電位を与えて電位依存性の応答を確認した後、揮発性匂い物質をマイクロインジェクター (IM-31、NARISHIGE) を用いて投与し、電位固定下 (-40 mV) での応答を記録し、イモリ単離嗅細胞の揮発性匂い物質への応答を調べた。また、-80 mV から +80 mV まで 40 mV 間隔で段階的に固定電位を変化させ、応答を記録した。
- 3) 匂い刺激としてアミノ酸混合溶液を用いて行った。

結果と考察

1) 膜電位を上昇させると、一過性の内向き電流の後に持続性の外向き電流が観察された。このような一過性の内向き電流と持続性の外向き電流について、固定した電位に対して生じた電流の大きさをプロットし、電流-電圧曲線を作成した。内向き電流の大きさは、電圧の上昇に伴って増加し、0 mV 付近でピークに達し、その後減少した。この時、反転電位には達しなかった。外向き電流の大きさは、-40 mV 付近から電圧の上昇に伴って増加した。以上のことから、一過性の内向き電流は電位依存性 Na^+ 電流であり、持続性の外向き電流は電位依存性 K^+ 電流であると推測され、単離したイモリ嗅細胞が一般的な興奮性神経で見られる特徴を持ち、電気的な特性を失っていないことを確認した。

2) 膜電位を -40 mV に固定し揮発性匂い物質を与えたところ、一部の嗅細胞において、内向き電流が流れる匂い受容応答を示した。電流の大きさの平均値は 63.26 pA ($n = 5$) であった。また、膜電位を -80 mV から +80 mV に段階的に変化させた条件では、揮発性匂い物質混合液によって誘導された電流の向きは膜電位に依存し、負の電位では内向き電流が流れ、正にシフトするにつれて電流は減少した。反転電位は 0 mV 付近であった。以上のことから、揮発性匂い物質への受容応答には、陽イオンチャネルが関与していることが示唆される。

3) 本実験は現在進行中であり、結果の詳細及び考察については卒業研究発表会で報告したい。

アカハライモリの陸上・水中飼育における嗅覚応答性変化の解析

丹羽文太郎（筑波大学 生物学類）

指導教員：櫻井啓輔（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

嗅覚は、五感の一つの感覚である。我々生物において、嗅覚は外部環境に存在する化学物質を匂い情報として感知し、餌の確保や種の存続など生命活動に重要な役割を果たしている。また、これらの化学物質は空気中では揮発性化学物質、水中ではアミノ酸などがあり、環境により全く異なる分子を匂い物質としている。この化学物質を匂いとして感知する機能は、鼻腔の嗅上皮に存在する嗅細胞であることが明らかにされている。

陸上生物では嗅上皮に存在する嗅細胞でアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性があることが報告され、嗅覚の情報伝達経路のセカンドメッセンジャーに cAMP が関与していることが知られている。また、AC/cAMP 経路には G タンパク質の関与が考えられ、アデニル酸シクラーゼ活性のある G タンパク質が嗅細胞上に存在することが報告された。この G タンパク質は $G_{\alpha olf}$ と命名された。一方、水生生物ではアミノ酸が匂い物質として受容されることが知られている。その情報伝達経路は、G タンパク質である $G_{\alpha o}$ を仲介とした PLC/IP3 経路であると考えられている。

今回実験で使用するアカハライモリを含む両生類において、揮発性化学物質とアミノ酸の両方を匂い物質として感知していることが明らかになっている。またイモリは、生息環境がかわることによって嗅覚の応答性が変化させることが知られている。アカハライモリの生息環境を水中から陸上に変化させたところ、揮発性化学物質の応答性は変化しなかったのに対し、アミノ酸に対する応答性が高まることが示唆された。また、陸上への環境変化に伴い嗅細胞の繊毛が伸長することが報告されている。これらの結果から、アミノ酸の応答性の上昇に嗅細胞の伸長が関与する可能性が示唆される。本研究では、陸上と水中で飼育したイモリにおいて、揮発性匂い物質の受容を担う G タンパク質 $G_{\alpha olf}$ と、アミノ酸の受容を担う G タンパク質 $G_{\alpha o}$ を指標に、免疫組織化学染色で各条件下における両嗅細胞の分布と嗅細胞の長さを調べること、細胞の応答性の上昇と形態の変化の関連を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

実験動物

業者から購入した千葉県産のアカハライモリを、2 つのグループに分け、次の条件下で飼育した後、解析を行なった。

陸上飼育：

水を抜いた水槽の底に湿らせたキッチンペーパーを置き、その上で摂餌させずに 5 日間飼育した。

水中飼育：

水を張った水槽中で、摂餌させずに 5 日間飼育した。

免疫組織化学染色

アカハライモリの嗅上皮を対象に、抗 $G_{\alpha olf}$ 抗体および抗 $G_{\alpha o}$ 抗体を用いた免疫組織化学的手法による染色を行なった。麻酔処理後、4% パラホルムアルデヒド液で固定し、脱灰液である 0.25

MEDTA (pH 7.4) に漬けた。その後、20%スクロース液に置換し、OCT コンパウンドで凍結包埋した。包埋したサンプルは、20 μ m 厚で薄切し、スライドガラスに貼り付けた。組織切片は PBS に浸し、OCT コンパウンドを除去した。その後でメタノール処理をし、PBS 洗浄を行った。次にブロッキング液 (2% BSA/PBS) を滴下し、モイスタチャーボックスに入れて、4°C で 24 時間ブロッキングした。次に、抗 $G_{\alpha olf}$ 抗体、抗 $G_{\alpha o}$ 抗体を用いて組織切片に対して、一次抗体溶液 (1/1000 倍希釈) を 4°C で 24 時間反応させた。次に、組織切片に対し二次抗体溶液を、室温で 1 時間反応させた。その後、PBS 洗浄を行い、スライドガラスを封入した。スライドは蛍光顕微鏡 (Olympus: IX83) により観察し、画像を取得した。

嗅細胞の単離と、嗅細胞の長さ測定

アカハライモリの嗅上皮から嗅細胞の単離を行った。まず、摘出した嗅上皮をコラゲナーゼ処理するため、1 mg/ml コラゲナーゼを含む二価イオンを除去生理的塩類溶液に移し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、生理的塩類溶液で洗浄し、嗅細胞を単離した。単離した嗅細胞は、コンカナバリンでコートされたディッシュに移し、細胞をディッシュ底に固着させるために 30 分間静置した。その後、顕微鏡により単離した嗅細胞の微分干渉像を取得し、画像解析ソフトウェアにより嗅細胞の長さを計測した。

【結果・今後の展望】

免疫組織化学染色より、アカハライモリを水中飼育した条件下では、嗅上皮において G タンパク質 $G_{\alpha o}$ が広く分布し、陸上飼育した場合は $G_{\alpha olf}$ が広く分布する傾向が観察された。下の図は、嗅上皮上における抗 $G_{\alpha o}$ 抗体の免疫組織化学染色例である。このような観察を今後、水中飼育、陸上飼育において行い $G_{\alpha o}$ と $G_{\alpha olf}$ の発現分布を解析する。

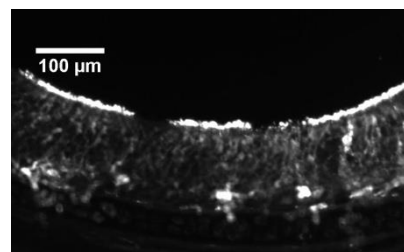


図1 イモリ嗅上皮における G タンパク質 $G_{\alpha o}$ の発現

また両条件下における嗅細胞の長さ測定も行っている。これらの結果は合わせて 2 月の発表時に報告する。

ゾウリムシの刺激応答性に対する光の効果：光条件の定量的検討

平良 恵大（筑波大学 生物学類）

指導教員：大網 一則（筑波大学 生命環境系）

導入

単細胞生物ゾウリムシは様々な環境要因を刺激として受容し、適切に反応して生きている。一つの細胞が一つの個体を成すために、単一の細胞が多種の刺激に反応することが可能である。これまでに、これら刺激間の相互作用については、良く知られていないが、光環境下で培養したゾウリムシは、通常よりも化学刺激に対して過敏に反応するという現象が明らかになっている。これは、光条件により、ゾウリムシの化学刺激感受性が影響を受けることを意味している。これまでの実験では、光条件としての分光特性や照射時間、光強度、光周期などの定量的な制御とその際のゾウリムシの反応の関係については調べられていない。私は、この光による刺激応答性の制御、光条件と反応性の相関をより詳しく調べることに興味を持った。この実験は光条件のどのような要素が、ゾウリムシの化学刺激応答性にどのような影響を与えているのかを調べることを目的としている。今回は、特に光照射時間と光強度の二つの条件に着目し、実験を行った。

材料・方法

ゾウリムシは麦わらの抽出液を用いて、20度で培養した。培養条件では、室内の照明により、20 lux ほどの光があたる。培養したゾウリムシは標準溶液(1mM KCl、1mM CaCl₂、1mM Tris-HCl、pH7.4)で3回洗い、30分間室温で放置した後、実験に用いた。

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

ゾウリムシの化学刺激感受性に対する光照射の効果調べる実験では、洗浄したゾウリムシを光が遮断された暗条件下で半日以上培養し、コンディショニングを行った。このコンディショニングのあと、ゾウリムシを、光条件をコントロールした発泡スチロールの箱に移した。実験用の光源には熱発生が少ない光ファイバーを用い、小さな穴を通して光ファイバー先端を箱の中に導き、箱の内部を照射した。光を照射した状態で24時間箱の内部の温度をモニターしたが、室内温度との差はなかった。この箱の中に、コンディショニングを行ったゾウリムシを2群に分けて入れた。片方はアルミホイルで完全に覆い光を遮断し（暗条件）、もう片方は、アルミホイルで覆わずに光を照射した（明条件）。この条件下に一定時間おいた後に、化学刺激に対する行動反応を調べ、光条件の効果を検討した。

結果

① ゾウリムシの化学刺激に対する行動反応。

通常培養条件下のゾウリムシは標準溶液からKイオン濃度の高い刺激液に移すと、速やかに後退遊泳を始め、しばらく経つと細胞の先端部分を旋回させた後、ゆっくりと前進遊泳に戻っていた。これら一連の行動反応は、刺激液のKイオン濃度が高い

程顕著であり、後退遊泳の持続時間や旋回運動の持続時間は長くなった。

② ゾウリムシの化学刺激感受性に対する光照射時間の効果。

次にKイオン刺激に対する行動反応に対する光照射時間の効果を調べた。光強度を2000 luxとして、明条件と暗条件下でゾウリムシの後退遊泳持続時間を測定した。ここでは化学刺激としてK濃度20 mMの刺激液を用いた。照射時間が3時間までは、化学刺激に対するゾウリムシの後退遊泳持続時間は、明条件、暗条件共に違いがなかった。照射時間を3時間以上に増すと明条件下のゾウリムシの示す後退遊泳のみが延長した。照射時間を更に延ばすと、明条件下のゾウリムシの後退遊泳は更に延長したが18時間以上になると、後退遊泳持続時間の増加は止まり、ほぼ一定となった。これら一連の実験で、暗条件においては、照射時間の長さに関わらず、後退遊泳の延長は見られなかった。

次に、光強度の影響を調べた。光照射時間を24時間に固定し、光強度を変化させて(50 luxから4000 lux)ゾウリムシの化学刺激に対する後退遊泳の持続時間を調べた。50 luxの明条件下では、ゾウリムシの後退遊泳持続時間がわずかに増加した。2000 luxまでは、光強度の増加に従い、明条件下における後退遊泳持続時間が長くなった。更に光強度を増して4000 luxにすると、ゾウリムシの後退遊泳持続時間は減少し、通常条件とほとんど変わらなくなった。

考察

今回の実験で、ゾウリムシを光条件下で培養した場合、暗条件下に比べ化学刺激に対する反応が顕著になることを確認した。このような刺激応答性の亢進は、これまで言われているように、視覚を利用した捕食者から逃避する際に有利であり、ゾウリムシの生存に役立つ生理学的適応であると捉えることができる。今回は、化学刺激にしぼって、光条件の影響を調べているが、機械刺激や、他の化学物質に対する反応性が影響を受けているかどうかについては興味を持たれる課題である。

今回の実験で光条件を制御した結果、光による反応性の亢進は光照射の持続時間と光強度の何れにも依存していることが明らかとなった。光条件に依存した反応性の亢進がおおよそ18時間で最大値をとり、飽和した事実は、ゾウリムシの刺激応答性の再構成にかかる時間を反映しているかもしれない。また、今回調べた光強度は、自然状態での屋外の光強度(100000 luxに及ぶ場合がある)と比べると一桁以上小さく、比較的弱い自然光に対してもゾウリムシの刺激応答性に影響があると考えられる。

今回の実験では、光は連続照射しているが、実際の自然条件下では光条件は24時間周期で変化する。自然状態で、ゾウリムシの反応性が光によりどのように制御されているかを知るためには、光周期を制御した実験が必要である。また、今後、分光学的研究、電気生理学的研究等を行うことにより、光受容器の実体や、反応性亢進のメカニズムについて明らかになると考えられる。

ゾウリムシの H^+ に対する行動反応：順応 pH と集合 pH の関係

萩原 和輝（筑波大学 生物学類）

指導教員：大網 一則（筑波大学 生命環境系）

導入

ゾウリムシは細胞表面にある繊毛を使い遊泳する単細胞生物である。様々な外界の刺激に対する反応性をもち、遊泳行動を変化させることにより、刺激に対して集まったり、反対に刺激を避けたりする。

ゾウリムシは外界の温度刺激に対しても行動反応を示すことが知られており、温度勾配環境下では特定の温度へ集合する。ゾウリムシが集合する温度は培養温度に等しいことが示されており、培養温度を変えると集合する温度も変わる。温度刺激に対するゾウリムシの行動反応の特徴は、特定の温度を絶対値として判断し、そこに集合することである。一般の有害物質や光等に対する反応では、多くの生物はそれら刺激の相対値を判断し、行動を決定していると考えられるが、温度の場合は、相対的な刺激の強度（温度の高低）に依存して行動すると、極端な高温あるいは低温に集合してしまうことになり、生存に不都合である。

ゾウリムシは様々な化学物質に対しても反応性を有している。そのうちのひとつに pH (H^+) があるが、温度に対する反応と同様にゾウリムシは pH の絶対値を判断していると考えられる。私は、ゾウリムシが pH の絶対値を認識し、遊泳行動を制御していることに興味を持った。温度刺激に対する反応は、環境情報の絶対値を判断すると同時に、培養温度という履歴に基づいた集合を示す。これは、生物の環境に対する適応能力を意味し、また、記憶の単純な形として捉えることができ、興味深い。このような履歴に基づいた行動反応の可塑性がゾウリムシの pH に対する行動にも見られるかどうかは興味深い問題である。この実験では、ゾウリムシが実際に特定の pH を判断して集合行動を示すかを確認し、更に、この集合 pH が事前に pH を制御した前処理により変化するか否かに着目して実験を行った。

材料・方法

実験に用いたゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦藁の抽出液で培養した。培養したゾウリムシは標準溶液に ME S バッファーを加えた溶液 (1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Tris-HCl, 1 mM MES, pH 5.5~8.5) で 2 回洗い、30 分以上順応させた後、実験に用いた。この溶液は pH 5 から pH 9 の範囲で緩衝能をもつ。

異なる pH の溶液に対するゾウリムシの集合反応は、2 種類の薄い溶液が中央で接する実験槽で調べた。2 つの液槽（標準槽、試験槽と呼ぶ；それぞれ 9 mm×10 mm×1.05 mm）ははじめ離して用意し、実験開始時に結合した。ゾウリムシは、はじめに、標準槽だけに入れ、実験開始後、ゾウリムシの遊泳に伴うそれぞれの溶液槽でのゾウリムシの分布の変化をビデオカメラを用いて記録し、解析した。今回解析した pH は 5.5、6.5、7.5、8.5 の 4 種類であり、隣接した pH 値をもつ溶液 2 種類について集合反応を調べた。ゾウリムシは標準槽に用いた pH 値をもつ標準溶液で洗浄して実験に用いた。

ゾウリムシの集合の程度は集合指数として表した。集合指数は、標準槽中のゾウリムシの分布数から試験槽中の分布数を引き、そ

れを両液槽中のゾウリムシの総数で割ったものである。分布が均一な場合値は 0 となり、標準槽に完全に集合した場合 1、試験槽に集合した場合 -1 の値をとる。

結果・考察

はじめにコントロール実験として、標準槽と試験槽に同じ標準溶液 (pH 7.5) を満たして、ゾウリムシの分布を調べた。はじめ、標準槽だけに入れておいたゾウリムシは、溶液結合とともに、両液槽間を移動し、およそ 3 分すると、両液槽間のゾウリムシの数はほぼ同じになり、その後、5 分後まで維持された。

次に pH 5.5 の標準液（標準槽）と pH 6.5 の標準液（試験槽）でのゾウリムシの分布を調べた。ゾウリムシは溶液結合後両液槽間を移動し、2 分程すると分布の割合はほぼ一定値を示した。このときの集合指数は約 0.1 であった。この結果は、ゾウリムシの分布が、標準液に用いた pH 5.5 の標準液側のわずかに偏ったことを示す。

同様に pH 5.5 と 6.5 の溶液に対するゾウリムシの集合を pH 6.5 の溶液を標準槽に満たして調べた。この場合も、ゾウリムシの分布の割合は 2 分程で一定となり、その値は 0.7 であった。これは先ほどの pH 5.5 で洗った時と異なり、ゾウリムシの分布が pH 6.5 の溶液に大きく偏ったことを示す。即ち、同じ pH に対する集合反応であっても、事前にゾウリムシを入れておいた条件（履歴）の違いにより、ゾウリムシの集合が大きく影響を受けたことになる。

同様に pH 6.5（標準槽）と 7.5（試験槽）の溶液でゾウリムシの集合を調べた。ゾウリムシは溶液結合後両液槽間を移動し、2 分程すると分布の割合はほぼ一定値を示した。このときの集合指数は約 0.1 であった。同じ pH に対する集合反応を pH 7.5 を標準槽に満たして調べると、集合指数は約 0.2 であった。これはゾウリムシの分布がわずかに pH 7.5 の溶液に偏った事を示す。従って、この 2 つの pH に対する行動反応も、ゾウリムシを洗った pH 値により、大きく影響を受けたことになる。

次に pH 7.5 の標準液と pH 8.5 の標準液で調べると、pH 7.5 を標準槽にした時には集合指数は約 0.2 であり、pH 8.5 を標準槽にしたときは約 -0.5 でありどちらの場合も、ゾウリムシは pH 7.5 の溶液に集合した。

今回の実験から、ゾウリムシが pH の違いを認識し集合反応を示すこと、また、その集合 pH は事前に経験した履歴により変化する事実が示された。これまでは、pH を調整していない培養液から実験を開始しているが、今後、既知の pH の溶液にゾウリムシを一定期間インキュベートし、その際の、ゾウリムシの pH に対する集合反応と順応 pH の関係を詳細に調べる所存である。

ゾウリムシの圧力変化に対する行動反応

大川奈都美（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）

1. 緒言

淡水に生息する単細胞生物ゾウリムシは、体表に多数の繊毛をもち活発な遊泳を示す。ゾウリムシは他の生物同様、外界の各種刺激を受容する能力をもち、それら刺激に対応して行動反応を示す。物理的障害物や有害な化学物質に対する回避反応はその一例である。

外界の圧力は生物に作用する物理的な環境要因のひとつである。これまでに生物の外界の圧力刺激に対する反応の研究は他の刺激に対する研究に比べ、あまり行われていない。私はゾウリムシを例にとり、生物が外界の圧力を受容することができるのか、また、圧力受容の結果、どのような反応が生じるのかに興味をもった。この実験は、圧力変化刺激に対するゾウリムシの行動反応を調べることを目的とする。

2. 材料と試験方法

実験に用いたゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)はバクテリアを植え付けた麦藁の抽出液を用いて 20℃で培養した。培養したゾウリムシは標準溶液(1 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 1mM Tris-HCl, pH 7.4)で3回洗い、その液に1時間順応させた後実験に用いた。ゾウリムシに実験的に圧力変化を与えるには2通りの方法を用いた。ひとつは、シリンジを用いて密閉した実験容器全体の体積を変化させる方法であり、もうひとつは水を満たしたガラス管を実験容器に接続し、その水面の高さの差を用いて圧力変化を与える方法である。比較的大きな圧力変化を与える場合にはシリンジを、微小な圧力変化を与える実験には、水面差の方法を用いた。

ゾウリムシの遊泳行動は実体顕微鏡下(Leica, MZ8 型)で観察した。また、一部の実験ではデジタルカメラを用いて、ビデオ画像として記録した。今回の測定では、主に、ゾウリムシの遊泳速度を中心に測定した。遊泳速度は、5 個体の平均値として表した。すべての実験は室温(18℃~22℃)で行った。

3. 実験結果

3.1 ゾウリムシの遊泳行動に対する加圧の効果

はじめに、遊泳するゾウリムシにシリンジを用いて加圧を行った時の行動変化を調べた。ゾウリムシを入れた実験容器に圧力変化を与えると、速やかにゾウリムシの遊泳速度の減少が観察された。このとき、自発性の遊泳方向の変化や後退遊泳はほとんど観察されなかった。ゾウリムシの遊泳速度の減少は加圧中続き、加圧を終えると元に戻った(1.11 気圧の時の遊泳速度は、加圧前; 1.43 mm/s、加圧開始後 0-5 分; 0.94 mm/s、5-10 分; 0.86 mm/s、10-15 分; 0.95 mm/s、加圧終了後; 1.42 mm/s)。

次に与える圧力変化の強さの効果を調べる目的で、加える圧力を 1.43 気圧、2 気圧に増して同様の実験を行った。これらの圧力変化に対するゾウリムシの遊泳行動は、1.11 気圧の刺激で述べたものと同様であり、速度減少の程度も同じ傾向が見られた。

ゾウリムシの加圧に対する行動反応の程度は、ここまで調べた刺激の範囲では、ほぼ一定であったが、その原因を明らかにする

目的で、ゾウリムシに微弱な圧力変化を与え、中間的な応答が得られるかどうかを検討した。

水面差を用いてゾウリムシに比較的小さい圧力変化(1.002 気圧から 1.05 気圧)を与えると、シリンジで比較強い圧力変化を与えたときと同様に、遊泳速度の減少が認められた。与える圧力を変化させて実験を行い、加圧開始後 0-5 分の遊泳速度を比較すると、1.002 気圧で 1.09 mm/s、1.005 気圧で 1.06 mm/s、1.01 気圧で 0.86 mm/s、1.02 気圧で 0.90 mm/s、1.05 気圧で 0.90 mm/s であった。これらの結果は、この圧力範囲では、ゾウリムシの行動反応は刺激の強度に伴って顕著になってゆくことを示している。従って、ゾウリムシの圧力変化に対する速度減少反応は、全か無かのではなく、刺激の強さに応じて反応が強くなる性質を持つことが明らかとなった。

3.2 ゾウリムシの遊泳行動に対する減圧の効果

次に、ゾウリムシに対する減圧の効果がどのようなものかを検討した。シリンジを用いて 0.83 気圧に減圧するとゾウリムシの遊泳速度は低下した(減圧前; 1.43 mm/s、減圧後 0-5 分; 0.94 mm/s、5-10 分; 0.86 mm/s、10-15 分; 0.95 mm/s、減圧終了後; 1.42 mm/s)。与える減圧の程度を増して(0.71 気圧から 0.50 気圧)同様の実験を行うと、ゾウリムシは先の減圧時と同様に遊泳速度を減少させ、その程度も同様であった。次に、水面差を用いて微弱な減圧を行うと、ゾウリムシは微小な減圧(0.995、0.99、0.95 気圧)に対しても、遊泳速度の減少を示したが、その程度は刺激の強さに応じて顕著になった(0.995 気圧で 1.25 mm/s、0.99 気圧で 1.0 mm/s、0.95 気圧で 0.98 mm/s)。

4. 考察

生物は様々な環境因子を刺激として受容し、それに適切に対応して生きている。これまでに、外界の圧力を感知する受容系の報告は多くはないが、状態異常としての高山病や潜水病等は良く知られており、これ以外にもポンプ作用を有する心臓の拍動調節にかかわる圧受容系の報告も見られる。

今回の実験で得られた結果より、ゾウリムシは加圧下、減圧下共に圧力変化を感知して遊泳速度を減少させることがわかった。ゾウリムシの示す圧力変化に対する行動反応の感受性は非常に高い。ゾウリムシが自然条件で経験する圧力変化の原因のひとつに水深の違いが挙げられるが、ゾウリムシは少なくとも 1.002 気圧で反応していることから、2 cm の水深差を感知できることになる。従って、ゾウリムシは自然界での遊泳中に圧受容系を利用して水深を調節している可能性が示唆される。

ゾウリムシの遊泳速度は繊毛の有効打の向きと繊毛打の頻度により決まる。今回の実験で得られた結果から、ゾウリムシは圧力を受容し、繊毛の有効打の向きを変化させて遊泳速度を減少させる機能を有していることが示された。圧受容系の実体やゾウリムシが圧力変化により繊毛打を変化させるメカニズムに関しては今後の課題である。

ゾウリムシの機械刺激に対する行動反応：刺激の違いと行動反応の関係

坪川 淳俊（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）

【背景・目的】

生物は、外界の様々な環境情報を適切に判断して生きている。生存に有利な動物の動きは行動と呼ばれ、環境情報である刺激の受容、刺激情報の伝導、伝達、統合、更に、効果器活性の適切な制御がすべてなされて、はじめて可能となる。

ゾウリムシは繊毛を打つことにより、水中を活発に遊泳する単細胞生物である。ゾウリムシは様々な外界の刺激に対する反応性を持ち、行動反応を示す。例えば、遊泳中に物理的な障害物に遭遇すると、ゾウリムシは、障害物に衝突した後に、これを避けて遊泳することが可能である。これは、衝突による機械的な刺激をゾウリムシが受容し、その結果、回避行動と呼ばれる行動反応を示したためである。これまでに、回避行動は、(1)体表全体の繊毛の有効打の方向が逆転することによる後退遊泳、(2) 続いておこる、細胞の回転による方向転換 (3)そして、元の進行方向とは異なる方向への前進遊泳、の3段階からなるとされている。私は、実際にゾウリムシの行動を観察してみると、障害物に衝突しても、文献に見られる様な回避反応を示していないゾウリムシが非常に多いことに気づいた。これは、ゾウリムシ集団にとって、画一的な行動反応を示すよりも、多様な行動様式を用意することが、個体群としての生存に有利なためではないかと考えた。即ち、行動反応の多様性は、単純な体制のゾウリムシの生存にとって、重要な性質であるとも考えられる。このような背景から、私は、ゾウリムシの機械刺激に対する行動反応を詳細に見直し、それら行動反応と、刺激の質の関係を明らかにすることを目的とする実験を行おうと考えた。この実験では、観察用のチェンバーを作製し、その内壁面に衝突するゾウリムシを観察し、衝突の角度や速度によって衝突に対する行動反応がどのように変化するか調べた。

【方法】

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦わらの抽出液を用いて 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。

ゾウリムシの遊泳行動はスライドガラスを用いて作成した 26 mm, 12 mm, 1.2 mm の液槽からなる観察用チェンバーで観察した。この液槽の上下左右奥はスライドガラスで密閉されるようにしてあり、ゾウリムシの出し入れを行う解放端は一カ所になるようにした。この観察用チェンバーに小さいピペットを用いてゾウリムシを移し入れた。チェンバー内のゾウリムシの遊泳は実体顕微鏡下でビデオカメラをもちいて記録し、解析した。ゾウリムシがチェンバーの特定の内壁に衝突する際の行動に特に着目した。

【結果】

はじめに、チェンバー内のゾウリムシの遊泳速度の変化を時間に対して測定した。標準溶液に順応させた後、チェンバーに移さ

れたゾウリムシは 1.5 mm/s ほどの速度で遊泳していた。チェンバー内での遊泳速度は、10 分間の測定中、大きくは変化しなかった。

次に、チェンバー内の側壁に衝突したゾウリムシの行動反応について調べた。前述したようにゾウリムシの行動反応は画一的ではないために、はじめにどの程度多様な行動反応が生じるかを観察した。今回の実験から、壁に衝突したゾウリムシの示す行動反応は、大きく分けて、4つのパターンに類型化された。ひとつは、これまでに回避反応として記述されている典型的な行動反応であり、後退遊泳とそれに続く頭部の回転、更に、前進遊泳の再開というものである。これを反応Ⅰとよぶ事にする。反応Ⅰを示すゾウリムシの割合は衝突した個体の 1/4 程であった。反応Ⅰ以外の行動でこれよりも多く見られたのは、壁に衝突したあとに、後退遊泳を伴わずに別の方向に直線的に泳ぎ去るもので、ここで反応Ⅱとよぶ事にする。反応Ⅱはおおよそ半数の個体で見られた。これとは別に、衝突後に壁に沿って遊泳する行動も観察され、これを反応Ⅲと呼び、おおよそ2割弱の個体で見られた。これ以外の行動反応も見られたが、出現頻度が低いいため、今回の測定ではその他の行動 (反応Ⅳ) として取りまとめて扱うこととする。

ここで、それぞれのパターンに対応する行動がどのくらいの割合であらわれたかを、実験開始からの時間をおって調べた。実験開始当初は、パターンⅡの割合が最も多く、それについて、Ⅲ、Ⅰの順であった。実験開始からの時間とともに、Ⅱは徐々に減少し、Ⅰ、Ⅲは若干増加する傾向をみせた。

次に、物理的障害物である側壁への衝突の仕方と行動パターンの間に相関があるかどうかを調べた。衝突時のゾウリムシの壁に対する角度について調べると (垂直に衝突した時を 90 度とする)、角度が 90 度に近い程、Ⅰが多く、ついで、Ⅱ、Ⅲの順であった。衝突の速度について着目すると、速度が高い時にはⅡが多く、速度が低くなると、ⅡよりもⅠとⅢが多くなった。

【考察】

壁面への衝突は、ゾウリムシ細胞に対し機械的な変形、即ち、機械刺激を与えられと考えられる。機械刺激の強さは、衝突の角度と速度により決まると考えられる。今回の実験から、速度に関して最も強い刺激時にはⅡが多かったが、角度に関して最も強い刺激時 (90 度に近い時) にはⅠが多い結果となった。これは、ゾウリムシの行動が、単に、刺激の強度だけで決まっている訳ではないことを示しており、興味深い。今後、更に精密な解析を進め、刺激の質と行動反応の関係を調べる所存である。

ヘテロクロマチン領域内遺伝子の発現を制御する転写因子 Ouija board の活性調節メカニズム

上山 拓己 (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

ヘテロクロマチンは高度に凝集したクロマチン構造であり、ヒトを含む真核生物の染色体中に普遍的に存在する。一般に、ヘテロクロマチン領域内に存在する遺伝子の発現は強く抑制されると考えられている[1]。しかし、ヘテロクロマチン領域内に存在する遺伝子が特異的なパターンで発現し、またそれらの遺伝子にコードされるタンパク質が生命活動に必須の機能をもつ例が多く、生物で報告されている[2,3]。このような遺伝子のひとつとして、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のゲノム中に存在する *spookier(spok)* がある。*spok* は昆虫の脱皮と変態に必須の役割を果たすステロイドホルモン、「エクジソン」の生合成を触媒する酵素をコードしている[4,5]。

所属研究室の先行研究から、*spok* の発現は Ouija board (OuiB) と Molting defective (Mld) と呼ばれる2つの転写因子によって制御されることがわかっている[6,7]。しかし、*spok* 遺伝子の発現において、これらの転写因子が物理的に凝集した状態にあるヘテロクロマチン領域にどのような作用して転写を実現させているのか、その詳細なメカニズムは不明である。

この問題を解決するために、ショウジョウバエを材料とし、OuiB と Mld の機能解析を行い、さらにこれらの転写因子に共役するタンパク質の探索を目指した。

方法

(1) 前胸腺の解剖と免疫組織化学染色法

エクジソン生合成器官である前胸腺細胞における OuiB の局在を、免疫組織化学染色法により可視化した。染色にはゲノム中に存在する *ouib* 遺伝子のC末端側に HA タグをノックインした系統を用いた(熊本大学・中村輝博士より提供)。3齢幼虫を解剖して前胸腺を取り出し、1次抗体としてラット抗 HA 抗体 (Roche)、2次抗体として Alexa 蛍光標識抗体 (Thermo Fisher Scientific) を用いて染色した。蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM700(Carl Zeiss)を用いて撮影した。

(2) S2 細胞の培養

Ouib と Mld の機能解析のために、ショウジョウバエ由来の培養細胞である S2 細胞を用いた。細胞培地には Schneider's *Drosophila* Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて、25℃で培養した。

(3) OuiB と Mld のクローニング

S2 細胞で OuiB を発現させるために pWALIUM10-moe ベクターに *ouib* 遺伝子のコーディング配列と、そのN末端側に Ty1 タグを挿入したコンストラクト(Ouib N-Ty1)を作製した。また、*mld* 遺伝子に存在するジンクフィンガーモチーフ7つすべてを欠失させ、pWALIUM10-moe ベクターに挿入したコンストラクト(Mld N-HA dZnF1-7)を作製した。野生型 *mld* 遺伝子全長発現コンストラクトは所属研究室所有のものを用いた[7]。

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に *spok* 遺伝子のプロモーター領域をつないだコンストラクト[6]を *ouib* および *mld* 発現コンストラクトと共に S2 細胞にトランスフェクションし、その後にルシフェラーゼの活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて定量した。

(5) 核分画の抽出と免疫沈降

先行研究に従い、S2 細胞由来の抽出液から核分画を抽出した[6]。抽出した核分画を用いて、免疫沈降 (IP) 法により OuiB N-Ty1 を回収できるか検証した。一次抗体にマウス抗 Ty1 タグ抗体 (Sigma)、ビーズに Dynabeads Protein G (Life Technologies) を用いた。

(6) ウェスタンブロット法

Ouib N-Ty1 はマウス抗 Ty1 タグ抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。サンプルには細胞抽出液、核分画、IP 産物を用いた。

結果・考察

免疫組織化学染色法の結果、OuiB は3齢幼虫期において常に前胸腺細胞の核に局在していることがわかった。よって、OuiB の活性は細胞内局在の変化によって調節されるのではなく、何か別の共役因子によって制御されていることが予想された。

S2 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、OuiB N-Ty1 は野生型 Mld と共に発現させた時、*spok* プロモーターからの転写活性を顕著に上昇させた。一方で、OuiB N-Ty1 とジンクフィンガーモチーフを欠失させた Mld N-HA dZnF1-7 を一緒に発現させても *spok* プロモーターは活性化しなかった。この結果は、Mld の *spok* に対する転写活性にはジンクフィンガーモチーフが重要であるということを示唆する。さらに、OuiB はN末端側に Ty1 を付加しても *spok* に対する高い転写誘導性を保持することも合わせて示している。

ウェスタンブロット法の結果、S2 細胞で発現させた OuiB N-Ty1 を、市販の抗 Ty1 抗体と磁気ビーズを用いた IP 法によって回収可能であることが確認できた。今後、この免疫沈降物に含まれるタンパク質群を単離し、質量分析法によって解析することで OuiB の共役因子の同定へと進む予定である。

参考文献

1. Dimitri et al. *Chromosoma* **118**, 419-435(2009).
2. Altomose et al. *PLOS Comput Biol* **10**, e1003628(2014).
3. He et al. *Genome Res* **22**, 2507-2519(2012).
4. Niwa & Niwa. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**, 1283-1292 (2014).
5. Ono et al. *Dev. Biol.* **298**, 555-570 (2006).
6. Komura-Kawa et al. *PLOS Genet* **11**(12): e1005712. (2015).
7. Uryu et al. in preparation.

含窒素ヘテロ環化合物の微生物による分解に関する研究

木村 滯（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

植物はアルカロイドに分類される多種多様な含窒素ヘテロ環化合物を生産する。そのような物質の中には抗菌作用、鎮痛作用、抗がん作用などが認められ、医薬品に利用されているものもある。しかし、これらの物質の明確な作用機序やそれらの代謝・分解機構は未だに明らかにされていないものが多い。

先行研究では、含窒素ヘテロ環化合物を代謝する菌・酵素および遺伝子の同定とその酵素の精製が行われた。

本研究では、植物由来の含窒素ヘテロ環化合物を分解する微生物を用いた分解産物や分解経路の解明を目的として、本酵素の大量調製のための異種発現と精製効率を上昇させるための精製条件の検討を試みた。

方法・結果

先行研究により同定された含窒素ヘテロ環化合物代謝微生物（以下 A 株）のゲノムを抽出し、PCR により目的酵素（以下酵素 X）遺伝子を増幅した。増幅した酵素 X の遺伝子断片を大腸菌発現用ベクター pET24a(+) にクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換して酵素 X の異種発現を試みた。しかし、酵素 X の発現は見られなかった。

そこで、当研究室で開発された放線菌を宿主とする異種発現系を用いて酵素 X の発現を試みた。A 株のゲノムから PCR により酵素 X の遺伝子を増幅し、当研究室で開発された大腸菌-放線菌シャトルベクターにライゲーションした。ライゲーション産物で大腸菌を形質転換して得られた複数のコロニーからプラスミドを抽出し、シークエンスにより正しい配列のインサートが挿入されているプラスミドを得た。次に、得られたプラスミドを用いて放線菌を形質転換し、形質転換体を得た。2YT 培地にカナマイシンと基質となる含窒素ヘテロ化合物を加え、誘導剤としてイソバレロニトリルまたは ϵ -カプロラクタムを添加し、この形質転換体を 28°C で 3 日間培養した。菌体が生育したものは集菌を行い、培養上清を回収した。それらの培養上清と基質である含窒素ヘテロ化合物を混合し、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。しかし、異種発現によって本酵素を大量調製するに至らなかった。

異種発現により大量の酵素が得られなかったため、酵素 X を A 株から精製する手順の見直しを行った。具体的には、硫酸アンモニウム沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー（DEAE Sepharose, ResourceQ）、疎水性クロマトグラフィー（Butyl）の各過程の条件検討を行い、精製効率を向上させた。

今後の予定

含窒素ヘテロ化合物代謝酵素を精製後、詳細な酵素学的諸性質の解明を行う予定である。

Terpendole E の作用機構解析

関口 尚樹 (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

細胞は正しい増殖のため、いくつかのチェックポイントにより細胞周期を厳密に制御している。その一つに、分裂期中期に染色体整列の遅延や紡錘体構造の異常が起きた際に活性化し、細胞周期進行を停止させる紡錘体チェックポイント (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) がある。SAC の活性化は微小管作用薬の抗腫瘍活性に重要なメカニズムであり、現在臨床で抗がん剤として用いられている微小管作用薬である taxane 類や、vinca alkaloid 類は、いずれも紡錘体構造を破壊し SAC を活性化する。SAC の活性化は正常な細胞では細胞周期の停止を引き起こすが、多くの腫瘍細胞では SAC が活性化するにも関わらず分裂が進行するため、細胞死が誘導され、抗腫瘍活性を示す。しかしながら微小管作用薬の多くは細胞内物質輸送などの間期微小管機能も阻害してしまうため、末梢神経痛などの副作用が問題となっている。

KSP (Kinesin Spindle Protein, Eg5) は N 末端にモータードメインを有する単量体からなるホモテトラマーであり、両極に 2 つずつモータードメインを向けた構造をとっている。この構造により、KSP は二つの中心体から伸びる逆平行な微小管と結合し、それぞれの微小管の一端側から + 端側に移動することで、中心体を引き離し、二極紡錘体形成を誘導する。そのため KSP 阻害は中心体の不分離による単極紡錘体形成を引き起こし (Fig. 1) ¹⁾、SAC を活性化する。さらに KSP は分裂期特異的に機能することや、KSP 特異的阻害剤は微小管に作用しないことから、これまでの微小管作用薬で問題とされていた末梢神経痛などの副作用を防ぐことができると考えられる。以上のことから KSP 阻害剤は副作用の少ない有望な抗がん剤として開発が進められている。

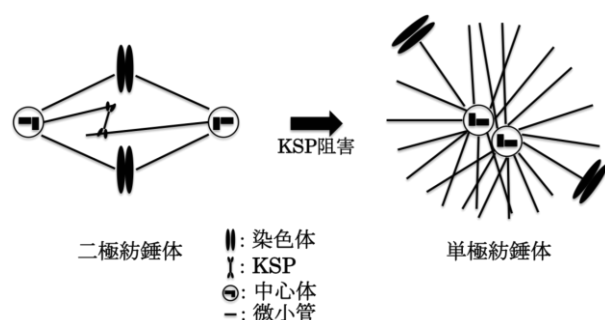


Fig. 1 KSP 阻害による単極紡錘体形成

Terpendole E (TerE, Fig. 2) は糸状菌 *Tolypocladium album* から単離された小分子化合物であり、KSP 阻害剤としては初の天然由来物質である ²⁾。TerE は既存の KSP 阻害剤 (Strityl-L-cysteine, GSK-1) に耐性を示す変異 KSP に対しても野生型 KSP に対してと同程度の阻害活性を示す。このことから、TerE は既存の KSP 阻害剤とは薬剤結合部位が異なると考えられるが ³⁾、TerE の薬剤結合部位は未だ明らかになっていない。そこで、TerE が結合する可能性のあるアミノ酸残基に変異を導入した KSP に対する TerE の KSP 阻害活性を、野生型 KSP に対する阻害活性と比較することで、TerE の KSP 結合部位の検討を行うこととした。

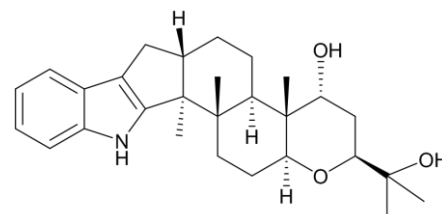


Fig. 2 Terpendole E (Ter E) の構造

方法

1. KSP モータードメインの精製

His-tag 融合 KSP (野生型及び変異型) モータードメインを発現する pET21b 由来プラスミドを、大腸菌株 BL21(DE3) に導入した。遺伝子導入された大腸菌を、Ampicillin を含む液体培地で対数増殖期まで培養した後、培地中に isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside を添加することで T7 RNA ポリメラーゼを介した His-tag 融合 KSP モータードメインの発現を誘導した。大腸菌を破碎し、アフィニティ担体と混ぜ合わせて KSP モータードメインの His-tag と担体の Ni²⁺ を結合させ、imidazole で溶出することで精製を行った。

2. KSP の ATPase assay

モータータンパク質の運動は ATP の加水分解で生じるエネルギーを利用しているため、ATP の加水分解によって遊離した無機リン酸を定量することで KSP のモーター活性を測定することができる。

そこで TerE 存在下、KSP、微小管、ATP を混ぜ、30°C、6 分間反応させ、遊離した無機リン酸を Malachite Green Buffer (0.2 % Na₂MoO₄, 0.03 % Malachite Green Oxalate, 0.05 % Triton X-100, 0.7 M HCl) を用いて測定した。

結果・考察

詳細は発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) T. U. Mayer *et al.*, Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype Based Screen. *Science*, **286**, 971-974 (1999)
- 2) J. Nakazawa *et al.*, A Novel Action of Terpendole E on the Motor Activity of Mitotic Kinesin Eg5. *Chem. Biol.*, **10**, 131-137 (2003)
- 3) Y. Tarui *et al.*, Terpendole E and its Derivative Inhibit STLC- and GSK-1-Resistant Eg5. *ChemBioChem*, **15**, 934-938 (2014)

γ -テルピネンの植物生育促進作用の検討と β -カリオフィレンとの作用性比較

蝦名 渉平（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われた。その結果、ハナハッカ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、 β -カリオフィレン等が同定され、これらの標品を用いたレタスでの試験により、 γ -テルピネン、 β -カリオフィレンに幼根長の生育促進効果があることが明らかになった。また、その後の研究で、 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可能性が示唆されたが、 γ -テルピネンの植物生育促進機構の詳細については不明である。

そこで、本研究では、 γ -テルピネンの植物生育促進作用の詳細を調べることを目的として、まず、 γ -テルピネンによる植物生育促進効果の植物種による違いや作用性の特徴を β -カリオフィレンと比較した。また、 γ -テルピネンによる植物生育促進作用にオーキシシンが関与している可能性についても検討を行った。

材料

供試植物

- トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)
- シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh)
- レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Legacy)

方法

1. トウモロコシに対する生育促進作用の検討

トウモロコシの発芽種子を 50 mL バイアル瓶に播種し、所定の濃度に希釈した γ -テルピネンを封入後、25°C暗条件下で3日間生育させ、幼根長、胚軸長、幼根新鮮重、胚軸新鮮重を測定した。 β -カリオフィレンでも同様の実験を行った。

2. シロイヌナズナに対する生育促進作用の検討

発芽させたシロイヌナズナを MS 培地の入ったプラントボックスに移植し、所定の濃度に希釈した γ -テルピネンを封入後、22°C明条件下で2週間生育させ、根長、茎葉長、根部新鮮重、茎葉部新鮮重を測定した。

3. レタスに対する生育促進作用の検討

レタスの発芽種子を MS 培地の入ったプラントボックスに播種し、所定の濃度に希釈した γ -テルピネンを封入後、25°Cで2週間生育させ、根長、茎葉長、根部新鮮重、茎葉部新鮮重、側根数、第3葉面積を測定した。 β -カリオフィレンでも同様の実験を行った。

4. オーキシシン極性輸送阻害剤 (NPA) による γ -テルピネンの生育促進作用への影響の検討

レタスの発芽種子を 1.0 μ M NPA を含む MS 培地の入ったプラントボックスに播種し、所定の濃度に希釈した γ -テルピネンを封入後、25°Cで2週間生育させ、根長、茎葉長、根部新鮮重、茎葉部新鮮重、側根数、第3葉面積を測定した。

結果・考察

トウモロコシでは、138 μ mol/L の γ -テルピネン処理により、幼根新鮮重が約 130%に増加し、生育促進作用がみられた。 β -カリオフィレンによる生育促進効果は、特に幼根で高く、518 μ mol/L の処理により、幼根新鮮重は約 150%にまで増加した一方、胚軸新鮮重は約 70%に減少した。 γ -テルピネン処理では、 β -カリオフィレンと異なり、胚軸新鮮重の減少はみられなかった。

シロイヌナズナでは、1.78 μ mol/L の γ -テルピネン処理により、根部新鮮重が約 110%、茎葉部新鮮重が約 120%に増加し、生育促進作用がみられた。

レタスでは、357 μ mol/L の γ -テルピネン処理により、根長が約 120%、茎葉長が約 120%、根部新鮮重が約 110%、茎葉部新鮮重が約 140%、第3葉面積が約 140%に増加し、生育促進作用がみられた。また、側根数の濃度依存的な増加がみられた。50 μ mol/L の β -カリオフィレン処理では、根長が約 140%、根部新鮮重が約 120%、茎葉部新鮮重が約 110%に増加したが、茎葉長が約 50%、第3葉面積が約 30%に減少した。茎葉長と第3葉面積は、 β -カリオフィレン処理により減少したのに対し、 γ -テルピネン処理により増加した。

γ -テルピネンによる生育促進効果は、トウモロコシ、シロイヌナズナ、レタスの中ではレタスとトウモロコシで高く、シロイヌナズナでは低かった。

NPA を添加した培地でレタスを生育させると、 γ -テルピネンによる濃度依存的な側根数の増加は抑えられたが、根長、茎葉長、根部新鮮重、茎葉部新鮮重、第3葉面積では、促進効果に影響を与えなかった。このことから、 γ -テルピネンによる側根数の増加には、オーキシシンが関与している可能性が示唆されたが、根部や茎葉部への促進作用には、他の要因が関与している可能性が考えられた。今後は、様々な植物ホルモン関連の変異株などを用いて、 γ -テルピネンによる植物生育促進作用のメカニズムを検討していく予定である。

(S)-(+)-カルボンの植物生育抑制作用におけるキシログルカンエンドトランスグルコシダーゼ/ヒドロラーゼ(XTH)および活性酸素の関与の検討

齋藤 龍平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: (筑波大学 生命環境系) 松本宏

1) 背景

カルボンは南米パラグアイ原産の薬用植物 *Aloysia polystachya* から放出される揮発性物質として見出された、植物の生育を抑制する活性を有する化合物である。*R* 体と *S* 体の異性体が存在し、*A. polystachya* は双方を生産するが、レタス幼植物に対する生育抑制活性を比較したところ *S* 体(*S*(+)-カルボン)は *R* 体と比べ極めて強い活性を示した(仲森-前原ら、2010)。

一方で、新規除草剤の開発への応用を目的に当研究室の先行研究において、薬用植物に含まれる植物の生育抑制活性を持つ揮発性物質の探索が行われた。その結果、ウスバサイシンの根部からオイカルボンが非常に高い植物生育抑制活性を持つ物質として見出された。このオイカルボンと *S*(+)-カルボンは類似した構造を持ち、*S*(+)-カルボンはオイカルボンよりもさらに強い植物生育抑制活性を有する事が確認された。(藤村 2015)

オイカルボンを植物に処理すると過剰に活性酸素を生じさせる事が示されているが、*S*(+)-カルボンによる植物生育抑制機構に活性酸素が関与しているかどうかは不明である。また、*S*(+)-カルボン処理後に根部で観察される、ひび割れのような症状がアルミニウム障害によって引き起こされるそれと類似している。アルミニウム障害による植物生育抑制機構には、*XTH* 遺伝子の発現量が減少の関与が示唆されているが、*S*(+)-カルボンの植物生育抑制機構と *XTH* の関係についても不明である。

2) 目的

S(+)-カルボン処理後の活性酸素発生や *XTH* 遺伝子の発現変動について解析し、*S*(+)-カルボンの植物生育抑制作用におけるそれらの関与について解明することを目的とした。

3) 方法

・植物の育成と *S*(+)-カルボンの処理

滅菌して暗条件 4℃で 3 日間静置したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 種子をシャーレ上に播種して 5 日間育成したものをプラントボックスに移植し、さらに 9 日間育成して実験に用いた。育成は 22℃、24 時間明条件で行った。

短冊状に切った濾紙にヘキサンを溶媒として所定の濃度に希釈した *S*(+)-カルボンを塗布し、密閉したプラントボックスの中央に静置、塗布した化合物を揮発させることで処理を行った。

・植物生育抑制活性の評価

S(+)-カルボン処理 5 日後のシロイヌナズナの根長を測定し、根部成長率から生育抑制効果を測定した。また、無処理区比較で生育を 50%抑制する濃度(GR₅₀ 値)の算出を行った。

・過酸化脂質含量(TBARS)の測定

所定の濃度で 5 日間 *S*(+)-カルボン処理をした植物体の茎葉部を切り取り液体窒素で磨砕したものに、0.1 % TCA を加えた。これをホモジナイズ後 10000 g、4℃で 20 分間遠心分離し、上清

に 5 % TBA in 20 % TCA を加えてよく混合、98℃で 30 分間静置した。

その後、氷上で 5 分間静置した後 10000 g、4℃で 5 分間遠心分離した。遠心した溶液の A₅₃₂ と A₆₀₀ をもとに TBARS の含量を算出した。

・クロロフィル含量の測定

所定の濃度で 5 日間 *S*(+)-カルボンを処理した植物体の茎葉部を切り取って DMSO に浸し、30℃暗条件で 48 時間静置してクロロフィルの溶出を行った。その後溶液の A₆₄₈ と A₆₆₄ を測定し、クロロフィルの含量を算出した。

・抗酸化物質添加による *S*(+)-カルボンの生育抑制効果の軽減の検討

通常の培地とアスコルビン酸を混合した培地の 2 種類を用いて所定の濃度の *S*(+)-カルボンを 5 日間処理し、根部の成長率とクロロフィル含量の変化からアスコルビン酸による軽減効果を調べた。

・*XTH* 遺伝子の発現量変動の検討

S(+)-カルボン処理 6 時間後および 24 時間後のシロイヌナズナ根部を切り取り、液体窒素を用いて磨砕した。このサンプルから totalRNA を抽出し、逆転写を行って得た cDNA をもとに、根部特異的に発現する 10 種類の *XTH* 遺伝子の発現変動を qRT-PCR によって解析した。

4) 結果・考察・展望

S(+)-カルボン処理を行ったシロイヌナズナの茎葉部では白化が観察された。また、処理 5 日後において、*S*(+)-カルボンは GR₅₀ 値以上の濃度処理で有意に茎葉部の過酸化脂質量の増加、クロロフィル含量の減少を引き起こした。このことから、*S*(+)-カルボン処理によるシロイヌナズナの茎葉部での生育抑制作用には、活性酸素の過剰発生が関与していることが考えられた。

また、根部では、*S*(+)-カルボン処理後にひび割れのようなアルミニウム障害様の症状が観察されることから、シロイヌナズナの根部を用いて根部特異的に発現する *XTH* 遺伝子の発現変動を調べたところ、いくつかの *XTH* 遺伝子で発現量の減少が認められた。現在、さらに *S*(+)-カルボン処理後の根部での活性酸素発生と根部生育抑制との関係について検討中である。

タイヌビエ CYP81A 遺伝子の除草剤代謝機能の解析

永井 輝一（筑波大学 生物学類）

指導教員：松本 宏（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

現代農業における作物栽培では、雑草防除を除草剤に大きく依存している。しかしその結果、除草剤に抵抗性を持つ雑草が出現し、世界的に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。米国カリフォルニアで発見されたタイヌビエは、アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤やアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害剤など複数の除草剤に抵抗性を示す。これまでの研究において、ALS 阻害剤や一部の ACCase 阻害剤に対する抵抗性については、除草剤を解毒代謝する CYP81A サブファミリーの 2 つのシトクロム P450 (CYP81A12 および CYP81A21) の高発現によると考えられている (Iwakami et al. 2014 Plant Physiol; 上館ら 未発表)。一方で、タイヌビエにはこれらの他に少なくとも 10 種の CYP81A P450 が存在し、このうち 3 種の偽遺伝子を除く 7 種については機能型と推定される配列を有している。

本研究では、CYP81A12 および CYP81A21 を形質転換したシロイヌナズナおよびイネと、その他 7 種の CYP81A 遺伝子を導入したシロイヌナズナおよびイネとの除草剤感受性を比較し、各 P450 の除草剤代謝機能の評価するとともに、除草剤の認識に重要なアミノ酸残基を推定する。

材料・方法

1. シロイヌナズナ形質転換体の作出

機能型と推定されるタイヌビエの 7 種の CYP81A 遺伝子 (CYP81A14, CYP81A15, CYP81A18, CYP81A22, CYP81A23, CYP81A24, CYP81A26) がそれぞれ挿入されたバイナリーベクター pB2GW7 をアグロバクテリウム EHA105 株に形質転換し、これらのアグロバクテリウムを用いて floral dip 法によりシロイヌナズナ (Col-0) に形質転換した。pB2GW7 の T-DNA 上には bar 遺伝子が存在するので、薬剤選抜 (グルホシネート、2.5 mg/L) を用いて形質転換体 (T1 世代) を 20-40 個体選抜し、その自殖後代 (T2 世代) を得た。T2 世代においてグルホシネート抵抗性個体と感受性個体の比が約 3:1 となった系統を外来遺伝子のシングルコピー系統とした。シングルコピー系統について、複数の抵抗性個体を自殖させ、次世代 (T3) において全個体がグルホシネート抵抗性を示した系統を外来遺伝子ホモ固定系統とした。作出された T3 ホモ固定系統について発現量の高い 2 系統を、ALS 阻害剤ベンシルフロノメチルへの抵抗性程度または導入 P450 遺伝子についての半定量 PCR により選抜し供試した。

2. シロイヌナズナ形質転換体の ALS 阻害剤感受性試験

ALS 阻害剤感受性試験には、本研究で作出した 7 種類のタイヌビエ CYP81A 遺伝子のホモ固定系統に加え、CYP81A12 または CYP81A21 を導入したシロイヌナズナ (Iwakami et al. 2014) をそれぞれ供試した。異なる濃度の ALS 阻害剤 (ベンシルフロノメチルまたはクロルスルフロノ) を含む MS 培地に野生型 (Col-0) および

CYP81A 遺伝子を導入した系統を播種した。人工気象器で 10 日間生育させた後、シロイヌナズナの除草剤感受性を評価した。

3. イネ形質転換体の作出

タイヌビエの 7 種の CYP81A 遺伝子 (CYP81A14, CYP81A15, CYP81A18, CYP81A22, CYP81A23, CYP81A24, CYP81A26) をそれぞれバイナリーベクター pCambia1390 に挿入後、アグロバクテリウム EHA105 株に形質転換した。イネ (日本晴) 完熟種子から N6D 培地を用いてカルスを誘導後、カルスにアグロバクテリウムを接種し形質転換した。イネの形質転換には上記 7 遺伝子に加え、Green fluorescent protein (GFP) および CYP81A12 を導入したアグロバクテリウムを用いた。形質転換カルスの選抜には選抜薬剤ハイグロマイシン 50 mg/L を用いた。

4. イネカルスを用いた除草剤感受性試験

ACCase 阻害剤 (フェノキサプロップエチル、ジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデン) および ALS 阻害剤 (クロルスルフロノ) を含む N6D 培地をそれぞれ調整し、独立の形質転換カルスを 9 個体ずつ置床した。3 週間生育させた後、カルスの生育量から各除草剤への感受性を評価した。

結果・考察

シロイヌナズナの CYP81A22 ホモ固定系統はベンシルフロノメチルへの抵抗性を持たなかったため半定量 PCR を行ったところ、CYP81A22 の高発現はベンシルフロノメチルへの抵抗性に関与しないということがわかった。

CYP81A12 導入イネカルスはジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデンへの有意な抵抗性を示したが、フェノキサプロップエチルに対しては GFP や他の CYP81A 遺伝子を導入したカルスと同程度の感受性を示し、先行研究に一致した。CYP81A12 および CYP81A21 はジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデンの代謝には関与しているがフェノキサプロップエチルの代謝には関与しておらず、他の遺伝子が代謝に関与していることが示唆されている (上館 2016 卒業研究)。

発表では、タイヌビエの P450 遺伝子を導入したシロイヌナズナおよびイネの ALS 阻害剤や ACCase 阻害剤に対する反応を示す。各遺伝子を導入した形質転換体の除草剤反応の差異と、各遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列を比較し、除草剤代謝に重要であるアミノ酸残基を推定する。

カニ類における自切位置の再検討

細田 胡桃 (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/医学医療系)

【背景と目的】

自切 (autotomy) とは付属器官の反射的な切断であり、他の付属器官の力を必要としないものを指す (Hiatt, 1948)。トカゲの尻尾切りなど、自切の例はさまざまな動物種で知られている。節足動物において最も研究されているのは、甲殻類のカニ類である (Fleming et al., 2007)。カニ類の歩脚の自切は特定の位置で起こり、膜状の構造によって出血や損傷が抑えられるほか、この位置で切断された場合は他の位置で歩脚が切断された場合に比べて再生が早く行われるメリットがある (椎野, 1964)。カニ類の歩脚は基部から、底節、基節、座節、長節、腕節、前節、指節の 7 節からなる。このうち基節と座節は融合して基座節をなしており、自切はこの節で起こる (椎野, 1964)。しかしカニ類の歩脚の自切構造の位置の詳細については、基座節内にある点では見解は一致しているものの、基座節の基部にある (Moffett, 1974) とか、基節と座節の融合面である (Hiatt, 1948) などさまざまな記述があり、自切構造が基節領域にあるのか基節領域と座節領域の間にあるのかについては、未だ曖昧なままである。

本研究では、カニ類における歩脚の自切構造の具体的な位置を明らかにすることを目的として、解剖学的、組織学的な視点から研究を行った。

【材料と方法】

比較的入手の容易な次の 2 種を材料として使用した。

- ・サワガニ *Geothelphusa dehaani*: 2016 年 7~9 月、つくば市内にて採集
- ・ヒラツメガニ *Ovalipes punctatus*: 2016 年 10 月、水産業者より入手

サワガニの歩脚、および解剖して肉を取り除いたヒラツメガニの歩脚を用い、歩脚基部の外骨格および内骨格の構造を実体顕微鏡を用いて観察した。また、サワガニの歩脚の基部を 20% の乳酸に 60℃ で 48 時間処理した透明化試料、および 5% のギ酸に室温で 48 時間処理した脱灰試料を作成した。実体顕微鏡および生物顕微鏡を用いて、透明化試料の外部および内部の形態を観察した。また、透明化試料と脱灰試料のパラフィン連続切片を作成してヘマトキシリンとエオシンで染色し、生物顕微鏡で観察した。

【結果と考察】

サワガニの歩脚を外から観察したところ、基座節の基部で自切が起きていた。また、自切の起こる位置に 1 本と、それより遠位に 1 本の縫合線が見られた (図 1)。この縫合線は両方とも基座節を一周していた。ヒラツメガニでもサワガニと同様に、基座節の自切の起こる位置に 1 本と、それより遠位に 1 本の縫合線が見られた。また、底節を取り除くと、外骨格の陥入によって形成されている内骨格が、基座節の基部の末端部近くから胴部に向かって伸びていた。ヒラツメガニの歩脚の内部には、2 つの縫合線のそれぞれのある部位の内側に外骨格の内側への肥厚

が見られた。このうち自切位置に対応する肥厚は発達していて基座節を一周しており、遠位側の肥厚は腹側のみに限られており肥厚の程度も弱かった。サワガニの組織切片では、基座節の底節側の末端近くから胴部方向に向かう内骨格の陥入が、また長節側の末端近くから歩脚基部方向に向かう内骨格の陥入が見られた。自切位置では、外側に縫合線の溝が、内側には発達した外骨格の内側への肥厚が見られた (図 2)。また、自切位置より遠位の縫合線に対応する位置の内側にも、基座節を周回する弱い外骨格の内側への肥厚が見られた。

以上の結果より、本研究で用いた 2 種のカニにおいても自切は基座節の基部で起こることが確かめられ、従来の記述と一致した結果を得られた。また、2 種に共通して基座節には自切位置のほか、それより遠位にも縫合線があり、その位置で外骨格の内側への肥厚が確認されたが、このような構造は頻繁に見られるものではなく、これが基節と座節の融合面である可能性が非常に高い。つまり、自切構造の位置は、基座節の中でも基節と座節の融合位置より基部側、すなわち基節領域と考えられる。ただし、本研究ではカニ類の自切位置が基節と座節の融合部位である可能性を完全に否定することはできていない。今後、基節と座節の融合していない他の甲殻類で観察を行い、基節や座節の固有の特徴を明らかにし、その特徴を基準としてカニ類の基座節における基節と座節の範囲をより高い精度で判断することで、自切構造は確かに基節領域に位置すると断定することができるだろう。

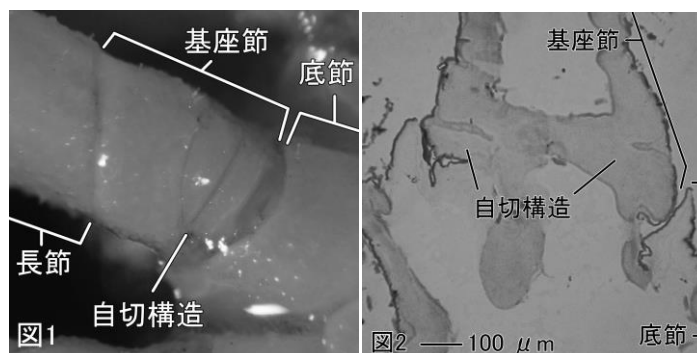


図 1 サワガニの歩脚基部の腹面

図 2 サワガニの歩脚基部の組織切片像

真正クモ類における歩脚基部の構造について

栗林茉理乃（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

捕食者から逃れるために身体の一部を切り離す現象を自切といい、トカゲの尻尾切りが良く知られた例である。自切は、1) 自衛機能の一種である、2) 生得的なメカニズムである、3) 神経により制御されるという 3 点で定義される (Fleming, 2007)。自切は分類群ごとに特定の部位で起こり、その部分には自切のための特別な構造が見られる。

自切は真正クモ類の歩脚でも起こることが知られている。クモの脚は、基部側から基節、転節、腿節、膝節、脛節、蹠節、附節の 7 節に分かれている。自切の起こる場所については 2 つの異なる記述がある。Parry (1957) は、タナグモ科の *Tegenaria atrica* の歩脚を観察し、自切面は基節と転節の間であると考えた。一方、木村 (2014 卒業研究要旨) はコモリグモ科のカラコモリグモ *Pardosa hedini* において、歩脚の転節内に 2 つの外骨格陥入構造があるとし、それをランドマークとした解釈により、自切面を転節内部とする新説を提唱した。

このように 2 つの先行研究では自切面についての見解が一致していない。彼らはパラフィン切片によって観察を行ったが、パラフィン切片法では切削の際に外骨格が崩れてしまい、複雑に陥入した外骨格の正確な観察が困難であることが多い。木村 (2014 卒業研究要旨) と Parry (1957) の見解の不一致も、正確な観察が行えていないことが原因で生じた可能性がある。以上の背景から、本研究では真正クモ類の歩脚基部の外骨格構造をより正確に把握することを目的とし、パラフィンよりも硬質な樹脂を用いて連続切片を作成し、画像データをもとに立体再構築を行った。画像データに基づく立体再構築を行うことで、外骨格陥入構造を明確にすることができ、自切面の位置をより正確に同定できると期待できる。

材料と手法

先行研究で木村 (2014 卒業研究要旨) の用いた、コモリグモ科のカラコモリグモ *Pardosa hedini* を材料とした。採集は 2016 年 5 月から 7 月にかけて、茨城県つくば市内で行った。試料は Formalin-Acetic-Alcohol (FAA) で固定し、エタノールとアセトンで脱水後、Quetol 651 に包埋した。厚さ 1.5 μm の連続切片を作成し、メチレンブルーで染色した。連続切片をデジタルカメラで撮影し、画像データを基に AzPainter と Delta Viewer を用いて立体再構築を行い、自切面周辺の外骨格構造を観察した。

結果と考察

基節から腿節までを含む歩脚のサンプルと、自切後の歩脚の基部側のサンプルを立体再構築し、比較したところ、自切後の歩脚基部側には転節領域は残っていないことがわかった。基節には前側に基部から末端部に向かう板上の外骨格陥入構造があり (図 1A, 1B)、これは Parry (1957) の記載と一致している。転節には腹側に基部から末端部に向かう峰状の外骨格陥入構造がただ 1 つある (図 1B)。基節と転節の間は、基節の末端部側と転節の基部

側が折れ込むようにして形成されている厚い外骨格で隔てられている (図 1B)。自切はこの部位で起こっていた。これらの結果から、木村 (2014 卒業研究要旨) がランドマークとした転節内の 2 つの外骨格陥入構造のうち、基部側のものは、実際は基節と転節の間を隔てる外骨格構造の一部と推定される。したがって、カラコモリグモにおいても歩脚の自切面は Parry (1957) がタナグモの一種について記載したのと同様に基節と転節の間であると考えられる。

Parry (1957) と木村 (2014 卒業研究要旨) は、基節基部から転節に向かって伸びる筋肉の転節側の付着点についての記載が異なっており、筋肉についても見解が一致していない。そのため自切によって切れる筋肉についても両者の解釈には不一致が見られる。この不一致についても、筋肉に注目して立体再構築を行うことで明らかにできるかもしれない。

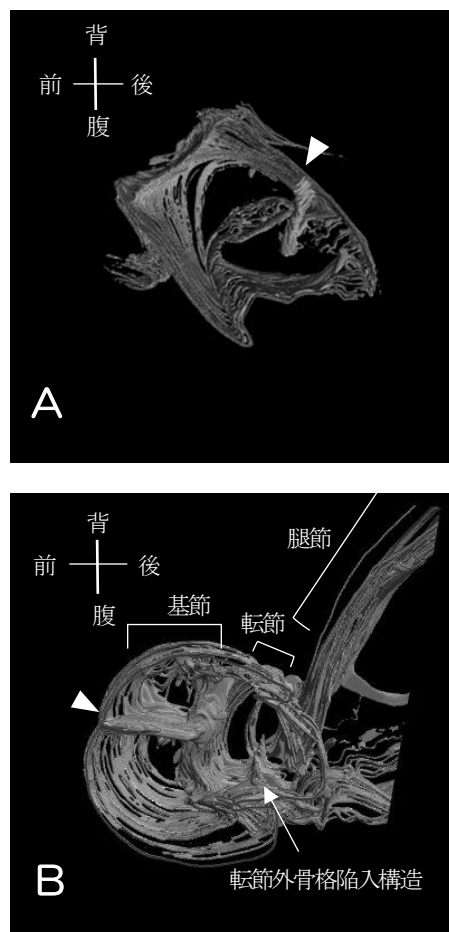


図 1 歩脚基部の外骨格構造の立体再構築画像

A: 左第 2 歩脚の自切後の基節

B: 右第 4 歩脚 (基節～腿節)

△は基節外骨格構造を指す

多足類の骨格構造の観察への試料透明化法適用の試み

岡田 朋之（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

生物学において形態の観察はもっとも基本的な研究手法の一つである。形態の観察手法として、標本の外部形態の観察や、試料の解剖による内部形態の観察があげられる。しかし、特に内部形態に関して、小さな動物では内部の構造などは解剖による観察が難しい。また、節足動物の気管系などの構造は解剖などの破壊的な手法では生体での構造が失われる可能性がある。生物の内部形態の観察手法として、骨格の染色と軟組織の透明化によって生物の構造を維持したまま内部形態を観察する手法がある。しかし、節足動物のような外骨格をもつ生物においては透明化法により内部形態を観察する手法はあまり一般的ではない。

本研究では、試料透明化による観察法の確立を目的とした。また、高価な薬品や危険な薬品を避け、安全で安価な手法による形態の観察法を確立することを試みた。簡便な手法による観察法が確立できれば、教育の現場などへも応用が可能になる。

本研究では、解剖による観察の難しい節足動物の気管系など、虫体の内部に陥入した外骨格構造の観察を可能にする試料透明化法を検討した。

材料と方法

本研究では材料として唇脚類（ムカデ類）を用いた。唇脚類は1年を通して成体を採集可能なため季節を問わず試料を得ることができる。また、体サイズが極端に大きくも小さくもなく、また外骨格も極端に厚くも薄くもないため、一般的な節足動物のモデルとして用いることができると考えた。現生の唇脚類はすべて陸生であり気管系を有している。なお、従来は唇脚類の骨格構造や気管系の観察手法は試料の解剖などによる方法が一般的であった。おもに埼玉県行田市、および茨城県つくば市筑波大学構内において採集した唇脚綱オオムカデ目のセスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus* を試料として用いた。

試料は10%ホルマリン液により固定した。試料からホルマリン液を洗い流した後、10%乳酸水溶液、20%乳酸水溶液、40%乳酸水溶液に漬け、60℃のインキュベータで24時間、48時間、100時間など乳酸水溶液の濃度と処理の時間などを変え、いくつかの条件下で処理を行った。

透明化処理後、実体顕微鏡を用いて気管系など、おもに骨格の陥入構造を観察し、処理条件の検討を行った。

結果と考察

乳酸による処理によって外骨格および軟組織が透明化し、軟組織を残したまま全身の気管系を観察することができた。乳酸水溶液の濃度を高くするほど透明化の程度は高くなった。しかし、乳酸水溶液の濃度が高くなるほど試料は脆弱になり、40%乳酸水溶液を用いた処理では外骨格の損壊や軟組織の漏出がみられ、試料が観察に適さない状態になることがあった。気管系のおおまかな観察に適した透明化処理条件は、20%乳酸溶液による48時間の処理であった。

この条件で作成した試料の観察では、解剖では観察することの難しい歩脚や触覚への微細な気管の伸長を非破壊的に観察することができた。

本研究の方法による透明化ではクチクラ骨格以外の組織はほぼ完全に透明化するため、消化器系、筋肉系などの組織の観察には適さない。しかし、解剖によって観察することの難しい節足動物の内部骨格構造を観察する方法としては適している。

また本研究で用いた乳酸による透明化法は比較的安価で安全であり、また、複雑な操作も必要としないため、節足動物の内部骨格構造の簡便な観察法として利用可能である。

イトマキヒトデにおける五放射相称の発生機構について

山川 隼平 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

<背景と目的>

ヒトデやウニ、ナマコ、ウミユリなど棘皮動物はふつう五放射相称の体制をもつ。五放射相称の体制はこの動物群の最も際立った特徴のひとつであるが、発生過程のなかでどのように「5」という数字が生み出されているのか、分子的なレベルでの研究はほとんど進んでいない。その現状に対して本研究はイトマキヒトデを用い、発生機構の解明を試みた。

イトマキヒトデはビビンナリア幼生がブラキオラリア幼生へと成長し、岩などの外部基質に着底後、稚ヒトデ(成体)へと変態する発生過程を示す。幼生は成体と姿かたちが全く異なるが、幼生期の頃からすでに五放射相称的な構造は形成され始めている。この種においてはまず体の左側に5つの「成体骨片」が形成され、やや遅れて同様に左側に5つの「水腔葉」が観察できるようになる(図1)。成体骨片と水腔葉は幼生の成長と共に発達し、変態時にはこれらの構造をもとに成体が形作られる。本研究の目下の課題は、成体骨片や水腔葉を安定して5つずつ形成させる仕組みを明らかにすることである。

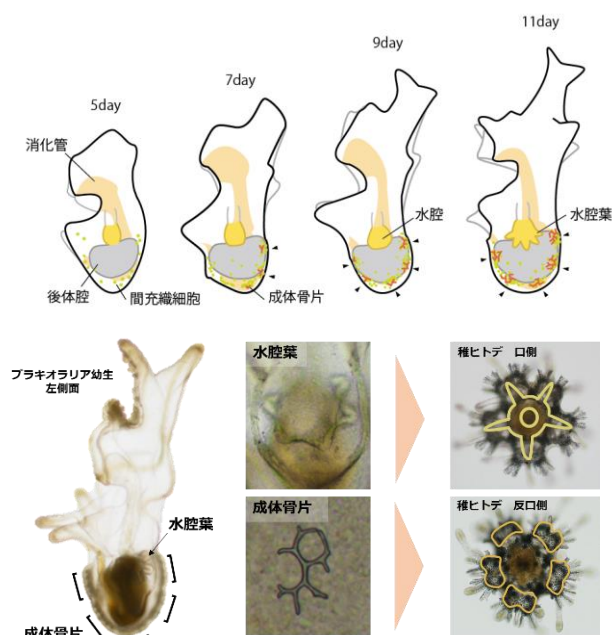


図1:成体骨片と水腔葉の形成過程

成体骨片は間充細胞が集合したクラスターから分化してくる。受精後1週間ほどで後体腔と表皮の間に間充細胞が5か所に分かれて集合しクラスターを形成するために成体骨片も5つ形成される。一方で水腔上皮が5か所の突出部を形成することで5つの水腔葉が形成される。

<実験と結果>

○シグナル経路の阻害実験

成体骨片や水腔葉の形成には細胞間の相互作用が生じていると想定される。そこでこれらの形成に関与するシグナル経路の同定を目的に、薬剤を用いた発生阻害実験を行った。これまでに9種類のシグナル経路(Wnt, HH, Nodal, RA, BMP, Notch, FGF, VEGF, MAPK)の阻害剤を用いたなかで FGF シグナル経路の阻害

(SU5402 処理)により成体骨片の「5」のパターンを人為的に乱すことに成功した(図2)。一方で FGF シグナル阻害を含め、一連の実験で水腔葉の形成に異常は見られなかった。

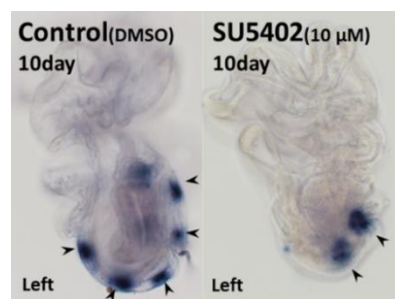


図2: 対照胚と SU5402 処理胚での CA1 の発現

対照胚と比較して SU5402 処理胚では形成される骨の数が減少し、それに対応して骨マーカー遺伝子である CA1 の発現領域にも違いが見られた。

○FGF シグナル関連遺伝子の発現解析

以上の結果を受け、FGF シグナル経路が成体骨片のパターニングに関与していることが示唆された。これまでに同定されたイトマキヒトデの有する3種のリガンド(FGFa, FGFb, FGF8)と2種の受容体(FGFR1, FGFR2)を Whole mount in situ hybridization (WMISH)法によって発現解析を行ったが、骨形成領域での発現は見られなかった。しかし近縁種(*Patiria miniata*)のデータベースから、この種は FGFR に類似した未知の遺伝子を9種類持つことが明らかになった。同属のイトマキヒトデ(*Patiria pectinifera*)も相同な遺伝子を有すると考えられ、これらの遺伝子が成体骨片の形成に関与するのか、発現解析を進めていく予定である。

○Hox 遺伝子の発現解析

Arenas-Mena et al(2000)によるとウニの後体腔で5つの Hox 遺伝子が共線的に発現する。ヒトデにおいても相同な5つの Hox 遺伝子が同様の発現パターンを示し、Hox 遺伝子が成体骨片の分布を制御している可能性がある。発現解析(WMISH 法)を行うと、3種が後体腔で発現を示したが残りは後体腔での発現が見られなかった。「5」の形成への関係性は発現解析のみでは不明瞭であり、CRISPR/Cas9を用いた機能阻害を試みている。

<考察>

これまで棘皮動物が五放射相称の体制を生じさせる際の分子機構は全く分かっていなかった。本研究により FGF シグナル経路の関与が示唆されたことは、分子機構の解明に向けて大きな手掛かりを得たと言える。原因遺伝子の同定からより詳細な発生機構が明らかになると期待できる。また FGF シグナル阻害により成体骨片の形成パターンに乱れが生じても水腔葉は正常に5つ形成されることが分かった。このことから成体骨片と水腔葉は独立に「5」が確立されていると考えられる。発生過程のなかでどのように両者が組み合わさるのか、今後検証していきたい。

冠輪動物(Spiralia) 特異的なホメオボックス遺伝子群の二枚貝における発現解析

角田 淳平 (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

左右相称動物は前口動物と後口動物に分けられ、さらに前口動物は脱皮動物と冠輪動物に分けられる。冠輪動物(Spiralia)は軟体動物、環形動物、扁形動物などを含むグループで、らせん卵割を行なうという特徴がある。らせん卵割において、4細胞期の割球はA、B、C、Dと呼ばれ、これらはそれぞれ将来的に胚の左側、腹側、右側、背側を形作ることが知られている[1]。らせん卵割の様式とそれに伴う割球運命の決定は冠輪動物内で非常によく保存されているが、軟体動物の二枚貝などではその一部が変更されている(図1a)。また、二枚貝で卵割様式が変更されている割球(図1aのX)は将来的に貝殻の形成を担うことが分かっている[2]。

一方、ホメオボックス遺伝子の1グループであるTALEには冠輪動物に特異的なSPILEというサブグループがある。典型的ならせん卵割を行なう腹足類などではSPILEが6遺伝子ほどであるのに対して、二枚貝では12-14遺伝子ほどが確認されている。腹足類を用いた先行研究において、SPILEは動物極-植物極軸に沿って偏った発現(例：2A, 2B, 2C, 2D)をしていて、割球運命の決定に関わることが分かっている(図1b)。

上記の2点から、「二枚貝において変更されているらせん卵割とそれに伴う割球運命の決定の分子的な背景としてSPILEが関わっている」という仮説を立てた。卒業研究においては、二枚貝の初期発生におけるSPILEの発現領域を特定し、この仮説を検証する上での基盤を構築することを目的とした。

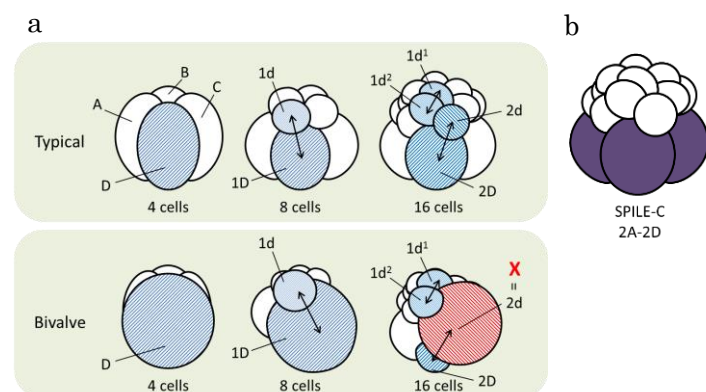


図1. a. 典型的ならせん卵割(上)と二枚貝のらせん卵割(下)
b. クサイロアオガイの16細胞期におけるSPILEの発現領域

材料・方法

実験材料にはムラサキインコ *Septifer virgatus* を用いた。茨城県大洗、青森県浅虫、宮城県女川において採集した個体を人工授精させ、初期胚を得た。ムラサキインコは採集が容易であり、また、卵が比較的大型であるため、観察や将来的に機能解析を行なう上で適している。

先行研究で得られたトランスクリプトームデータから、ムラサキインコの初期発生では13遺伝子のSPILEが発現していることが分かっている。そこで、32細胞期までの初期胚を用いて *in situ* hybridization を行ない、それぞれの遺伝子がどの割球で発現しているのかを特定した。割球同定は[1]を参考にした。

結果・考察

SPILEの発現領域のいくつかを図2に示した。詳細は口頭にて発表する。ムラサキインコがもつ13遺伝子のSPILEのうち、11遺伝子の発現領域を特定したが、これらは全て異なる発現パターンを示した。

クサイロアオガイ同様の動物極-植物極軸に沿って偏った発現(図2左)に加えて、D系統の割球に偏って発現している遺伝子やXにのみ発現している遺伝子も確認された(図2中央、右)。これは二枚貝のSPILEがより詳細な割球運命を決定づけている可能性を示唆している。

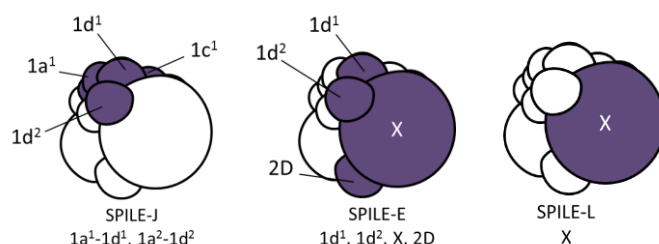


図2. ムラサキインコの16細胞期におけるSPILEの発現領域

今後の展望

それぞれの遺伝子に対するモルフォリノオリゴを作成し、機能解析を行なう。また、図1aのような卵割様式は二枚貝で共通であるが、二枚貝のSPILEを系統解析しても種間で対応の取れない遺伝子が多い。ゲノムが解読されているアコヤガイ *Pinctada fucata* を用いて同様の *in situ* hybridization を行なった先行研究では、ムラサキインコと異なる発現パターンを示すことが分かっている。両種の発現パターンを詳細に観察し比較することで、二枚貝におけるSPILEの進化的な変遷を明らかにする手がかりを得たい。

参考文献

- [1] Kurita, Y., Deguchi, R., & Wada, H. (2009). Early development and cleavage pattern of the Japanese purple mussel, *Septifer virgatus*. *Zoological science*, 26(12), 814-820.
- [2] Mohri, M., Hashimoto, N., & Wada, H. (2016). Lineage tracing of the bivalve shell field with special interest in the descendants of the 2d blastomere. *Biology letters*, 12(3), 20151055.

糸状不完全菌 *Aenigmatospora* の謎 ("enigma") に迫る —キシヤヤスデを介する生活史の解明—

田中 直歩 (筑波大学 生物学類)

指導教員：出川洋介 (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

1999年にキューバの Castañeda らにより、*Aenigmatospora* という不完全菌の新属が記載された。同属は、*aenigmato* (=謎の) + *spora* (=孢子) という名の通り、特異な形態 (キノコ型) の孢子を形成する。原記載以後の再発見例がなく、培養も成功しておらず、分子系統解析もなされていないため、その分類学的所属はおろか、生活史も謎に包まれている。しかし、近年、キシヤヤスデの糞から *Aenigmatospora* 属に類似する菌が繰り返し検出されることが分かった。*Aenigmatospora* 属菌の分類学的位置ならびに生活史の解明を目指し研究を行った。

【材料と方法】

1) キシヤヤスデの採集とその糞上の菌体の観察

2016年9月、八ヶ岳山麓でキシヤヤスデ (*Parafontaria laminata*) を採集し、飼育した。湿らしたキムワイプを敷き詰めたアイスクリームカップにキシヤヤスデを入れ 24 時間放置し、得られた糞を 2~3 週間保湿しながら観察した。糞上に認められた菌体の一部は光学顕微鏡観察、一部は分子系統解析に用いた。

2) キシヤヤスデの解剖・消化管内部の観察

Aenigmatospora 属菌は、キシヤヤスデの糞からのみ特異的に生じており、消化管内に本菌が認められると予想した。そこで本菌の消化管内での動態を調べるため、解剖し、消化管を摘出した。50 個体において、前腸・中腸・マルピーギ管周辺・後腸に分けて光学顕微鏡で観察した。各個体の消化管に何等かの菌が存在するか否かと、同じ個体に由来する糞の上に *Aenigmatospora* 属菌が発生するかどうかの関係性を、一般化線形モデル (Generalized linear model) により解析した。その際、個体群の違い、性別、糞を回収してから解剖するまでの日数を考慮した。

3) 分子系統解析

Aenigmatospora 属菌については、カバーガラスで押し潰した成熟孢子、消化管内の菌に関しては寒天培地上で不純物を除去した菌体を用い、DNA 抽出を行った。両者について、核 SSU 領域の塩基配列を決定し、最尤法系統樹を作成した。

【結果】

① キシヤヤスデの糞から得られた *Aenigmatospora* 属菌

キシヤヤスデの糞上に発生した菌体の特徴は以下の通りであった。孢子柄は先端が球形に膨らみ、そこから瓢箪型の細胞を放射状に複数個生じる。その細胞先端に、キノコ型の孢子を一個ずつ作る (図 1)。これらの形態的特徴は *Aenigmatospora* 属の唯一の既知種である *A. pluchra* と酷似していたが、孢子形成細胞の形態、個数、孢子形成部位が異なるため、未記載種と判断された。以下、*Aenigmatospora* sp. と称す。また、発生基質の糞を丁寧にほぐしたところ孢子柄の基部は円筒形の細胞から生じていた (図 1B)。更に、本菌の孢子をカバーガラスで潰すと、外皮が破れ、円盤を伴う楕円形の単孢子性小孢子嚢が現れた。即ち本菌の孢子は、内生的に形成される単孢子性小孢子嚢孢子であることが判明した。これはキクセラ亜門に属す菌群に見られる特徴である。

② キシヤヤスデの消化管内から得られた *Mononema* 属菌

キシヤヤスデの消化管を観察した結果、*Aenigmatospora* sp. の孢子柄基部に見られる円筒形の細胞に類似した細胞を生じる菌体が、前腸壁に認められた。この菌体は付着器により前腸壁に付着し、顕著な油球を含む円筒形の分節孢子を生じる (図 2)。前腸に付着するという生態的特徴も併せ、現在分類学的所属が不明である *Mononema* 属菌の一種と同定された。以下、*Mononema* sp. と称す。腸内に *Mononema* sp. が認められると、糞上に *Aenigmatospora* sp. が出現しやすい一方で、腸内に *Mononema* sp. が認められないと、糞からは一切 *Aenigmatospora* sp. が検出されなかった。本傾向は統計解析からもサポートされた。

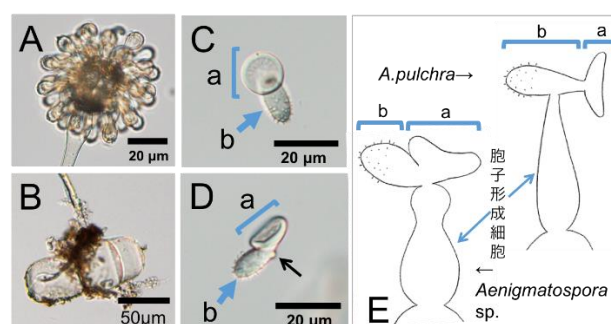


図1. A-E: *Aenigmatospora* sp. A: 孢子形成細胞 B: 基部の円筒形細胞, C, D: キノコ型の孢子. aとbの2細胞からなる. 黒矢印で示す部分で形成細胞と付着していたと考えられる. E: *A. pulchra* と *Aenigmatospora* sp. の孢子形成構造および孢子の模式図.



図2. F, G: *Mononema* sp. F: *Mononema* sp. の分節孢子, G: 基部の付着器

③ 分子系統解析の結果

分子系統解析の結果、*Aenigmatospora* sp. と *Mononema* sp. は非常に近縁で単系統群をなした。しかし、両者の塩基配列は一致しなかった (相同性 96%)。また、このクレードはキクセラ亜門に属し、亜門内の既知種いずれとも区別された。しかし、亜門内の正確な分類学的位置を決めるには更なる検討が必要である。

【考察】

Aenigmatospora sp. の孢子柄基部の円筒形細胞と消化管内の *Mononema* sp. の孢子は形態的に類似し、両者の出現頻度に相関が見られるため、同一性が強く疑われる。しかし、分子系統解析の結果、両者の塩基配列は極めて近縁だったものの一致はしなかった。形態的には識別できない複数の隠蔽種が存在する可能性も考えられる。今後は、キシヤヤスデの同一個体由来する *Aenigmatospora* sp. と *Mononema* sp. の分子系統解析を行い、その塩基配列の同一性を検証する必要がある。

日本産 *Allomyces* の分類学的研究

奥西 宏太 (筑波大学 生物学類)

指導教員：出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

コウマクノウキン (厚膜囊菌) 門は祖先的な真菌類であるツボカビ類より派生した水生菌類の一群で、乾燥に強い「厚膜囊」という構造を作ることにより特徴づけられ、1 目 5 科 16 属約 180 種を含む分類群である。好気性、嫌気性の腐生菌類の他、藻類共生菌、維管束植物病原菌、節足動物寄生菌など多彩な生活を送る菌類を含む。耐乾燥性の獲得に加え、菌界では珍しい単相・複相同型世代交代を示す種を含むという特徴と、その系統的位置から、真菌類の淡水中における生活圏の拡大や、陸上進出のルートを解き明かす上で重要な鍵を握る分類群と考えられる。

このうち、*Allomyces* (カワリミズカビ) 属は好気性、腐生性の淡水生菌類で、培養が容易なため古くからモデル生物として様々な研究に用いられてきた。本属は、特徴的な二又分枝性の菌体を生じ、基準種の生活環は、配偶体より単相の、孢子体より複相の遊走子嚢を生じ、孢子体上に休眠性の厚膜囊を形成、この中で減数分裂が生じる典型的な同型世代交代型である。Emerson (1941) は生活環と形態の特徴に基づき本属の分類体系を構築し、以下の三亜属を提唱した。

- *Euallomyces* 亜属：配偶体と孢子体双方を生じる同型世代交代を行う。孢子体上の厚膜囊が乾燥・休眠した後に減数分裂を行い、放出された遊走子が配偶体に成長する。
(*A. arbusculus*, *A. macrogynus*, *A. javanicus*)
- *Cystogenes* 亜属：配偶体を持たず、孢子体は大型の厚膜囊を作る。厚膜囊から放出された遊走子が一度シスト化する。
(*A. moniliformis*, *A. neomoniliformis*)
- *Brachyallomyces* 亜属：*Euallomyces* 亜属と同様、菌体上に厚膜囊を生じるが配偶体を生じない。(*A. anomalus*)

しかし、近年 Porter ら (2011) が本属の分子系統解析を行ったところ、これら 3 亜属は系統を反映しないこと、さらに属内において多くの種が多系統になり単系統性が支持されなかったことが示され、属内の分類学的混乱が生じている。

日本では、印東 (1940) や加藤が 1940~1960 年代に本属の分類学的研究を進めたが、それ以降研究が途絶えており、同定された株が現存せず、またいずれの塩基配列データも残されていない。そこで私は本属の分類学的整理を目指すこととし、まず、日本各地から *Allomyces* 属を検出、分離培養し、形態観察と分子系統解析を行い、日本産 *Allomyces* 属菌のフロラを再探索するところから研究を開始した。

【サンプリングと検出】

先行研究では、本属菌は水田、側溝、流れが緩やかな川岸、池の岸等よりよく分離されている。これらの環境に着目し、日本各地 (東北・関東・近畿・中国) から 61 点の土壌試料を採取した。乾燥試料はそのまま、湿潤試料は紙袋に入れて数カ月乾燥させ、40℃~50℃のインキュベーターで一晩加熱した後、滅菌したゴマ種子をベイトとした釣り餌法により菌の分離を試みた。その結果、13 サンプルから *Allomyces* 属を検出、内 8 サンプルについて以下の方法で単離培養株を確立した。

【単離培養】

ゴマ上の菌体を一部切除して PmTG 培地上で生育させ、他の細菌類・菌類が無い部分の菌体を切り出し、新しい培地へ移動した。この作業を繰り返し、単一菌体由来の純粋培養を確立した。この培地片を切り出し、滅菌水中に投入、遊走子を放出させ、これを PmTG 培地に落として単遊走子による単離を行った。単離培養した株にはそれぞれ以下の菌株番号を付けた。

- 茨城県つくば市 筑波大学構内 図書館前排水管付近 IK4
- 大阪府高槻市氷室町 關鷄山古墳付近 (池岸) OS1
- 大阪府寝屋川市池の瀬町 寝屋川公園墓地 (側溝) OS7
- 兵庫県明石市明石公園 剛の池 (池岸) HG6
- 京都府京都市京大農学部構内 (建物の脇) KT1
- 新潟県三条市代官島 県道 537 号線 水田 (側溝) NG7
- 長野県上田市国分 水田 (側溝) NN5
- 東京都千代田区皇居外苑 道路脇 TK1

【形態観察と種同定】

OS1、OS7、HG6、KT1、NN5、TK1 の計 6 株は配偶体を形成せず、厚膜囊のサイズ (長径約 50 μm)、孢子体の形状から *A. anomalus* と同定された。IK4 株は配偶体を形成し、オレンジ色の雄性遊走子嚢が透明の雌性遊走子嚢の基部に形成されることから *A. arbusculus* と同定された。NG7 株は長径約 70 μm に達する大型の厚膜囊を生じ、厚膜囊表面のくぼみの密度が低く、厚膜囊から放出された遊走子がシスト化することから *Cystogenes* 亜属の一種 *A. neomoniliformis* である可能性が高い。しかし本種に知られる遊走子嚢の連鎖が現段階では認められない。

【分子系統解析】

2017 年 1 月現在、OS1、HG6、IK4 について LSU 及び SSU の部分塩基配列を決定した。3 株の LSU+SSU ついて系統解析したところ、いずれも *Allomyces* 属内に位置づけられること、また、OS1 株と HG6 株は属内で近縁、もしくは同一種であることが示唆された。

【まとめと考察】

印東 (1940) は日本において *A. arbusculus*, *A. macrogynus*, *A. javanicus*, *A. neomoniliformis*, *A. anomalus* の計 5 種を報告している。本研究ではこの内、*A. macrogynus*, *A. javanicus* を除く 3 種を再発見できた。これらの形態的特徴は、先行研究の記載とほぼ一致したが、暫定的に *A. neomoniliformis* と同定した NG7 株は、遊走子嚢の連鎖を欠くなどの若干の差異が認められ、今後さらなる詳細な検討を要する。また、本研究では *Allomyces* 属は頻繁に乾湿を繰り返す側溝や人工池の岸等から良く分離され、分離株の多くは *Brachyallomyces* 亜属の *A. anomalus* と同定された。配偶体を欠き、厚膜囊から放出された遊走子が孢子体に成長する *Brachyallomyces* 亜属の生活環は、放出された遊走子が配偶体に成長する *Euallomyces* 亜属の生活環や、遊走子が一度シスト化する *Cystogenes* 亜属の生活環と比べ、より頻繁に乾燥する人工環境に対して強い耐性を持つのではないだろうか。

スミレ属植物を宿主とする不完全サビキン *Uredo* 属菌の系統分類学的検討

須藤 悠太郎 (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

サビキンは担子菌門サビキン目に属する生体栄養性の植物絶対寄生菌である。これまで 7000 種以上が報告され、最大で 5 つの形態および機能的に異なる孢子世代を持つ種や、異種寄生種が含まれる。無性世代だけが確認されている種や有性世代を形成せずに生活環を完結させる種は不完全サビキンと呼ばれている。スミレ属植物を宿主とする不完全サビキンには 3 種の *Uredo* 属菌が報告されている。そのうちの *Uredo iyoensis* と *Uredo alpestris* は主に夏孢子堆中の周辺糸状体の有無によって区別されているが、形態的な類似性が認められ、形の異なる 2 タイプの夏孢子 (図 1) を形成することでも共通性がある。先行研究において *U. iyoensis* と同定された標本の塩基配列データからなる系統群に *U. alpestris* の登録配列データが含まれたことから、これらの 2 種が分子系統学的にきわめて近縁である可能性も示唆されている。また、*U. iyoensis* については 2 タイプの夏孢子が一孢子堆内で形成されることがないため、その同根性が疑問視されている。

本研究では、*U. iyoensis* および *U. alpestris* とされているスミレ属植物を宿主とする *Uredo* 属菌の分類学的取扱いとそれらの系統位置を明らかにすることを目的として、夏孢子堆の周辺糸状体の有無および夏孢子的の形に着目しながら、分子系統学的な検討を行った。

材料と方法

供試標本：*U. alpestris*：国立科学博物館植物研究部菌類標本庫 (TNS-F) 所蔵標本 5 点

U. iyoensis：筑波大学寄生菌学研究室標本庫 (TSH) 所蔵標本 8 点；茨城大学教育学部菌学標本庫 (IBA) 所蔵標本 24 点

本研究で採集：ST-1、ST-2 (筑波大学川上演習林)；ST-3 (筑波大学八ヶ岳演習林)；ST-4 (筑波山)；ST-5、ST-6 (茨城県亀谷地湿原)；ST-7 (茨城県佐白山)；ST-8 (栃木県日光)

形態観察：夏孢子的の形態観察と形態測定のために各標本の 1 孢子堆から掻き取った孢子のプレパラートを作製し、また、夏孢子堆の周辺糸状体の有無を確認するため、孢子堆切片のプレパラートを作製して光学顕微鏡観察を行った。各標本で形成されていた夏孢子的の形態タイプの割合を調べるため、20 個の孢子堆から夏孢子的を掻き取って光学顕微鏡で識別した。また、表面構造の詳細な観察は走査型電子顕微鏡 (SEM) で行った。

分子系統解析：形態タイプを識別した夏孢子堆から掻き取った夏孢子的の DNA を抽出し、rDNA ITS 領域および 28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列を決定して、近隣接合法 (NJ 法) と最尤法 (ML 法) による解析を行った。解析には、当研究室に蓄積されているサビキンの配列データから予備検討によって本研究の供試菌と近縁であると推測された既知種の配列を加えた。

結果と考察

形態観察：孢子の大きさは *U. iyoensis* および *U. alpestris* の記載とほぼ一致していた。また、*U. alpestris* とされていた標本を含む全ての供試標本の孢子堆において周辺糸状体を認めることができなかった。周辺糸状体が形成されない特徴は *U. iyoensis* の形態的

特徴と一致するものである。全 45 標本で観察した各 20 個の夏孢子堆は、標本毎に単一のタイプの夏孢子的を形成しており、33 点が楕円形 (elliptic、E タイプ)、12 点が微突起形 (mucronate、M タイプ) の夏孢子的を形成していた (図 1)。SEM による観察の結果、2 タイプの夏孢子上で表面構造に有意な差は認められなかった。

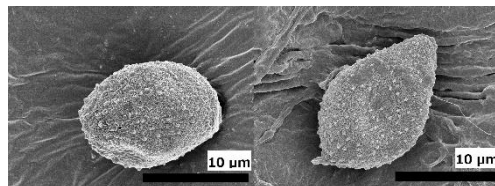


図 1 *U. iyoensis* の 2 タイプの夏孢子上：楕円形 (左) と微突起形 (右、孢子上端部に突起が見られる)

分子系統解析：供試標本に由来する ITS 領域の配列データに基づく解析では夏孢子的のタイプを反映する 2 群に分かれ、解析に用いた 181 サイト中 3 サイトで塩基置換が認められた (図 2)。

ITS 領域および D1/D2 領域に基づく系統解析では、供試標本の配列データからなる系統群と *Phakopsora* 属菌 (*Phakopsoraceae*) が姉妹群を形成した。また D1/D2 領域を対象とした系統解析の結果、供試標本の配列データからなる系統群には *U. alpestris* の D1/D2 領域の登録配列データ (AF426212) が含まれた。

以上の結果から、本研究に用いたスミレ属植物を宿主とする *Uredo* 属菌は *Phakopsoraceae* に属する菌であることが推測されたが、姉妹群を支持するブートストラップ値は低かった。解析に用いた *Phakopsoraceae* の既知種の配列データが少なかったことによるものと思われ、配列データを増すことで姉妹群を特定する必要がある。ITS 領域を対象とした系統解析では夏孢子的の形態タイプを反映する系統群に分かれ、また、各標本において単一のタイプの夏孢子的のみが観察されたことから、1 つの個体群が両方のタイプの夏孢子的を形成することはないと推測される。したがって夏孢子的の形態の違いは、異なる個体群における形質の違いであることが示唆された。この形質がスミレ属植物を宿主とする *Uredo* 属菌の種の分類基準として十分な形質であるかについては他の領域の DNA 配列データを解析するなど慎重に検討していく必要がある。また本研究においても、周辺糸状体の形成が認められなかった標本からなる系統群に周辺糸状体を有するとされる *U. alpestris* の登録データが包含されたが、そのデータの元となる標本の周辺糸状体については確認できていない。今後、周辺糸状体が確認された標本を供試するとともに、D1/D2 領域以外の遺伝子領域の塩基配列データを用いた分子系統解析を行う必要がある。その上で、周辺糸状体およびその他の形態形質の分類基準としての評価をおこない、スミレ属植物を宿主とする *Uredo* 属菌の分類学的取り扱いについてさらに検討する必要がある。

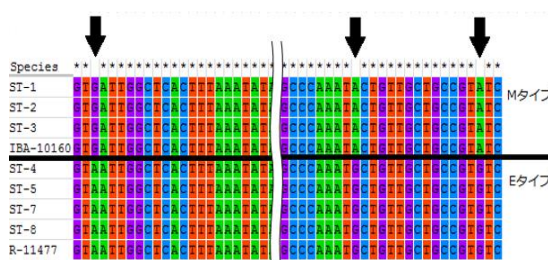


図 2 供試標本の塩基配列 (矢印の所のサイトが孢子タイプ毎に異なっている)

ヤブレッツボカビ類細胞の浮遊性と凝集性～水産養殖用初期餌料に向けて～

青谷 樹里（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

日本では水産資源の安定供給と持続性の点から、総漁業生産に占める養殖漁業の割合が増加している。現在では数十種類の魚の完全養殖が可能であり、魚種の拡大が目指されている。また、養殖業では初期の仔魚の死が収益に直結する。そのため、初期餌料の栄養を改善することにより、種苗生産の歩留まりを改善しようとする取り組みがされている。

近年魚類栄養学の進歩により、DHA や EPA 等の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) が海産魚の必須脂肪酸であることが明らかとなっている。海産魚はこれらの不飽和脂肪酸の獲得を摂食に頼っているため、餌となるワムシなどの動物プランクトンの PUFA 含有量が仔魚生育の可否を大きく左右している。ワムシの PUFA 含有量を増加させるため、ワムシの培養槽に DHA 強化クロレラを与えたり、乳化した魚介類の油を直接添加したりするという改善策が取られているが、培養槽の水質汚染や吸収効率が問題視されている。そこで、PUFA 含量が高く、強固な細胞壁を持たない海産従属栄養性藻類であるヤブレッツボカビ類をワムシの餌として用い、栄養強化に用いる方法が現在期待されている。

ワムシはプランクトンを捕食するため、ワムシを介する仔魚への給餌経路には沈みにくい株が適している。初期餌料用途に適したヤブレッツボカビ類株の探索のため、以下の実験を行った。

方法

・培養条件

ヤブレッツボカビ類の培養には GTY 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%海水濃度）を用い、25℃、100 rpm で 2 日～10 日間振とう培養を行った。

・沈降実験

容量 70 mL の角フラスコに、シオミズツボワムシの飼育海水濃度である 60%海水とヤブレッツボカビ類培養液を入れ、容器側面からの写真撮影や吸光度測定（ $\lambda = 660 \text{ nm}$ ）を行って細胞の浮遊性を評価した。また、細胞の顕微鏡観察を行った。

結果と考察

沈降実験では株により性質が大きく異なることを示す結果が得られた。

・沈降実験

沈殿率（ $100 - (0 \text{ 分での吸光度} / \text{採水した時間での吸光度}) * 100$ により求めた）の時間変化の傾向が株ごとに異なっていた（図 1）。細胞サイズが小さな株は浮遊性が高い傾向があった。また、同じ株の細胞でも凝集している細胞や大きな細胞よりも、小さな細胞は浮遊性が高かった。現在までに 29 株試験し、浮遊性の高い 4 株の有望株を得た。

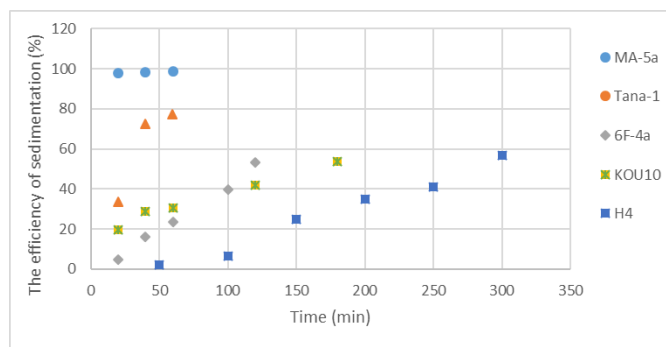


図 1：吸光度に基づく沈殿率の時間変化。株ごとに時間経過による沈殿率の変化の傾向が異なった。

今後の展望

今回得られた有望株について脂質組成と総脂質量を調べる予定である。また、培養法や収穫時期の検討を行う。

謝辞

本研究は内閣府による戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) 事業「未利用藻類の高度利用を基盤とする培養型次世代水産業の創出に向けた研究開発」の支援を受けて行った。

新規無色鞭毛虫 SRT310 株はマリモナス目（ケルコゾア）の再検討を促す

渡邊 晃太郎（筑波大学 生物学類） 指導教員：石田 健一郎（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

ケルコゾア門は SSU rDNA 配列を用いた分子系統解析の結果をもとに設立された分類群であり、多様な形態（鞭毛虫、アメーバ）や栄養様式（捕食性、光合成性、寄生性）の原生生物によって構成されている。近年ケルコゾア生物に関する研究は盛んに行われているものの、分類群の多くは未だに分子系統解析の結果のみに基づいて提唱されており、分類形質となる形態的特徴が明らかになっていない。さらに、環境 DNA の解析から多くの未記載ケルコゾア生物の存在も示唆されており、ケルコゾア生物の形態的特徴及び多様性の把握は重要な研究課題であるといえる。

ケルコゾア門の 1 綱として、一般的に珪酸質の殻を持つインブリカテア綱がある。その中には無殻の鞭毛虫のグループであるマリモナス目が属しており、珪藻寄生性の *Pseudopirsonia mucosa*、大型で 4 本鞭毛の *Auranticordis quadrivirberis*、匍匐性鞭毛虫の *Abollifer globosa* の 3 種が知られている。マリモナス目は SSU rDNA 配列の分子系統解析の結果に基づいて設立された分類群で、環境配列が多数含まれている。また既知種に分類形質となる形態的な共通点も見られないため、さらなる多様性の把握と分類体系の整理・構築が必要とされている。

SRT310 株は 2013 年にパラオの海水湖中堆積物から単離された従属栄養性鞭毛虫の培養株である。予備的な形態観察において本生物は細胞の形状や 2 本の不等長鞭毛の配置等の点でケルコゾア門ケルコモナス目に属する生物と共通する特徴を示した。しかし既知種との明確な類似性は観察されず、本生物はこれまでに報告のないケルコゾア生物であることが示唆された。そこで本研究では 1) SSU rDNA 及び LSU rDNA を用いた分子系統解析、2) 光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた詳細な形態観察を行い、SRT310 株の分類学的位置について検討した。

方法

SRT310 株から DNA を抽出して SSU rDNA 及び LSU rDNA の塩基配列を決定し、分子系統解析に用いた。分子系統解析は RAxML による最尤系統樹の作成及び最尤法に基づく検定を行った。外部形態の観察には光学顕微鏡を用い、内部の微細構造は超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて観察した。TEM による観察ではグルタールアルデヒドと四酸化オスミウムにより二重固定を行った細胞を樹脂包埋し、超薄切片を作製、それらを酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した試料を用いた。

結果

SSU rDNA 配列を用いた分子系統解析の結果、SRT310 株はマリモナス目に属する *Pseudopirsonia mucosa* が含まれるクレードと強い支持（ブートストラップ値 100%）で単系統群を形成した。しかし、本株を含めたマリモナス目の単系統性に対する支持は低かった。そこで LSU rDNA 配列を用いて分子系統解析を行ったところマリモナス目は単系統にならず、本株はサルコモナス綱の基部に位置した。

光学顕微鏡による形態観察から、SRT310 株は柔軟性のある円型～楕円型の細胞概形で 2 本の不等長鞭毛を持ち、匍匐性であることが分かった。仮足やアメーバ状の細胞は観察されなかった。前鞭毛は細胞前方で激しく波打つのに対し、後鞭毛は後ろに引きずられるように伸びていた。

TEM による微細構造観察では、クロマチンの凝集した核が細胞前部に位置しており、核内部には核小体が観察された。2 つの基底小体は非平行（約 60°）で細胞前端部に位置し、鞭毛移行帯には板状構造が見られた。ゴルジ体は核と基底小体の間に位置し、ミトコンドリアクリステは平たい管状であった。細胞膜直下には粗面小胞体と複数のシリンダー型の射出装置が観察された。

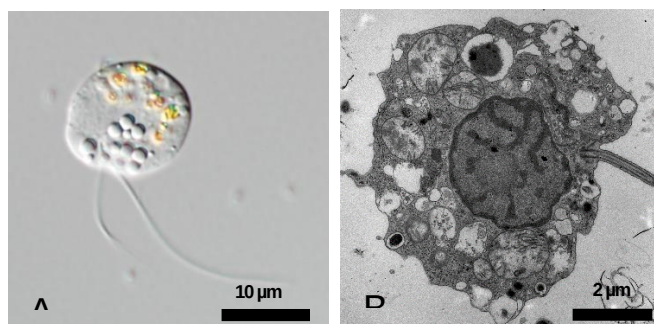


図 1. SRT310 株

(A) 光学顕微鏡写真、(B) 透過型電子顕微鏡写真

考察

予備的な形態観察では SRT310 株はケルコモナス目の生物との近縁性が示唆されたが、詳細な顕微鏡観察の結果、仮足をもたない点やミトコンドリアクリステ及び射出装置の形状が既知のケルコモナス目の生物とは異なることが明らかとなった。分子系統解析でも SRT310 株はケルコゾア系統に含まれるもののケルコモナス目との近縁性は示されず、本株はケルコモナス目に所属させるべきではない。また、既知ケルコゾア生物のいずれにも同定されないことから、本株は新属新種のケルコゾア生物であると考えられる。

SSU rDNA 配列を用いた分子系統解析では、SRT310 株はマリモナス目の *Pseudopirsonia mucosa* と近縁であることが強く示された。しかし、SRT310 株の形態的特徴はマリモナス目の既知種には見られないものが多く、マリモナス目の形態的共通性の乏しさが改めて浮き彫りになった。さらに、LSU rDNA 配列を用いた分子系統解析でマリモナス目が再現されなかったことからマリモナス目の単系統性には疑問が生じる。したがって、マリモナス目は鞭毛装置などの微細構造観察や他の遺伝子を用いた複合的な分子系統解析を通して再検討される必要がある分類群であると考えられる。

ハプト藻 *Chrysochromulina* sp.に対する海洋酸性化の影響

チョン スンホ (筑波大学 生物学類) 指導教員: 濱 健夫 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

産業革命以降、人類起源の化石燃料の消費が急激に上昇し始め、それに伴い、大気中の二酸化炭素の濃度が増加している。この人為起源二酸化炭素の1/4程度は海洋に吸収されていると見積もられており、海洋は人為起源二酸化炭素の重要なシンクとして機能している。一方、海水の二酸化炭素濃度の増加は海水のpHの低下、すなわち海洋酸性化をもたらしている。海洋酸性化の海洋生物への影響に関しては、近年、多様な研究が行われている。

海洋酸性化の植物性プランクトンに影響についても活発な研究が行われてきている。植物性プランクトンは海洋生態系食物連鎖の基礎になるため、海洋生態系の全般において影響があると思われる。

自然植物プランクトン群集を用いた実験的な研究により、ハプト藻 *Chrysochromulina* sp.は酸性化により阻害的な影響を受ける事が報告されている。一方、Liuら(2009)は、ハプト藻が主要な一次生産者であり、また、その主要な構成グループが *Chrysochromulina* 属であることを明らかにした。このため、本属の増殖に対する海洋酸性化の影響の評価は、今後の海洋の一次生産過程を考える上で非常に重要である。

本研究は、*Chrysochromulina* sp.の培養系を用いて、海洋酸性化がその増殖に対して与える影響を評価することを目的とした。また、本種は物理的ストレスに弱いため、一定の二酸化炭素濃度を維持する際の物理的ストレスの影響についても検討を行った。

材料・方法

1) 株と培養条件

筑波大学下田臨海実験センターの稲葉研究室から譲渡頂いた *Chrysochromulina* sp. D1株を実験に用いた。実験の分析はフローサイトメトリーにより総計細胞数から植物プランクトンの生細胞数を計測した。

定期培養ではフィルター滅菌を行ったダイゴ IMK 培地入りダイゴ人工海水を作成、プラスチックフラスコ (Nunc™ Cell Culture Treated EasY Flasks) に入れ1週間ごとクリーンベンチ内の無菌状態で植え継ぎを行った。

2) 成長速度の確認

先行実験として *Chrysochromulina* sp.の成長速度を確かめるため100 mlの容量で培養が可能なBM社の細胞培養フラスコを用いて数回実験を行った。

3) 物理的ストレスの確認

Chrysochromulina sp.への物理的ストレスを評価するため、物理的ストレスが少ないとされる球形のマリンフラスコを用いて、通気(100 ml/min)をした条件下で成長速度を測定した。

4) pHの影響

マリンフラスコ総計6個を用いて、異なった二酸化炭素濃度の気体(400、800、1200 ppm;それぞれ2個の培養器)を通気し、成長速度と培地のpHを24時間毎に測定した。

結果・考察

本実験において二酸化炭素濃度の差における成長速度の差を見ることはできなかった。実験開始後6日目(Day 7)の時点からの二酸化炭素注入によるpHの調節が今回の設定値である100 ml/minでは調節が困難であった。光合成量の増加によりpHの上昇が認められ、特に400 ppmの培養系で顕著であった。このpHの上昇に伴い細胞増殖速度の低下が生じていると考えられるため、pHの上昇が、特に400 ppmの培養系において成長を阻害した可能性がある。

今後実験を改良し、より精度の高い条件で実験を行う予定である。その改良点としては1. 流量の増大(200 ml/min; 現在のCO₂供給の2倍)、2. 実験前のpHの調節(1~2日前からpHの調整)、3. 定期培養時の培地のpH調整(現在7.88)及び4. 人工海水内の栄養塩の比率を減少である。これらの条件を踏まえ、pHの調整が可能であれば、今後9日以降の対数増殖期の差を観察できると予想される。

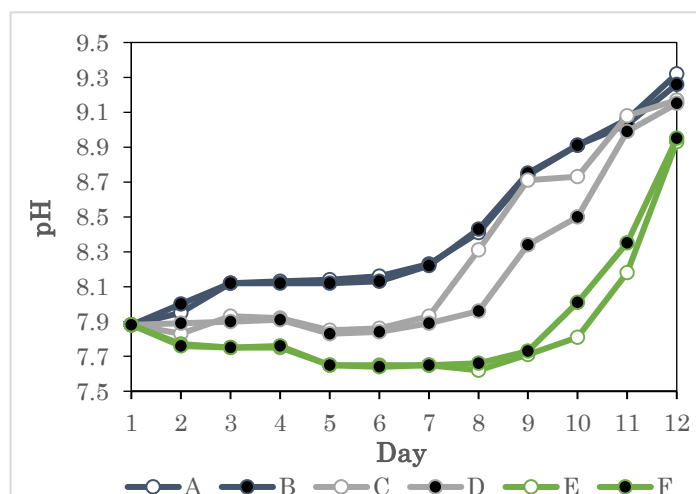


Fig.1 マリンフラスコ6つの日数経過(横軸)に伴うpHの変化(縦軸); A、B: 400 ppm、C、D: 800 ppm、E、F: 1200 ppm

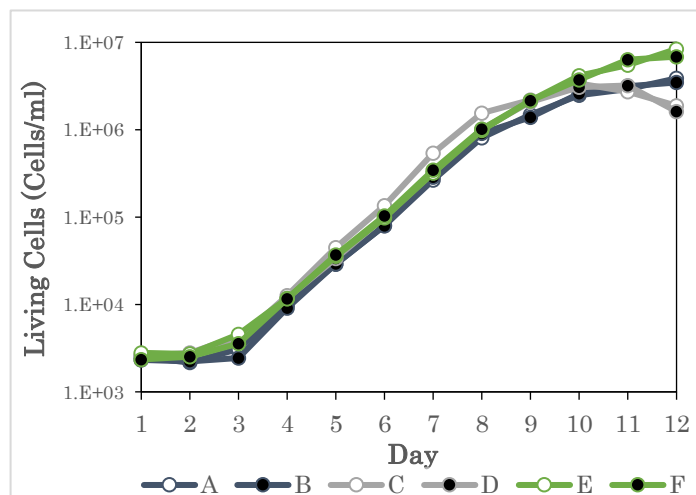


Fig.2 *Chrysochromulina* sp.の日数経過(横軸)に伴う生細胞数の変化(縦軸); A、B: 400 ppm、C、D: 800 ppm、E、F: 1200 ppm

海洋表層における蛍光性溶存態有機物の動態に関する実験的解析

佐伯 瑛（筑波大学 生物学類）

指導教員：濱 健夫（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

海洋に溶けている溶存態有機物(Dissolved Organic Matter: DOM)は、地球表層における最大級の有機炭素リザーバーのひとつである。DOMのうち、蛍光特性を示すものを蛍光性溶存態有機物(Fluorescence DOM: FDOM)といい、バクテリアに対して難分解性の腐植様 FDOM と易分解性のアミノ酸様 FDOM が含まれる。腐植様 FDOM は主にバクテリアによって生産されることが報告されている。腐植様 FDOM の蛍光強度は海洋表層において低く、これは表層で太陽光による腐植様 FDOM の消光が起こっているためと考えられている。深度とともに蛍光強度が増加することから、腐植様 FDOM がバクテリアによって生産されることが示唆されている。

これらのことから、海洋表層において腐植様 FDOM は昼夜問わずバクテリアによって生産されており、昼間は太陽光によって退色するため蛍光強度が低くなるが、夜間は生産された腐植様 FDOM が蓄積していると考えられる。しかしながら、海洋表層における腐植様 FDOM の動態に関してはこれまでほとんど研究が行われていない。そこで、太陽光下での自然海水の培養実験を行い、海洋表層における腐植様 FDOM の生産と光退色の動態を観察する。またバクテリア現存量とその活性を測定することにより、腐植様 FDOM の動態とバクテリアの関係を明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】

2016年7月に研究船「新青丸」KS-16-8の西部北太平洋における航海で、亜熱帯外洋域（東経144度、北緯32度）の表面海水を用いた培養実験を行った。海水は2個の20Lポリカーボネート容器に分けて採取し、片方には採水と同時に栄養塩を添加した(KNO_3 16.1 g, KH_2PO_4 1.4 g, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 45.4 g)。7月7～8日に栄養塩非添加の海水、7月11～12日に栄養塩添加の海水を培養した。

同様に、2016年8-9月に静岡県下田市沖において採取した沿岸域の表面海水を用い、培養実験を行った。8月30～31日に栄養塩非添加の海水、9月2～3日に栄養塩添加(KNO_3 16.2 g, KH_2PO_4 1.8 g, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 46.1 g)の海水を培養した。

海水は紫外線を透過する石英瓶12本に分取し、アルミホイルと黒ビニールで遮光して日没から培養を開始した。培養開始時と翌日の日出時に3本ずつ回収し、0時間および12時間試料とした。残りの6本の石英瓶のうち3本は日出時にアルミホイルと黒ビニールを取り除いて明条件試料、3本はそのまま遮光して暗条件試料とした。培養は開始翌日の日没時に終了し、回収した6本の石英瓶を24時間試料とした。また、同じ海水で満たした酸素瓶も同時に同条件で培養した。

培養実験後、それぞれの海水について、①溶存酸素濃度測定、②DOC(Dissolved Organic Carbon, 溶存態有機炭素)濃度測定、③FDOM 蛍光強度測定、④バクテリア細胞数計測、⑤バクテリア DNA 分析、⑥植物プランクトン現存量計測、⑦植物プランクトン色素分析を行った。

【結果と考察】

観察された腐植様 FDOM の蛍光強度は、0-12時間および暗条件試料の遮光した状態では横ばいまたは上昇傾向にあり、太陽光にさらした後の明条件試料では低下した(図1)。暗条件での腐植様 FDOM 蛍光強度の増加により、海洋表層においてバクテリアにより腐植様 FDOM が生成されていることが確認できた。また、明条件での蛍光強度の低下は、腐植様 FDOM が光によって消光したことを示していると考えられる。一方、DOC濃度の変動はどの培養実験においても明確には見られず、本実験ではDOM全体の変化に占める腐植様 FDOM の光退色の寄与は小さかった。このことから、腐植様 FDOM の消光は蛍光部位の分解によるもので、腐植様 FDOM は消光後も蛍光特性のないDOMとして存在している可能性がある。

腐植様 FDOM の蛍光強度は、外洋の培養海水よりも、沿岸の培養海水でより高かった。バクテリア細胞数は外洋に比べ沿岸で多かったことから、バクテリア現存量が腐植様 FDOM の蛍光強度に関係していると見られる(図2)。また蛍光強度の経時変化も沿岸でより明確であったことから、バクテリア現存量が増加したことによって蛍光強度の変化が明らかになったと考えられる。亜熱帯域の海水は他の海域と比べて特にバクテリア現存量が少ないため、蛍光強度の変化が明確でなかったと考えられる。

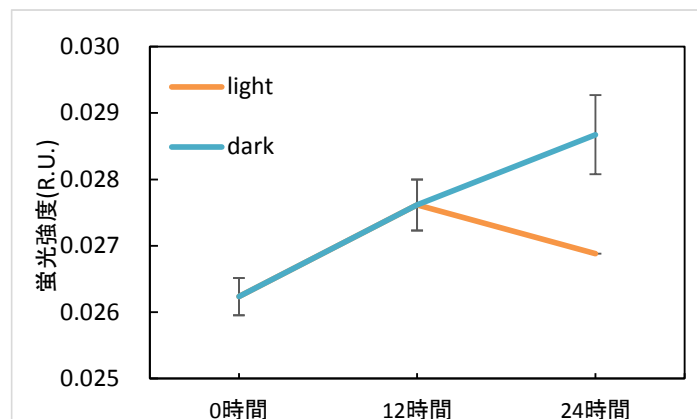


図1. 沿岸・栄養塩添加海水における腐植様 FDOM 蛍光強度の経時変化

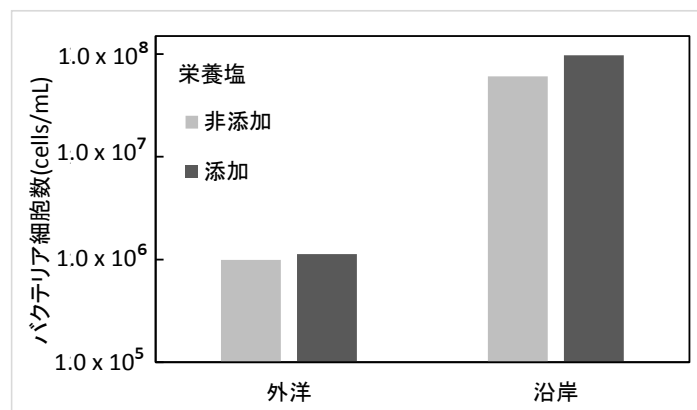


図2. 外洋・沿岸の各培養実験におけるバクテリア細胞数

大型藻類起源溶存態有機物の微生物学的・光化学的分解過程

岩澤 絵梨（筑波大学 生物学類）

指導教員：濱 健夫（筑波大学 生命環境系）

背景

海洋に存在する溶存態有機物(Dissolved Organic Matter: DOM)は陸上植生を上回るほどの炭素量を保持し、地球表層の炭素循環における有機炭素リザーバーとして重要である。海洋DOMは、バクテリアに分解されやすく微生物のエネルギー源となる画分や、分解を受けにくく有機炭素のリザーバーとなる画分から構成される。このDOM分解過程は、微生物学的分解、光化学的分解の二つに分けられる。DOMの動態を理解するにあたり、この二つの分解過程を知ることは重要となる。海洋DOMのほとんどは、植物プランクトンの一次生産に由来している。しかし沿岸域においては、コンブやカジメ等が藻場を形成し、この大型藻類が主要なDOM生産者となっている。大型藻類起源DOMの分解についての研究は、いまだ十分に行われていない。

本研究では、大型藻類起源DOMの分解過程を微生物学的分解と光化学的分解の両方から評価するため、大型藻類起源DOMを含む海水に対する微生物分解実験および光照射実験を実施した。DOMのうち蛍光特性を示す画分は蛍光性溶存態有機物(Fluorescent DOM: FDOM)と呼ばれ、この蛍光特性を分析することにより、DOMの組成や起源を知ることが可能となる。この分解過程における溶存態有機炭素(Dissolved Organic Carbon: DOC)濃度変化および蛍光特性の変化から、大型藻類起源DOMの分解過程の定量・定性評価を行った。

方法

(1)試料採取

2016年7月12日に、静岡県下田市大浦湾沿岸藻場および湾外にて、海水試料を採取した。大浦湾沿岸藻場はカジメ群落となっており、海水には大型藻類起源DOMが多く含まれる。湾外の海水は、藻場から2 km以上離れた地点で採取し、大型藻類起源DOMの少ないコントロール試料として使用した。海水試料は、孔径0.7 μm のガラス繊維濾紙(Whatman, GF/F、400°Cで5時間の処理済み)で濾過し、懸濁態有機物を除去した。この濾液を、微生物分解実験および光照射実験に用いた。

(2)微生物分解実験

藻場海水と湾外海水の濾液をそれぞれポリカーボネートボトルに入れた。光分解の影響を排除するため暗室に置き、20°Cの状態を保った。5ヶ月間、定期的にサブサンプリングを実施し、孔径0.2 μm のフィルターで濾過したのち、DOC濃度および蛍光特性の測定を行った。

(3)光照射実験

微生物分解の影響を取り除くため、GF/F濾液を更に孔径0.2 μm のカプセルフィルターで濾過し、バクテリアを除去した。この濾液を石英瓶に移し、人工光照射装置を用いて、試水を20°Cに保った状態で光を照射した。照射光の強度は765Wm⁻²、照射時間は0、1、2、3、4、12、24、48時間とした。時間ごとにサブサン

プリングを実施し、DOC濃度および蛍光特性の測定を行った。また対照実験として、藻場海水、湾外海水ともに暗条件試料を用意した。

結果・考察

(1)微生物分解実験

DOC濃度は、藻場海水・湾外海水ともに7日目までに約12%減少した(図)。その後もゆるやかな減少を続け、5ヶ月後には約20%の減少が確認できた。藻場海水・湾外海水において、同様のDOC濃度変化が見られたことから、大型藻類起源特有の微生物易分解性DOMの存在量は少ないことが示唆された。また、実験開始後2ヶ月の時点からDOC濃度に変化が見られなかったことから、微生物が数ヶ月中に分解することの出来る海洋DOMは、全体の2割程度であることが考えられる。

蛍光特性については、腐植様FDOMの蛍光強度が増大した。腐植様FDOMは、微生物に分解されにくい難分解性の画分である。このことから海洋DOMは、微生物活動によって無機化されるだけでなく、難分解性有機物の生成も行われることが示唆される。

(2)光照射実験

藻場海水・湾外海水ともに、光照射によるDOC濃度の減少は確認されなかった。このことは、大型藻類起源DOMが、光照射に対して難分解性を持つことを示している。蛍光特性については、特に藻場海水で腐植様FDOMの蛍光強度が減少した。ここから、光照射により、一部の難分解性DOMが、蛍光特性を示さないDOMに変性したことが考えられる。

以上のことから、大型藻類起源DOMを無機化する要因は微生物による分解であり、DOMの組成変化については微生物活動と光照射の両者が関わっていることが示唆された。

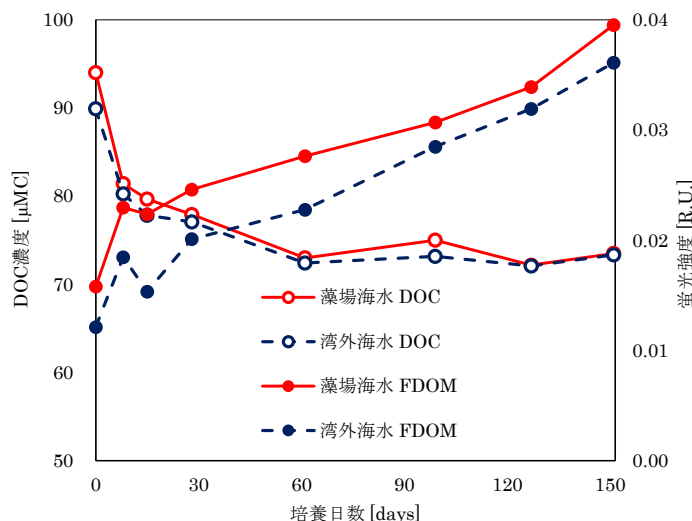


図 微生物分解によるDOC濃度および腐植様FDOM蛍光強度の変化

樹形・葉の形質の変化からみた林冠構成種の若齢期における光環境に対する応答

中田 貴子（筑波大学 生物学類）

指導教員：廣田 充（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

光は樹木の生存に関わる重要な環境のひとつである。森林内の光環境は一様でなく、暗く覆われた場所もあれば、明るく開けた場所もある。固着性の樹木はそのような様々な光環境の中で自身の置かれた環境に合わせて生きていく必要があり、実際に、同一種でも光環境によって樹形や葉の形質が変化することが分かっている。一方、森林内には光環境に対する応答が異なる様々な種がいる。光環境に対する応答の中でも、特に、暗い光環境に耐えて成長する性質（耐陰性）は樹種ごとに様々であり、暗い林床で生き抜くために重要である。暗い光環境を耐えるうえで、光環境による樹形・葉の形質の応答は環境の改善にはたらき、この形態の応答が耐陰性に関係すると考えられるが、これに関して調査した研究は少ない。そこで私は、光環境によって変化する樹形・葉の形質の違いが耐陰性の違いを決定づける要因としてはたらくと考え、本研究では、耐陰性が異なる樹種の樹形・葉の形質の解明を目的として調査を行った。

【方法】

調査地と対象種

2016年6月から同年10月に、長野県の筑波大学菅平高原実験センター、カヤノ平高原、信州大学志賀自然教育園と茨城県の筑波大学構内で調査を行った。

日本の主要な林冠構成種であるアカマツ、シラカバ、コナラ、ミズナラ、ブナ、オオシラビソの6種の樹高10 m以下の若齢期の木を対象とした。

測定項目

調査地内の様々な光環境下で生存する個体について樹高、樹冠深度、樹冠幅、葉の乾燥重量、葉面積、および光量子センサーを用いて対象木直上の光強度を開放地の光強度と共に測定した。これらの値から、樹形として樹冠の深度、投影面積、ボリューム、葉の形質として樹上部の葉の比葉面積を測定した（図1）。さらに、樹形の曲がりやすさを表す樹形のいびつさを測定した。樹冠のいびつさを表すために、樹冠のつぶれ比（樹冠直径の最大最小比を表したもの）と重心のずれ（根元と樹冠面の重心の水平距離）も調べた。

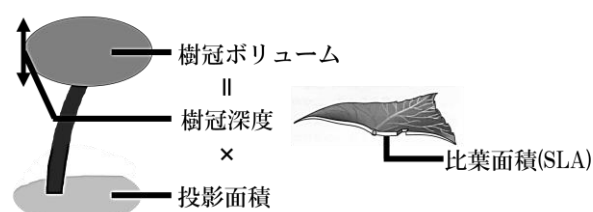


図1 測定項目の名称

【結果と考察】

光環境に対する樹形・葉の形質の変化

○投影面積と樹冠深度（図2）

アカマツ、オオシラビソは暗くなるほど、投影面積も樹冠深度も小さくなった。一方、シラカバ、コナラ、ブナは投影面積が大きく、樹冠深度は小さく、平たい樹冠になった。ミズナラは投影面積も樹冠深度も大きくなり、投影面積の変化が大きいのにに対して樹冠深度の変化は小さいため、シラカバなどと同じように、平たい樹冠になることがわかった。

○樹冠ボリューム

樹冠ボリュームは樹冠の大きさを表し、樹冠深度と投影面積の積から計算される。アカマツ、コナラ、オオシラビソは、暗くなると、樹冠ボリュームが小さくなる傾向がみられた。一方、シラカバ、ミズナラ、ブナはその逆の傾向がみられた。

○葉の形質

アカマツ、シラカバ、コナラ、ブナは暗くなると、葉が薄くなる傾向がみられた。一方、ミズナラとオオシラビソは厚くなる傾向がみられた。

樹形のいびつさ

重心ずれとつぶれ比の両方で種間に有意な差があることがわかった。重心ずれは、オオシラビソ、アカマツ、コナラ、シラカバ、ミズナラ、ブナの順に樹冠が根元上からずれやすい傾向がみられた。種間では、アカマツとコナラ、コナラとミズナラ、ミズナラとブナの間に有意差があった（ $P < 0.05$ ）。つぶれ比はアカマツ、コナラ、ミズナラ、シラカバ、ブナ、オオシラビソの順に樹冠がつぶれやすい傾向だった。種間では、コナラとシラカバ、ミズナラとブナ、シラカバとオオシラビソの間に有意な差があった（ $P < 0.05$ ）。

光環境に対する樹形・葉の形質の応答、樹形のいびつさは種間で異なった。今回調査した形質の中で、樹形のいびつさと耐陰性の関係が最も強いことが示唆された。

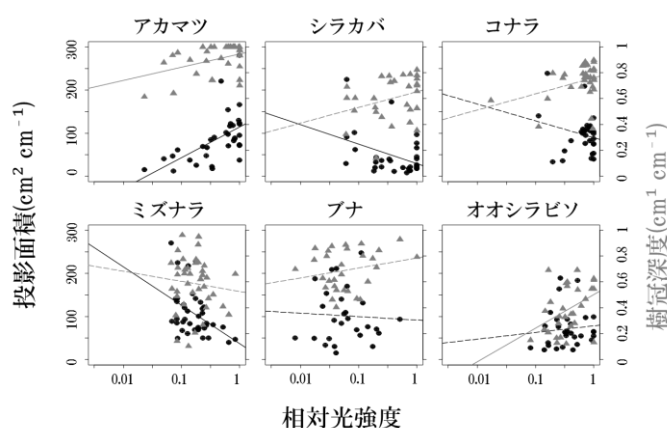


図2 各種の相対光強度に対する投影面積（●）、樹冠深度（▲）の値と回帰直線（実線は $P < 0.05$ 、破線は $P \geq 0.05$ ）

ススキ草原の野焼きが土壌呼吸速度と地上部バイオマスに与える影響

有水 理菜（筑波大学 生物学類）

指導教員：安立 美奈子（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

日本の気候は降水量が多く温暖湿潤な気候であるため、海浜地域や高山地域、湿地などに見られる高塩分、乾燥、低温、強風、強光、過剰水分などの特別な環境条件下でない限り草原は森林へと遷移をし、草本群落を維持することは難しい。従って、日本に存在する草原は、茅場や牧草地、景観保持などの目的で古くから野焼きや刈り取り、放牧などの人の管理のもと維持されており、半自然草原と呼ばれている。野焼きは、野外・野山で植生を計画的に焼き払う事で、古くから植生遷移を人の手により調整する方法の一つとして利用されてきた手法である。野焼きは雪解け直後に行われることが多く、前年のリターや樹木の実生などを燃やすことで、草本植物の生長促進や多様性の維持、森林への移行抑制の効果がある。

生態系の炭素循環において土壌呼吸は、土壌表面から CO_2 が放出される現象のことで、植物体の根の呼吸と、土壌中の従属栄養生物による呼吸から成っている。土壌呼吸量をモニタリングすることは、野焼きなどの人の管理が生態系の炭素循環プロセスに与える影響を把握する上で重要である。

本研究では、野焼きを行った区域（野焼き区）と野焼きをしなかった区域（対照区）における土壌呼吸速度と地上部バイオマスの比較を行うことで、野焼きが草原の炭素循環に与える影響を明らかにすることを目的とした。また、環境要因である地温や土壌栄養塩濃度などについても調査を行った。

【方法】

調査地は、群馬県北部にある水上高原の斜面に位置する半自然草原で、茅場の再生と生物多様性の保全・管理を目的に継続的に野焼きを行っている地域である。本研究と同時期に行われた植生調査では、優占種であるススキの他にワラビ、ヤマハギなどが確認されている（増井ら、未発表データ）。

調査は2016年4月から10月に行った。野焼きは2016年4月16日に行い、野焼きを実施する前日に、 $8\text{ m} \times 8\text{ m}$ の調査区を野焼きする場所と野焼きしない場所にそれぞれ1つ設置して、野焼き区と対照区とした。また、調査区内における各 $2\text{ m} \times 2\text{ m}$ の小区画内で土壌呼吸速度を月1回、閉鎖系チャンバーを用いて測定した（ $n = 16$ ）。土壌呼吸の測定と同時に、各測定地点の深さ1cmと5cmの地温の測定を行った。環境要因の測定として、各区に地表から1cm、5cm、10cmの位置に温度センサーを設置し、野焼き後から10月まで1時間おきに地温の継続測定を行った。また、地上部バイオマスを調べるために各区の周辺の任意の5カ所に $50\text{ cm} \times 50\text{ cm}$ の方形区を設置して、月一回、方形区内の枯死体を除いた植物体を地際から全て刈り取った。刈り取った植物体はススキとそれ以外に分別し、乾燥後に重量を測定して地上部バイオマスとした。乾燥させたサンプルは粉碎し、CN コーダーを使用して炭素と窒素の含有量を測定した。また、土壌栄養塩の変化を調べるため、野焼き前と野焼き後、10月の3回において、各区の周辺の任意の5カ所（計10カ所、 $20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ ）で深さ0-2cmの土壌を回収した。回収した土壌のうち、4.0 gを2 mol/Lの塩化カ

リウム水溶液で抽出後、アンモニア態窒素、硝酸態窒素量を測定した。また、風乾後にCN コーダーを使用して炭素と窒素の含有量を測定した。

【結果と考察】

野焼き実施直後（4月16日）の測定では野焼き区域の土壌呼吸速度が対照区に比べて有意に高かった（図1）。これは野焼き直後に一時的に土壌温度が上昇したことが一つの要因であると考えられる。しかし、野焼き区と対照区で有意差が認められたのは野焼き直後と9月の測定のみであり、その他の月では有意差は認められなかった。また、野焼き区では地上部のバイオマス量は対照区に比べてススキ、ススキ以外共に多い傾向があり、その差は野焼き後日数を経るごとに大きくなっていった（図2）。

これらの結果から、野焼きがススキ草原の年間の土壌呼吸量に及ぼす影響は小さいが、ススキとススキ以外のバイオマスが増えることにより炭素の吸収量は大きくなることが示唆された。

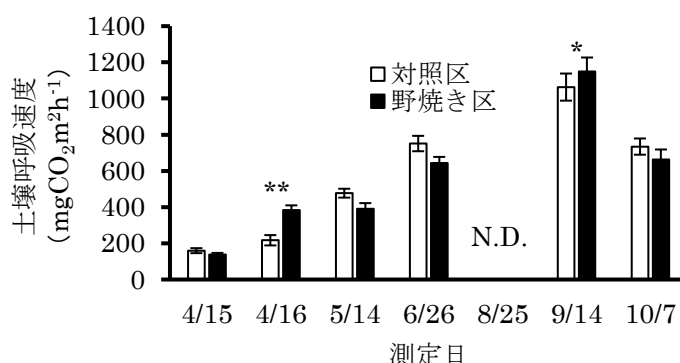


図1. 土壌呼吸速度の測定結果。エラーバーは誤差範囲、N.D.はデータがないこと、*と**はt検定による有意差を示し、それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ であることを示す。

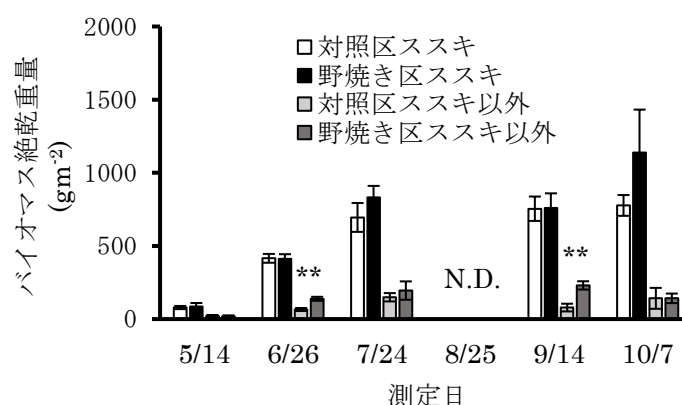


図2. 地上部バイオマス乾燥重量の比較。エラーバーは誤差範囲、N.D.はデータがないこと、*と**はt検定による有意差を示し、それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ であることを示す。

三宅島の火口周辺における特異な微地形がススキの生育に与える影響

笹森 猛夫 (筑波大学 生物学類)

指導教員：安立 美奈子 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

火山の噴火は自然攪乱の1つである。その規模が著しく大きい場合には、生態系の構造は一変し、そこから一次遷移が始まる。

2000年に大規模な水蒸気爆発を伴う噴火をした伊豆諸島の三宅島でも、大量の火山灰、スコリア、そして火山ガスの影響によって火口周辺の植生はほぼゼロとなり裸地が形成され、そこから一次遷移が始まった。15年以上経過した今日でも植生が十分に回復していない場所は、火山性荒廃地となっている。このような植生のない場所では、降雨による水が地表流となって地面を流れてできる特異な溝地形、リル (図1参照) がみられる。三宅島の火山性荒廃地では、リルは幅が数cmの小型のものから数mの大型ものまで大小様々あるが、それらのリルに沿ってススキなどの草本が分布していることが多い。このことからリルのような溝地形が、遷移初期過程における植物の定着、そして発達に重要な役割を果たしていると考えられている。リルがあることで、強風等のストレスを軽減できる、風散布種子の定着効果を高める (露崎, 2001) などの効果が報告されている。リルが降雨による水の通路になっていることを考慮すると、リルという微地形を介した水環境の変化も植生の定着および発達に影響を与えている可能性もあるが、それについてはこれまで検証されたことがない。そこで私は、火山性荒廃地におけるリルが植生の定着と発達に与える影響、特に水環境の影響を明らかにすることを目的とした。

【調査地】

一万年以上昔から現在に至るまで活発な活動を続けている三宅島の火口周辺に位置する旧村営牧場跡地の緩斜面を調査対象地とした。この周辺では2000年の大規模噴火の際に大量の火山灰が降り積もり火山性荒廃地となっている。調査を行った2016年の時点でも植生はまばらで草本先駆種のハチジョウススキ、ハチジョウイタドリ、シマタヌキラン等が分布している。本調査では、初期植生のなかで優占するハチジョウススキ (以下ススキとする) に着目して調査を行った。

【方法】

1. ライトランセクト法によるススキと土壌水分

調査地の斜面上部から斜面下部に向けて1本50mの直線を10m間隔で平行に4本設置した。各直線上に1m×1mの方形調査区 (コドラート) を1m間隔で設置し、直線1本につき計25、全部で100のコドラートを設置した。各コドラート内のススキ株の大きさ (高さ、長径・短径)、ススキ株数、ススキ実生数、穂の有無、土壌水分、リルがある場合はリルの大きさの計測を行った。またリルが存在する場合は、リル内外でこれらの計測を行った。

2. 実験室内でのススキ生育実験

土壌水分条件の違いによるススキの生育を調べるため、インキュベーターを用いてススキ生育実験を行った。水分条件を3段階 (1日あたり5g, 3g, 1g ずつ3日おきに水やり) に分けて2016年7月11日～10月10日の93日間育てた。実験終了後に土壌の質量含水率、ススキ葉面積、相対成長速度 (単位時間

あたりの植物の乾燥重量の増加量)、NAR (葉面積あたりの成長量)、LAR (植物の乾燥重量あたりの葉面積) を求めた。

【結果】

1. 調査地のススキの生育に関する測定

土壌水分は、リルの外の方がリルの内よりも有意に大きいことが分かった (リル外: 31.8%, リル内: 24.2%, $P < 0.001$, $n=25$ の平均)。また斜面の上下では土壌水分に有意差はなかった。

ススキの大きさと数に関しては、いずれの項目においてもリル内外で統計的に有意な差はなかった。しかし、ススキの大きさはリル外が大きい傾向がある一方で、数に関してはリル内の方が多い傾向があった。また土壌水分の違いに伴う各項目の応答は、いずれも統計的に有意ではないが以下のような傾向が見られた。土壌水分が多いほど①リル外ではススキは大きくなる (リル外: $5.7 \times 10^5 \text{ cm}^3$, リル内: $2.1 \times 10^5 \text{ cm}^3$, $n=34$ の平均) ②リル内ではススキ株数・実生の数ともに多くなる (リル外: 19.2 個, 119 個, リル内: 33.1 個, 179 個, $n=34$ の平均)。

2. ススキの生育実験

方法に示した各解析項目と土壌水分条件との関係をピアソンの積率相関分析をした結果、ススキ葉面積と相対成長速度、LARは土壌水分条件が良いほど有意に大きくなった。NARは統計的に有意ではなかったが、土壌水分条件が良いほど小さくなる傾向を示した。

【考察】

結果1のリル内外における土壌水分条件による各項目の応答の結果から、土壌水分条件が良いほどススキはリルの外では大きく成長することができ、リルの内では数を増やすことができることが分かった。リル内のススキが土壌水分条件に関わらず大きくなれなかったことは、成長するための十分なスペースがなかったことが原因だと考えられる。リル内では土壌水分条件が良いほど実生の数も多くなるが、リル外では水分が多くても、個体サイズが大きいススキの陰になり実生を増やせなかったことが考えられる。結果2から水分条件が良いことがススキのサイズを大きくさせるということを裏付けた。そしてそれはススキが1枚1枚の光合成の質を上げる方法ではなく、葉の量を増やす戦略で成長量を増加させていたことが分かる。



図1. 調査地のリル

神奈川県相模川水系のカワアナゴ *Eleotris oxycephala* 集団に対する温排水の影響

山川 宇宙 (筑波大学 生物学類)

指導教員：今 孝悦 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

下水処理場や発電所などからの温排水は、河川や沿岸域の水温を上昇させ、水圏生態系の改変を招く。高緯度地域における温排水は、好暖水温種の摂餌生態や繁殖生態の改変を伴ってそれらの生存を促進し得るが、そうした影響を野外で検討した事例は極めて乏しい。これは高緯度地域において温排水の影響下でない場合、好暖水温種が低水温期に大きく個体数を減じるため、温排水の有無によって生じる影響を直接評価し難いことに起因する。

カワアナゴ *Eleotris oxycephala* は亜熱帯から暖温帯に分布するハゼ亜目カワアナゴ科の両側回遊魚で、紀伊半島南岸や四国太平洋側沿岸、九州南岸に分布主体がある典型的な好暖水温種である。関東地方周辺が太平洋側の分布北限とされるものの、特に、南関東地域では厳冬期（1–2 月）を除けば低水温期でも多くの個体が生残している。したがって、当該地域における本種を対象とすることで、低水温期でも温排水の影響下にある水域とない水域間で、それらの生態を直接評価することが可能となる。

本研究では、好暖水温種に対する温排水の影響を調べることを目的として、カワアナゴを対象に、神奈川県相模川水系の温排水の影響がある水域と影響がない水域で食性や肥満度、生殖腺体指数および遺伝構造を評価した。

【材料と方法】

1. 物理環境要因、餌生物およびカワアナゴの採集

2015 年 11 月下旬～12 月上旬（低水温期）、2016 年 5 月中旬（水温上昇期）、8 月下旬～9 月上旬（高水温期）に、相模川本流の湘南銀河大橋下右岸（温排水の影響あり：以下、温排水域）と相模川水系小出川支流千の川（温排水の影響なし：以下、対照水域）で物理環境要因を計測し、餌生物およびカワアナゴを採集した。

2. カワアナゴの消化管内容物分析および安定同位体比分析

各個体の消化管内容物を精査し、各餌生物の出現頻度（%F）、体積百分率（%V）、RI（ $RI = \%F \times \%V$ ）を算出するとともに、空胃率も求めた。また、各個体における各餌生物の存在・不在データを用いて PerMANOVA を行い、両水域間および 3 時期間で食性の差異があるのか調べた。有意差が検出された場合には、SIMPER を行って有意差に対する各餌生物の貢献度を求めた。加えて、炭素・窒素安定同位体比分析により、カワアナゴの体組織に対する各餌生物の寄与率を調べた。

3. カワアナゴの肥満度および生殖腺体指数（GSI）の算出

幼魚、雄成魚、雌成魚の肥満度を算出した。雌成魚については、GSI も求めた。

4. カワアナゴの水域内および水域間の遺伝的変異の評価

温排水域および対照水域から採取した全 61 個体から DNA を抽出し、MIG-seq を用いて一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）を検出した。ヘテロ接合度期待値（ H_E ）により水域内の遺伝的多様性を評価し、水域間の遺伝的分化程度

は固定指数（ F_{ST} ）を用いて評価した。また、STRUCTURE 解析を行い、両水域における個体レベルでの遺伝構造も調べた。

【結果と考察】

1. カワアナゴの食性と餌環境について

温排水域では、消化管内容物中のユスリカ科幼虫の %F や RI が高く、安定同位体比分析でもユスリカ科幼虫の寄与率は高かった。一方、対照水域では、水温上昇期を除いてユスリカ科幼虫の %F や RI、寄与率は低かった。PerMANOVA では、幼魚、成魚ともに両水域間で食性の差異が認められ、この有意差に最も貢献している餌生物はユスリカ科幼虫であることが SIMPER により判明した。これらの結果から、温排水域では対照水域と異なり、ユスリカ科幼虫が主餌料となることが示唆された。

餌環境をみると、ユスリカ科幼虫の個体数が対照水域と比べて有意に多く、そうした餌生物の現存量の相違が、両水域のカワアナゴの食性の差異にも反映されていると考えられる。

2. カワアナゴの空胃率、肥満度、GSI について

空胃率は、対照水域では低水温期に高かったのに対し、温排水域では低水温期でも低かった。これは、温排水域では低水温期の水温低下が緩和され、カワアナゴの採餌活性が高く保たれることに起因すると考えられる。

肥満度をみると、成魚では、低水温期は温排水域の方が対照水域よりも有意に高かった。空胃率の結果からも示唆されたように、温排水域では低水温期でも十分な採餌活動が認められ、良好な栄養状態が維持されたものと推察される。一方、幼魚では両水域間で肥満度に有意差は認められなかったが、当該水域への加入時期や加入前の餌環境が影響を及ぼしているのかも知れない。

雌成魚の GSI に関して、温排水域では水温上昇期および高水温期に高く、対照水域では高水温期でのみ有意に高かった。これは、対照水域での繁殖期が高水温期に限定されるのに対して、温排水域では水温上昇期から既に繁殖期が開始される可能性を示唆している。温排水域では、低水温期でも肥満度が高く、生殖腺への投資が早期に整うのであろう。さらに、高水温期間でも高い GSI を保っており、水温上昇期から高水温期にわたる長い繁殖期間を有する可能性も考えられる。

3. カワアナゴの遺伝的変異について

MIG-seq により 1417 SNP 遺伝子座が検出された。 H_E は、温排水域では 0.320、対照水域では 0.321 であり、各水域の遺伝的多様性は同程度であった。 F_{ST} は 0.010 と低く、この値は有意であったが、両水域間での遺伝的分化はほとんどないことがわかった。STRUCTURE 解析でも両水域間での遺伝的分化はみられなかったが、両水域全体でみると遺伝的に異なる 2 系統およびそれらの雑種系統があることがわかった。これらのことから本種は両側回遊を行うため、複数系統が同所的分布し、またそれらの間での雑種形成が進んでいることが示唆された。また、両水域間での食性や肥満度でみられた差異は、遺伝的要因ではなく、温排水の有無という環境要因によるものであることが明らかとなった。

花の向きは訪花者相の‘フィルター’として機能しうるか？～操作実験による採餌行動の比較

高野 美幸（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）

背景と目的

多くの顕花植物は、色や形、香りなどさまざまな花の形質によって、花粉の運搬を担う動物たちを巧みに誘引している。このように花の形質は、訪花動物との密接な相互作用を通じて多様に進化してきた。なかでも、特定の訪花者による送粉への適応進化を遂げた花は、分類群によらず似たような花形質の組合せをもつと考えられることが多い。こうした考えは「送粉シンドローム」と呼ばれ、花形質と訪花者の関係を理解する上で重要な概念の一つに位置づけられている。

各種の送粉者に対するシンドロームを構成する重要な花形質としては、色や形、香りなどの他に、花が咲く向きもしばしば挙げられる。最もよく知られた考えとして、下向きに咲く花は、逆さにとまるのが苦手のハナアブやチョウを遠ざけ、逆さにもとまることができるハナバチにだけ花粉の運搬をまかせている、というものがある（田中 1997）。たしかに野外の植物を観察すると、下向きの花にはハナバチが多く訪れているようにみえる。しかし、異なる種の花は、花の向き以外の形質においても一致しない点が多く、花の向きが訪花者相の違いをどこまで説明できるのかは不明である。

そこで本研究では、さまざまな昆虫群の訪花頻度が、花の向きの違いによってどこまで、どんな影響を受けるのかを定量的に調べるため、複数種の野生植物を用いた操作実験をおこなった。同属内から花を上向きに咲かせる種と下向きに咲かせる種をえらび、それぞれ人為的に花の向きを逆転させて比べることで、生来の花の向き、あるいは花の向き以外の形質の違いによる結果の偏りを小さくするよう工夫した。このような手法を用いて、花に訪れた各昆虫群の1) 訪問頻度、2) ある花に接近してからその花を離れるまでの一連の行動（訪花行動）が、花の向きに応じてどのように変わるかを観察した。

材料と方法

材料

操作実験には、種間で花の形態が似ており、かつ上向きに咲かせる種と下向きに咲かせる種を両方とも含む2つの属を用いた。さらに、水平な花弁からなるキイチゴ属（クサイチゴ、カジイチゴ、モミジイチゴ）の皿状花と、多数の細い管状花からなるアザミ属（ノハラアザミ、ナンブアザミ）の頭花の比較によって、花の向きと形態が昆虫のつかまりやすさにおよぼす交互作用についても手がかりを得ることをねらいとした。調査地と調査期間は以下の通りである。

- ・キイチゴ属 2016年4月、つくば市内の林
- ・アザミ属 同年8月下旬～9月上旬、菅平高原

方法

開花中の株を無作為にえらび、花序内のすべての花の向きを逆転させ、園芸用ビニルタイで各花の花茎を固定したものを処理区とした。その後、処理区と対照区（花の向きを変えない花序）のそれぞれにビデオカメラを設置し、録画を行なった。これらの記

録映像をPC上で再生してフレーム数をかぞえ、訪問頻度および採餌などの訪花行動にかかった時間を測定した（精度は1/30秒）。

結果・考察

まず、ハナアブやチョウでは、植物種や処理の有無によらず、下向きの花をつけた花序における訪問頻度と花あたりの滞在時間が減少する、という一貫した傾向がみられた。こうした傾向は、足がかりの少ない皿状花をつけるキイチゴ属でより顕著にみられた。これらの結果は、ハナアブやチョウは逆さにとまるのが苦手であるために、下向きの花を嫌うことを示唆する。一方、ハナバチでも上向きの花をより好む傾向がみられたものの、ハナアブやチョウの場合に比べると影響は小さかった。よって下向きの花は、訪花者相に占めるハナバチの割合が上向きの花よりも高いことになり、従来の説はおおむね支持されたと言える。

ただし、ハナバチの滞在時間は、植物種によらず下向きの花でより長くなるという、ハナアブやチョウとは正反対の傾向だった。これは、ハナバチの訪問頻度が下向きの花で減少した原因が「とまりにくさ」によるものではない可能性を示唆する。特にアザミ属に訪れた小型ハナバチに注目すると、ノハラアザミ（背丈50～100 cm）では上向きの花を、ナンブアザミ（背丈150 cm以上）では下向きの花を好んで訪れた。この結果は、花の向きに対する選好性が、花の高さに影響を受ける可能性を示す。たとえばハナバチが地上1 mほどの高さを飛ぶ場合、背丈が低い花ほど上を、背が高い花ほど下を向いていた方が発見～接近が容易かもしれない。

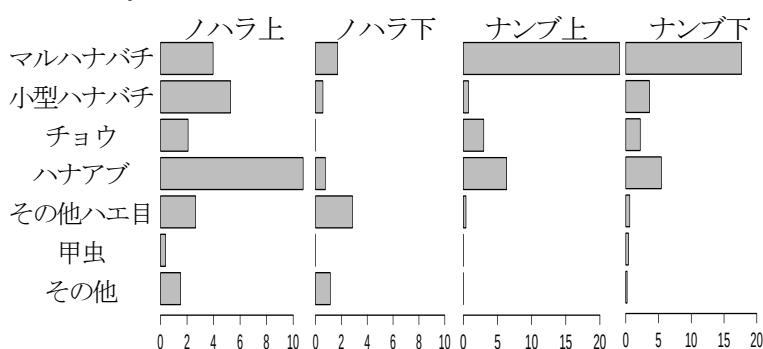


図 アザミ属2種における各昆虫群の訪問頻度（4時間⁻¹・花⁻¹）

結論

本研究では、花に人為操作を加え訪花者の行動を比べることで、花の向きに関する従来の説を支持する有力な証拠を得た。送粉生態学的前提として使われる「送粉シンドローム」は、実証されていない考えを多く含むとして、しばしば批判される。今回の結果は、こうした従来の概念の弱点をおぎなう重要な資料となる。

また本研究では、花のかたちや高さといった他の形質との組合せが、花の向きによる‘フィルター’効果に重要な影響をおよぼす可能性が示唆された。今後さらにこうした影響を調べることで、送粉シンドロームでは十分に説明されてこなかった形質の組合せの包括的な「意味」を明らかにしてゆく必要がある。

外来キク科植物における在来昆虫の訪花目的と送粉量

坂本 昂佑（筑波大学 生物学類） 指導教員：横井 智之（筑波大学 生命環境系）

序 論

頭花植物の多くは、花粉や花蜜などの花資源を目当てに訪花した昆虫に、花粉を付着させて送粉を行なわせている。そして、訪花昆虫はそれらの花資源を餌として得ている。この関係は在来植物と在来昆虫の間だけでなく、日本に侵入した外来植物においてもみられる。外来植物は侵入した環境で在来の訪花昆虫をリクルートすることで、在来の訪花昆虫と外来植物の間にも密接な送粉関係を築いていると考えられる。在来植物と同様に、外来植物においても送粉を行なう昆虫類としては、ハナバチ類やハナアブ類など様々な分類群が確認されている。これらの昆虫は花資源を利用するという点で共通している。一方、皿状に開いた集合花序をもつ外来植物種には、花資源を目的としない昆虫も訪花していることが観察されている。これは、外来キク科植物のハルジオンとヒメジョオンにおいても、花序上で交尾するカメムシや捕食性昆虫の飛来が確認されているため、同様と考えられる。そこで、両種は花資源を目的としない昆虫も誘引し、これらの昆虫にも花粉を付着させている可能性があると考えた。本研究では、ハルジオンとヒメジョオンに訪花する昆虫種の多様性を明らかにするとともに、種ごとの訪花個体数や送粉量から、花資源を利用しない昆虫の送粉への関与を調べた。

方 法

筑波大学構内において、ハルジオンの開花期間である4月末～5月末と、ヒメジョオンの開花期間である5月末～10月まで野外調査を行なった。

調査地に1m×1mのコドラートを設置し、毎週1回、朝9時から15時まで2時間おきに、コドラート内に訪花した昆虫を15分間捕獲した。採集した昆虫は可能な限り分類し、各昆虫の背面から見た表面積、消化管内の花粉の有無、体表付着花粉数を計測した。そこで本研究では、送粉量の指標として単位面積当たりの体表付着花粉数を用いた。さらに消化管内の花粉の有無と文献を用いて、採集した昆虫の訪花目的を、花資源目的とその他の目的（吸汁や植物体摂食）の2つに分けた。

結 果

野外調査の結果、ハルジオンには花資源目的15種、その他の目的3種がみられ、ヒメジョオンには花資源目的37種、その他の目的5種の昆虫が訪花していた。また、種別に訪花昆虫個体数を比べると、両植物種の間で違いがみられた。ハルジオンでは花資源目的のハナアブ類が最も多く、次にその他の目的のクロアシナガコガネとヒメナガカメムシが多く訪花していた（図1）。ヒメジョオンにおいては、ヒメナガカメムシが最も多く訪花し、次に花資源目的であるその他のハエ、ヒメヒラタアブ属と続いた。単位面積当たりの体表付着花粉数はどちらの植物においても、アカガネコハナバチ、ナミハナアブ族、ヒメバチで多かった。ハルジオンとヒメジョオンともに、花資源利用とその他の目的の昆虫間で、体表付着花粉数に違いはみられなかった（図2）。

考 察

ハルジオンとヒメジョオンのいずれも、訪花昆虫種数は花資源目的の昆虫が多かったが、種別の個体数では花資源を目的としない昆虫も花資源目的の昆虫と同程度、またはそれ以上の個体数が訪花していた。花資源を目的としない昆虫の体表にも1個体当たり10～1000粒の花粉が付着しており、これらの昆虫による送粉量は小さくないと考えられる。

花資源を目的としない昆虫を送粉者として利用できた理由の一つとして、交尾場所の提供があると考えられる。両種は皿型に開いた花を咲かせるため、花の上は飛んでいる配偶者に目立つ場所となっている。カメムシ類やコガネムシ類など花資源を目的としない昆虫の多くは、採餌とともに配偶者や交尾場所を求めて両種の花を訪れ、結果的に送粉に貢献していたと考えられる。

日本におけるハルジオンとヒメジョオンの送粉成功は、花資源を利用しない昆虫を送粉者として利用することでもたらされたのかもしれない。

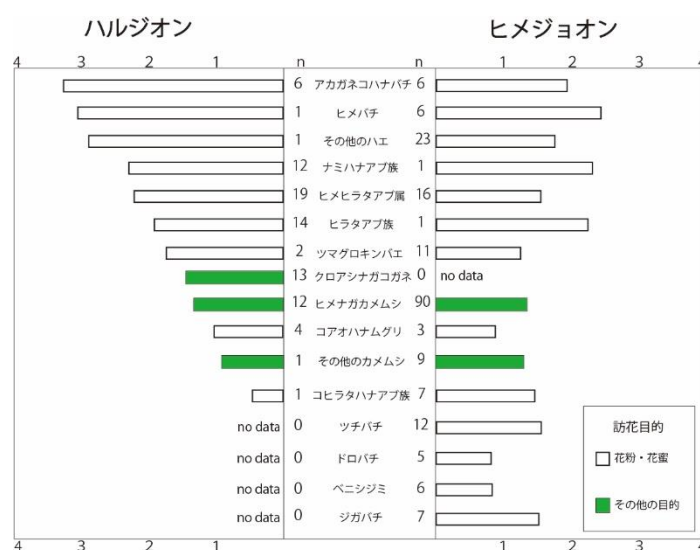


図1:訪花昆虫と単位面積当たりの平均体表付着花粉数 (log10 花粉数/mm²)、nは飛来個体数を示す。

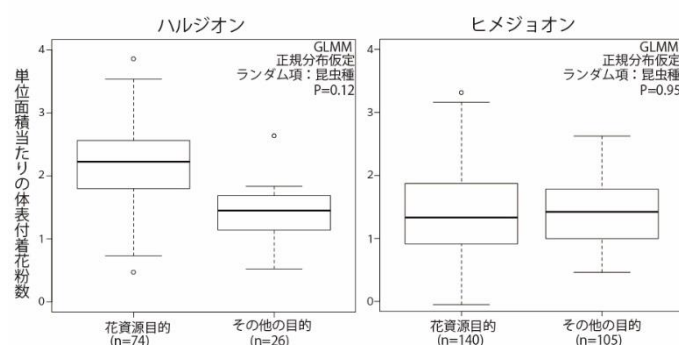


図2:飛来した昆虫における訪花目的別の体表付着花粉数(log10)

ムラサキツメクサ群落におけるヒゲナガハナバチ類の訪花行動

我孫子 尚斗（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）

背景

ハナバチ類は花資源の利用において高度に適応した分類群であり、重要な送粉者の1つである。その中でも、ミツバチやマルハナバチなどの社会性ハナバチの訪花行動については多くの研究がなされてきた。一方で、社会性をもたない単独性ハナバチは送粉への寄与が示唆されているが、訪花行動についての知見があるのは僅かな種のみである。一般に、多くのハナバチ類の雄は羽化時から常に交尾相手の探索を行ない、雌は卵巣を発達させながら、営巣や採餌、産卵を行なうことが知られている。そのため、雄は生涯を通じて、活動のエネルギー源となる蜜を必要な時だけ利用するが、雌はエイジ（齢）の進行に伴い、卵巣の発達度や採餌行動に変化がみられると考えられる。本研究では単独性であるシロスジヒゲナガハナバチとニッポンヒゲナガハナバチの2種のムラサキツメクサへの訪花行動に着目し、性別やエイジによって違いがみられるかを調べた。

方法

本研究では、訪花行動として1花序あたりの滞在時間と訪花花序数、体表付着花粉数、花粉採餌の有無を調査した。筑波大学構内のムラサキツメクサ群落において、4月後半から5月後半まで数日おきに晴れた日を選び、9時から9時半まで訪花した個体を撮影した。撮影データをもとに1花序あたりの滞在時間を算出した。また、2×2mの区画を設置し、調査期間中に11時と13時にそれぞれ30分間観察し、飛来個体が区画に侵入してから出るまでに訪れた花序数を記録した。区画から出た個体はすぐに捕獲し、体表付着花粉数・消化管内花粉の有無・翅汚損度（エイジの指標）を記録した。雌では卵巣発達度もエイジの指標として記録した。

結果

雌雄間で1花序あたりの滞在時間に有意な差はみられなかった。雌の区画あたりの平均訪花花序数が6.8花であるのに対し、雄はほとんど訪花せずに区画を去っていた（図1）。体表付着花粉数を推定したところ、雌は平均7968個に対して、雄の平均1188個と少なかった（図2）。雌はほとんどの個体が花粉を採餌しており、雄は約6割の個体が花粉採餌を行っていた（図3）。雌において、翅汚損度や卵巣発達度による訪花花序数と体表付着花粉数の違いはみられなかった。同様に雄においても翅汚損度による訪花花序数と体表付着花粉数の違いはみられなかった。

考察

雌は雄に比べて多くの花序を訪花し、多量の花粉を体表に付着させ、ほとんどの個体が花粉を摂食していたことから、活動期間を通して卵巣発達や仔のための花粉採餌を行っていたと考えられる。

雄は訪花を行わずにムラサキツメクサ群落を通過するだけ個体が多く、さらに体表付着花粉数は少量であったことから、ほ

とんど採餌を行なっていないことが示唆された。調査中に雄が雌に掴みかかろうとする行動が観察されたことから、雄がムラサキツメクサ群落を訪れるのは交尾が目的と考えられる。しかし、従来の知見と異なり約6割の雄の消化管内から花粉が発見された。このことから、雄も花粉を餌資源として利用していることが分かった。

ヒゲナガハナバチ類の訪花行動は雌雄で異なるが、エイジによる違いはみられなかった。このことから、ヒゲナガハナバチ類の雌はムラサキツメクサ群落で出現期間を通して活発な花粉採餌を行なう一方、雄は交尾相手の探索のために群落を訪れていると考えられる。また、雄も雌と同様に花粉由来の栄養を必要としている可能性が示唆された。

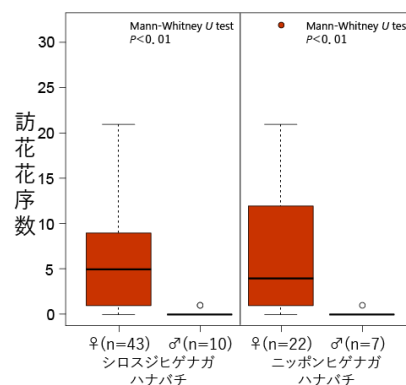


図1. 区画内における訪花花序数

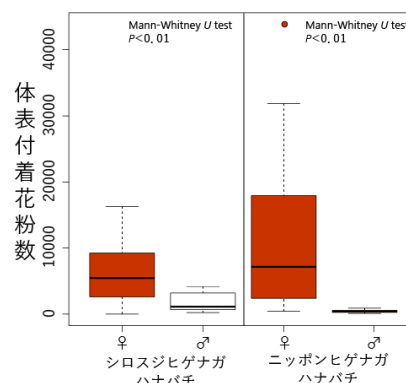


図2. 体表付着花粉数

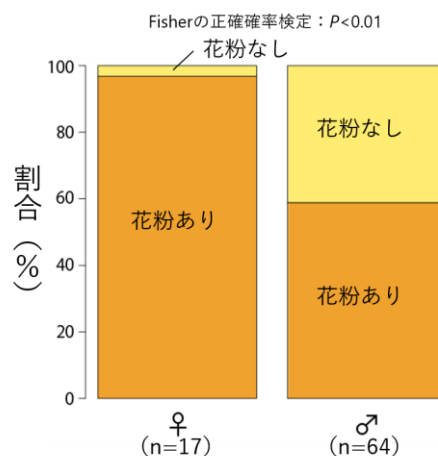


図3. 消化管内花粉の有無

蟄居型コロニー創設を行なう女王アリの資源配分

井戸川 直人（筑波大学 生物学類）

指導教員：横井 智之（筑波大学 生命環境系）

【序 論】

蟄居型コロニー創設とは、交尾を終えた新女王が単独で営巣し、巣室にこもって最初の仔を育てるという、アリ類において最も優占的なコロニー創設の様式である。このような創設様式を採用する種の女王は、巣外で採餌せず、体内に蓄えた栄養しか利用しないため、創設開始までに多量のタンパク質と脂質を貯蔵することが知られてきた。しかし、これらの資源が女王自身の生存と仔の生産にどのように配分されるのかという知見は乏しい。蟄居型コロニー創設を採用するクロオオアリ, *Camponotus japonicus*, を用いて、育仔の経過に伴う女王体内の貯蔵栄養量の減衰過程を調べ、女王による資源の配分戦略を考察した。

【方 法】

筑波大学構内において、交尾を終えたばかりの女王を採集した。これらを1頭ずつスチロールケースに入れ、25℃・全暗の恒温室にて飼育し、水のみを与えてコロニー創設を行なわせた。

女王の育仔過程

女王が仔に給餌を行なう期間を特定するため、23頭の女王を飼育し、創設開始から60日間、ケース内の仔（卵と幼虫、繭、ワーカー）の個体数を記録した。

女王の貯蔵栄養量の経時的変化

創設開始から0, 10, 20, 30, 40, 52日後に、各10頭の女王を冷凍して殺し、80℃で24時間にわたり乾燥させたのち、乾燥重量を計測した。その後、乾燥させた女王を有機溶媒中に24時間浸漬し、脂質を抽出した。これを再び80℃で24時間乾燥させて得られた女王の除脂肪体重を、タンパク質量の指標として用いた。乾燥重量と除脂肪体重の差分を算出し、脂質量の指標とした。

【結 果】

女王の育仔過程

すべての女王が創設開始の2日後から産卵を開始していた。卵は 20.1 ± 0.2 日（平均±SE, $n=23$ ）後に孵化し、ワーカーは 48.8 ± 0.3 日後に羽化した（図1）。したがって、女王が仔に給餌を行なう期間は、創設開始からおおよそ20日後から50日後までと考えられた。

女王の貯蔵栄養量の経時的変化

女王の貯蔵栄養量の経時的変化を図2に示した。採集直後の個体において、タンパク質量は 46.3 ± 1.6 mg（平均±SE, $n=10$ ）、脂質量は 28.3 ± 1.4 mg であった。タンパク質量は20日後まで変化せず、30日後に有意に減少した。これに対して、脂質量は10日後から有意な減少を示していた。52日後のタンパク質量は

27.8 ± 1.0 mg、脂質量は 8.9 ± 0.7 mg であり、いずれも採集直後からおおよそ19 mg減少していた。

【考 察】

女王のタンパク質量は、産卵開始後しばらくの間一定の値を保っており、仔への給餌の開始後に減少を示した。一方で、脂質量は創設開始後まもなく低下し始めていた。したがって、創設女王はタンパク質を主に仔の生産に用い、脂質を女王自身の体組織の維持のために消費していると考えられた。

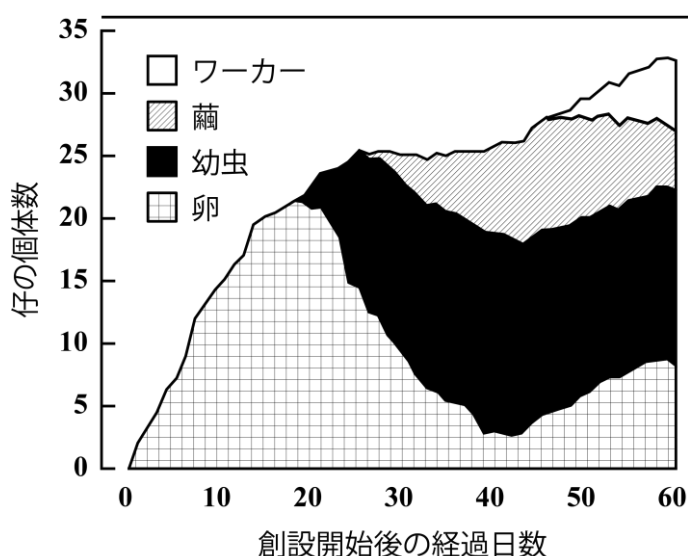


図1. 仔の個体数の経時的変化

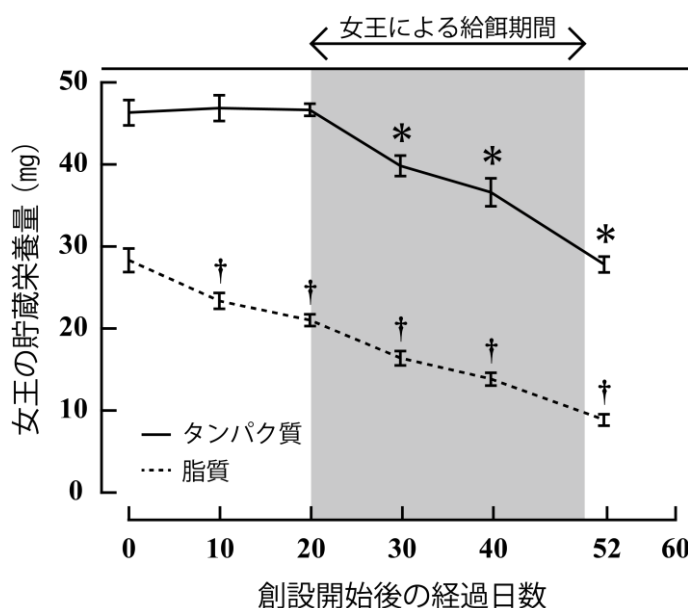


図2. 女王の貯蔵栄養量の経時的変化

*はタンパク質量, †は脂質量が創設開始後0日と有意に異なっていたことを示す (Dunnett test; $p<0.01$)

Phenotypic Evaluation of Strawberry (*Fragaria ananassa*) under Auxins and Cytokinins *in vitro* Culture

Andrew Masami Soewandi (筑波大学 生物学類)

指導教員：渡邊和男 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Strawberries are vegetatively propagated and cash - making crops in many countries. Thus, germplasm conservation is important to support the industry. However, there are weak scientific backgrounds of seedling production efficiency due to genotype specificity which could be elaborated for conservation and production. This experiments could contribute in the benefits for the plant conservation and production in the industry. The objective of this experiment is to successfully obtain the high quality seedlings of *Fragaria ananassa* common cultivars for 1) rapid propagation of conservation materials and 2) field production with mass-scale.

Materials and Methods

In vitro micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) was examined under different concentrations of auxins and cytokinins and the combination of both with controlled environment in measuring the growth rate of shoots, roots and tips for different genotype accessions (N19, N75, N166, N182, N190, N204).

Results and Discussion

The phenotypic reactions were observed in between single source and mixed sources exposure of phytohormones in vitro media culture (MS basal media culture 2.1g/L, 25g/L sucrose, 8g/L agar and 0.3g/L CaCl) at 23°C with a regular photo - period of 18 hours of light and 6 hours of darkness. 12 clones of each accessions were used with 9 clones under treatments

and 3 controlled. Each treatment goes through 3 months time period of evaluation with one phase of exposure to the phytohormones. There were three repetitions of the experiments. Clones come from hormone free cultivation. The exposure to a specific concentration of mixed phytohormones are hypothesized to have resulted in the highest rate of growth in roots, shoots and tips resulting in high quality explants. However, a custom-made genotype specificity was observed for better growth, and it is recommended to make genotype-dependent approaches at present to support mass-propagation. Genomic study of phytohormone reaction shall be engaged in the future to identify specific causes of the genotype specificity.

Acknowledgements

I would like to thank all of faculty members and administrative staffs for patiently supporting me during my study. I would also like to thank personally, Professor Kazuo N. Watanabe for all the guidance and advices as my advisor, and Dr. Takao Niino and Ms. Miriam Valle Arizaga for their technical and scientific support.

イネの発達過程におけるペクチン制御機構の機能解析

鈴木 靖章 (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】

高等植物に特徴的な構造である細胞壁は細胞形態のみならず発生や器官形成にも大きく関わることが知られている。細胞壁を構成する主成分のうち、ペクチンはその性質や存在量が制御されることで細胞接着性を高めるなどの細胞壁の特性を変化させる機構に関わることが報告されている。まずペクチンはゴルジ体においてペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) により高度にメチル化された流動性の高い状態で合成される。やがて細胞壁へ小胞輸送されたメチル化ペクチンは、ペクチンメチルエステラーゼ(PME)によって脱メチル化され、カルシウム架橋を形成、ゲル化することによる質の変化が起き、細胞接着性を高めるなどの細胞壁の特性を変化させる機構に関わることが報告されている。シロイヌナズナのような双子葉植物ではペクチンが全細胞壁中の約 35%と多く存在するものの、その機能欠損変異体は致死となり、ペクチン制御の植物発達への機能を解析しにくい。一方で単子葉植物のイネは、全細胞壁中のペクチンは約 5%と非常に少ないものの、分裂組織や生殖組織といった発達に重要な組織に局所的に多量のペクチンを含んでいることが報告されている。

OsPMT10, *OsPMT16* 変異体を用いた解析から、花粉管のメカニカルガイダンスと生殖組織の形態形成に、ペクチンのメチル化度調節が必須であることが示されている。しかし分裂組織における詳細なペクチンの分布・機能は単子葉植物・双子葉植物を問わず未だに解明されていない点が多い。そこでPME阻害作用を持つことが近年報告された茶カテキンの主成分であるEGCG(没食酸エピガロカテキン)を用いた投与実験を行うことで、イネの発達過程においてペクチンのメチル化調節がどのような機能を有するかについて考察する。本研究では分化の開始点である分裂組織においてペクチンが適切なメチル化度を維持することが重要であるという仮説に基づき、栄養生長期におけるメチル化度調節の機能の一端を明らかにすることを目的としている。

【材料】

実験には全ゲノム配列が解読されているイネ(*Oryza sativa* 品種: Nipponbare)を採用した。解析には、変異によって発現・器官形成などへの影響がこれまでに確認されている欠損変異体の *pmt10*, *pmt16*、過剰発現変異体の *PME3-FOX*, *PG-FOX* (*PG*: ペクチン分解酵素)、*PMT16::GUS*を使用した。

【方法】

1. EGCG 投与と表現型の観察

異なる濃度の EGCG ((-)-Epigallocatechin gallate)を含む KIMURA B 培地を用いて水耕栽培(インキュベーター内)し、1週間の伸長量、ペクチン制御に関わるいくつかの遺伝子由来の酵素活性や発現量の変化を WT と変異体とで比較した。

2. ペクチン局在・蓄積調査

植物体(根)をルテニウムレッド染色し、実体顕微鏡で観察した他、カルバジール硫酸法を用いた糖定量を行うことでペクチンを

可視化・数値化した。

3. EGCG の及ぼす PMT 発現への影響

EGCG を投与・生育させた *OsPMT16::GUS* に対して GUS 染色法を行い、メチル化の阻害がペクチンの制御機構へ与える影響について調査した。

【結果】

1. EGCG 投与と表現型の観察

WT ではシュートでは伸長が抑制されるのに対して、根では伸長が促進された。また *PME3-FOX*を使用した場合は、WT の無処理と EGCG 処理 (50 μ M)でほぼ同様な表現型を示したほか、無処理では WT に比べてさらに根での伸長が抑制されていた。

2. ペクチン局在・蓄積の比較

ペクチンの局在は変化しないものの、PME 阻害を行うとより顕著な蓄積が観られた。この蓄積は糖定量でも傾向が観られた。

3. EGCG の及ぼす PMT 発現への影響

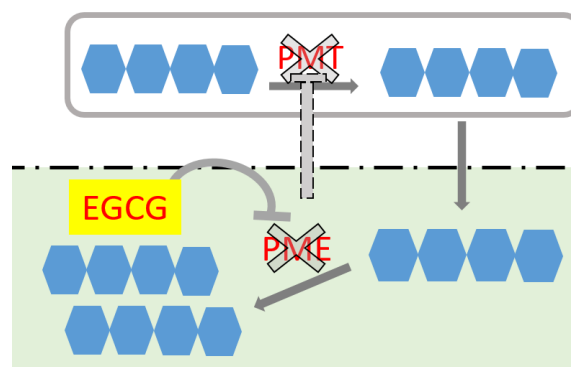
GUS 染色の結果、根端分裂組織では PME の阻害によって PMT の発現が抑制されていた。一方で茎頂分裂組織では PME 阻害の有無に関わらず PMT の発現が検出できなかった。

【考察と今後の展望】

PME3-FOX, WT(-EGCG, +EGCG)の水耕培養結果から、脱メチル化活性が下がるほど、根の伸長が促進されることが考えられる。しかし、*OsPMT16::GUS* の発現解析にて、PME 阻害により発現が抑制されていたことから、細胞壁で作用しているペクチンの酵素を阻害することによってゴルジ体内でペクチンをメチル化する機構が何らかの負の制御を受けることがわかる。従って、現在私はメチル化をそもそも受けていないペクチンが蓄積することで根の伸長促進を行うのではないかと考えている。今後は根における免疫抗体染色によるペクチンの種類の特定や茎頂分裂組織での解析、また PME Inhibitor 発現イネを使った調査や光条件の検討を行いたい。

本研究室で蓄積された PME と PMT の遺伝子調節イネの研究とあわせて、これらの課題を調査することで、様々な発達過程におけるペクチンのメチル化調節がどのような機能を有するかについて考察できると考えている。

【仮説】



環境ストレス条件下における早期トマト果実の形態と細胞壁構造の変化

宮越 茜里 (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】

トマトを代表とする被子植物の果実の発達は、受粉をきっかけに果実形成が開始し、その後果実成熟が起こる。受粉を介した着果から Mature Green ステージまでを果実形成過程、Mature Green 以降を果実成熟過程と呼ぶ。トマト果実は果実成熟過程に入ると成長が止まり、サイズが変化しないことが知られている。すなわち、果実の大きさと形態は Mature Green までに決定し、この間に細胞増殖や急激な細胞肥大の変化が起こっていると予測される。この果実発達過程に伴う急激な変化には、細胞壁の合成や分解が大きく関わっている。また果実は、塩ストレスや Ca 欠乏条件などの環境ストレス条件において、果実のサイズ減少や栄養障害である尻ぐされとなることが知られている。本発表会では、特に Ca 欠乏に着目して報告する。

Ca は脱メチル化したペクチンに結合して架橋を形成し、細胞壁構造の保持に働く。これらのことから、Ca は果実形態や細胞壁構造に大きく関与していると考えられる。しかし、受粉後 5 日間で果実は急激に肥大成長し、それに伴い果皮で、Ca が直接結合するペクチンのみならず、ヘミセルロースであるキシログルカンも増加することがわかっている (Terao *et al.* J Plant Res 2013)。

そこで本研究では、果皮・胚珠・胎座に着目し、組織染色・免疫組織化学染色によって各因子の局在性を調査し、Ca 欠乏条件下における果実形態・細胞壁多糖類およびキシログルカン修飾関連酵素の動態を調査した。これにより、Ca 欠乏条件下での果実形態の変化における細胞壁制御の機構を明らかにすることを目的としている。本研究により尻ぐされ果実発生の原因の一端が解明されることも期待している。

【材料および方法】

1. トマトの水耕栽培および Ca 欠乏処理

試料: トマト(品種: Micro Tom)を 24°C のインキュベーター内で水耕栽培を行った(Yin *et al.* Plant Cell Physiol. 2010)。水に濡らしたろ紙にトマト種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えを行った。Ca 欠乏処理はつぼみが揃った後行った。

2. 実体顕微鏡による形態観察

1 によって育てた Mature Green 果実、人工授粉を行った 3, 5 DPA(Days post anthesis: 開葯後日数)果実を用いて、実体顕微鏡による形態観察を行った。

3. 果実真円度の測定

2 で観察した果実に関して、数値で果実形態の複雑さを示す果実真円度を測定した。果実の形態を手動で縁取り、真円度 = $4\pi \times \text{面積} \div (\text{周囲の長さ})^2$ の式を用い、Image J によって計測した。なお、測定方法は東京大学の桧垣先生に提供していただいた。

4. テクノビット切片の作成

1 によって育てた 1, 3, 5 DPA 果実を固定(4%パラホルムアルデヒド + Tween20 in 50 mM リン酸バッファー)し、テクノビット樹脂に包埋し、切片を作成した。

5. 組織染色・免疫組織化学染色

組織染色としてはルテニウムレッドによるペクチン染色、カルコフロールホワイトによるセルロース染色を行った。免疫組織化学染色としてはキシログルカンを標識する LM15、キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)を標識する XET5、エクспанシンを標識する EXPB2 を用いた。

【結果】

●形態観察および果実真円度の測定

Ca 欠乏果実では、3 DPA 果実では円形の形態が観察されたが、5 DPA 果実では凸凹で先端部がくっつきにくい様子が観察された。しかし、その後発達が進んだ Mature Green 段階では再び果実形態は円形となった。また、果実の急激な肥大は 3 から 5 DPA にかけて起こっていた。果実真円度に関しても、5 DPA 果実のみでコントロール果実と比べ有意に低い値が計測され、5 DPA の Ca 欠乏果実で複雑な形態を示していたと言える。

●組織染色・免疫組織化学染色

ペクチンに関しては、Ca 欠乏で量が少なかった。セルロースに関しては、コントロールでは 3 DPA でピークを迎えたが、Ca 欠乏では 1 DPA でピークを迎えた。キシログルカンに関しては、コントロールでは徐々に量が増えていたが、Ca 欠乏では増加と減少を繰り返しており、全体的な量も Ca 欠乏で少なかった。XTH に関しては、コントロールでは 3 から 5 DPA にかけて増加したが、Ca 欠乏ではこの期間で変化はなく量も少なかった。エクспанシンに関しては、コントロール・Ca 欠乏果実ともに 3 から 5 DPA にかけての増加が観察された。

【考察】

Ca 欠乏果実では、ペクチンが少ないため粘性が低下する・骨格成分であるセルロースが早めにたまるため早めに硬くなる・キシログルカンと XTH が少ないため、細胞壁をつなぎかえるための成分と酵素が少ない、というような理由から 5 DPA の Ca 欠乏果実では膨らみにくくなっていると考えられる。しかし、細胞壁を緩め、細胞を伸長させる役割をもつ酵素であるエクспанシンは存在している。これらのことから、Ca 欠乏でも 3 から 5 DPA にかけて果実は膨らもうとしているにも関わらず、その際に適切な細胞壁蓄積と修飾が行われていないために膨らみきれず、凸凹の果実が生じていると考えられる。また、Ca 欠乏条件では、5 DPA で凸凹に膨らみ、先端が癒合しにくい果実が生じていた。こういった初期果実サイズ決定時における凸凹の形成が、尻ぐされ果の発生に寄与している可能性があると考えられる。

また、Ca 欠乏果実ではペクチンのみならず、セルロースやヘミセルロースの動態にも影響が生じていた。Ca 欠乏による初期果実サイズ決定時における、果実形態のいびつな成長は、Ca が直接結合するペクチンのみならず、細胞壁ネットワーク全体が変化することによって生じていると考えられる。

環境ストレス条件下のトマト果実発達過程における種子とローキュラーの変化

山田 佳央理 (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・目的】

陸上植物の多くは散布体として種子を形成する種子植物であり、種子植物はさらに被子植物と裸子植物に分類される。被子植物は重複受粉による種子形成と同時に種子を覆う子房を発達させる特徴をもつ。発達した子房は果実として、種子の保護および散布の役割を果たす植物にとって重要な生殖器官である。

多くの植物の種子と果実は成熟とともに乾燥することが多い。しかしトマト果実では、種子はローキュラー組織と呼ばれるゼリー状の組織に包まれて発達し、種子の水分含量は約40%程度と高いものとなっている。ローキュラーは種子の物理的保護の他に発芽抑制効果も報告があり、種子形成や発芽と密接な関係があると考えられるが、ほとんど機能についての報告がないのが現状である。

ローキュラーは果実および種子成熟過程において液化することが知られている。このローキュラーの液化現象は、細胞壁中のアスコルビン酸 (AsA) が関わっていることが本研究の和田らによって示されている。AsA の植物体内における含量は様々な環境条件の影響を受けることが知られており、トマト果実においては塩ストレス下で栽培した場合、AsA 含量の増加が見られる (Petersen et al., 1998)。また AsA が関わりとされる液化レベルも塩ストレス条件では AsA 量の増加と相関して上昇していた (柳, 2016)。しかし、環境ストレスによる AsA 含量および液化レベルの変化はどのようなメカニズムで引き起こされるのかは明らかになっていない。また、AsA は、植物において主にマンナンの生合成と共通部分をもった経路によって合成される。マンナンは種子における貯蔵物質であるため、環境ストレスが AsA 量同様にマンナン合成さらには種子形成にも影響を与えることが考えられる。

本研究では、種子発達過程、ローキュラーの液化、AsA の合成、マンナン合成が、有機的に連携を取っていると仮説を立て、それらの関係性について考察することを目的とした。

【材料・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ォ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った後、塩ストレス処理は花が咲き始めた時点で行った。
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 4 ステージ (Mature Green (M), Breaker (B), Turning (T), Red Ripe (R))、果実の組織を 4 組織 (外果皮、中内果皮、ローキュラー、種子) 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。

4. ローキュラーの液化レベルの測定

先を切ったフィルター付きのチップにサンプリングしたローキュラーをのせ、1,500 rpm, 23°C で 5 分間遠心ろ過を行い、ろ過された液体量の元のサンプル量に対する割合を液化レベルとした。

5. 種子の大きさ・重さ・発芽率の測定

各条件の R の果実から種子をサンプリングし、重さを測って正重量とした。2 日間乾燥させて測った重さを乾燥重量とした。乾燥後の種子の大きさを測定した後、水に濡らしたろ紙に播種して 1 週間経過するまでの発芽率を調査した。

【結果・考察】

AsA 量および液化レベルはカルシウム欠乏条件においてはコントロール条件と差が見られなかったものの、塩ストレス条件下ではどちらも上昇していた。そのため、環境ストレス下ではローキュラーにおける AsA 量の変化が液化レベル変化に関与していることが示唆された。

種子の大きさは、塩ストレス条件では、サイズが約 15% 小さい種子の割合が、10% 程度増加した。一方、カルシウム欠乏条件では、逆に約 16% 大きい種子の割合が 12% 程度増加した。生重量に関してはコントロール > カルシウム欠乏 > 塩ストレスの順に値が大きかったが、乾燥重量は各条件に変化はなかった。発芽率はコントロールとカルシウム欠乏条件では同程度で、塩ストレス条件では他と比べて発芽までにより多くの日数を要し、1 週間経過後の発芽率も半分程度に抑えられていた。

以上のことから、トマト果実のローキュラーにおいては特に塩ストレスの影響を受けて、抗酸化物質であるアスコルビン酸を蓄積させ、その結果液化を加速させるように働くことが分かった。また、塩ストレス下では果皮が赤く成熟しているのにも関わらず、果実内部では黄緑がかった色の状態のものいくつか見られた。このことと種子に関する調査で得られた結果を合わせて考えると、塩ストレスは種子やローキュラーといった果実内部の成熟に対して何らかの効果をもたらすと考えられる。

【今後の展望】

現在、成熟や環境ストレスに伴うローキュラーや種子の発達過程の形態的特徴を顕微鏡による観察を行っている途中である。

環境ストレスと果実における AsA 量の関係について、AsA 生合成経路に関わる遺伝子やマンナンの合成酵素遺伝子の発現レベルがどのようにストレス下で変化しているか解析を行う予定である。

トマト果実成熟過程におけるペクチン制御機構に対する塩ストレスの影響

細川 花栄（筑波大学 生物学類）

指導教員：岩井 宏暁（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

植物はさまざまな環境ストレスにさらされているが、中でも塩ストレスは浸透圧ストレスやイオン毒性を引き起こし、植物の生育に支障をきたす。しかし塩ストレス条件下のトマトでは、グルコースやフルクトース等の糖類、プロリンやγアミノ酪酸等のアミノ酸の蓄積により、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、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、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、それぞれ異なる性質の細胞壁を再構成していることを明らかにした (Takizawa A et al. 2014)。さらに塩ストレスの影響を組織ごとに調査したところ、塩ストレス条件下のトマトでは、クチクラ層が厚くなることで外部である皮の硬度が上昇する一方で、内部では軟化が促進されており、組織ごとに軟化の程度が異なっていることがわかった。しかし果実に硬度を寄与する存在である細胞壁の量が増加したにも関わらず果実内部は軟化しており、その理由は明らかになっていない。

そこで本研究では塩ストレス条件下のトマト果実内部の細胞壁はペクチン含量が増加しているという作業仮説のもと、成熟過程におけるトマト果実のサイズと硬度の変化において、ペクチン制御が塩ストレスの影響を受けてどのように変化しているかについて明らかにすることを目的とした。このことを通して、塩ストレスによってトマト果実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】

トマト果実（品種：Micro Tom）を成熟ステージで Immature green, Mature green, Breaker, Turning, Red ripe, Over ripe の 6 つに、果実の組織を外果皮、中内果皮の 2 組織に分けてサンプリングおよび実験を行った。

【方法】

➤ トマトの水耕栽培 / 塩ストレス処理

水耕栽培は Yin et al. 2010, JXB の方法を用いて、24℃のインキュベーター内で行った。水に濡らしたろ紙に滅菌した種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えた。塩ストレス処理は花が咲き始めた時点で、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 になるよう水耕液に NaCl を溶かして行った。

➤ 細胞壁糖定量

コントロール、塩ストレス条件のそれぞれのトマトサンプルから細胞壁を抽出し、得られた細胞壁から 50 mM Na₂CO₃ 処理によって細胞壁との結合性の弱いペクチンを抽出し、さらにその後 4M KOH 処理によって細胞壁との結合性の強いペ

クチンを抽出した。これらペクチンのウロン酸量と中性糖量をそれぞれカルバゾール硫酸法とアンスロン硫酸法を用いて測定した。

➤ 果皮のペクチン染色

コントロール、塩ストレス条件のそれぞれのトマト果実の Mature green, Breaker, Turning, Red ripe の 4 ステージでの果皮のテクノビット切片を作製し、ルテニウムレッドを用いて染色し、生物顕微鏡で形態の観察を行った。

【結果・考察】

◆ 細胞壁糖定量

中性糖量は塩ストレス条件では初期ステージで増加していた。ペクチン量は外果皮では変化がみられなかったが、中内果皮では、塩ストレス条件で Mature Green におけるペクチン量が多かった。また、ステージを経るごとに減少していた。塩ストレス条件のトマト果実の中内果皮は、このペクチン量の大きな変化が原因で、力学的に柔らかな性質を持つに至った可能性が考えられた。

◆ 果皮のペクチン染色

ルテニウムレッド染色によってそれぞれの条件の果皮におけるペクチン量および細胞の形態を観察したところ、Red ripe ステージではコントロール、塩ストレス条件で同程度の染色レベルが観察され、細胞形態も違いがみられなかった。一方で、Mature green や Breaker のような初期ステージでは、塩ストレス条件のトマト果皮で強い染色レベルと細胞間隙の増加や細胞の肥大化が観察された。このことから塩ストレス条件下ではコントロールよりも、初期ステージにおけるペクチン量が多くなっていることや細胞形態が変化していることが示唆された。

本研究室の先行研究と今回の結果から、塩ストレス条件下の果実は、果実全体で見ると硬度は上昇しているが、組織ごとに軟化の程度は異なっていた。外果皮ではクチクラ層が厚くなることによって硬度上昇が起こり、逆に果実内部の中・内果皮では軟らかな肉質へ変わることで軟化が促進されていることが示された。軟化の促進が観察された果実の中・内果皮では、細胞壁のペクチン（ホモガラクトuronan）量が増加するとともに、ペクチン分解酵素活性が上昇する傾向が確認された。塩ストレス条件下では、特に果実軟化が本来進行しない初期ステージにおいてペクチン動態に変化が生じており、これらのペクチンの変化が塩ストレス条件下における果実内部の軟化に寄与していることが示唆された。今後はこの結果をさらに発展させていくために、ペクチン合成関連遺伝子の発現解析を行う予定である。

シロイヌナズナ切断花茎の組織癒合における原形質連絡カロース結合タンパク質の関わり

大場裕介（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】

植物は自然界において風や害虫による被害の影響で茎組織が傷害を受けることがあり、この傷を修復するメカニズムが存在する。このメカニズムのことを組織癒合と呼んでいる。組織癒合に関する研究がシロイヌナズナを用いて行われており、シロイヌナズナの茎では傷害を受けて3日後から髄細胞の細胞分裂が開始し、7日後に傷口がふさがり組織癒合が完了する(Asahina *et al.*, 2011)。

これまでの研究により組織癒合時に傷の上側ではオーキシンの蓄積、エチレンにより転写因子であるANAC071が誘導され、傷の下側ではオーキシンの枯渇、ジャスモン酸により転写因子であるRAP2.6Lが誘導されることが知られている(Asahina *et al.*, 2011)。ANAC071の下流遺伝子は調べられていたが、RAP2.6Lの下流遺伝子は調べられてこなかった。そのためRAP2.6Lの下流遺伝子の候補の一つとしてPlasmodesmata callose binding protein (PDCB)がピックアップされた。

PDCBは原形質連絡の頸部領域においてカロースと結合し原形質連絡の輸送を抑制する働きをもつとされているPDCBファミリーの一種のタンパク質である(Simpson *et al.*, 2009)。このPDCBは生理学的に不明な点が多いタンパク質であるが組織癒合において重要な働きがあるのではないかと考えた。

そこで本研究ではこのPDCBが組織癒合において、どのような制御を受けているのか、またどのような機能があるのかを明らかにすることを目的とした。

【材料】

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた。

Wild type (WT)、*pdc*b mutant、

proPDCB::sp:EYFP::PDCB 形質転換体、ジャスモン酸情報伝達関連遺伝子欠損変異体 (*jar1*、*fin219*、*coi1*)、*RAP2.6L*-SRDX 形質転換体をMS培地に播種してから人工土に植え替え、あるいは直接人工土に播種し生育させた。

【方法】

① *jar1*、*fin219*、*coi1*、*RAP2.6L*-SRDX 形質転換体における *PDCB2* の発現解析

抽苔してから7～10日後に花茎の第一節間を直径の半分までマイクロサージェリーナイフを用いて切断した。切断から1日後にサンプリングを行い、qRT-PCRにより *PDCB* の発現量を解析した。

② *pdc*b mutant、*proPDCB::SP:EYFP::PDCB2* 形質転換体の表現型観察

抽苔してから7～10日後に花茎の第一節間を直径の半分までマイクロサージェリーナイフを用いて切断した。切断から7日後にサンプリングを行い、Technovit 樹脂に包埋、切片の作製を行った。その切片をトルイジンブルーにより染色し、形態学的観察を行った。

【結果・考察】

① *jar1*、*fin219*、*coi1*、*RAP2.6L*-SRDX 形質転換体における *PDCB* の発現解析

どの変異体、形質転換体でも WT と同様に切断処理により *PDCB* の発現が上昇した。この結果から *PDCB* はジャスモン酸や *RAP2.6L* の制御下にはないと考えられる。

② *pdc*b mutant、*proPDCB::SP:EYFP::PDCB* 形質転換体の表現型観察

*pdc*b mutant では、髄細胞の過剰な押し出しが起こり、傷口の上側の皮層の厚みが増すといった表現型が観察された。また、相補実験を兼ねて作成した *proPDCB::SP:EYFP::PDCB* 形質転換体ではこのような表現型が解消された。この結果から *PDCB* は組織癒合における髄、皮層の細胞分裂を制御しているのではないかと考えられる。

【今後の展望】

今後の展望としては、図1で表されるような仮説を立証していきたいと考えている。

PDCB の誘導機構の面ではジャスモン酸による制御下にあることが示されたので傷害時に上昇することが知られている ROS とエチレンによる制御の可能性が浮上した。このため、*PDCB* と ROS やエチレンの関係性について今後調べていく。

作用の面では *proPDCB::SP:EYFP::PDCB* 形質転換体を用いての YFP 蛍光観察によるタンパク質の局在調査、*PDCB* はカロースと結合することが知られているため、*pdc*b mutant におけるカロース局在の調査、*PDCB* は原形質連絡による輸送を抑制すると考えられているため、癒合部における原形質連絡を介した物質輸送の調査を考えている。

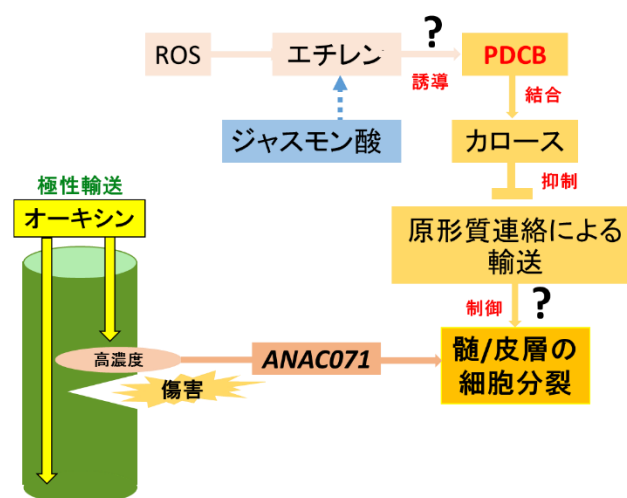


図1. *PDCB* の組織癒合における誘導機構と作用の仮説

細胞壁改変イネを用いた Al 耐性に関与する細胞壁成分の探索

長山 照樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：古川 純 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

アルミニウム (Al) は地殻に最も多く含まれる金属元素だが、土壌の pH がおよそ 5 を下回ると溶出し植物に吸収されてその成長を阻害する。Al による植物の成長阻害は世界の作物収量低下の、乾燥に次ぐ大きな要因とされる。

植物に吸収された Al の多くは細胞壁領域に存在し、細胞壁を構成する多糖の一つであるペクチンと主に結合していると考えられている。ペクチンの構成物質の一つであるガラクトuron酸が負の電荷を帯びており、正の電荷を帯びる金属イオンと結合しやすいためである。通常細胞壁のペクチンはカルシウム (Ca) を介して所々でつながり、柔軟なゲルになっている。しかし Al が Ca と入れ替わるとゲルはより硬くなり、これによって細胞伸長が阻害されることが考えられている。

また Al がリン脂質と結合することで細胞膜の特性が変化し、機能が阻害されることによっても成長量が低下すると考えられている。

一方植物の中には Al ストレスに抵抗性を示す、あるいはこれを排除する機構を持つものもいる。代表的な方法としては根から有機酸を分泌し、土壌中の Al イオンが有機酸とキレート化合物を形成することで根に吸収されにくくなるという機構が知られている。しかしイネは Al ストレスに応答した有機酸の分泌増加が極めて少ないにもかかわらず、高い Al 耐性を持っている。

本研究ではイネの Al 耐性には細胞壁が寄与しているのではないかという仮説のもと、細胞壁改変イネにおける Al 耐性を調査した。

【材料と方法】

供試植物

細胞壁改変イネ：PG2FOX, WT：日本晴

ポリガラクトナーゼ (PG) はペクチン主鎖を分解する酵素であり、これを過剰発現させた PG2FOX では細胞壁のペクチン含有量が低下していることが示されている。

実験方法

Al ストレスによる早期の成長阻害は植物の根に表れる。この実験では、異なる濃度の Al 溶液に 24 時間曝して根の伸長量を比較した。

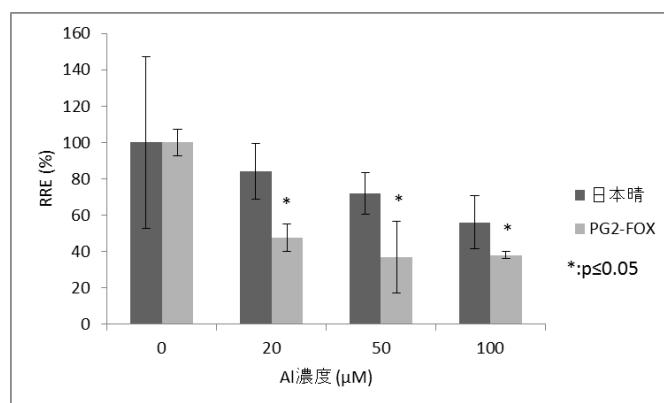
イネの種子を次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 15 分殺菌してから 1 日吸水させ、0.5 mM CaCl₂ 水溶液 (pH4.5) で 3 日間育てた後、0 / 20 / 50 / 100 μM AlCl₃ を含んだ 0.5 mM CaCl₂ 水溶液 (pH4.5) で 1 日処理した。Al 処理の前後で定規を用いて根長を計測し、処理中の伸長量を算出した。

Al を加えずに生育させた場合であっても、細胞壁改変イネと WT における根の伸長量には差が生じる場合があるので、Al の影響だけを評価するためその系統で 0 μM AlCl₃ にて処理された個体群における伸長量を 100% とし、他の Al 濃度にて処理され

た個体群における相対伸長量 Relative Root Elongation : RRE (%) を評価した。

【結果と考察】

WT と比較して PG2FOX では 20 / 50 / 100 μM AlCl₃ 処理条件下において伸長量の低下がより強く表れることが示された。



この実験結果から

1. Al が結合することにより伸長阻害を発生させる起点となっている場所はペクチン以外にも存在する (ペクチンがその一つであるかは不明)
2. ペクチンが細胞壁中に少ないとき、ペクチン以外の細胞壁成分に Al が結合することで、より大きな伸長阻害が生じる

以上のことを考察した。

考察 1 は Al がリン脂質と結合すると示した先行研究とも矛盾しない。

またペクチンが Al と結合することで細胞壁が柔軟性を失い、それによって細胞伸長が阻害されるというモデルでは、PG2FOX において Al の影響がより強く観察された今回の実験結果を説明することが難しいと考える。

【今後の展望】

イネにおいてペクチン以外の細胞壁成分が Al 耐性に寄与しているかを調べるために、他の細胞壁改変イネにおける Al 阻害強度を確認することを考えている。またどの細胞壁成分が Al と結合しているかを調べるために、各細胞壁改変イネのサンプルを 70% エタノールで保存し、それらの細胞壁における各細胞壁成分やそこに含まれる Al の定量を予定している。

細胞壁キシラン分解物によるイネいもち病感染応答機構

木村 郷子（筑波大学 生物学類）

指導教員：古川 純（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

植物は常に多くの植物病原菌にさらされている。植物病原菌と宿主植物との最初の攻防は細胞壁で行われる。植物に防御反応を誘導する物質を総称してエリシターと呼ぶが、本研究ではエリシターの中でも細胞壁分解物に注目した。

病原菌は細胞壁分解酵素を送りこみ、植物細胞壁を分解する。このとき発生する細胞壁分解物のうち、植物細胞に感知され防御反応を引き起こすものがある。

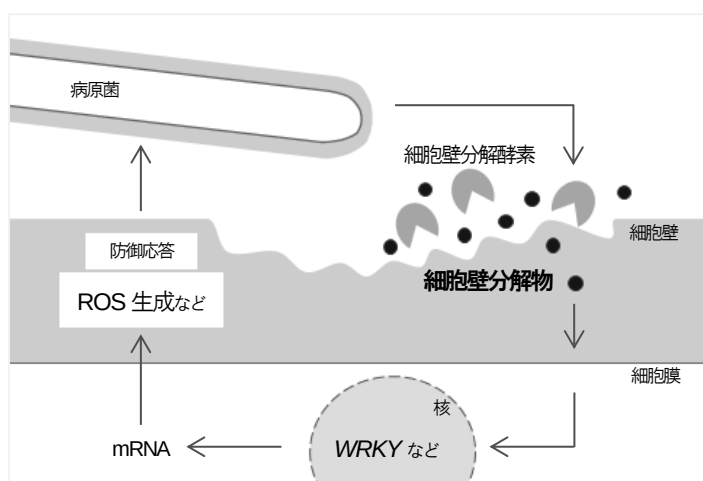


図. エリシターによる防御応答モデル図

エリシター活性を持つ細胞壁分解物が防御応答を引き起こす

現在エリシター活性を持つ細胞壁分解物として病原菌由来のキシロオリゴ糖などがよく知られている。しかし宿主植物の細胞壁分解物がエリシターとして働く例はオリゴガラクトuron酸しか報告がないのが現状である。現在までに植物の防御応答に関して様々な解析が行われてきたが、植物内でのプログラムについての研究がほとんどであり、細胞壁はあまり重視されてこなかった。そのため細胞壁空間についての植物の病害抵抗性についての知見は、ここ30年大きな進歩がなされてきていない。しかし細胞壁は植物が生育する上で様々な働きを持ち、病原菌からの影響を最初に受ける組織でもあり、病害抵抗性についても重要な働きを持っていると考えられる。

これまでの研究において、イネ由来のアラビノキシラン分解酵素であるアラビノフラノシダーゼ (*OsARAF*) をユビキチンプロモーターにより恒常的に高発現させたイネ (*OsARAF*FOX) ではいもち病抵抗性が向上していた。いもち病はイネがイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) に感染することで起こり、現在も罹病で収量が大幅に低下している。

*ARAF*FOX では細胞壁キシラン分解物であるキシロオリゴ糖が発生/増加し、病害抵抗性を付与していると予想した。新規エリシターの発見を目的とし、キシロオリゴ糖のエリシター活性を評価した。

【材料】

Yamada *et al.* (1993) の方法に従い、イネ (*Oryza sativa* 品種: Nipponbare) の培養細胞を用いた。

【方法】

植え継ぎ後、培養4、5日目のイネ培養細胞を約40 mg量り取り、培地1 mLに懸濁した。これをサーモミキサー (eppendorf) で25°C、750 rpmで30分間プレインキュベートし、その後DW、キシロオリゴ糖八量体 (終濃度0.4 mg/mL)、キシロオリゴ糖八量体 (終濃度1.6 ng/mL)、オリゴガラクトuron酸 (終濃度0.4 mg/mL) で処理を行った。処理直前および処理後、経時的に10 µLずつ96穴マイクロタイタープレートにサンプリングし、ルミノメーター (Applied Biosystems: TR717, Berthold: Centro LB 960) にて生成した活性酸素を発光量として測定した。測定プロトコルを以下に示す。

- ①1.1 mM ルミノール溶液 50 µL を添加
- ②2 秒放置
- ③14 mM フェリシアン化カリウム溶液 100 µL を添加
- ④10 秒間発光量測定

【結果】

イネ培養細胞にキシラン分解物であるキシロオリゴ糖と既知のエリシターをそれぞれ添加し、ROS生成量を経時的に測定した。キシロオリゴ糖によって誘導されたROSの生成量は処理後120分でオリゴガラクトuron酸の約2倍であった。この結果からキシロオリゴ糖にはエリシター活性があることが示唆された。さらにはキシロオリゴ糖により誘導されたROSの生成量がオリゴガラクトuron酸より多かったことから、既知のエリシターであるオリゴガラクトuron酸よりもエリシター活性が高い可能性が考えられる。

【考察と今後の展望】

双子葉植物と比較して、イネの一次細胞壁中にはペクチンが少なくキシランが多い。イネのような単子葉植物では、ペクチン分解物であるオリゴガラクトuron酸ではなく、キシラン分解物であるキシロオリゴ糖が主要なエリシターとして活用されているかもしれない。

現在までに細胞壁に注目して病害抵抗性を研究した例は少なく、今回、キシロオリゴ糖が新規エリシターである可能性を示したことは大きな一歩であると考えている。

今後はキシロオリゴ糖により *WRKY* などの抵抗性遺伝子の発現が誘導されていることを確認する。また *ARAF*FOX の細胞壁中でキシロオリゴ糖が増加しているか検証する。また、キシラン主鎖を直接分解する *Xylosidase*-FOX についても、今後、解析を進める予定である。

I have GA, I have a GPU. Uh...~R における並列計算による遺伝的アルゴリズムの高速化~

ガニエ 拓也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 徳永 幸彦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

現存する生物は、多様な生活環境に対してそれぞれ適応する形質を、進化によって獲得してきたと考えられている。進化の原動力として、自然選択・交叉・突然変異がしばしば例に挙げられる。これらの概念は、生物学の分野を超えて工学系の分野でも活用されており、遺伝的アルゴリズム(genetic algorithm, GA)がよく知られている。GA は、与えられた問題に対する妥当な解を発見的手法により求めようとする非決定性アルゴリズム(ヒューリスティクスと呼ばれる)の一つであり、ある種の集団遺伝学的モデルと捉えることができる。GA では、最初にビット列で表される遺伝情報(解に対応する)をもつ個体を複数用意し、適応度値が高い個体を優先的に選択し交配して世代を重ねることによって良い解を得ることができる。しかし、そのための計算量が多くなりがちであることが問題となっている。解決策として、100~1000 個のオーダーのコアを持つ演算装置である GPU(graphical processing unit)を利用すれば、コアと個体を一対一対応させ並列に計算することで GA を極めて高速に計算することが可能である。

昨今ほとんどの PC は何らかの GPU を搭載しているため、GPU は身近で利用しやすい。これらの GPU の多くは共通の技術的基盤である OpenCL によって制御することができるが、実際には科学技術計算には OpenCL よりも NVIDIA 社製 GPU 向けの技術である CUDA が用いられることが多い。そのため、研究のツールとして GPU に最適化された既存の GA ライブラリを利用したい場合、NVIDIA 社製以外の GPU を搭載した PC を活用することは困難である。GPU の制御に OpenCL を利用した GA ライブラリを提供すれば、GA の利用の敷居を下げることに繋がるだろう。

生物学などで一般的な科学技術計算のツールである R に注目してみると、GA を行うパッケージが既に CRAN にて複数提供されている。しかし並列計算は未だ十分にサポートされているとは言えないため、本研究では多くの研究者が自然に利用できる高速な GA ライブラリの提供を目的として、GPU の制御に OpenCL を用いた汎用的な GA の R パッケージを開発した。

研究内容

R を用いた Simple GA(SGA)の単一コアでの逐次的な計算を行うスクリプトを、オプションの指定によってマルチコア CPU/GPU、またはその両方を利用した高速化が選択出来るように改変した。特に、定型的な処理である選択・交叉・突然変異は GPU で行えるよう OpenCL で実装し直した。他方、ユーザによって定義される適応度関数はパッケージにとっては未知の処理であり、入力を受けるまで内容が分からないものである。従って、適応度関数は R または OpenCL C のソースコードを入力とし、OpenCL C が入力された場合のみ GPU で行うようにした。

選択・交叉・突然変異に利用する擬似乱数生成機(pseudo-random number generator, PRNG)にはハッシュ関数

と Xorshift と呼ばれるアルゴリズムを組み合わせたものを採用した。この PRNG および線形合同法のみを用いた PRNG の性質を確認し比較した。

さらに、このパッケージ(以下では暫定的に gpuga と呼ぶ)と、既存のパッケージ”GA”との間で、巡回セールスマン問題(travelling salesperson problem, TSP)の計算速度を測定し比較した。

結果

ハッシュ関数と Xorshift を組み合わせた PRNG は、線形合同法のみを用いた PRNG に比べ性質が良いことが視覚的に明瞭に確認された。

また、gpuga は多くの問題について”GA”パッケージより高速であることが確認された。この傾向は GA に用いる個体数が多い程・染色体が長い程強く、一例として 3500 bit の染色体を持つ個体を 512 個体用いたナップザック問題では 2 倍程度の速度で同じ適応度の解を発見できた。

考察

OpenCL を用いた処理は個体とスレッドの対応付けで行われるため、同期の必要がある選択の処理を GPU に処理が移る以前に行うことで、大きなコストなくアルゴリズムを簡潔にすることができた。

多くの研究者に手の届きやすいハードウェアを用いて更なる高速化を実現するためには、複数の GPU を備えるマシンや多数の不均質な PC で構成されたクラスタを活用する必要がある。そのような多様な構成のハードウェア環境に適用できるパッケージとするためには柔軟なアルゴリズムと表現力の高いインターフェースが求められ、今後の課題となるだろう。

鷺の巣は。

八木浩樹（筑波大学 生物学類）

指導教員：徳永幸彦（筑波大学 生命環境系/医学医療系）

背景・目的

近年、Google Map や Google Earth などの（半）無料サービスのおかげで、インターネット上で衛星画像を容易に入手できるようになった。これらの衛星画像は、ある意味無限の情報を含んでいる、ビッグデータである。特に Google Earth の場合、過去の衛星画像が用意されているため、時間を遡ったデータ探索が可能になっている。このようなビッグデータから、注目する生物種の分布を、時空間的に抽出することが、本卒業研究の目的である。

注目する生物種としては、所属研究室で30年余りの調査実績のあるサギ類を選択した。日本においてサギ類は夏に繁殖コロニーを形成する。このコロニーは、特に構成種にアオサギを含む場合、樹冠に形成される巣が直径1m余りと巨大であるため、専門家の目をもってすれば、夏場に撮影された衛星写真の中でコロニーを容易に識別することが可能である。

本卒業研究では、専門家の目に頼らず、これらコロニーを衛星画像の中から網羅的に発見するためのアルゴリズムの構築を目指す。予備的な研究から、巷で流行っている深層学習や顔認識などのアルゴリズムをそのまま応用しても、コロニーの発見には至らないことが分かった。そこで、コロニーの発見プロセスを2段階に分け、独自のコロニー発見アルゴリズムの構築を目指した。

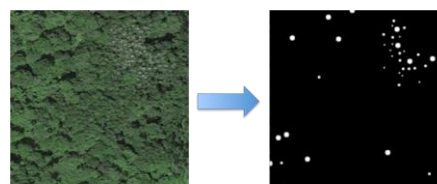
材料・方法

1. 画像収集

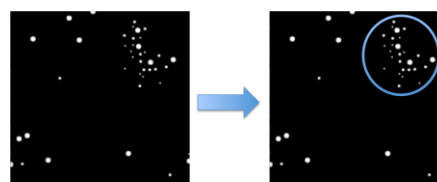
所属研究室が保有する、茨城県とその周辺県における、アオサギを含むコロニーの衛星写真、および松長克利氏が提供している、北海道のアオサギのコロニーの分布情報から、アオサギのコロニーの衛星写真を用意し、それらをアルゴリズムの教師データとして利用した。

2. コロニー抽出

コロニーの抽出を、1) アオサギの巣っぽく見えるものの抽出と、2) 抽出された巣様のものの空間分布の形状から、塊（コロニー）として認識されるものを選ぶという、2段階に設定した。1) には円形の物体の抽出によく利用される Hough 変換や、物体の塊を抽出するための blob-detection を用い、2) には、空間分布の統計手法として多用されている Ripley の K 関数法を用いた。



1) 巣っぽい点の抽出



2) 分布によるコロニー認識

結果・考察

アオサギの巣はほぼ円形であることから、第一段階の抽出では当初は Hough 変換が有効だと思われたが、2つのパラメタの調整が難しく、巣のように見えるものを有効に抽出することはできなかった。一方、blob-detection は巣のように見えるものをきちんと認識することができた。残念ながら、画像によっては blob-detection によって巣とはまったく異なる物体が抽出されてしまうことがあった。

第二段階の塊の抽出方法として採用した K 関数法では、第一段階で抽出された巣様のものの中から、的確にコロニーを抽出するには至らなかった。

結果として、2段階に分けたコロニーの抽出方法の第一段階は概ね成功したが、第二段階はまったくの失敗に終わった。これは、コロニーの形状が多様であるとともに、そもそもアオサギの巣の分布がどのようなになっているのかを、探索に使う画像そのものから求めてしまったためであると考えられる。

幸いなことに、所属研究室は2000年以降から蓄積された、ラジコンを使ったコロニーの空撮画像を保有している。これらの空撮画像を使って、アオサギの巣の分布の特徴を抽出し、その統計量を使って第二段階のアルゴリズムを構築することができると期待される。また、分布の形状を判断する手法として、K 関数法だけでなく、Mitchell and Messina (1989) の U 統計量を改善し、所属研究室で開発された Z 統計量を用いるなど、今後更なる改善を行う予定である。

Ikimon GO

三田 堂人 (筑波大学 生物学類)

指導教員：徳永 幸彦 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

GPS 対応スマートフォンの普及により、近年だれでも簡単に位置情報を得ることができるようになった。それに伴って、多くの位置情報を利用したアプリケーションが開発された。Google Maps や Pokémon GO といったアプリケーションがその最たるものである。その他に、総務省の「いきものログ」や iNaturalist.org の「iNaturalist」がある。これらは生き物の出現情報を調査するためにつくられたアプリケーションであるが、研究者や研究機関の職員のみならず、一般参加者にもデータの収集を呼びかけることができるという点で非常に画期的なものである。しかし、使用者（ユーザ）に公開される位置情報の精度が粗かったり（ポイントではなくメッシュである）ユーザがデータの公開範囲を制限できなかったりする問題がある。また、野外でのデータ閲覧に向かないなど、改善の余地が多々ある。そのため本研究では、これらの改善点を解決することを目的として、アプリケーション Ikimon GO の開発を行った。

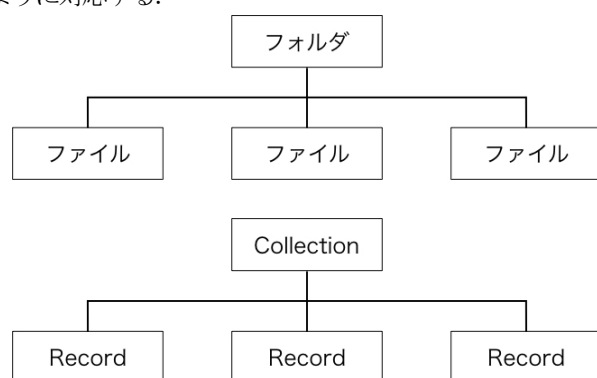
【仕様】

Ikimon GO は以下の2つより構成される。

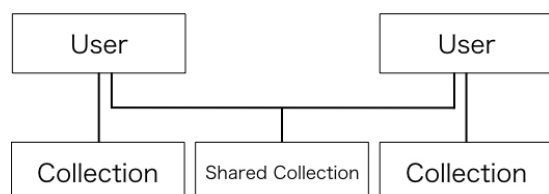
Ikimon GO App：データの登録・閲覧機能等を持つ

Ikimon GO Server：データの保存・検索の実行等を行う

アプリケーションのユーザは Ikimon GO App を通して Ikimon GO Server とやり取りし、データを登録したり、閲覧したりすることができる。ユーザは生物の位置情報や画像、音声のようなメディアを含むレコード (Record) を登録し、コレクションに (Collection) にレコードをまとめることができる。Record と Collection はフォルダとファイルのようになっていて、次図のように対応する。



ユーザは Collection を複数作成することが可能で、Collection は Record をまとめる機能を持つとともに、次図のようにユーザ間で Record を共有するために使うことも可能である。



Ikimon GO App は iOS アプリケーションとして開発したため、iPhone や iPad を持っていれば誰でもインストールして使うことができる。Ikimon GO Server は Ruby on Rails を用いて開発しており、こちらは Ikimon GO App さえあれば何か特別な準備をしなくても利用することができる。

【結果】

本研究で開発した Ikimon GO には、生物の位置情報だけでなく、名前・画像データ・出現日時・採集者などのメタデータを含めて登録する機能や、そのデータを地図上で確認する機能を持たせることができた。発表会では Ikimon GO の実演を行う予定である。

【考察】

従来のアプリケーションではユーザがデータの共有をする際に相手を限定することが不可能であった。それに対して新しく開発した Ikimon GO では、Collection を用いて特定の相手と特定のデータを共有できるようになった。研究室などの特定のグループ内でのみデータを共有することができるようになるため、Ikimon GO は非常に有用なものであると考えられる。

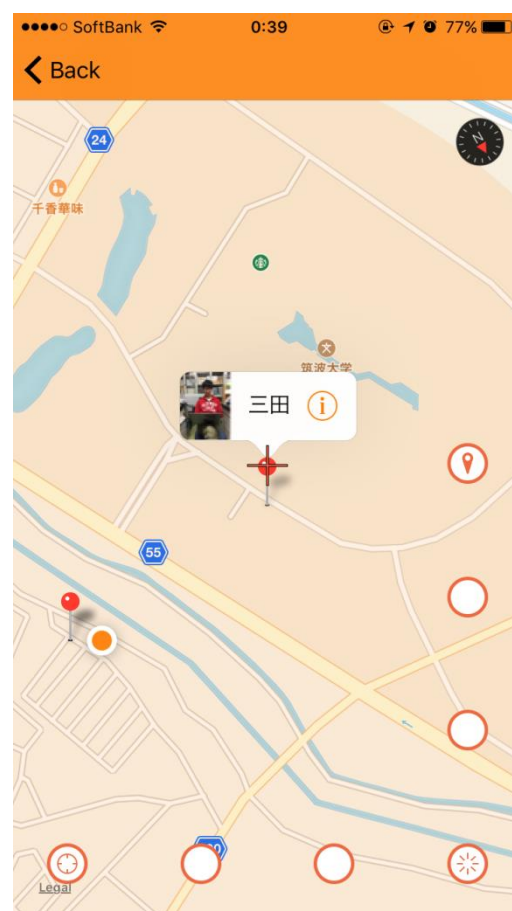


図. Ikimon GO スクリーンショット

アサガオの花成誘導機構における microRNA 標的遺伝子の機能解析

驚塚 滯 (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】

植物は、自身の生育段階や外部環境を把握し、適切な時期に花成を誘導する。その制御には様々な外的・内的要因が関係しており、光周性を示す植物は、日長の変動 (光周期) を感知して生殖段階に移行する。本研究では絶対的短日植物であるアサガオ (*Pharbitis nil* 又は *Ipomoea nil*) を用いて、microRNA (miRNA) 標的遺伝子が花成に与える影響について注目した。

miRNA は 20 塩基ほどの 1 本鎖 RNA であり、標的遺伝子の mRNA の不安定化や分解を誘導する因子である。miRNA157 の標的配列を保持する *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) は、*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN* (SBP) -BOX を DNA 結合ドメインとして持つ、植物特有の転写因子をコードする遺伝子である。長日植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、花成ホルモン *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) と *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) の複合体が *APETALA1* (*AP1*)、*FRUITFULL* (*FUD*) などの花器官形成を制御する MADS-box 遺伝子の発現を誘導し、花成を促進する。そして *SPL* も MADS-box 遺伝子の発現制御に関わることが知られている。

本研究では、アサガオの *SPL* 遺伝子の発現パターンの解析と、miRNA 耐性にした *PnSPL* cDNA (*rPnSPL1a*, *rPnSPL2a*) を用いた過剰発現体の解析により、アサガオの花成誘導機構における miRNA と *SPL* 遺伝子の役割の解明を目的とする。

【材料】

アサガオ品種 Violet の非形質転換体と *rPnSPL1* と *rPnSPL2* の cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで過剰発現した形質転換系統 (*rPnSPL1a*-OX, *rPnSPL2a*-OX) を用いた。

```

PnSPL1a 5' - ATGCTCTCTATCTTCTGTCAA -3'
miR157 3' - CACGAGAGATAGAAGACAGTT -5'
rPnSPL1a 5' - GCGCCTTAAGCTTGTTAAGCA -3'
miR157 3' - CACGAGAGATAGAAGACAGTT -5'

PnSPL2a 5' - CGTGCTCTCTCTTCTGTCAAAC -3'
miR157 3' --CACGAGAGATAGAAGACAGTT---5'
rPnSPL2a 5' - CGAGCCTTAAGCTTGTTAAGCAAC -3'
miR157 3' --CACGAGAGATAGAAGACAGTT---5'

```

図1 *PnSPL1*, *PnSPL2* 遺伝子の miR157 標的配列と同義置換後の配列 (先頭の r は miRNA 耐性 (resistant) の意味。* は塩基の対合部分を示す。)

【方法】

1. *PnSPL* 遺伝子の発現パターンの調査

非形質転換体の Violet を用いて、16 時間連続暗期 (強い短日条件) を与えた芽生えと連続明期 (長日条件) を与えた芽生えの頂芽における *PnSPL* 遺伝子の発現パターンを、SYBR® *Premix Ex Taq*™ II を用いた qRT-PCR

により解析した。頂芽は、暗期開始直後から 4 時間おきに 2 日間サンプリングされたものを使用した。

2. 過剰発現体の花成調査

発芽後 7 日目の芽生えに 12 時間連続暗期 (弱い短日条件) を与え、約 1 か月間恒明条件で栽培後、花成を調査した。各個体の花芽の個数と、系統ごとのターミナルフラワー (茎の先端に形成される花芽) 形成率を比較することで評価した。

3. 過剰発現体を用いた花成関連遺伝子の発現解析

1. と同様に、発芽後 7 日目の芽生えに 12 時間連続暗期を与えた。その後、12 時間の暗期終了時に子葉を、暗期開始後 24 時間後に頂芽をサンプリングした。子葉は mRNA のみを、頂芽は miRNA を含む total RNA を抽出し cDNA を合成した。miRNA に対しては TaqMan® MicroRNA Assays を、mRNA に対しては SYBR® *Premix Ex Taq*™ II を使用して qRT-PCR を行った。miRNA は miR157 を解析し、mRNA は *PnSPL* 遺伝子及び、花成関連の遺伝子を解析した。

【結果】

1. *PnSPL* 遺伝子の発現パターンの調査

PnSPL1 の発現量は、暗期開始 12~16 時間後に一過性のピークを示す傾向にあった。*PnSPL2* は、暗期を与えたことによる発現量の変化は観察されなかった。

2. 過剰発現体の花成調査

rPnSPL1a-OX は、花芽形成数、ターミナルフラワー形成率が増加した。一方、*rPnSPL2a*-OX は花芽数が増加しターミナルフラワーを形成する系統 (#3, #8) とやや花芽数が減少する系統 (#11)、花芽の形成されない系統 (#12) が観察された。

3. 過剰発現体を用いた花成関連遺伝子の発現解析

現在解析中

【考察・展望】

花成調査の結果より、*PnSPL1a* は花成を促進する因子であることが示唆された。qRT-PCR 解析では *PnFT1* の発現量に変化が見られないため、*PnFT1* の発現を直接促進する因子である可能性は低いと考えられる。一方、*PnSPL2a* は系統により花成に差が見られた。この原因を探るため、引き続き qRT-PCR による *rPnSPL2a*-OX の発現解析を行う。

【謝辞】

形質転換アサガオの種子を提供してくださった、農研機構・野菜・花き研究部門の渋谷健博士に、御礼を申し上げます。

ウイルス様粒子を用いた遺伝子組換え作物による食べるワクチンの開発に関する研究

伊藤 有梨 (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 〕

食べるワクチンとは植物体内で様々な病気に対するワクチン抗原タンパク質を生産し、それを食べることによってその病気を予防しようとするワクチンのことである。食べるワクチンの利点には全身性免疫応答とともに粘膜免疫応答を誘導する、動物病原体のコンタミがないなど様々なものがあるが、ワクチンが腸管粘膜に達するまでに消化されてしまうなどの問題点も存在する。そこで本研究ではウイルスのカプシドタンパク質のみからなり遺伝情報を持たないため病原性がなく、また自己会合能があり消化耐性のある E 型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様粒子(Virus Like Particle: VLP)を利用した。

本研究では、抗原として A 型インフルエンザウイルスで保存性が高い M2 タンパク質(Membrane ion channel 2) (上流 10 アミノ酸)、植物材料として食用作物であるトマト(*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) とニンジン(*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) を使用した。トマトでは果実で導入遺伝子を発現させるためにアグロバクテリウム法により核形質転換を行い、一方ニンジンでは根で導入遺伝子を発現させるためにバイオリスティック法により葉緑体形質転換を行った。本研究は HEV-VLP に M2(10) タンパク質を HSVtag でつなげた融合タンパク質を可食部で発現する形質転換体の作出・解析を目的とした。

〔 材料 〕

導入遺伝子としては HEV-VLP と M2(10) を HSVtag でつないだ融合遺伝子を用いた。

トマトでは融合遺伝子を果実特異的に発現する E8 プロモーターと植物体全体で発現するカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの 2 種類のプロモーターで発現させた。さらに、対照として M2(10) タンパク質を融合させない HEV-VLP と HSVtag のみの導入コンストラクトも作成した。また、形質転換体選抜のためにカナマイシン耐性遺伝子(*NPTII*)を導入した。

ニンジンでは HEV-HSVtag-M2(10)、HEV-HSVtag 融合遺伝子の他に、形質転換体選抜のためスペクチノマイシン耐性遺伝子(*aadA*)と緑色蛍光遺伝子(GFP)の融合遺伝子を導入した。

〔 方法 〕

1. トマト

トマトではアグロバクテリウム法で核形質転換を行った。トマトの種子を無菌播種し、6-7 日目の子葉の切片をアグロバクテリウム液につけ、共存培地に移植した。2,3 日後にカルス誘導培地、2 週間後にシュート誘導培地、さらに 2 週間後に発根培地に移植し、カナマイシンを添加して形質転換体の選抜を行った。再生個体は PCR 解析によって遺伝子が導入されているか確認した。遺伝子が導入されていた個体は順化し、発現解析を行った。

2. ニンジン

ニンジンではバイオリスティック法で葉緑体形質転換を行った。葉緑体形質転換では導入遺伝子は相同組換えによって葉緑体

ゲノムに部位特異的に組込まれる。プラスミド DNA を金粒子に付着させ、パーティクルガンによってニンジンの胚性カルス(embryogenic callus, EC) 細胞に導入した。2,3 日暗所にて静置した後、3 週間ごとにスペクチノマイシンの濃度を 150, 350, 500 mg/L と段階的に上げた培地に移植し、形質転換体を選抜した。固形培地で選抜後は液体培地に移し、震盪培養で増殖させた。

〔 結果・考察 〕

1. トマト

作出した形質転換体 35S:HEV-HSVtag-M2(10) 17 系統、E8:HEV-HSVtag-M2(10) 14 系統、E8:HEV-HSVtag 29 系統について、トマトの果実(red ripe)を収穫し、Western Blotting による発現解析を行った。その結果、35S:HEV-HSVtag-M2(10) で 2 系統、E8:HEV-HSVtag-M2(10) で 5 系統、E8:HEV-HSVtag で 14 系統、目的タンパク質である約 50 kDa で濃いバンドが確認された。これらの系統では目的タンパク質が多く発現していると考えられた。

また、発現解析を行った形質転換体のうち目的タンパク質の高発現が確認された E8:HEV-HSVtag-M2(10) #20、E8:HEV-HSVtag #7 で VLP の形成を確認するためタンパク質抽出液をショ糖密度勾配遠心で分画後、Western Blotting を行った。その結果、E8:HEV-HSVtag #7 の方が E8:HEV-HSVtag-M2(10) #20 より多くの VLP 形成が確認された。

2. ニンジン

複数回に分けてニンジン EC 細胞にパーティクルガンでショットを行い、現在スペクチノマイシンを含む培地にて形質転換体の選抜を行っている。

〔 今後の展望 〕

1. トマト

電子顕微鏡観察による VLP 構造の確認、実際にサルなどを用いた動物試験などを行う。

2. ニンジン

形質転換体選抜後増殖させ、PCR 解析による遺伝子導入の確認、目的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。

花粉症治療に向けたスギ花粉アレルゲンの大量発現系に関する研究

高岡 美予（筑波大学 生物学類）

指導教員：三浦 謙治（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

アレルギーとは特定の抗原に対して免疫系が過剰に応答し、目のかゆみ、鼻水、皮膚のかゆみなどの症状を引き起こす反応である。中でもスギ花粉をアレルゲンとするスギ花粉症は日本で最も多くみられ、患者は2500万人（人口の約25%）に及ぶ。

アレルギーの治療法としては、抗ヒスタミン剤などを服用する対症治療が主流であるが、これは一時的に症状を緩和するに過ぎない。そこで現在、アレルギーを根治治療する方法として減感作療法というものが行われつつある。減感作療法とはアレルゲンエキスを体に継続的に投与することでアレルゲンに対する過敏性を抑制し、症状を緩和させる方法である。

従来はアレルゲンの投与に注射が用いられており、治療に痛みを伴うことや長期の通院が必要であるなどのデメリットがあった。そこで舌下からアレルゲンを投与する舌下免疫療法というものがある。舌下免疫療法ではリンパ腺に近い舌下から直接アレルゲンを投与するため痛みがなく、注射による投与と比較して患者への負担が少ない。

一方デメリットとして、アレルゲンエキスの調製のために莫大な量の花粉アレルゲンを必要とすることが挙げられ、その実量としては患者10万人を1年間治療するのに約2tの花粉が必要であるといわれている。この人数はスギ花粉症患者のうちの約0.4%である。アレルギー患者数が増加している現状を考慮すると、花粉から花粉アレルゲンを調製するだけでは賄えない可能性がある。

これまでも大腸菌や酵母を用いた花粉アレルゲンの大量調製は試みられてきたが、これらのタンパク質はアレルギー性がない、あるいは不溶化してしまい精製が困難であるなどの問題があった。そのため花粉アレルゲンの発現には植物を宿主とするタンパク質発現系を用いるのが適切であると考えられる。

そこで本研究ではスギ花粉症の舌下免疫療法で用いるアレルゲンエキス生産効率化のために、スギ花粉アレルゲンの大量調製を試みる。

【方法】

1. アグロバクテリウムの準備

大腸菌プラスミドの制限酵素処理により、目的タンパク質をコードする遺伝子を導入し、ベクターを作製した。このベクターを用いてアグロバクテリウムに形質転換を行った。

2. タバコへのインフィльтраーション

ベンサミアナタバコに、シリンジを用いてアグロバクテリウム溶液を浸漬させた。

3. タンパク質の回収・精製

回収した葉をすりつぶし、タンパク質を溶出させた。回収したタンパク質は各種クロマトグラフィーにより精製を行った。

【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する。

【今後の予定】

- ・インフィльтраーション条件の検討
- ・花粉アレルゲンの精製度合の向上

デリバリー技術の適応によるゲノム編集トマト作出に関する研究

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

【背景・目的】

ゲノム編集とはゲノム上の特定部位を切断できる TALEN や CRISPE/Cas9 などの人工ヌクレアーゼを用いて目的の配列に DNA 二重鎖切断を誘導し、DNA 修復機構を発動させて任意の配列を改変する技術である。二重鎖切断時の修復機構には非相同末端再結合人(Non-Homologous End-Joining: NHEJ)と相同組換え(homologous recombination: HR)があり、NHEJ 経路を利用すると遺伝子のノックアウトが行われ、HR を利用すると切断部位に外来の遺伝子のノックインが行われる。

ゲノム編集は基礎研究分野をはじめ、創薬、再生医療、作物の品種改良などさまざまな分野において活用が期待されている技術である。例えば、基礎研究分野では変異体作製が困難であった多くの生物で、目的の変異体の作製が報告されている。さらにレポーター遺伝子の挿入も可能であるため、遺伝子発現のライブイメージングにも今後広く利用されることも予想されている。応用分野の例として創薬を考えた場合、ゲノム編集によって病態を反映したモデル細胞またはモデル動物の作製がより簡易になる。これまでの技術ではそれらモデル系の構築に長い年月を要し、また複数遺伝子を同時に改変することは極めて困難であった。しかしゲノム編集技術を用いることで短時間に多くのモデル系を構築することが可能となるだけでなく、複数の遺伝子を同時に改変することも可能となった。植物においてもゲノム編集の適応例が報告されている。例えば、コムギにおける病害耐性株の作出などである。ただ、現状、植物において目的の遺伝子をノックアウトするには、Cas9 タンパク質と標的遺伝子への Cas9 の誘導を行う RNA がコードされた配列をアグロバクテリウム法やパーティクルガン法などの方法で植物のゲノムに組み込む方法が主流である。この方法で得られた植物は Cas9 遺伝子組換え体であり、ヌルセグレガント（目的の遺伝子がゲノム編集されており、なおかつ Cas9 遺伝子が除去された植物体）を得るには戻し交配をする等が必要となり、作製までに時間がかかる。

そこで本研究では標的遺伝子を破壊するように設計した gRNA および Cas9 タンパク質を直接細胞内へ輸送させることで、目的の変異体の作出の短期間化、及び組換え体を経ずに変異体を作製することを目的とした。

【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する。

【今後の予定】

Cas9 を導入する際の時間や組成などの条件を変化させていき、結果に影響がでるかを見ていきたいと考えている。

Δ9 desaturase 遺伝子導入ユーカリの隔離圃場における

不飽和脂肪酸産生量と耐冷性の相関性の検証

林 奈々美 (筑波大学 生物学類)

小口 太一 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

産業革命以降、産業活動に伴う二酸化炭素排出の増加による大気中の二酸化炭素濃度の増加は、地球温暖化の一因となっている。そこで地球温暖化の解決策の一つとして、世界中で植林が行われている。植林される林木の中で特に注目されているのが、ユーカリである。ユーカリは、他の林木よりも成長が早く、非生物ストレスに耐性が高い。しかし、ユーカリの最適生育温度が 25 度のため、植林地域が低緯度地域に限られているため、植林地域拡大のためには、耐冷性の付与が必要である。

当研究室では、ラン藻 *Anacystis nidulans* から単離された Δ9 desaturase 遺伝子 (*des9*)¹⁾ をユーカリ (*Eucalyptus globulus*) に導入することで、形質転換ユーカリを作出した。*des9* 遺伝子から誘導される、脂肪酸不飽和化酵素はパルミチン酸を融点が高いパルミトレイン酸に変換することで、低温状況下での生体膜の流動性が維持できると考えられる。

この形質転換ユーカリを隔離圃場に植林、萌芽更新させ、2016 年 11 月から 2017 年 3 月において、葉緑体の自家蛍光を指標に低温障害を測定することで、耐冷性評価を行った。また、形質転換体における、耐冷性と脂肪酸の関係を明確にするために、導入遺伝子数の分析、*des9* 遺伝子の発現量解析、脂肪酸分析を行った。

【植物材料】

des9 導入形質転換ユーカリ 2 系統 (144-13 : 4 個体、204-10 : 6 個体) と非組換え 3 系統 (No.1 : 10 個体、Au1 : 3 個体、L047 : 3 個体) を実験材料とした。各植物は、2013 年 11 月に遺伝子実験センターの模擬的環境試験圃場Ⅱ (隔離ほ場Ⅱ) に植栽した後、2016 年 4 月に地面から約 50 cm で伐採し、今年度新たに生じた萌芽を評価対象とした。

【実験方法】

1) 導入遺伝子数の確認

隔離ほ場試験に供した遺伝子組換え体 2 系統及び非組換え対照系統よりそれぞれランダムに選んだ各 3 個体から採取した葉よりゲノム DNA を抽出、qPCR 解析により推定した。

2) 発現量解析

隔離ほ場試験に供した遺伝子組換え体 2 系統及び非組換え対照系統よりそれぞれランダムに選んだ各 3 個体から採取した葉より RNA を抽出、qRT-PCR 解析により *des9* 遺伝子の相対発現量を分析した。

3) 脂肪酸分析

2016 年 4 月から隔離圃場で萌芽更新したユーカリから 1 枚ずつ葉を採取、1 日凍結乾燥処理させた後、各系統からランダムに 3 個体を選択、脂肪酸抽出し、ガスクロマトグラフィー解析により分析した。

4) 低温障害の測定、評価

遺伝子実験センターの隔離ほ場Ⅱで、屋外における葉の QY の変動をモニタリングすることで低温障害を定量評価した。QY 測定は、樹冠から 1 m 以内及び樹冠から 1 m~2 m の範囲の枝の先端から 4 枚の葉について、FluorPen-FP100 を

用いて各 3 スポットの測定値の平均値として得た。

【結果】

1) 導入遺伝子のコピー数

形質転換体 204-10 系統は、導入遺伝子が約 12 コピー存在し、144-13 系統は、約 3 コピー存在することが推察された。

2) 発現量解析

形質転換体でのみ、*des9* 遺伝子の発現が確認された。また、204-10 系統と 144-13 系統の発現量を比較すると、204-10 系統の方が約 1.3 倍程度発現量が高かった。

3) 脂肪酸分析

形質転換体からのみ、パルミトレイン酸 (C16:1) が特異的に検出された。また、204-10 系統と 144-13 系統のパルミトレイン酸含有量を比較すると、204-10 系統の方が約 2 倍程度高蓄積していた。一方で、他の脂肪酸組成は、形質転換体と非組換え体の間で違いはなかった。

4) 低温障害の測定

これまでの測定の結果、気温の低下とともに、全ての系統において、QY が低下する傾向を確認しているが、現時点では、形質転換体と非組換え体の間に、低温障害において大きな差は確認できていない。ただし、先行研究では、形質転換体と非組換え体の低温障害の差は、1 月以降に観察されていることから、その後も測定を継続している。

【考察】

GC 解析の結果、形質転換体では、非組換え体では検出されないパルミトレイン酸が検出された。パルミトレイン酸は、パルミチン酸 (C16:0) の Δ9 位に一価の不飽和化が導入された脂肪酸であり、*des9* の導入によって生成されたものと考察される。また、*des9* の発現量とパルミトレイン酸含量に正の相関がみられたことから、本考察は強く支持される。

一方で、他の脂肪酸組成には有意な影響がみられなかったことから、導入した *des9* がパルミチン酸に特異的であることが考察された。タバコでは、本酵素は、非特異的に飽和脂肪酸の不飽和化に関与することが報告されており¹⁾、ユーカリとタバコでは、脂肪酸不飽和化の機構に相違があることが推察される。

一方で、導入遺伝子数と導入遺伝子の発現量の間には、相関が認められなかった。これは、導入遺伝子の発現は、導入数よりも導入したゲノム上の部位による影響が大きいためと考察される。

今後は、低温障害の測定により、冬季のほ場におけるユーカリの低温障害を定量的に評価することで、低温耐性と *des9* 遺伝子発現量・パルミトレイン酸含量の関係を明らかとし、*des9* 遺伝子導入によるユーカリの耐冷性育種の有効性を示したいと考えている。

【参考文献】

- 1) Ishizaki-Nishizawa, O., *et al* (1996) Low-temperature resistance of higher plant is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Natuer Biotech.* **14**: 1003-1006

サツマイモ β -amylase 遺伝子の多様性解析

眞玉橋 将央 (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】

サツマイモ (*Ipomoea batatas* L.) は、栽培化に至る経緯で微生物の遺伝子を取り込まれており (Kyndt *et al.* 2014)、生物学的に特徴的な研究材料である。また、農学的には痩せた土地での栽培が可能であり、世界の年間総生産量は 1 億 t を超える (FAOSTAT 2013)、重要な作物の 1 つである。

サツマイモのデンプンは加熱されると糊化し、 β -amylase 活性によりマルトースに分解される。一方で、 β -amylase が欠損すると、マルトースが生成されないため甘くならない。 β -amylase 欠損型品種であるサツマヒカリ (SH) とオキコガネ (OK) には、 β -amylase 遺伝子の exon 5 に塩基挿入があり、フレームシフトにより正しく翻訳されないことが明らかにされている (Anwar *et al.* 2009)。一方、 β -amylase 欠損型品種のジョイホワイト (JW) ではこの塩基挿入がなく、他にも欠損を引き起こす遺伝子変異が存在すると考えられる。

甘くならない品種は、じゃがいものように持続的な食用炭水化物源となる主食や惣菜として、毎日の食事に利用しやすい。そのため、 β -amylase 欠損型品種の育成意義は高いと考えられる。しかし、サツマイモは他殖性の同質 6 倍体 ($2n = 6x = 90$) であるため、遺伝子解析や農業上有利な形質を持った品種の育成には多くの時間と労力を要する。そのため、DNA マーカーなどを用いて効率良く育種する必要がある。

β -amylase 活性型品種の高系 14 号 (K14) では、その塩基配列が決定されており (Yoshida *et al.* 1992)、酵素の結合部位と活性部位が同定されている (Cheong *et al.* 1995)。また、サツマイモは倍数性であるため、時間と労力の観点から遺伝子多型解析では次世代シーケンサーの利用が効果的である (Monden *et al.* 2015)。そこで、本研究では β -amylase 欠損型 DNA を解析し、その多様性を明らかにするとともに、DNA マーカーの作成を目的として、4 品種 (K14, SH, OK, JW) を用いて、次世代シーケンサーによる β -amylase 遺伝子の多様性解析を行った。

【材料・方法】

(1) 植物材料と DNA 抽出

β -amylase 活性型の K14 と、欠損型の SH, OK, JW の 4

品種を実験材料として用いた。これらは、固形培地で継代培養し、培養室で維持した。ゲノム DNA は、葉から抽出した。

(2) PCR プライマー設計と PCR

K14 の β -amylase の塩基配列をデータベースから取得し、全 exon をカバーするように 9 つのプライマーセットを設計した (下図)。用いるシーケンサーの平均リード長が約 500 bp (Loman *et al.* 2012) であるため、各 PCR 産物が 500 bp 程度となるように設計した。抽出したゲノム DNA を鋳型に、品種別に各プライマーセットで PCR を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動し、増幅を確認した。

(3) サザンハイブリダイゼーション

β -amylase に由来しない増幅断片を確認するためにサザンハイブリダイゼーションを実施した。メンブレンは、品種毎に電気泳動後のゲルからアルカリブロットニングにより作成した。プローブは品種毎に全 exon を含む領域を PCR により DIG ラベルして作成した。抗 DIG 抗体を用いて化学発光を検出した。

(4) シーケンシングと多型解析

プライマーなどの DNA 断片を除去した後、DNA 断片に MID タグをライゲーションシライブラリーを作成した。その後、GS Junior を用いて塩基配列決定した。得られたリードをタグで整列させ、データベースから取得した K14 の配列データをリファレンスとしてマッピングを行い、データ解析を行った。

【結果・考察】

PCR により増幅されたバンドパターンを K14 と比べたところ、SH と OK では、プライマーセット①、③、⑥、⑧で明らかに異なるバンドパターンを示した。一方で、JW では K14 と同様のバンドパターンを示した。多型を示した領域のうち、サザンハイブリダイゼーションにより、③と⑧で認められた多型は β -amylase に由来しない増幅断片によることが明らかとなった。従って、SH と OK では①と⑥の領域に PCR レベルでの多型が含まれる事が判明した。また、JW では PCR レベルでの比較から確認できない変異をシーケンシングによって見出したい。シーケンシングにより、品種間のより詳細な多型が検出できると考えており、 β -amylase 遺伝子の多様性を明らかにする。

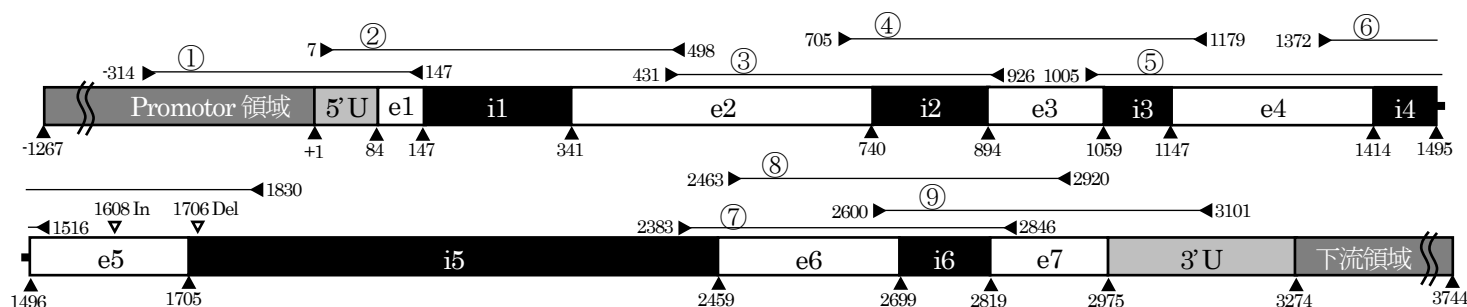


図 サツマイモ β -amylase の遺伝子構造と設計したプライマー位置

データベースの情報を基に 9 セットのプライマーを作成した。5' U: 5' 側非翻訳領域、+1: 転写開始点、e: exon、i: intron、3' U: 3' 側非翻訳領域をそれぞれ示す。また、In、Del は先行研究 (Anwar *et al.* 2009) で明らかにされた挿入、欠損変異をそれぞれ示す。

シアノバクテリアの光呼吸経路の改変によるグリコール酸の合成に関する研究

小林 孝太郎（筑波大学 生物学類）

指導教員：鈴木 石根（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

近年、微細藻類や微生物を用いて燃料や医薬品などに利用できる有用物質を生産する試みが広く知られるようになった。シアノバクテリアは、酸素発生型光合成をおこなう細菌である。また内部構造や光合成に関わるタンパク質は、高等植物の葉緑体のそれと共通点が多く、葉緑体の起源であると考えられている。更にシアノバクテリアは、遺伝子組換えによる形質転換も遙かに簡便で増殖も速い。なかでも *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、グルコースを用いた光従属栄養的にも生育可能であることから光合成研究のモデル微生物として広く利用されてきた。

シアノバクテリアや葉緑体のカルビン・ベンソン回路で、CO₂固定を触媒するリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RubisCO) はカルボキシラーゼ反応によって基質であるリブローズ 1,5-ビスリン酸 (RuBP) に CO₂ を固定する一方で、オキシゲナーゼ反応により RuBP に O₂ を固定して 2-ホスホグリコール酸を生じる反応も起こす。通常この反応によって生じた 2-ホスホグリコール酸は、いわゆる光呼吸により 3-ホスホグリセリン酸へと変換され、カルビン・ベンソン回路内へと戻される。これまで、RubisCO の CO₂ 固定反応による物質生産系は複数検討されているが、オキシゲナーゼ反応により物質生産を試みられたことはない。光呼吸経路の中間体のグリコール酸からの物質生産系の構築に向け、グリコール酸デヒドロゲナーゼ (GlcD) をコードしている 2 つの遺伝子 *glcD1*, *glcD2* の二重変異体を作製し、その性質、グリコール酸の蓄積について検討した。

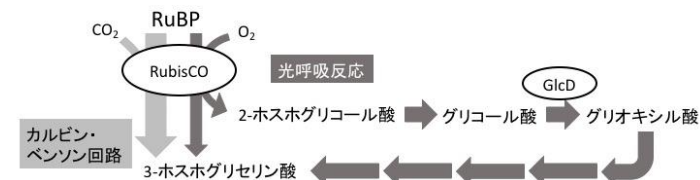


図1. 光呼吸経路の概略

材料・方法

シアノバクテリアは既に全ゲノムが解読されており、モデル生物として広く使われている *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を使用した。*glcD1* および *glcD2* の組換えはまずゲノム PCR により増幅した両遺伝子を含んだ領域をそれぞれ組込んだ pMD19 プラスミドベクターを作製し、それぞれカナマイシン耐性遺伝子またはスペクチノマイシン耐性遺伝子カセットを、制限酵素処理によって ORF 中に挿入し機能を欠失させた。これらのプラスミドを相同組換えによりシアノバクテリアの野生株の染色体上に挿入し、一重変異株 $\Delta glcD1$ および $\Delta glcD2$ を得た。形質転換体の選抜には抗生物質であるカナマイシンまたはスペクチノマイシンを 5 μ g/mL 含んだ BG-11 寒天培地を使用し、コロニー選抜後は抗生物質濃度を 25 μ g/mL に高めた BG-11 プレートを使用して培養を行った。PCR によって組換えを確認した。さらに *glcD1* 株を用いた相同組換えによって、二重変異体である $\Delta glcD1/2$ を得た。先行研究において二重変異体は空気中の CO₂ 濃度 (0.03%) では生育

できないことが指摘されているため、1%CO₂ を通気しながら培養した。

野生株および形質転換によって得られた変異株について、あらかじめ 5%CO₂ を通気して培養した細胞を、細胞濁度 0.3 の濃度で新たな培地に植菌しさらに一晩培養した。その後遠心 (2800rpm, 10 min) により細胞を回収し、50 mL HEPES-NaOH (pH 7.5) に細胞濁度が 0.3 になるよう懸濁し、5% CO₂ 通気下と 0.03% CO₂ 通気下に移して培養した。培養開始から 0 時間、1.5 時間、3 時間の培地を回収し、Calkins 法により培地中へのグリコール酸の放出量を調べた。

結果・考察

野生株および変異体の *glcD* 遺伝子のゲノムを抽出し、*glcD* 遺伝子領域の PCR を行った結果、図 1 に示すようにいずれの変異体においても意図した薬剤耐性遺伝子の導入が確認できた。野生型の遺伝子は完全に変異型に置き換えられており、高 CO₂ 条件下では *glcD* 遺伝子は必須ではないことが示された。現在、CO₂ 条件を変化させた条件での培養特性について検討中である。

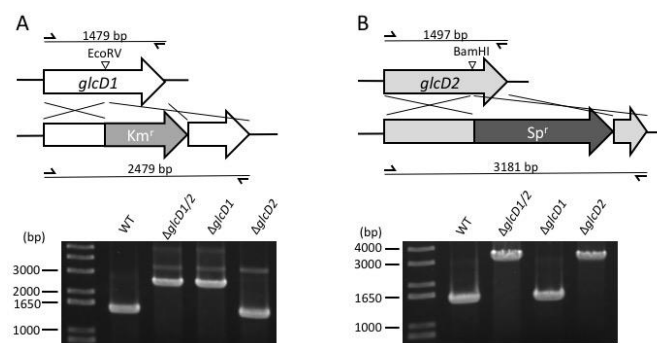


図2. *glcD1* (A) および *glcD2* (B) 遺伝子の組換えの概要と PCR 結果

一方で培地中へのグリコール酸の放出は確認できなかった。原因としては培地中の細胞数が少ないか、シアノバクテリアの細胞外へのグリコール酸放出が他の藻類と比較して少ないためと考えられる。

今後の展望

シアノバクテリア野生株および *glcD* 変異体におけるグリコール酸量をより詳しく調べるために、有機溶媒による抽出や他の分析方法についても試してみたい。

グリコール酸は光呼吸経路ではグルイオキシル酸へと酸化されカルビン・ベンソン回路へと戻されるが、 $\Delta glcD1/2$ 株への外来遺伝子導入によってグリコール酸のエチレングリコールやビタミン B₆ といった有用物質への転換、または別の代謝経路へのバイパスができないか検討中である。また、シアノバクテリアのもつ炭酸固定機構に関与する遺伝子の操作によって RubisCO のカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ活性の割合を変更しグリコール酸の生成量を増やすことができないかについても検討している。

5 種のアルケノン産生ハプト藻の貯蔵物質への炭素分配様式の解析

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

【背景・目的】

アルケノンは微細藻類が生産する脂質であり、炭素数 37-39 の分子に 2-4 個のトランス型不飽和結合を有する長鎖不飽和アルキルケトンである。アルケノンには培養温度によって不飽和数が変化する性質があり、地質学分野においてアルケノンは古水温度の再現に利用されている。近年では、アルケノンをエネルギー源として活用するための技術開発が行われている。

アルケノンを合成する微細藻類は、ハプト植物門の *Emiliania huxleyi*、*Gephyrocapsa oceanica*、*Tisochrysis lutea*、*Isochrysis galbana*、*Chrysotila lamellosa* の 5 種が知られるのみである。*E. huxleyi* と *G. oceanica* は海洋に、*T. lutea*、*I. galbana* は汽水域に、*C. lamellosa* は塩湖に生息している。

この 5 種のハプト藻がアルケノンを合成する目的はまだわかっていない。*E. huxleyi* NIES-837 株を用いた先行研究で、明条件下でアルケノンが蓄積し、暗条件下でその蓄積したアルケノン量が減少したことから、アルケノンは炭素の貯蔵物質であることが示唆されている。しかしながら、他の 4 種のアルケノン合成種では不明である。

本研究では、生体内でのアルケノンの生理機能を明らかにすることを目的とし、5 種のアルケノン産生ハプト藻における貯蔵物質への炭素分配様式を解析した。また、明条件から暗条件へ移した後、多糖とアルケノンの含有量がどのように変化するのかを調べ、アルケノンの生理機能について考察する。

【材料・方法】

本実験では、*E. huxleyi* は NIES-837 株と CCMP2090 株、*G. oceanica* は NIES-838 株、*T. lutea* はタヒチ株、*I. galbana* は CCMP1323 株、*C. lamellosa* は CCMP1307 株の計 6 株を用いた。

培養は、500 mL 扁平培養ビンに 500 mL の MA-ESM 培地を加え、20°C、80-100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の光強度の連続光照射の下、100 ml/min の空気を通気して行った。2、3 日ごとにサンプルを回収し、750 nm における吸光度、細胞数、有機炭素量 (TOC)、酸性多糖量、中性多糖量、アルケノン量、脂肪酸量、および培地のリン酸濃度を測定した。

最後に、定常期まで育った細胞に対して、容器をアルミホイルで遮光することで暗条件への移行を行った。

【結果】

定常期において、TOC に占めるアルケノンの割合は、*T. lutea* タヒチ株では 5-10%、*I. galbana* CCMP1323 株では 5-10%、*E. huxleyi* NIES-837 株では 15-20%、CCMP2090 株では 15-20% となった。中性多糖の割合は、*T. lutea* タヒチ株では 8-15%、*I. galbana* CCMP1323 株では 6-11%、*E. huxleyi* NIES-837 株では 4-6%、CCMP2090 株では 4-8% となった。

暗条件下では *E. huxleyi* NIES-837 株、CCMP2090 株でアルケノンの著しい減少が見られた。一方、*T. lutea* タヒチ株、*I. galbana* CCMP1323 株ではアルケノンの減少がわずかであったが、中性多糖の著しい減少が見られた。*G. oceanica* NIES-838 株と *C. lamellosa* CCMP1307 株については現在解析中である。

【考察】

E. huxleyi は NIES-837 株と CCMP2090 株において暗条件下でアルケノン量が減少したことから、アルケノンを貯蔵物質として利用していると考えられる。一方、*T. lutea* と *I. galbana* では暗条件下で多糖量が減少したことから、アルケノンではなく中性多糖を貯蔵物質として利用していると考えられる。*E. huxleyi* は海洋性であり、*T. lutea* と *I. galbana* は汽水性であることから、貯蔵物質の利用の違いは生息域にあるかもしれない。また、*E. huxleyi* と *T. lutea* の比較解析により、さらなるアルケノンの生理機能解明が期待できる。

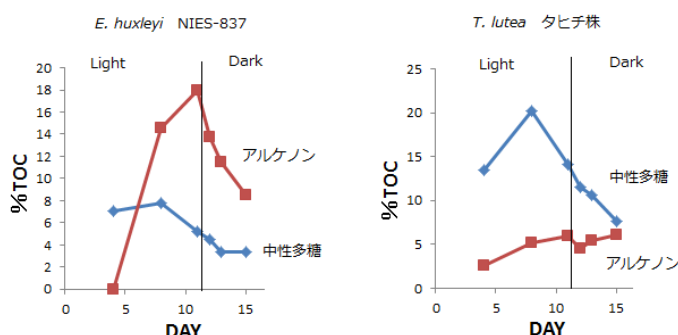


図. *E. huxleyi* NIES-837 株および T-Iso タヒチ株におけるアルケノンと中性多糖の明暗変化 (%TOC)

Optimization of the environmental factors for the growth and biomass production of the green alga, *Monoraphidium neglectum*

Li Jung Hi (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)

Introduction

Biofuel is one of the hot candidates which can remedy lots of environmental issues caused by excess consumption of the fossil fuels. However, since the biofuel is predominantly made by edible crops such as maize or soybean nowadays, it accelerates shortage in foods as well. In order to solve this issue, microalgae are considered as candidates of a sustainable production host for biofuel and other biotic products (Bogen et al. 2013). Among lots of different species, freshwater microalgae *Monoraphidium neglectum* shows a high potential for biofuel production as well as growth in a wide range of pH and temperature, which can be utilized in the field of bioremediation as well. In this research, the optimal conditions for the growth of *M. neglectum* were evaluated in terms of temperature, pH and compositional factors in growth media.

Materials and Methods

M. neglectum A11 strain was pre-cultivated for 2 d with starting optical density (OD) 0.2, and then cultivated up to 8 d. BG-11 was selected as the standard medium. The standard growth conditions were continuously illumination with 70 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ of white light and aerated with 1% (v/v) CO_2 enriched air. The growth temperature was set to 25°C except temperature tests.

The temperature test was conducted with 3 replicates per each temperature, from 10°C to 40°C with 5°C interval. For pH tests, 20 mM MES, HEPES, CHES and CAPS were used to adjust pH at 5.5, 7.5, 9.5, and 11.1, respectively, in order to minimize any drastic changes of pH during cultivation.

Compositional analysis was based on the Ilavarasi's research (2011), where Half-strength Chu 10 media (HC-10) showed a significantly higher growth rate than BG-11 for *M. neglectum* cultivation. Total of 4 different BG-11 media were tested based on the major differences between HC-10 and BG-11 media; a medium with low nitrogen content, a medium with Vitamin B₁ or $\text{SeO}_3^{2-}/\text{SiO}_3^{2-}$, and normal BG-11. OD at 730 nm was used to measure the growth rate of *M. neglectum*, and total amount of chlorophyll *a* and *b* was calculated based on the OD at 665 nm and 650 nm (OD at 750 nm was used for calibration). To analyse fatty acid composition and quantification of them, the total lipids were extracted by hexane and methyl-esterified fatty acids were applied on a gas chromatography.

Results and Discussion

The cells of *M. neglectum* were able to maintain its growth in the range from 10°C to 35°C for 8 d cultivation. The growth rate started to increase drastically between 15–20°C, but most cells were dead at 40°C. The highest growth rate was reached around 25–30°C in terms of both OD and chlorophyll (Fig. 1).

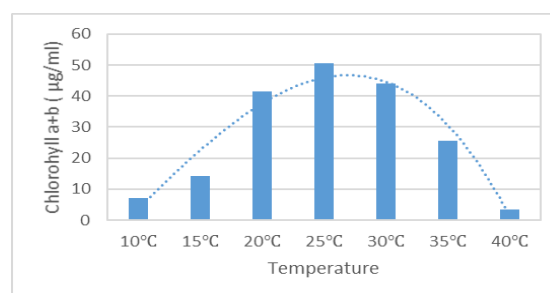


Fig 1. Chlorophyll content of *M. neglectum* in different temperatures after 3 d of cultivation

For pH tests, *M. neglectum* tended to grow much better at basic conditions than acidic conditions. The pH of media was converged to slightly basic condition (pH 8.1~8.5) during cultivation, and the growth rate was increased with this up-shift in pH. Hence, it is assumed that this species might adjust unfavorable pH conditions to increase its growth rate.

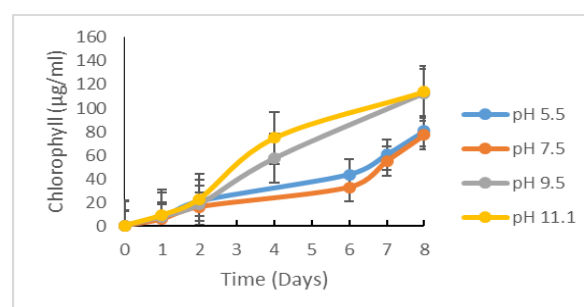


Fig 2. Chlorophyll content of *M. neglectum* with different pH

In the media comparison tests, an addition of $\text{SeO}_3^{2-}/\text{SiO}_3^{2-}$ showed the highest growth rate, while low N media showed the lowest result. The GC analysis of *M. neglectum* showed that it produced mainly C16:1 (24.1±1.2%), C18:1 (15.1±0.7%), C18:2 (27.9±0.8%) and C20:1 (32.9±1.2%) fatty acids. However, there are some minor peaks corresponding to unidentified fatty acids to be examined.

References

- Bogen C. et al. (2013) *BMC Genomics* **14**, 926.
 Ilavarasi A. et al. (2011) *Biotechnology* **10**, 540-545.

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の性転換株における性特異的な接合装置の空間配置

印南 椋矢 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 宮村 新一 (筑波大学 生命環境系)

〈背景・目的〉

同形、異形配偶をおこなう多くの緑藻植物において、配偶子は2本の鞭毛と光受容装置である眼点をもち、走光性や走化性を利用して出会い受精する。配偶子が出会うと細胞先端部に位置する接合装置(細胞融合装置)の領域で融合し、4本鞭毛の動接合子を形成する。多くの緑藻植物において、接合装置の位置は、2つの性の間で異なることが分かっている。例えば、*Chlamydomonas reinhardtii* の同形配偶子(mt^+ と mt^-)では、鞭毛運動面を基準にすると、 mt^+ 配偶子の接合装置は眼点に対し反対側、 mt^- では同じ側にある。この結果、受精後の動接合子では、2つの眼点が細胞の同じ面に並ぶことになる。このことは動接合子が正しい走光性を示すことができるという点で重要だと考えられている。また、接合装置の空間配置の違いは、同形、異形配偶に関わらず認められるために、2つの性を区別する普遍的な形態的な特徴であると考えられている。このような配偶子の形態的な特徴は、特定の“性”あるいは“交配型”と結びついた性質であると考えられるが、その詳しい仕組みはまだ分かっていない。

そこで、接合装置の性特異的な空間配置の仕組みを明らかにする第一歩として、*C. reinhardtii* を用いて交配型(mt^+ と mt^-)と接合装置の空間配置の関係を解析することを試みた。*C. reinhardtii* では、性決定遺伝子 *MID* が知られており、*MID* があると mt^- 、無いと mt^+ になることが分かっている。*MID* を欠損した mt^+ 株の配偶子は mt^+ として振る舞い、*MID* が挿入された mt^+ 株は mt^- に性転換する。しかし、性転換に伴い接合装置の配置も変わるかどうかは調べられていない。そこで、本研究では、*C. reinhardtii* の性転換株を用いて配偶子細胞内での接合装置の位置を調べた。

〈材料と方法〉

C. reinhardtii の野生株 CC124(mt^-)、CC125(mt^+)及び性転換株 CC3712(*MID* 欠損、 $mt^+ \rightarrow mt^-$)、CC3947(*MID* 挿入、 $mt^+ \rightarrow mt^-$) は TAP 培地で 23°C、約 240 $\mu\text{mol/s/m}^2$ の連続照明下で培養した。配偶子形成の誘導は、TAP1/2N 寒天培地上で 23°C、約 240 $\mu\text{mol/s/m}^2$ の連続照明下で培養後、配偶子形成誘導培地に懸濁し 4 時間、25°C で震盪培養することで行った。配偶子の融合方向は、 mt^+ と mt^- 配偶子を混合し、30 分後に配偶子懸濁液と 2% グルタルアルデヒドを等量混合することによって固定し、ついで光学顕微鏡で動接合子を観察することで確認した。

また、 mt^+ 配偶子の接合装置からアクチンが重合して伸長した受精管を観察するために、10mM dbcAMP と IBMX を mt^+ 株 (CC125、CC3712) の配偶子に添加し、受精管の伸長を誘導した。そして、まず電界放射型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) での観察のため、2% グルタルアルデヒドによる固定、タンニン酸、オスミウムを用いた導電染色、エタノール脱水後に凍結乾燥させ観察した。また、受精管の蛍光抗体染色のため、5% パラホルムアルデヒドと 3% TritonX100 の混合溶液による固定、メタノール処理を行い、微小管性鞭毛及び鞭毛根を抗アセチル化チューブリン抗体、

受精管を抗アクチン抗体、核を DAPI で染色し蛍光顕微鏡で観察した。

〈結果と考察〉

動接合子の光学顕微鏡観察の結果から、接合が確認された性転換株 CC3947($mt^+ \rightarrow mt^-$) と野生株 CC125(mt^+) の接合子のうち、野生株同士の組み合わせ (CC124xCC125) と同じように2つの眼点が細胞の同じ面に並ぶ向きで接合するものが 100% であった。従って、性転換株 CC3947 も CC124 と同じ向きで接合すると考えられる。CC124 では、眼点と同じ側に接合装置があることが分かっているため、CC3947 の接合装置も、眼点と同じ側にあることが示唆された。

性転換株 CC3712($mt^+ \rightarrow mt^-$) は接合に必要な遺伝子 (*fus1*) を持っていないために野生株 CC124(mt^-) と接合できなかった。そこで、接合装置から伸長した受精管を FE-SEM と蛍光抗体法で観察することによって接合装置の位置を確認した。その結果、FE-SEM では、CC3712 の受精管が野生株 CC125(mt^+) と同じように眼点の反対側に位置していることが確認できた。また、蛍光抗体染色では、(1) 接合装置が4本の鞭毛根 (1s, 1d, 2s, 2d) のうちの1本の側に位置していること、(2) 眼点に接する 2s 鞭毛根が一番長いことを利用して、その位置を判断した。その結果、眼点に接する 2s 鞭毛根及び同じ向きに位置する 1d 鞭毛根の位置には受精管は見られず、眼点と反対側に位置する 1s 鞭毛根と 2d 鞭毛根の間 (83.3%) および 1s 鞭毛根 (14.3%)、2d 鞭毛根 (2.4%) の基部に分布していることが確認できた。従って、CC3712 の接合装置は、CC125(mt^+) と同様に眼点と反対側に位置していると考えられる。これにより、*MID* 挿入欠損による性転換に伴い、接合装置の位置も転換することが明らかになった。従って、接合装置の空間配置も *MID* によって制御されていることが示唆される。

〈今後の予定〉

接合装置の性特異的な空間配置の仕組みを明らかにするため、抗生物質耐性遺伝子の挿入による変異体を作成し、*MID* よりも下流に位置し接合装置の位置決定に関わる新たな遺伝子の探索を進めていきたい。

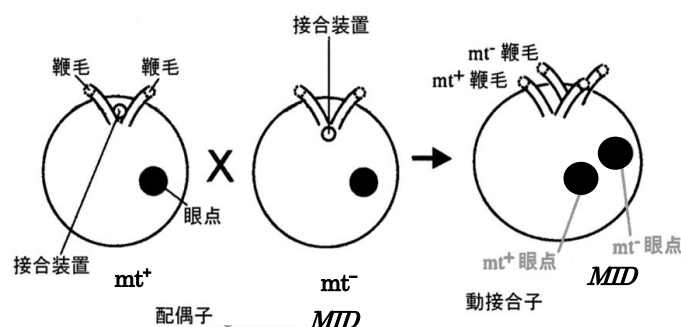


図: *C. reinhardtii* の配偶子における接合装置の位置と動接合子

Behavioral Genetics of Pain Sensation in Fruit Flies

Karen Sanford (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)

Background and Purpose

Nociception is the response of the nervous system to noxious or potentially damaging stimuli. In this process, sensory neurons called nociceptors are activated by chemical, mechanical, or thermal stimuli. This detection and processing of information alerts organisms of possible threats and results in the sensation of pain in humans. While nociception is essential for survival, persistent pain has adverse effects on life. Therefore, studying the mechanisms behind nociception is important to better understand sensory response systems and treat pain.

Drosophila melanogaster is an excellent model system due to its simple structure and genetic likeness to humans; fruit fly nociceptors have been shown to be functionally and morphologically similar to those of vertebrates¹. Neuropeptides are short amino acid sequences associated with numerous physiological processes, including pain modulation. Their systems are evolutionarily well-conserved, and past studies suggest that neuropeptides may play significant roles in mammalian nociception. However, little is known about how neuropeptides regulate nociception.

This study aims to characterize and elucidate the mechanism of action of three neuropeptides which may be implicated in nociception in *Drosophila* larvae. In this paper, the mutant larvae will be referred to as mutants (M) 1, 2, and 3.

Methodology

Thermal Nociception Assay

Drosophila larvae exhibit a highly stereotypical rolling response to harmful stimuli, known as nocifensive escape locomotion (NEL)². This avoidance behavior is specific to noxious stimuli and thus can be used as an indicator of nociception. In this behavioral assay, wandering third instar larvae were collected from vials using distilled water. Larvae were placed on a dish with a thin layer of water. Using a thermal probe, heat was applied to the abdominal regions (A4-A6) of larvae and latency until complete lateral rolling (360° or more) was recorded. The thermal probe was set to 42°C for M1 and M2 larvae as they were previously found to be hypersensitive to heat, and 45°C for

M3a and M3b larvae, which were insensitive to heat. All experiments were carried out at 25°C room temperature.

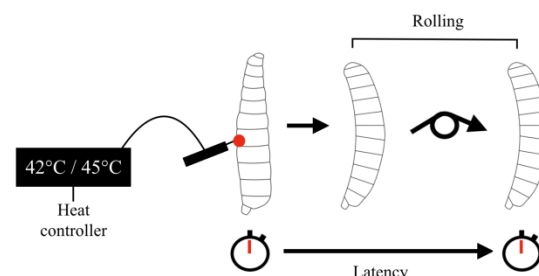


Fig. 1: Diagram of methodology

Results and Discussion

Results were consistent with previous findings that M1, M2, and M3a/b larvae exhibit abnormal behavior in response to noxious heat. M1 and M2 larvae are hypersensitive, and M3a/b larvae are insensitive. Lower latency was seen in M1 and M2 larvae compared to control larvae at 42°C, and higher latency was seen in M3a/b larvae compared to control larvae at 45°C.

To confirm that the hypersensitivity and insensitivity to noxious heat was due to the mutations, deficiency experiments were conducted. Unfortunately, no deficiency larvae were available for M2. Deficiency tests showed that the hypersensitivity of M1 and insensitivity of M3a/b were due to the genetic mutations. Graphs and remaining findings will be discussed in the presentation.

Conclusion

Results raise the possibility of these neuropeptides' association with thermal nociception. Research is required to further reveal the mechanisms behind nociception, including the possible roles of other neuropeptides in the regulation of nociception.

References

1. Milinkeviciute, G. *Drosophila* as a tool for studying the conserved genetics of pain. *Clinical Genetics* 82. October 2012. Pages 359-366.
2. Tracey et al. *painless*, a *Drosophila* Gene Essential for Nociception. *The Cell* 113. 18 April 2003. Pages 261-273.