



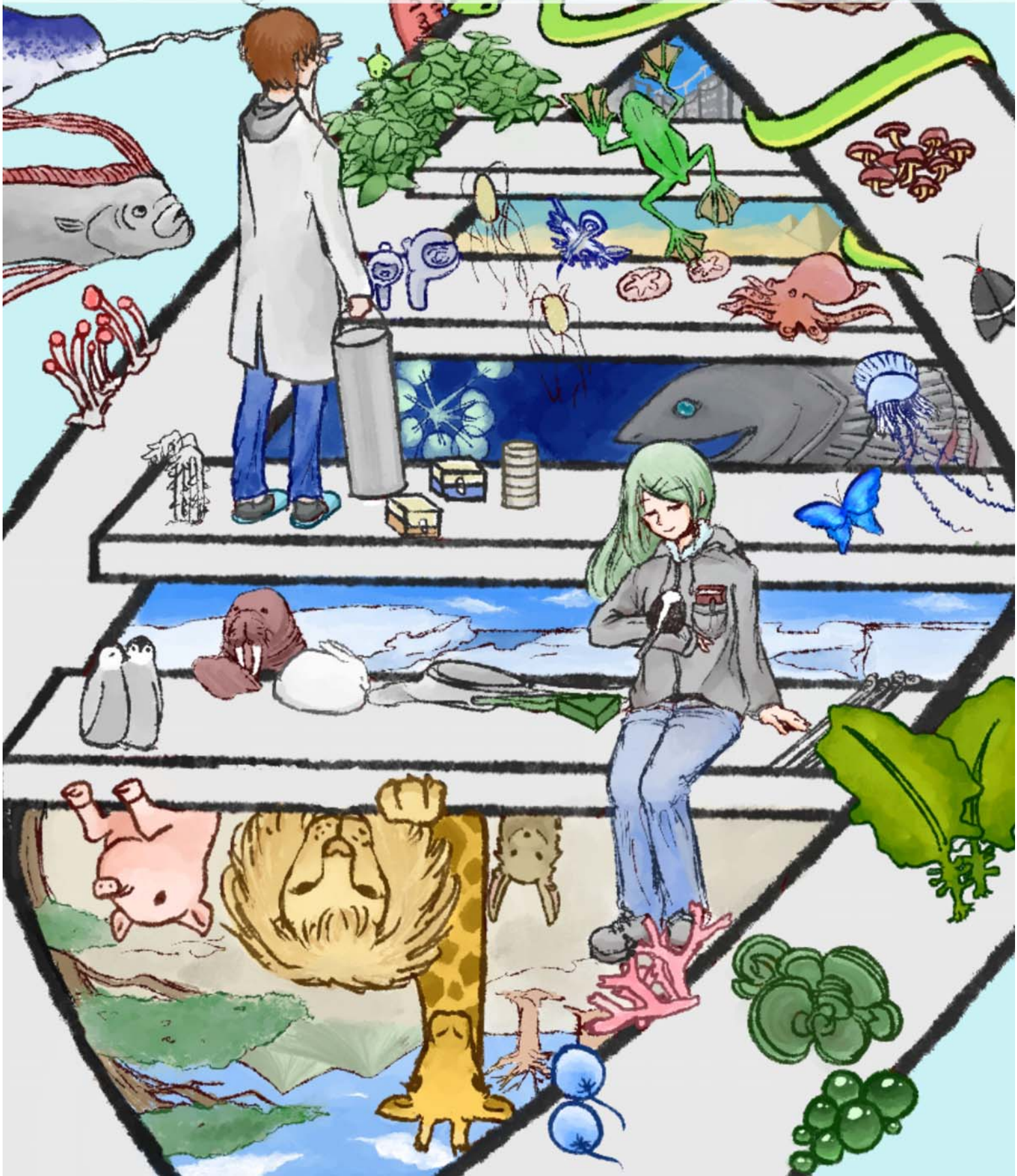
つくば生物ジャーナル

生物学類

Tsukuba Journal of Biology

Vol.17 No.1 January 2018

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.17 No.1 January 2018
www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

平成 29 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 30 年 2 月 10 日

筑波大学
生物学類

第一会場 2B411教室

9:40—9:55	荒井 玲奈	女性ホルモンでおばけ退治!!～昆虫エクジステロイド生合成調節因子 Noppera-boの生化学的解析～	2
9:55—10:10	須藤 裕子	脳に第三の眼は存在するのか：マウス小脳における光受容能の検証	3
10:10—10:25	本間 龍之輔	マウス桿体視細胞におけるホヤオプシンの機能解析	4
10:25—10:40	脇田 一樹	マウス脳に発現する光受容体の機能解析	5
10:40—10:55	安田 佳世	成体イモリの肢再生メカニズムの再検証	6
11:10—11:25	梅澤 明寛	ゾウリムシの誘引物質に対する化学集合	7
11:25—11:40	李 倩	ゾウリムシの刺激応答性に対する膜流動性修飾物質の効果	8
11:40—11:55	香山 瑞生	ショウジョウバエの始原生殖細胞における体細胞分化抑制遺伝子 (<i>nanos, pgc</i>)の機能解析	9
11:55—12:10	三浦 博樹	ショウジョウバエ始原生殖細胞の性決定に關与する新規遺伝子の探索	10
12:10—12:25	Nosaka Dvnye Issei	CRISPR/Cas9-based mutagenesis of neuropeptide receptors potentially involved in nociception in <i>Drosophila melanogaster</i>	11
13:15—13:30	及川 泉	進化的に保存された神経ペプチドDSKを介した痛覚制御メカニズム	12
13:30—13:45	遠藤 優佳	食品由来Nrf2活性化剤による酸化ストレス緩和能のゼブラフィッシュを用いた検討	13
13:45—14:00	上田 遥菜	パラインフルエンザウイルスMタンパク質のウイルス粒子形成における機能解析	14
14:00—14:15	大澤 優生	リサイクリング関連因子Xのマウス精子形成における機能解析	15
14:15—14:30	亀山 響子	鳥インフルエンザウイルスの哺乳類適応を規定する組織特異的な自然免疫抑制機構	16
14:30—14:45	豊島 理	ダイナミックに変動する報酬価値をコードする線条体ニューロンの探索	17
15:00—15:15	中井 彩加	人為的レム睡眠操作マウスの解析によるレム睡眠の機能の探索	18
15:15—15:30	Park Minjeong	<i>Sik1, Sik2</i> 点変異マウスの作製	19
15:30—15:45	松尾 壯一	Concanavalin A誘導性肝炎における免疫受容体DNAM-1の機能解明	20
15:45—16:00	森口 佳奈	異なる脂肪組織由来間葉系幹細胞の乳がん細胞転移能に対する影響	21
16:00—16:15	LI JINGYUE	多能性幹細胞から副腎性腺原基 (Adreno-gonadal primordium) への分化誘導条件の探索	22

第二会場 2B412教室

9:40—9:55	木田 裕哉	REMI法を用いた細胞性粘菌集合異常株の探索	23
9:55—10:10	田中 結衣	細胞性粘菌カフェイン耐性株の原因遺伝子の探索	24
10:10—10:25	宮下 拓也	細胞集団運動のソリトン波形成における責任遺伝子の探索と発現解析	25
10:25—10:40	仁平 隆太	点突然変異型mtDNAを有するマウスの酸化ダメージの臓器特異性	26
10:40—10:55	山田 亮仁	ミトコンドリアDNAにランダムな突然変異を有するマウスの病態形成に及ぼすミトコンドリア内タンパク質分解の影響	27
11:10—11:25	河合 あかり	HMGCoA還元酵素ノックアウト細胞におけるミトコンドリア機能の解析	28
11:25—11:40	小谷 知広	病原性突然変異型mtDNAがB細胞の分化・機能に及ぼす影響の解析	29
11:40—11:55	須田 和樹	ミトコンドリア機能不全マーカーに関する基礎研究	30
11:55—12:10	遠坂 尚子	香り成分が線虫の生理作用に与える影響	31
12:10—12:25	太田和 勇輝	クエン酸による線虫のストレス耐性作用の解析	32
13:15—13:30	十河 衿香	脂肪細胞 3T3-L1 における琥珀エタノール抽出物の生理作用解析	33
13:30—13:45	平川 勝彦	酵母遺伝学を用いたゲノム刷り込み制御因子の探索	34
13:45—14:00	宮嶋 優	CRISPR/Cas系による <i>cis</i> 配列反転マウスを用いたゲノム刷り込み制御機構の解析	35
14:00—14:15	堀 早苗	微生物によるグリコシド代謝に関する研究	36
14:15—14:30	宮尾 歩実	嫌気性微生物によるポリフェノール代謝に関する研究	37
14:30—14:45	吉田 香里	アクチン阻害剤の構造活性相関検討	38
15:00—15:15	三代 侑平	紅茶由来および人工合成した高分子ポリフェノールが代償性筋肥大に与える影響	39
15:15—15:30	萩田 美乃里	テトラヒメナのアクチンアイソフォームの繊毛内の機能解析	40
15:30—15:45	牧野 瑛美	繊毛虫テトラヒメナの CDK アイソフォームの機能解析	41

第三会場 2C404教室

9:40—9:55	小沼 萌	カオジロショウジョウバエ類4種における分類形質の比較検討	42
9:55—10:10	濱 遙介	ペナン島のアナナスショウジョウバエ類における形質置換の可能性	43
10:10—10:25	岩本 亮介	見せてもらおうか、縮退進化したミトコンドリアの性能とやらを	44
10:25—10:40	上原 忠晃	オピストコンタ早期分岐系統におけるオートファジー関連遺伝子の網羅的探索	45
10:40—10:55	清野 晃平	放射光X線マイクロビームを用いた細胞核限定的照射による細胞致死効果	46
11:10—11:25	竹山 優花	アカマツ林におけるササ群落のCO ₂ 吸収量の推定	47
11:25—11:40	宮崎 裕希	水の安定同位体比を用いたアカマツ・シラカバ・ミズナラ稚樹の吸水特性に関する研究	48
11:40—11:55	高橋 俊輝	海洋表層におけるアセトンの微生物学的生成・分解に関する実験的解析	49
11:55—12:10	竹内 裕貴	CO ₂ シープにおける付着藻類の脂肪酸量および組成	50
12:10—12:25	佐々木 悠子	海洋酸性化はオカダウミウシ <i>Vayssierea felis</i> の行動様式に影響を及ぼすのか？	51
13:15—13:30	中泉 雄登	DTWとDPを用いたMPA：Voronoi図を添えて	52
13:30—13:45	向峯 遼	ちーがーうーだーろー！これ以上私の適応度を下げるな！！	53
13:45—14:00	井上 太貴	草原の時間的連続性が植物と蝶類の種組成に与える影響	54
14:00—14:15	河合 純	進入初期ニホンジカ <i>Cervus nippon</i> の採食生態：餌植物嗜好性と生息密度影響	55
14:15—14:30	田中 千聡	クロマルハナバチにおける花粉摂取と卵巣発達	56
14:30—14:45	渡辺 黎也	水田管理と周辺環境が水生昆虫群集に与える影響	57
15:00—15:15	山本 鷹之	広腰亜目（昆虫綱：膜翅目）の発生学的研究を目指して—完全変態類のグラウンドプランの再構築—	58
15:15—15:30	浅井 仁	塩濃度の低下が平板動物に与える影響	59
15:30—15:45	横山 広真	顎の進化を無顎類の発生から探る	60

第四会場 2C410教室

9:40—9:55	熊岡 未奈子	液体振盪発芽実生によるユーカリ属林木の新規形質転換法の開発	61
9:55—10:10	町野 弘明	水耕栽培によるユーカリ挿し木からの不定根発生評価系の開発	62
10:10—10:25	澁谷 美乃里	ベタレイン合成経路導入による新規花色アサガオ作出に関する研究	63
10:25—10:40	藤原 麻衣	アサガオの頂端花芽形成に関わる <i>TFL1</i> 遺伝子の研究	64
10:40—10:55	本山 星香	午後開花アサガオの光周性花成と開花時刻の解析	65
11:10—11:25	飯島 優香	交差反応性食物アレルギー治療へ向けたダイズアレルゲンの生産系に関する研究	66
11:25—11:40	林 遼馬	植物を用いた医薬タンパク質の生産に関する研究	67
11:40—11:55	山田 侑希	花粉症治療に向けたシラカバ花粉アレルゲンBetv1の生産系に関する研究	68
11:55—12:10	下城 彩	シアノバクテリアの推定Cl ⁻ 輸送体をコードする <i>slr0753</i> 遺伝子変異体に関する研究	69
12:10—12:25	森岡 諒	<i>Nostoc punctiforme</i> のスキトネミン合成の制御に関する研究	70
13:15—13:30	崔 リベカ	ニンジンのストレス不定胚誘導系を用いた新たなゲノム編集手法の開発	71
13:30—13:45	高山 由妃	L-DOPAの低濃度領域における植物生育抑制作用の機序	72
13:45—14:00	松井 祐美	ビワの花の含窒素香气成分生合成に関与するCYP79について	73
14:00—14:15	星野 元泉	根粒菌の侵入形式を決定するミヤコグサの新規遺伝子 <i>LAN</i> に関する研究	74
14:15—14:30	三澤 文香	根粒共生における窒素応答に関わる <i>nitrate unresponsive symbiosis 3</i> (<i>nrsym3</i>) 変異体の解析	75
14:30—14:45	福田 耕大	クロララクニオン藻の高発現機能未知タンパク質に関する研究	76
15:00—15:15	坂梨 瑠南	菅平高原における変形菌類のフロラ	77
15:15—15:30	森 政貴	カニクサ属植物に寄生するサビキンの分類学的再検討と系統位置の推定	78
15:30—15:45	柿澤 侑花子	新奇捕食性バクテリアの運動とアクチン様タンパク質に関する研究	79
15:45—16:00	Renina Navarro	Photosynthesis and biomass allocation in parasitized clover plants	80
発表なし	末満きらり	乾癬モデルマウスを用いた新規VEGFに関する基礎研究	81

平成 29 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

町野 弘明

亀山 貴都

仮屋山 博文

川本 晟司

黒木 祥友

桑原 ひかる

杉原 翔吉

高瀬 由布果

瀧澤 幸史

谷口 友梨

李 知彦

表紙画

山田 侑希

表紙画の解説：

テーマは「二重らせんを紐解けば…」です。

DNA の二重らせん構造を中心に、自分が「生物」と聞いてイメージしたものをのびのびと自由に描きました。

表紙画を描く機会をくださった町野弘明さん、制作にあたって助言してくださった田中千聡さん、相澤良太さん、本当にありがとうございました。

平成 29 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあたって

町野 弘明 (筑波大学 生物学類 4 年)

とうとう、卒業研究発表まであとわずかという時期になりました。ふと今までを思い返すと、あの時あすれば・・・なんて後悔もまま残っていますが、この筑波で過ごした大学生活は、勉学でも、そのほかの様々な活動においても、今までで最も規模が大きく、最も刺激的で、そして最も早く過ぎ去った 4 年間となりました。特にこの生物学類においては、様々な発見や体験にあふれた日常を過ごすことができたと感じています。終わらない実験や観察に途方に暮れた日、泣きそうになりながらレポートの提出に明け暮れた日、友達同士で集まってテストの作戦を練った日など、かなり苦労した時期もありました。そんな中で、雄大な自然に心奪われたり、生物の多様性に驚かされたり、苦労して取ったデータをうまく発表できたりといったような、感動する瞬間も多々ありました。ほかの 4 年生も、多かれ少なかれそういった経験には覚えがあるのではと思います。

そんな大学生活の集大成の一つが、この卒業研究発表会です。今まで自分が見聞きし、体験した中で興味深く感じた物事をさらに掘り下げていく。その作業が卒業研究なのだと私は感じています。しかし、実験し、データを集めて解析し、様々なアドバイスをいただきながら形にしていくという流れの中で、多くの卒業研究生が、データがうまく集まらない、実験が思うように進まないなどの辛い経験をしたと思います。またその一方で、きれいなデータが取れたり、発表がうまくできたりといったこともあったと思います。そんなこの一年間の喜怒哀楽が、卒業研究には詰まっています。その思いも含めて、自分たちが何に興味を持ち、どんなことが分かったのかを、卒業研究生一同、発表を聞いてくださる方々に精一杯お伝えしたいと思います。ぜひ、多くの発表を聞いていただいて、そのことを感じていただければと思います。

また、この卒業研究発表会を開催し、運営を行ってくれた 2、3 年生には、本当に感謝しています。生物学演習が大詰めのタイミングで様々な調整やミーティングの運営など、なかなか大変だったと思います。卒業研究発表当日は忙しいかもしれませんが、来年の参考になる部分をできるだけ吸収してほしいなと思います。そのほかの生物学類生も、多くの発表を聞いて、自分の興味範囲を広げてほしいと思います。そして発表で気になったことは、質疑応答や発表後にどんどん質問してください。発表する僕ら側からしても、後輩から質問が来るととてもうれしいです！

最後になりましたが、ご指導いただいた先生方、研究にご協力してくださった方々には、卒業研究生全員、誠に感謝しております。本当にありがとうございました。皆様のご指導やご協力のおかげで、この 1 年間大きく成長できたと感じています。最後にふさわしい、悔いのない発表をいたしますので、温かい目で見守っていただければと思います。

つくばという土地は、生物学類にとってとても有意義な場所であると私は考えています。もちろん、生物学類でも生物が好きではない人がいると思いますが、それでもここまで自然を身近に感じられる大学もそうそうないのではないかなと思います。この筑波大学で勉強や研究、様々な活動ができたことを感謝しながら、活発な、そして聞いている人、発表する人、運営する人が楽しめる研究発表を行いたいと思います。

Communicated by Seiichi Furukawa, Received December 28, 2017.

女性ホルモンでおばけ退治！！～昆虫エクジステロイド生合成調節因子 Noppera-bo の生化学的解析～

荒井怜奈（筑波大学 生物学類）

指導教員：丹羽隆介（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

昆虫の脱皮と変態の誘導の制御には、ステロイドホルモンであるエクジステロイドが中心的な役割を果たす。エクジステロイドの生合成と生理作用は節足動物及び一部の線形動物に限定されており、哺乳動物には認められていない。よって、エクジステロイド生合成を選択的に阻害する薬剤は、ヒトを含む哺乳動物に無害な農薬の開発に繋がる可能性がある。

所属研究室において先年同定された Noppera-bo (Nobo) は、エクジステロイド生合成を担う器官である前胸腺において、前駆体であるコレステロールの細胞内挙動を調節するグルタチオン *S*-転移酵素(以後、GST) である。 *Drosophila melanogaster* (以後、ショウジョウバエ) で *nobo* 機能欠損個体は、エクジステロイド生合成不全を原因として胚性致死になる[1]。所属研究室は、すでに可溶化 Nobo 組換えタンパク質の調製方法、および人工蛍光基質 3,4-DNADCF を用いた組換え Nobo の試験管内酵素活性アッセイ系を確立している[2]。また、所属研究室において、このシステムを利用した酵素活性阻害剤の大規模スクリーニングが行われ、Nobo に対する阻害剤の1つとして女性ホルモンである β -エストロジオールが同定されている[2]。さらに、ショウジョウバエ由来の Nobo (以後、DmNobo) とグルタチオン (以後、GSH)、そして β -エストロジオールの共結晶を X 線結晶構造解析した結果、DmNobo の 113 番目のアスパラギン酸残基が β -エストロジオールと水素結合を形成することが示唆されている (小祝・稲葉ら、未発表)。しかし、この水素結合が β -エストロジオールの阻害活性に必須であるかどうかはまだ検討されていない。そこで私は、これらの先行的知見および技術に基づいて、DmNobo の阻害活性のメカニズムについて生化学的解析を行った。

【材料と方法】

(1)DmNobo の精製

大腸菌で DmNobo (野性型および変異型)を発現させるために His タグ配列をもつ PColdII ベクター(タカラバイオ)に *Dmnobo* 遺伝子のコーディング配列を挿入したコンストラクト(pColdII-DmNobo)を作製した。これを大腸菌株 BL21-CodonPlus -RIL Competent Cells (Agilent) に導入し、37°Cで形質転換体を培養した。培養した菌体は細胞粉碎した。その後、遠心分離によって回収した上清を HiTrap TALON カラム (GE Healthcare) を使ったアフィニティクロマトグラフィーに供することで、DmNobo を単離して精製を行った。

(2)3,4-DNADCF を用いた酵素活性アッセイ

3,4-DNADCF は、GST 活性依存的に GSH と結合すると、蛍光強度が増加する[2]。酵素溶液(100 mM NaPi Buffer pH6.5, 0.01 % Tween-20, 2% DMSO, 2 mM GSH)と基質溶液(100 mM Napi Buffer pH6.5, 1 mM 3,4DNADCF) を 1:1 で混和した後、一定時間ごとに蛍光強度を測定し、DmNobo 活性を評価した。

(3)ショウジョウバエ *nobo* ノックアウト個体への *DmNobo*(野生型および変異型)遺伝学的レスキュー実験

ショウジョウバエ *nobo* ノックアウト個体内で DmNobo(野生型および変異型)を発現させるために GAL4-UAS システムを用いた[4]。これは酵母由来の転写因子 GAL4 をショウジョウバエの特定のエンハンサーの制御下で発現させることで、GAL4 結合配列である UAS の下流に配置した遺伝子を誘導させるシステムである。本研究では *nobo* ノックアウト背景で前胸腺特異的 GAL4 ドライバーである *phm-GAL4* と野生型 *DmNobo* あるいは変異型 *DmNobo* 遺伝子を発現させるための UAS システムを掛け合わせることで遺伝学的レスキュー実験を行った。なお、ショウジョウバエは寒天、コーンミール、グルコース、乾燥酵母を煮詰めて混ぜ合わせたものを標準エサとして、25°Cもしくは17°Cで飼育した

【結果・考察】

私は、 β -エストロジオールとの水素結合を生じさせない DmNobo 変異分子として、113 番目のアスパラギン酸残基をアラニンに変えた変異型 DmNobo(以後 D113A 変異 DmNobo)を作出した。

D113A 変異 DmNobo 組換えタンパク質は野生型 DmNobo 組換えタンパク質と同程度の GST 比活性をもっていたにも関わらず、 β -エストロジオールに対する阻害活性は失われていた。よって、DmNobo が β -エストロジオールに対する阻害活性をもつには 113 番目のアスパラギン酸との水素結合が必要であることが分かった。

また、野生型 DmNobo 組み換えタンパク質の β -エストロジオールに対する阻害様式を調べるために、 β -エストロジオールの非存在下と存在下で Line weaver-Burk plot(LB-plot)を引いた。その結果、野生型 DmNobo 組み換えタンパク質は、 β -エストロジオールの非存在下と存在下でミカエリス定数(Km)に変化はなく、最大反応速度(Vmax)だけが変化した。このことから野生型 DmNobo 組み換えタンパク質は非競合阻害の様式で β -エストロジオールに対する阻害活性を起こしていることが示唆された。

さらに現在、*nobo* ノックアウト個体に D113A 変異 *Dmnobo* を発現させたショウジョウバエシステムを作製し、DmNobo の 113 番目のアスパラギン酸の生体内における役割を検討するための実験も行っている。

これらの一連の知見は、将来的な Nobo をターゲットにした新規農薬の開発と作用機序の解明に向けた基礎的データとして重要な意義を持つものと考えられる。

【参考文献】

1. Enya S et al. *Scientific Report* 4: 6586 (2014) .
2. Fujikawa et al. *ChemComm* 51: 11459-11462 (2015) .
- 3.丹羽. 化学と生物 54: 508-512(2016) .
4. Brand & Perrimon. *Development* 118: 401-415 (1993) .

脳に第三の眼は存在するのか：マウス小脳における光受容能の解析

須藤 裕子（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）

1. 導入

動物は周囲の空間的情報を得るための視覚情報として光を利用するだけでなく、概日リズムの光同調などの非視覚的情報として光を利用している。光受容を担うセンサータンパク質として知られる G タンパク質共役型受容体 (GPCR) オプシンは、その補因子レチナールのシス型からトランス型への光異性化が引き金となり、G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達系の活性を引き起こす。オプシンは大きく 7 つのサブファミリーに分類されるが、視覚情報の受容を担うオプシン類と非視覚情報の受容を担うオプシン類に分類される。視覚情報の受容を担う桿体オプシンや錐体オプシンは、網膜の桿体および錐体視細胞の外節に存在し光受容を行うのに対して、非視覚情報の受容を担うオプシン類は網膜視細胞以外の組織において発現が認められる。哺乳類以外の脊椎動物においては、第三の目といわれる松果体などの脳部位が光受容能をもつことが知られているが、哺乳類の松果体は光受容を失っており脳組織の光受容能の有無はよく分かっていない。

非視覚型オプシンファミリーの一つであるオプシン 3 (Opn3、別名エンセファロプシン) はマウスの脳に発現するオプシンとして 1999 年に発見された(*1)。それ以降、他の動物でもオプシン 3 のホモログが見つかっており、オプシン 3 は多くの動物において眼だけでなく脳などといった他の組織でも発現することから、非視覚型の光情報処理と関わるオプシンの一つと考えられる。しかし、マウス脳においてオプシン 3 の mRNA の発現が報告されているものの、生体における光受容能の有無やその役割に関してはよく分かっていない。

眼に比べ物理的に光情報が制限されるマウスの脳は、果たして光受容能をもつのであろうか。本研究ではマウス小脳の神経細胞の光受容能を調べる目的で、急性脳スライス標本を作製しカルシウムイメージングで光依存的な活動を調べた。また、マウス小脳におけるオプシン 3 タンパク質の発現パターンを調べた。

2. 材料と方法

カルシウムイメージング

雌雄区別なく生後 7~21 日の野生型 ICR 系統マウスを一晩暗順応させた。その後赤色光下でマウスを頸椎脱臼し脳の急性スライス標本の作製を行った。摘出した脳は 95%酸素/5%二酸化炭素でバブリングした 4°C の Modified Ringer 溶液 (Choline Chloride 120 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 8 mM, NaHCO₃ 28 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 25 mM) で満たされたチャンバーへ移した。振動刃マイクロトームで厚さ 250 μm の冠状断の脳切片を作製し、95%酸素/5%二酸化炭素でバブリングした 30°C の Normal Ringer 溶液 (NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 11 mM) で切片を 30 分間インキュベートした。その後、暗所でカルシウム指示薬 CaSiR-1-AM (終濃度 10 μM) および全トランスレチナール (終濃度 10 μM) 含む溶液で 30 分間浸漬した。これ以降は赤外光下で実験を行った。脳切片を顕微鏡のチャンバーに置き、青色 (極

大波長; 488nm) の LED 光を 1/100 倍、1/10 倍、1 倍の光強度の順で 5 秒間照射した際の蛍光輝度を CMOS カメラで記録した。取得画像の解析は、Icy ソフトウェアを使用して 1 画像あたり 20~30 個の細胞における蛍光輝度の相対値を求めた。蛍光強度の相対値は、光刺激の蛍光輝度 (ΔF) を光刺激前の蛍光輝度 (F) で割った $\Delta F/F$ を計算した。

免疫組織化学法

野生型 ICR 系統と野生型 C57BL/6J 系統の成体メスマウスを麻酔下 4%パラホルムアルデヒド(PFA)/リン酸緩衝液(PB)で灌流固定後、摘出した脳と眼球を 4%PFA/PB に 4°C で一晩固定した。30%スクロース/リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に 4°C で一晩漬け、包埋容器に標本を移して Tissue-Tek を流し込み凍結した。クライオスタットで脳と眼球どちらも厚さ 20 μm で脳は冠状断、眼球は横断の切片を作成した。

凍結切片は 100%メタノールで 30 分間処理し、10%ヤギ血清を含む PBS に室温で 2 時間ブロッキングし、抗オプシン 3 抗体 (1:500) と抗トランスデュシン抗体 (1:1000) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し Alexa568 蛍光標識二次抗体 (1:1000) と Alexa488 蛍光標識二次抗体 (1:1000) を用いて室温で 2 時間インキュベートした。核 DNA は DAPI で染色した。倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察、イメージングソフトウェア (Olympus cellSense) を用いて画像を取得した。

3. 結果と考察

生後 7~21 日のマウス小脳のスライス標本において、カルシウム蛍光指示薬の効率的な細胞内への取り込みが観察された。蛍光色素の取り込みが確認された細胞について光刺激による蛍光輝度の変化を測定した。これまで 317 個の細胞を調べたところ、6 つの細胞において光刺激依存的な蛍光輝度の上昇が確認された。その内 1 つの細胞において光強度依存的な輝度変化を示す細胞が確認された。この結果は、マウス小脳において光受容能を持つ細胞が存在する可能性を示唆している。記録を行った細胞のうち光依存的な応答を示した細胞の割合はわずかであったが、今回実験で用いた若齢のマウスにおいてはオプシン 3 を発現する細胞の割合が少ないという報告と一致する(*1)。小脳におけるオプシン 3 の発現は週齢が上がるにつれてより広範囲で認められるため、現在成熟個体の小脳においても同様にカルシウムイメージングの測定を行うべく実験条件の検討を行っており、その結果を発表会で報告したい。また、マウス脳においてオプシン 3 のタンパク質が発現している部位について免疫組織化学を用いて調べた結果も合わせて報告する。

4. 参考文献

*1 Blackshaw S and Snyder H, *The Journal of Neuroscience* 19, 3681-3690 (1999)

マウス桿体視細胞におけるホヤオプシンの機能解析

本間 龍之輔 (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】

脊椎動物の網膜には、暗所での光受容に機能する桿体視細胞と明所での光受容に機能する錐体視細胞が存在する。これら視細胞では、発色団レチナルとタンパク質であるオプシンからなる視物質が光受容すると、細胞内シグナル伝達過程を介して光応答が生じる。脊椎動物の網膜視細胞は高い光感受性をもつが、これはオプシンが視細胞の光受容部位である外節に高密度に局在しているのに加え、光異性化した視物質が高効率にシグナル伝達系を活性化することができることに起因している。このような特性はオプシンファミリーの中でも、視覚を担うオプシン類に特有の性質であることから進化の過程で獲得されたものと考えられる。

ホヤは脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物として知られ、その幼生は脊索や神経管を持つなどの脊椎動物の特徴を有することから、脊椎動物の進化を考える上でよく利用される。ホヤ幼生には光受容の器官である眼点にはレンズと繊毛型視細胞があり、明暗条件の変化より起きる遊泳行動に関与することが知られている。眼点の視細胞にはホヤオプシン Ci-opsin1 が発現している。ホヤの Ci-opsin1 は脊椎動物の視細胞のオプシン類に近縁であり、吸収極大波長など機能的に類似する点も多い。脊椎動物に近縁であるホヤが持つ Ci-opsin1 の機能解析は、脊椎動物のオプシンの特性がどのような過程で形成されたかを探る上で重要である。このような観点から、Ci-opsin1 を脊椎動物のオプシンと生理的条件下で比較することを試みた

本研究では、ホヤの一種のカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) のオプシンである Ci-opsin1 をマウスの桿体視細胞に発現させ、電気生理学的に機能を解析することで、脊椎動物の視細胞外節へのオプシンの輸送及びシグナル増幅効率におけるオプシンの進化的意義を明らかにすることを目指し実験を行った。

【材料と方法】

(1) マウス網膜における生体内ゲノム編集

マウスの網膜に対して、*in vivo* エレクトロポレーション法によって遺伝子導入を行った。Ci-opsin1 遺伝子のドナーベクターに加え、Cas9 及びガイド RNA ベクターを導入した。ドナーベクターには、Ci-opsin1 遺伝子、内部リボソームの結合サイト IRES、赤色蛍光タンパク質 mCherry の配列を順に結合させた。これらの配列が Cas9 とガイド RNA を介してマウスロドプシン遺伝子座に部位特異的に挿入される。部位特異的なゲノム編集が行われた細胞では、mCherry の蛍光が確認される。なお、Ci-opsin1 遺伝子はホヤの幼生から RNA を抽出しクローニングをおこなった。

マウスは、ICR 系統の雌雄を問わず用いた。生後 24 時間以内のマウスの眼を麻酔下で切開し、露出した眼球の角膜に穴を開け、プラントエンド針を網膜と強膜の間まで挿入し、プラスミドベクターを含む PBS 溶液 (終濃度 5 µg/µL) を 0.5 µL 注入した。注入した眼を陽極側にしてエレクトロポレーターで電気刺激を与えベクターを網膜神経細胞に導入した。これにより、マウスの桿体視

細胞のオプシンをノックアウトし、Ci-opsin1 を発現させることが可能になる。

(2) 免疫組織化学

遺伝子導入を行ったマウスが成体になった後 (5~6 週齢) に、インジェクションを行った眼球を摘出し、実体顕微鏡下で mCherry の蛍光が確認された眼球をスクリーニングし、20 µm の組織切片を作成した。この切片に対して、10%正常ヤギ血清/PBS でブロッキングを行い、一次抗体として抗ロドプシン抗体及び抗 Ci-opsin1 抗体を処理し、二次抗体溶液を処理した。その後 DAPI による核染色を行い、倒立型蛍光顕微鏡 (Olympus 社 IX83) により蛍光観察を行った。網膜はバックグラウンドが高い組織であるため、マウス網膜アセトンパウダーによる処理を抗 Ci-opsin1 抗体を含む血清に行い Ci-opsin1 への抗体の特異性を高めた。

【結果と考察】

網膜切片の蛍光観察より、全身性の CAG プロモーターにより EGFP を発現するベクターを合わせて遺伝子導入を行った場合には、EGFP の蛍光は桿体視細胞以外の内顆粒層の双極細胞にも確認されたが、mCherry の蛍光は視細胞層にのみ確認された。このことから、導入したドナーベクター配列はロドプシンの遺伝子座に部位特異的に挿入されているといえる。

また、mCherry が発現する桿体視細胞において外節の形成が確認された (図 1)。オプシンが発現していない桿体視細胞では外節は正常に発達しないが、mCherry が発現する桿体視細胞の形態観察から外節の形成が確認されたことから、観察した桿体視細胞では Ci-opsin1 が発現し、外節に正常に輸送されていることが示唆される。抗体を用いた免疫染色では桿体視細胞における Ci-opsin1 特異的な蛍光は現時点では確認できていないが、染色条件の検討を行っている。

【展望】

mCherry 陽性の桿体視細胞の外節の形成が観察されたことから、導入した Ci-opsin1 が発現し外節への輸送が適切に行われていることが示唆される。免疫染色条件の検討することで外節における発現を確認したい。また、mCherry 陽性桿体視細胞において、部位特異的な遺伝子改変の遺伝子型を調べる必要がある。そのため、mCherry 陽性桿体視細胞に対して 1 細胞 RT-PCR を行うことでゲノムの遺伝子型を調べていく予定である。さらに、パッチクランプ法などの電気生理学的手法を用い、Ci-opsin1 を発現する細胞の生理機能を明らかにしたい。

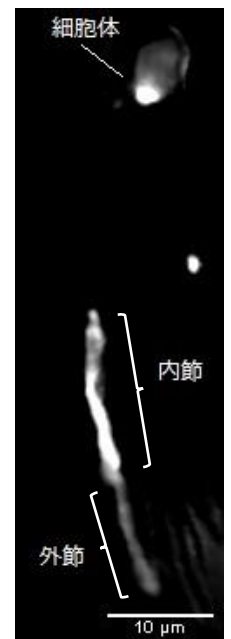


図 1 mCherry が発現する桿体視細胞

マウス脳に発現する光受容体の機能解析

脇田 一樹 (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】

我々は、外界の知覚や記憶の大部分を視覚に依存している。多くの脊椎動物は眼の網膜に存在する視物質を受容体として光を受容し電気エネルギーに変換し、視覚情報として利用している。視物質は補因子レチナールとオプシンというタンパク質で構成される。オプシンの中でもロドプシンが広く知られているが、1999年にマウスの小脳での存在が報告されたオプシン 3 (エンセファロプシン) という新規オプシン遺伝子は、眼以外の組織で発現がみられることから、非視覚的な光情報の利用に関与している可能性が示唆された。哺乳類における非視覚型のオプシンとしては、瞳孔反射や概日リズムの光同調にかかわるオプシン 4 (メラノプシン) が精力的に研究されその機能の詳細が知られているが、オプシン 3 については魚類や昆虫、環形動物での発現が報告されその分子特性が明らかにされているものの、その生体における機能については、いまだ不明な点が多い。マウス脳におけるオプシン 3 の生理機能を明らかにするためには、脳スライス標本のオプシン 3 を発現する細胞に対して暗条件下でパッチクランプ法を行い、光応答を電気生理学的に測定するのが有用であると考えられる。

そこで本研究では、まず、オプシン 3 の発現が比較的広範囲にみられるマウスの小脳において、その生理学的役割を検証する目的で、小脳スライス切片を作製し電気生理学的測定を行った。

また、オプシン 3 が発現する割合が少ない部位においても、細胞を同定し電気生理測定を可能にするためには、オプシン 3 陽性の細胞を蛍光タンパク質で標識させる必要がある。そこで、オプシン 3 の上流配列に蛍光タンパク質をつなげたベクターをエレクトロポレーション法でマウス脳へ導入することを試みた。

【材料と方法】

スライス標本の作製

マウスの非近交系 ICR マウス成体を頸椎脱臼し、頭蓋骨を切開して小脳を摘出した。脳は、酸素 95%-二酸化炭素 5% で平衡化した 4°C の Modified Ringer 溶液 (Choline Chloride 120 mM, KCL 3 mM, MgCl₂ 8 mM, NaHCO₃ 28 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 25 mM) で満たされたチャンバーに移し、振動刃マイクローム (Campden instrument, 5100mz) を用いて 250 μm のスライス標本を作成した。スライス標本は酸素 95%-二酸化炭素 5% で平衡化した 30°C の Normal Ringer 溶液 (NaCl 125 mM, KCL 2.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 8 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 11 mM) 中で 30 分間培養した後に使用した。

スライス標本への遺伝子導入

遺伝子導入は 1 μg/μL の DNA を含む HBSS 溶液に入れたスライス標本を、両側を円形電極 (直径 5 mm) で挟み、エレクトロポレーション装置 (ネッパジーン, NEPA21) を用いて行った。電気刺激は 10~15 V、5 ms の矩形パルスを正負の極性で 5 回ずつ与えた。エレクトロポレーションを行ったスライス標本は 1 晩培養し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。CAG プロモーター

に EGFP 遺伝子をつなげたベクター及びオプシン 3 遺伝子の上流配列と蛍光タンパク質を結合したベクターを構築した。

ホールセルパッチクランプ法

作製したスライス標本に対して、ホールセル/穿孔パッチクランプ法を利用して電気生理学的解析を行った。パッチクランプの記録電極に使用したガラス管は電極ブラー (Sutter instrument, P-97) を用いて、電極の抵抗値が 8~15 MΩ ほどのものを作製した。マニピュレータを操作して、記録電極を IR-DIC 可視化した細胞体に近づけた。記録電極内には K⁺電極内用液 (K-gluconate 112 mM, K₂SO₄ 10 mM, HEPES 5mM, KCl 15 mM, NaCl 10 mM, MgATP 4 mM, Na₃GTP 0.3 mM, pH 7.2) に β-escin を加えた溶液を満した。増幅器 (Axopatch200B) で記録したデータは、AD コンバーター (Digidata1322) で変換した後パソコンのソフトウェア (pClamp9.2) で取得した。観察の際、スライス標本はガラスボトムディッシュに入れて正立顕微鏡のステージに固定し、酸素 95%-二酸化炭素 5% で平衡化した Normal Ringer を灌流させた。

【結果と展望】

小脳組織においてオプシン 3 陽性の細胞の標識することを目指し、遺伝子導入の条件の確立を行った。まずエレクトロポレーション法による遺伝子導入効率を評価するために、CAG-EGFP プラスミドを用いて、小脳組織に対して遺伝子導入を行った。小脳スライス標本を蛍光顕微鏡で観察した結果、スライス標本の一部の領域において蛍光が観察された。適切に遺伝子導入され、蛍光タンパク質を発現させることが出来たため、引き続き構築中のオプシン 3 上流配列のプロモーター組み込んだベクターを小脳組織へ導入することを試みる。また、小脳スライス標本に対して、穿孔パッチクランプを用いて電気生理学的測定を行った。試みた細胞から光応答の取得には至っていない。現在、より多くの細胞が生理的な活性を保持した状態で測定を行えるように、スライス標本の作製条件の再検討をおこなっている。研究発表会において、その研究成果を報告する予定である。

成体イモリの肢再生メカニズムの再検証

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

【背景と目的】

両生類有尾目に属するイモリ科は卓越した再生能力を持ち、再生のモデルとして研究が進められている。肢や尾、眼の水晶体や網膜などのあらゆる組織を一生のうちに何度でも再生させることができる。

私はその中で、肢再生の形態形成メカニズムにおいて、どこでどんな因子がはたらくことにより複雑な3次元構造を形成しているのかについて興味を持った。過去の研究により肢再生で形態形成を司っているのは皮膚中の線維芽細胞であるとされてきた。今回は、皮膚中のどの部分がどんな因子を用いて形態形成に関わっているか、成体のアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いて再検証した。

【方法と結果】

発表会場で報告させていただきます。

ゾウリムシの誘引物質に対する化学集合

梅澤明寛 (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 (*Paramecium caudatum*) は多細胞生物と比べて単純な体制だが、外界の環境情報を受容して、行動反応を起こす。例えば、遊泳中のゾウリムシが障害物にぶつかると、繊毛逆転による後退遊泳を伴う一連の行動反応を示し障害物を回避する (回避反応)。

私はゾウリムシの化学刺激に対する反応に興味を持った。淡水に生息するゾウリムシにとって外液中の化学環境は重要な環境要因であり、外液中の化学物質に対して敏感に反応する。水中を遊泳する生物が示す化学物質に対する行動反応には、化学走性や化学集合が知られている。対象とする化学物質を含む溶液にその生物がより多く分布する時、その物質は誘引物質と呼ばれ、逆に、その物質を含まない方に多く分布する時は忌避物質と呼ばれる。

Van Houten らのグループは三方コックを用いて様々な化学物質に対するゾウリムシの集合を調べ、誘引物質として NH_4Cl 、グルタミン酸、乳酸、ピオチン、忌避物質としてキニーネ、GTP、NBT などを明らかにしている (1992)。しかし、三方コックを用いた方法では、異なる溶液が接する場所でのゾウリムシの行動反応は観察できなかった。その後中里と内藤は、異なる実験系を用いて、ゾウリムシの運動活性と化学集合の関係を明らかにした。

この実験では、Nakazato & Naitoh (1993) の開発したアッセイ法を用いて、ゾウリムシの化学集合を明らかにすることを目的とした。実験には、主に、この方法ではこれまでほとんど検討されていない誘引物質を選んだ。

【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 CaCl_2 , 1 mM Tris - HCl, pH7.4) で3回洗浄し、30分以上順応させた後、実験に用いた。

ゾウリムシの化学物質に対する遊泳行動は2種類の組成の異なる溶液が接するように作られた実験槽で調べた。この実験槽はスライドガラスとカバーガラスを用いて作成した 10 mm × 10 mm × 0.9 mm の2つの空間からできている (それぞれ、標準槽と試験槽と呼ぶ)。標準槽には200–300匹のゾウリムシを含む標準溶液を満たし、試験槽にはゾウリムシを含まない試験溶液を満たした。異なる溶液を満たした2つの槽は、はじめ離れた状態で用意し、実験開始時に結合した。実験開始後、ゾウリムシの遊泳、分布をビデオカメラで記録し、解析した。今回、実験には塩化ナトリウム、グルタミン酸、乳酸、ピオチンの4種類を用いた。

ゾウリムシの集合の程度は、試験槽中のゾウリムシの分布数から標準槽中のゾウリムシの分布数を引き、それを両液槽中のゾウリムシの総数で割った値、化学集合指数 (I_{che}) として表した。両液槽でのゾウリムシの分布が均一なときは I_{che} は0となり、標準槽に完全に偏った場合は-1、試験槽に完全に偏った場合+1の値をとる (マイナスの値の場合負の化学集合、プラスの時は正の化学集合)。

【結果】

ゾウリムシの化学集合反応

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を満たして、ゾウリムシの分布を調べた。標準槽だけに入れたゾウリムシは、溶液の結合と共に両液槽内を移動し、1分以内に両液槽間で均一に分布した。この均一な分布は、記録を続けた4分後まで維持された。この状態では、ゾウリムシの分布が平衡にあると考えられる。

次に5 mM NH_4Cl を試験槽に満たし (標準溶液に5 mM NH_4Cl を溶解、以下同様)、ゾウリムシの分布を調べた。ゾウリムシは溶液を結合した後、両液槽内を移動し、約90秒で分布は一定値を示し、その後維持された (I_{che} ; 0.08)。この濃度の NH_4Cl に対して、ゾウリムシは有意な集合を示さないことを表す。次に、 NH_4Cl 濃度を高くして (10 mM) 同様の実験をおこなうと、ゾウリムシの分布は標準槽側に偏り (I_{che} ; -0.36)、 NH_4Cl に対して負の化学集合を示した。これは、今回の実験系では NH_4Cl はゾウリムシに対して忌避物質として働いていることを示す。

ゾウリムシの1 mM グルタミン酸溶液に対する分布を調べると、約60秒で平衡に達し (I_{che} ; 0.01)、集合は見られなかった。またグルタミン酸の濃度を5 mM にするとゾウリムシの分布は標準槽側に偏り (I_{che} ; -1)、グルタミン酸は忌避物質として働いていることを示す。

ゾウリムシは1 mM 乳酸溶液に対して、約60秒で一定の分布を示した (I_{che} ; 0.41)。従って、1 mM 乳酸に対して、ゾウリムシは正の化学集合を示している。一方、乳酸の濃度を高く (5 mM) するとゾウリムシの分布は標準槽側に偏った (I_{che} ; -0.5)。従って、ゾウリムシは低濃度の乳酸に対しては集合し、高濃度に対しては離散することが明らかとなった。

ゾウリムシのピオチン溶液 (100 μM ~ 1 mM) に対する分布を調べると、約20秒でいったん一定の値 (-0.8等) をとったが、その後 I_{che} は緩やかに上昇し続け0に近づいていった。ピオチンの濃度を5 mM にすると、約60秒でゾウリムシは一様に分布した。

【考察】

今回の実験から、Van Houten らのグループにより報告されているゾウリムシの誘引物質が、多くの場合、今回の実験系では誘引物質として作用していないことが明らかとなった。これは実験系の違いが主な原因であると考えられるが、より詳細な濃度範囲を検討したり、また、集合を生じる行動反応を解析するなどして、自然界でゾウリムシが誘引される物質であるかどうかについて、考察する必要がある。特に、濃度により忌避物質から誘引物質に切り替わる乳酸に関しては詳細な検討が必要である。

Van Houten, J.(1992). A.Rev.physiol. 639-663

Hiroyuki Nakazato, Yutaka Naitoh.(1993).exp.Biol.176, 1-10

ゾウリムシの刺激応答性に対する膜流動性修飾物質の効果

李 倩 (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

淡水に生息する単細胞生物ゾウリムシは、一つの細胞が一つの生き物として機能している。そのため、外界の様々な刺激を受容し、速やかに適切な反応を示すことで、生存している。外界の刺激に反応するためには細胞膜の存在が不可欠であり、様々な刺激は受容体と呼ばれるタンパク質を介して受容される。細胞膜には受容体やイオンチャネルなどのタンパク質だけでなく、その二重層を構成している脂質も重要な要素として存在する。私は、細胞膜を構成している脂質の性質、状態の変化が生き物に与える影響に興味を持った。

今回の実験では、膜の脂質により生じる膜の特性である流動性に着目し、流動性修飾物質を用いてゾウリムシの刺激応答性に対する効果を調べた。

材料・方法

今回の実験で使用したゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)は麦わらの抽出液を用いて、20°Cで培養した。実験に用いた膜流動性修飾物質はコレステロールである。コレステロールは脂溶性のため3%のエタノールを溶媒として標準溶液(1 mM CaCl₂、1 mM KCl、1mM Tris-HCl、pH 7.4)に溶かした。この溶液にゾウリムシを1時間順応させた後、コレステロールを含まない標準溶液で3回洗い、その後30分間順応させ、遊泳速度や化学刺激に対する行動反応を調べた。

ゾウリムシの刺激応答性を調べるためには、標準溶液中のKCl濃度を高くした溶液を用いた(K刺激溶液)。これまでの研究から、ゾウリムシはK刺激溶液中で一過性の比較的長く続く後退遊泳を示すことが知られている。

膜流動性に変化を与えると、1-2時間で元の値への回復が生じる場合が報告されているため、実験はゾウリムシをコレステロール溶液から取り出してから、1時間以内に行った。また、実験データは30個体分のゾウリムシの平均値を用いている。

結果

1、コレステロール溶液中のゾウリムシの生存率

はじめに、コレステロール溶液がゾウリムシに与える影響を見るため、コレステロール溶液中でのゾウリムシの生存率を時間とともに計測した。ゾウリムシの生存率は時間とともに減少したが、コントロールとして用いたエタノールのみを含む標準溶液とコレステロールを含む溶液では、コレステロールを含む溶液の方が減少率がやや大きかった。しかし、0.01mMのコレステロールでの生存率はコントロールの90%ほどであり、低濃度のコレステロールは、ゾウリムシの生存に大きな影響を与えないと考えられる。

2、ゾウリムシの刺激応答性に対するコレステロールの効果

次に、ゾウリムシの刺激受容系に対するコレステロールの効果

を調べた。K刺激溶液のKCl濃度は、5mM、10mM、20mM、40mMとした。エタノール処理だけのコントロールでは、20mM以上の濃度でゾウリムシは持続性の後退遊泳を行なった。即ち、ゾウリムシはしばらく後退遊泳した後、その場にとどまり回転し、回転が終わると、再びゆっくり前進し始め、徐々に通常の前進遊泳に戻った。後退遊泳の持続時間、回転の持続時間はKCl濃度が高いほど長かった。同様に、コレステロール溶液で処理したゾウリムシにK刺激を与えると、コントロールと同様に20mM以上のKCl濃度で後退遊泳が生じた。後退遊泳の持続時間を比較すると、20mM KCl、40mM KClともに、コレステロール濃度が高くなるに伴い短くなった。40mM KClで比較した値は、コントロール;131.3s、0.01mM コレステロール;121.2s、0.05mM コレステロール;110.1s、0.1mM コレステロール;97.4sであった。

考察

高等動物では、コレステロールは細胞膜の脂質に入り込み、その流動性を下げる効果が知られている。今回、コレステロールを投与するとゾウリムシのK刺激に対する後退遊泳時間が短くなる結果が得られた。この結果は、膜の脂質流動性の変化が、ゾウリムシの刺激応答性に影響を与えたことを示唆している。

今回用いた化学刺激はKCl濃度の増加であったが、反応自体のK濃度依存性はほとんど変わらなかった。これに対し、反応(後退遊泳と回転運動)の持続時間は、コレステロール処理により、濃度依存的に減少した。K刺激により生じる後退遊泳の持続時間は、イオン刺激により活性化するCaチャンネルの不活性化の速度が主に決めていると考えられている。したがって、コレステロールはイオン刺激に対応するCsチャンネルの動態に影響している可能性が示唆される。

これまでに、ゾウリムシの細胞膜の流動性がeuplotin Cという物質の投与により低下し、その時に後退遊泳時間は約30%長くなったという結果が報告されている。今回の実験で用いたコレステロールの効果は膜の流動性を減少させるものと予想されるので、膜の流動性に注目すると、今回得られたコレステロールの効果は、euplotin Cで得られたものと逆の現象である。今後、実際に膜の流動性がどのように変化しているかを確認する必要がある。

ゾウリムシの細胞膜流動性を変化させる要因には、コレステロール等の膜修飾物質以外に、温度変化や外気圧の変化等も存在する。今後、このような環境要因がゾウリムシの刺激応答反応にどのような影響を与えるのかを調べ、ゾウリムシの環境要因への順応、特に膜の流動性を介した効果、を明らかにしてゆきたいと考えている。

ショウジョウバエの始原生殖細胞における体細胞分化抑制遺伝子(*nanos*, *pgc*)の機能解析

香山 瑞生 (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

ショウジョウバエ胚の後極に局在する生殖質と呼ばれる卵細胞質中には、生殖細胞の形成に必要な十分な母性因子が含まれており、生殖質を取り込む細胞が始原生殖細胞(極細胞)となる。極細胞は、生殖巣へと移動し、次世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞である生殖細胞(配偶子)へと分化する。極細胞が正常に生殖細胞に分化するためには、極細胞の体細胞分化を抑制すること、生殖細胞への分化を促進すること、が必要と考えられてきた。本研究では、このうち体細胞分化の抑制に着目して研究を行った。体細胞分化の抑制に関わる母性因子として、Nanos タンパク質と Pgc ペプチドが知られている。Pgc は、初期胚の極細胞で一過的に RNA polymerase II による転写を抑制することで、体細胞性遺伝子の転写を低く抑えている。一方、Nanos は、翻訳抑制タンパク質として知られ、複数のターゲット mRNA が同定されている。Nanos は、そのターゲットの1つである *importin α-2* mRNA の翻訳を抑制し、核移行レセプターである Importin α-2 の産生を妨げることで、体細胞性遺伝子の転写に関わるタンパク質の核移行を抑制する。これまで、Nanos と Pgc それぞれが体細胞分化の抑制に関わるということが明らかになってきたが、両者による抑制が解除された場合に、極細胞にどのような変化が見られるのかは解析されていなかった。そこで本研究では、Nanos のターゲットである Importin α-2 タンパク質の過剰発現 (Imp α 2 OE) と同時に *pgc* の機能も欠失 (*pgc*⁻) させた胚 (*pgc*⁻/Imp α 2 OE) の極細胞にどのような形態学的変化が見られるのかを解析した。

方法

・免疫染色

産卵後 2~4 時間のショウジョウバエの胚で抗体染色を行った。1 次抗体として chick anti-Vasa 抗体を、2 次抗体として Alexa488 標識 goat anti-chick IgY 抗体を用いた。

・RNA seq

産卵後2~3時間のショウジョウバエの胚から極細胞を100細胞分取し、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kitを用いて cDNA の合成・増幅を行い、Bioanalyzer でサンプルの品質を確認した。今後、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行っていく。

結果

Vasa タンパク質は、極細胞にのみ発現が観察されるため、極細胞のマーカーとして用いられている。そこで、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚、正常胚として *y w* 胚における極細胞の形態を Vasa 免疫染色により観察した。その結果、正常胚では極細胞のほぼ全ては丸い形態を示すのに対し、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚では細胞突起を伸ばすことを見出した(図1)。この表現型は胚発生ステージ 5~6 という短い間で観察され、その前後のステージではこのような形態的変

化は観察されなかった。次いで、この表現型をより詳細に観察するため、共焦点顕微鏡で撮影した画像を画像解析ソフトで解析し、異常な極細胞の割合をスコアした。その結果、正常胚と比較し、Imp α 2 OE、*pgc*⁻、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚では有意に細胞突起を持つ極細胞の割合が増加していた。この異常な極細胞の割合は、Imp α 2 OE、*pgc*⁻ 胚と比較して、*pgc*⁻/Imp α 2 胚で有意に高かった。

次に、*nanos* と *pgc* の double mutant (*nanos*⁻/*pgc*⁻) 胚について観察を行った。その結果、*nanos*⁻/*pgc*⁻ では、*pgc*⁻/Imp α 2 OE で観察された細胞突起を有する極細胞はほとんど観察されず、多くの極細胞は、核が不明瞭になり、膨潤し、空胞が形成されるという表現型を示した。この極細胞の形態異常を引き起こす要因を調べるため、RNA seq 法を用いて遺伝子発現の解析を現在行っている。



図1 左: 正常胚、右: *pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚

考察と展望

本研究では、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚の極細胞に細胞突起が生じることが明らかとなった。この表現型は、体細胞分化抑制の解除による極細胞の体細胞化によるものと予想している。この極細胞と同様の形態をもつ体細胞を探索したところ、休眠神経幹細胞の形態と類似していることが分かった。また、RNA seq の結果から、*nanos* や *pgc* の機能を欠失した胚では、休眠神経幹細胞で発現する遺伝子 (*mira*, *dpm*, *cas*, *pros* など) の発現が正常な極細胞と比べて上昇していることも明らかになっている。したがって、体細胞分化抑制が失われたことで、神経への分化が生じているのではないかという仮説を立てている。また、*nanos*⁻/*pgc*⁻ 胚において同様の表現型が見られなかった原因として、*nanos* の機能欠失により Importin α-2 が関わる経路以外にも異常が生じ、それによって細胞突起を持つという表現型とは異なる異常が観察されたのではないかと考えている。今後は、RNA-seq による *pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚の極細胞における遺伝子発現の解析や、*in situ* hybridization によって、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 極細胞における神経化の指標となる遺伝子の発現を解析するとともに、*nanos*⁻/*pgc*⁻ 胚の極細胞における遺伝子発現解析も行う予定である。

ショウジョウバエ始原生殖細胞の性決定に関与する新規遺伝子の探索

三浦 博樹 (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

有性生殖を行う動物では、発生の進行に伴って個体の形態や機能に雌雄差が生じ、それぞれ卵や精子である生殖細胞が作られる。生殖細胞の前駆細胞は、始原生殖細胞と呼ばれ、この細胞がオス化すれば精子に、メス化すれば卵に分化する。始原生殖細胞の性決定機構を明らかにすることは、生殖生物学や発生学分野において重要な課題であるにもかかわらず、未だ不明な点が多く残されている。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*: 以下ショウジョウバエ) では、体細胞と異なる機構によって、始原生殖細胞の性が決定する。たとえば、周囲のオス体細胞からのシグナルにより、始原生殖細胞は非自律的にオス化する[1]。また、始原生殖細胞中で発現する遺伝子の働きにより、自律的に性が決定されることも明らかになっている。そのような遺伝子として、メス化に関わる *Sxl*、オス化に関わる *Phf7* が知られている[2,3]。しかし、この 2 遺伝子以外にも始原生殖細胞自律的な性決定に関与する遺伝子が存在すると予想されている。そこで本研究では、ショウジョウバエ始原生殖細胞における発現に性差が見られる遺伝子を同定し、その機能を解析することによって始原生殖細胞の性決定に関与する新規遺伝子を同定することを目指した。

方法

・候補遺伝子の選定

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およびオス始原生殖細胞のトランスクリプトームを RNA-seq 法によって解析したデータに加え、胚全体の細胞および始原生殖細胞内で発現する遺伝子をマイクロアレイ法によって網羅的に解析したデータを利用できる。そこで、前者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 倍以上ある遺伝子を選択した。次いで、マイクロアレイデータを利用して、体細胞に比べて始原生殖細胞で 4 倍以上高発現している 33 遺伝子を選択した。また、体細胞に比べて始原生殖細胞で高発現していないが雌雄の始原生殖細胞での発現量が 4 倍以上異なる 16 遺伝子も加え、計 49 遺伝子を候補遺伝子として選定した。

・候補遺伝子の発現解析

野生型のショウジョウバエの胚 (ステージ 1~16) および成虫から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。それらをテンプレートとして、PCR により候補遺伝子に特異的な遺伝子断片を増幅し、pGEM-T Easy ベクタープラスミドにクローニングを行った。このプラスミドから 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、これをテンプレートとして *in vitro* 転写を行い、ジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたアンチセンスおよびセンスプローブを合成した。その後、これらのプローブを用いて、産卵後 0~16 時間の胚に対して *in situ* hybridization を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて始原生殖細胞における発現を観察した。この際、オスとメスを区別するた

めに、メスの始原生殖細胞でのみ Ds-Red (Redstinger) を発現する胚を用いた。

・候補遺伝子のノックダウンによる機能解析

in situ hybridization によって始原生殖細胞での発現に雌雄差が認められた遺伝子に対する *UAS-RNAi* 系統を Bloomington Drosophila Stock Center および Vienna Drosophila Resource Center から入手した。それらの系統のオスと始原生殖細胞で Gal4 を発現する系統 (*nos-GAL4*) のメスを交配し、始原生殖細胞で候補遺伝子をノックダウンした個体を得た。これらの個体が羽化してから 3~6 日後に解剖し、精巣と卵巣の形態が異常な成虫個体数をカウントした。形態に異常が認められた卵巣と精巣に対しては免疫染色を行い、生殖系列のマーカーである Vasa タンパク質の発現を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

結果・考察

これまで、45 の候補遺伝子について *in situ* hybridization による発現解析を行った。その結果、12 遺伝子がオスに比べてメス始原生殖細胞で高発現すること、15 遺伝子がメスに比べてオス始原生殖細胞で高発現することが確認できた。これらの遺伝子の働きにより、始原生殖細胞の性差が生じる可能性がある。

そこで、これら 27 の遺伝子のうち、7 つの遺伝子に対して機能解析を行い、これらの遺伝子が始原生殖細胞の性決定に関与するかを検証した。そのうち、オスの始原生殖細胞で多く発現していた *La* 遺伝子および *Hsp83* 遺伝子を始原生殖細胞でノックダウンした個体では、精巣や卵巣の形態が異常になっているものが確認できた。これらの生殖巣を免疫染色した結果、精巣と卵巣の両方で Vasa タンパク質の発現が失われていた。このことは、*La* 遺伝子や *Hsp83* 遺伝子のノックダウンによって成虫生殖巣から生殖系列が失われたことを示しており、これらの遺伝子が始原生殖細胞 (生殖系列) の維持に必要であることを示唆している。しかし、この表現型は雌雄に関係なく観察されたことから、始原生殖細胞の性決定に関与しているとは考えにくい。

今後は、残りの候補遺伝子に対して発現解析と機能解析を行い、始原生殖細胞の性決定に関与する遺伝子の探索を進めていく予定である。

参考文献

- [1] Louise et al. *Nature* 405: 970-973 (2000)
- [2] Hashiyama et al. *Science* 333: 885-888 (2011)
- [3] Shu et al. *Developmental Cell* 22: 1041-1051 (2012)

CRISPR/Cas9-based mutagenesis of neuropeptide receptors
potentially involved in nociception in *Drosophila melanogaster*

Dvyne Issei Nosaka (筑波大学 生物学類) 古久保・徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Nociception is a vital function for the survival of organisms. Because it is essential, many components of nociception are expected to be evolutionarily conserved. *Drosophila melanogaster* is a suitable model for studying the molecular basis of sensory systems including nociception. In our lab, using *Drosophila*, a genetic screen has been performed to identify neuropeptide genes important for nociception and several candidate neuropeptides genes have been successfully identified. However, there are currently no neuropeptide receptor mutants for most of candidate neuropeptides that have been isolated from the screen. Therefore, I performed a CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis for potentially nociceptive neuropeptide receptors.

Materials and Methods

Mutagenesis with CRISPR/Cas9 genome editing

The genetic crossing that was carried out to obtain candidate mutant strains is shown in Fig. 1 (Kondo and Ueda, 2013). nos-Cas9 strains were crossed to gRNA (guide RNA) strains to obtain offspring expressing both Cas9 and gRNA in germline cells, where Cas9-based genome editing is thought to be performed (Step 1 and 2). To preserve potential mutant genes, the offspring at the next stage are all isolated because there are variations of mutations for the same gene (Step 2 and 3). At the final stages, the potential mutant gene is preserved permanently by crossing offspring with the potential mutant and the balancer gene to another set of balancer flies, thus creating a permanent, isolated stock for the potential mutagenized gene (Step 4). Finally, the target region of gRNA was PCR amplified and sequenced to determine whether mutagenesis was successful.

Results and Discussion

I have generated more than 10 candidate mutant lines for three different neuropeptide receptor genes. Mutations are still being confirmed and the results will be reported in the presentation. Future research plans are to observe behavioral nociception phenotypes of these mutants.

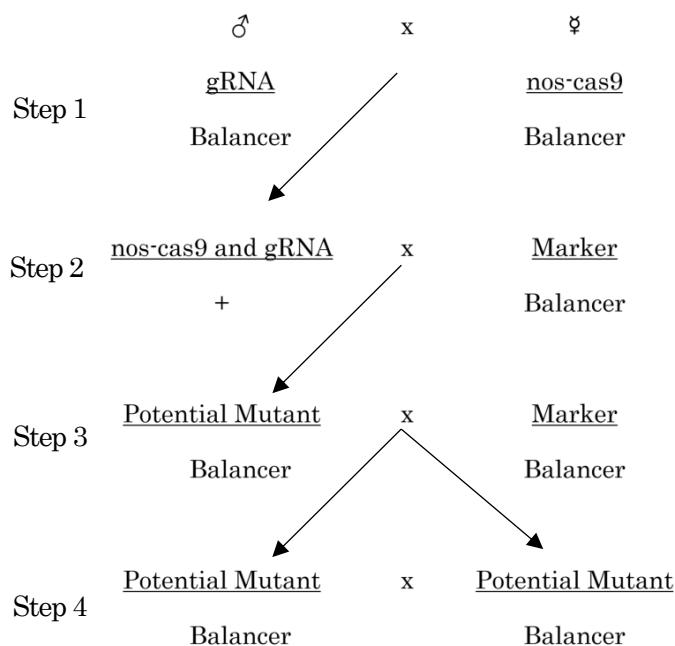


Fig. 1 Crossing scheme to isolate potential mutant lines

References

- 1) Kondo, Ueda. Highly Improved Gene Targeting by Germline-Specific Cas9 Expression in *Drosophila*. *Genetics*. 1, November, 2013. Pages 715-721.

進化的に保存された神経ペプチド DSK を介した痛覚制御メカニズム

及川 泉 (筑波大学 生物学類)

指導教員：本庄 賢 (筑波大学 生命環境系)

《背景》

生物は、危険から身を守りそれを回避する重要な防御機構として、痛覚を獲得・進化させてきた。しかしその一方で、痛みは我々ヒトの社会生活に負の影響を及ぼす存在でもある。国際疼痛学会の調査では、慢性疼痛疾患の罹患率は世界人口の20%にも及ぶと推計されている。また、現在利用されている鎮痛薬の中には、なぜ効果があるか全く分からないものも存在する。こういった現状の根本的な原因に、そもそも痛みがどのような情報処理によって生じるのか、そのメカニズムが明らかでないという点が挙げられる。つまり、痛覚のメカニズムを分子レベルで理解していくことは、難治性疼痛疾患の病理理解や、より良い鎮痛法の開発に繋がるものと考えられる。

哺乳類における先行研究から、神経ペプチドは痛覚シグナルの伝達と調節に重要な役割を果たすことが分かってきている。しかし、生体内に存在する神経ペプチドの種類の多様さと機能の複雑さ故に、そのメカニズムの理解は遅々として進んでいない。この複雑な機能分子の研究をするにあたり、哺乳類に比べて体制がシンプルなおよび遺伝学的解析手法が蓄積されているショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、非常に適したモデル生物となる。

所属研究室で行われた神経ペプチド変異体のスクリーニングから、ショウジョウバエの痛覚感受性に関わる神経ペプチドが複数見出された。私はこの候補神経ペプチドの中から、哺乳類のコレシトキニンと相同性を持つ DSK に注目した。DSK は2種類の受容体もヒトと相同性があるため、このシグナル伝達系はショウジョウバエとヒトで進化的によく保存されていると考えられる。現在、コレシトキニンは哺乳類において痛覚シグナルの伝達に関与しているとの報告があるが、その生体内メカニズムは分かっていない。そこで私は、体制がシンプルなショウジョウバエを用いて、進化的に保存された DSK による痛覚制御メカニズムの解明にアプローチした。

《材料・方法》

・痛覚応答試験

ショウジョウバエの幼虫では、痛覚刺激に対して特徴的な応答である「Rolling behavior (ローリング)」を示すことが知られている。適切な有害刺激温度に設定した熱プローブを幼虫の体側面に当て、ローリングを示すまでの時間を計測することで、熱刺激への感度を評価することが出来る (図1)。

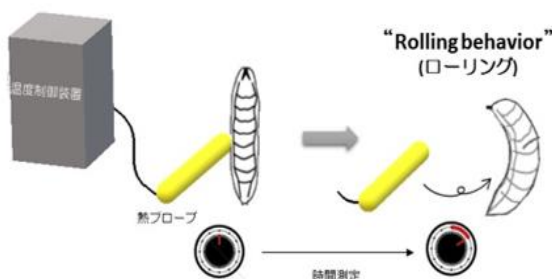


図1 熱刺激に対する痛覚応答の評価法

・変異体系統の作製

2種類の DSK レセプターにはどちらも有効な変異体系統は存在しなかったため、CRISPR-Cas9 技術を用いて各レセプターについて欠失変異体のショウジョウバエを作製した。

・抗体染色によるペプチド及びレセプターの発現解析

DSK 受容体の局在に関する知見は皆無であったため、信頼性の高い GAL4 を用いた受容体の局在解析を行った。更に、痛覚関連ニューロンと DSK 受容体の発現パターンについて調べるため、GAL4/UAS 及び LexA/LexAop を用いた共染色を行った。また、DSK 分泌細胞を報告した唯一の先行研究 (Nichols R et al, 1996) では使用した抗体の抗原特異性について確かめられていなかったため、*dsk* 変異体を用いた抗体染色により DSK 分泌細胞の特定を試みた。

《結果・考察》

痛覚応答試験の結果、*dsk* 変異体では痛覚感受性に顕著な異常が見られた。この結果から、DSK レセプターの変異体でも同じような表現型になるのではないかと考えられたため、CRISPR-Cas9 技術により作製したレセプター変異体を用いて痛覚応答試験を行った。その結果、予想通り、*dsk* 変異体と同様の痛覚感受性異常が確認された。*dsk* 変異体及び DSK レセプター変異体の両方で同様の痛覚感受性異常の表現型となったことから、DSK がショウジョウバエの痛覚シグナル調節に関与していることが強く示唆された。

続いて、レセプターの局在について調べるために GAL4 を用いた抗体染色を行った。その結果、各レセプターは脳の広範囲で発現していた。共染色によって痛覚関連ニューロンとレセプターの発現パターンについて調べた結果、DSK レセプターはローリング誘発に関与する既知の痛覚関連ニューロンの一部で発現していることが分かった。

抗体染色の結果から DSK レセプターが痛覚の経路に関与している可能性が十分に示されたため、続いて、DSK 分泌細胞の特定を試みた。*dsk* 欠失変異体を用いた抗体染色を行った結果、先行研究 (Nichols R et al, 1996) で報告された複数の分泌細胞はいずれも、*dsk* 変異体でその発現が抜けていた。これにより、先行研究で報告された分泌細胞が DSK を分泌している可能性が非常に高いということが示唆された。

《今後の展望》

これまでの研究で私は、DSK がショウジョウバエ中枢神経系のどの細胞に作用し痛覚シグナルを調節しているか、その手掛かりを掴むことに成功した。今後は、カルシウムイメージングや RNAi といったショウジョウバエで利用できる遺伝学的実験ツールを駆使して DSK 作用機構の解明を進めるとともに、ヒトとの間の機能的相同性について検証していきたい。

食品由来 Nrf2 活性化剤による酸化ストレス緩和能のゼブラフィッシュを用いた検討

遠藤 優佳 (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]

活性酸素などによる酸化ストレスは DNA やタンパク質などの生体分子に傷害を与えるため、がんや神経変性、炎症性疾患など様々な病気の原因になる。この酸化ストレスに対し細胞は生体応答を働かせることで恒常性を維持しているが、この応答機構を担うのが NF-E2 related factor 2 (Nrf2) である。Nrf2 は、細胞に酸化ストレスが生じると抗酸化ストレスタンパク質遺伝子のプロモーターに存在する抗酸化物質応答配列に結合し、これらを発現誘導する転写因子である。発現誘導された抗酸化ストレスタンパク質が活性酸素を除去し酸化ストレスが軽減される。注目すべき点は機能性食品の有効成分の多くが Nrf2 を活性化することであり、こうした食品を摂取するだけで Nrf2 活性化による抗酸化ストレス効果が発揮され、健康維持につながる。例えば、ブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファンは、強力な Nrf2 活性化能をもつことから²⁾、国内外の食品会社等がサプリメントとして商品化するまでになっている。

私の研究室では、さまざまな化学物質の毒性と薬効、及び Nrf2 活性化能をゼブラフィッシュ *nrf2* 変異系統を用いて評価する生体システムを構築しており (図 1)³⁾、この評価システムを用い

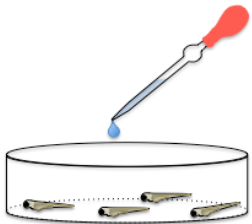


図 1 ゼブラフィッシュ評価システム
ゼブラフィッシュ稚魚は Nrf2 活性化剤などの薬剤に簡便に曝露することができるため、それらの毒性や薬効を評価することが容易である。

て上記スルフォラファンが、魚類においても Nrf2 を活性化するだけでなく、動物個体において酸化ストレス剤の毒性を緩和する活性をもつことを実証している⁴⁾。さらに Nrf2 活性化はヒ酸など重金属に対する毒性も緩和するが、スルフォラファンに関してはヒ酸に対する Nrf2 非依存的な共毒性があり、その摂取を控えるべき環境や状態もあり得ることを、ゼブラフィッシュ評価システムを用いて報告している⁵⁾。

このことは、スルフォラファンよりも優れた食品由来 Nrf2 活性化剤を探索する価値があることと、そのためにゼブラフィッシュ評価システムを活用する有効性を示している。そこで本研究ではこの評価システムの価値と有効性を実証するために、培養細胞レベルで Nrf2 活性化することが知られている機能性食品の有効成分を選出し、これらの生体における酸化ストレス緩和能を網羅的に評価することを目的とした研究を行う。

具体的には、まず酸化ストレス緩和能が期待できる物質を用いて、野生型のゼブラフィッシュ稚魚を用いた生存解析を行い、それぞれの物質が毒性を示さない濃度を決定した。次にこの濃度における当該物質の酸化ストレス緩和能をゼブラフィッシュ評価システムを活用して評価した。さらに当該物質の Nrf2 活性化能を、野生型ゼブラフィッシュ稚魚の全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション解析により測定した。酸化ストレス緩和能と Nrf2 活性

化能が見出された物質に関しては、*nrf2* 変異体ゼブラフィッシュを用いて同様の実験を行い、これらの活性が Nrf2 依存的であるかを検証した。

[方法]

ゼブラフィッシュ稚魚

野生型 AB 系統と *nrf2* 変異系統を用いた。*nrf2* ホモ変異体は胚性致死なので、*nrf2* ヘテロ変異成魚の交配により得た。

生存解析

食品由来 Nrf2 活性化剤の毒性に関しては、受精後 3.5 日の稚魚に濃度を振って 12 時間曝露し、その生存率で判定した。酸化ストレス緩和能に関しては、食品由来 Nrf2 活性化剤の 12 時間曝露後の受精後 4 日稚魚に、2 mM の過酸化水素処理を 72 時間行い、生存率を 12 時間毎に観察した。

全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション解析

Nrf2 標的遺伝子である *gstp1* の発現解析を行った。受精後 3.5 日の稚魚を各食品由来 Nrf2 活性化剤に 12 時間曝露した後、4% パラフォルムアルデヒドで固定した。ジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) で標識された *gstp1* 特異的 RNA プローブを 70°C で一晩固定稚魚の RNA とハイブリダイゼーションさせ、洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識の抗 DIG 抗体とその発色基質 BM purple を用いて、*gstp1* RNA の存在組織と量を検出した。

遺伝子型決定

生存解析や全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った後のゼブラフィッシュ稚魚のゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって *nrf2* 遺伝子に相当する部分を増幅した。その後 *nrf2* 変異体ゲノム特異的に DNA 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]

結果及び考察は卒業研究発表会にて示す。

[引用文献]

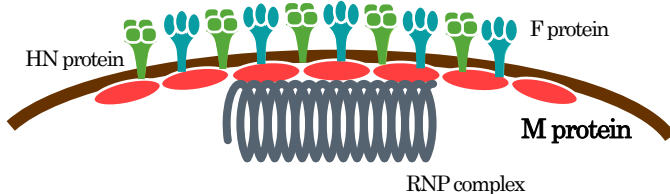
- 1) 田口恵子, 山本雅之. 酸化ストレス防御のための生体内センサー-Keap1-Nrf2 制御システム, 化学と生物, 45: 857-862, 2007
- 2) Fahey, J. W. *et al.* Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes, *Food Chem Toxicol*, 37: 973-979, 1999
- 3) 布施雄士, 小林麻己人. ゼブラフィッシュを用いた Nrf2 システムの解析: 効率的に防御能をアップする秘策, *医学のあゆみ*, 263: 528-529, 2017
- 4) Mukaigasa *et al.* Genetic Evidence of an Evolutionarily Conserved Role for Nrf2 in the Protection against Oxidative Stress. *Mol Cell Biol*, 32: 4455-4461, 2012
- 5) Fuse *et al.* Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*, 305: 136-142, 2016

パラインフルエンザウイルス M タンパク質のウイルス粒子形成における機能解析

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

【背景と目的】

呼吸器ウイルスの代表として、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス (Parainfluenzavirus: PIV)、RS ウィルスなどがあるが、いずれも呼吸器にのみ感染するといった組織特異性を示す。これら呼吸器ウイルスの感染機構および病原性発現機構には依然として不明な点が多く、インフルエンザウイルスを除けばヒト用ワクチンも未だ開発されていないのが現状である。PIV は、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス亜科に属し、非分節のマイナス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。PIV は脂質二重層 (エンベロープ) に囲まれた粒子で、エンベロープには F、HN といったウイルス表面タンパク質がスパイク状に突き出ている。M タンパク質はエンベロープの直下に分布し、NP タンパク質で覆われたウイルス核酸 (RNP 複合体) と相互作用している。(図 1)



(図 1: 感染細胞膜における各種ウイルスタンパク質の分布)

本研究では、増殖力が強く、取り扱いが容易な牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (Bovine PIV type3: BPIV3) をモデルとして、当研究室で開発された BPIV3 の遺伝子操作系を用いて M タンパク質をコードする M 遺伝子に部分欠損あるいは部分変異を導入し、それら変異体のウイルスの挙動を観察することで BPIV3 の細胞への感染と出芽における M タンパク質の機能を検討した。

【材料と方法】

(1) 組換え M 遺伝子の作製

当研究室が確立した EGFP 発現 BPIV3 完全長ゲノムプラスミド (pBPIV3-EGFP) (Ohkura et al. Virology, 2015) を鋳型として M 遺伝子を除いた断片を PCR で合成し pBluescript II ベクターに導入後、大腸菌 (Stbl2) を形質転換することによって M 遺伝子欠損 EGFP 発現 BPIV3 ゲノムを持つプラスミド (pBPIV3ΔM-EGFP) を作製した。これを M タンパク質発現プラスミド (pCAGGS-M) と同時に HeLa 細胞にトランスフェクションすることで M 遺伝子欠損ウイルス (BPIV3ΔM) を回収した。

pBPIV3-EGFP を鋳型として M 遺伝子の N 末端あるいは C 末端側の塩基配列をいくつか削るように設計したプライマーにて PCR を行うことで M 遺伝子部分欠損型プラスミドを作製した。また、末端のアミノ酸に加え、M タンパク質の立体構造において細胞質側に突出している領域に関して 4 つの連続するアミノ酸をアラニンに置換した M 遺伝子部分変異型プラスミドを

作製した。BPIV3ΔM を感染させた Vero 細胞にこれらの変異型 M 遺伝子プラスミドを導入し培養上清を回収した。この培養上清に関して MDBK 細胞を用いて TCID₅₀ (Tissue culture infectious dose) を行うことでウイルス力価を検討した。

(2) Western blotting 法によるタンパク質発現の検討

培養した Vero 細胞の培養上清および細胞に関して Anti-M および Anti-NP 抗体を用いて Western blot を行い、培養上清中および感染細胞中の BPIV3 の所在と変異型 M タンパク質の発現の様子を確認した。

【結果】

(1) 部分欠損型 M タンパク質に関して

感染後 2 日目のウイルスを上清から回収し、MDBK 細胞に感染させ、TCID₅₀ 法により力価を決定したところ、完全長 M タンパク質を同時に発現させた BPIV3ΔM のサンプル (ポジティブコントロール) のウイルス力価が 2.2×10^6 TCID₅₀/ml であった一方、N 末端もしくは C 末端から 10~150 アミノ酸を欠損させた M タンパク質を同時に発現させた BPIV3ΔM の各サンプルに関しては測定限界未満であった。より少ないアミノ酸欠損型の検討によって N 末端の 6 アミノ酸、および C 末端の 3 アミノ酸を欠損させた場合には $1.3 \sim 2.2 \times 10^5$ TCID₅₀/ml と力価が 10^{-1} 倍に減少し、それ以下のアミノ酸欠損ではポジティブコントロールと同程度の力価を有していることがわかった。

Western blot 法より、N 末端の 6 アミノ酸以上、C 末端の 3 アミノ酸以上を欠損させた M タンパク質を発現させたウイルス感染細胞内外においては各種欠損 M タンパク質の発現がみられたものの細胞外からウイルス核酸タンパク質である NP は検出できなかった。

(2) アラニン置換による変異型 M タンパク質に関して

M タンパク質の立体構造で細胞内側に突出している領域のそれぞれ 4 アミノ酸ずつをアラニンに置換した場合に、力価が $10^{-1} \sim 10^{-2}$ 倍に減少した。N 末端側 8~11 番目、および C 末端側 1~4 番目のアミノ酸を置換した場合には力価が 10^{-4} 倍まで減少した。

【考察】

ウイルス感染細胞における EGFP 蛍光の拡大およびウイルス力価の測定、さらに培養上清における NP タンパク質検出の結果を考慮すると、M タンパク質の両末端の数アミノ酸の欠損がウイルスの粒子形成から出芽までの過程に非常に重要であることが示された。

また、M タンパク質の N 末端 8~11 番目の重要性については現在までに報告が無く、新たな知見である。この領域と NP タンパク質との相互作用に関心がもたれる。

リサイクリング関連因子 X のマウス精子形成における機能解析

大澤優生 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 杉山文博 (筑波大学 医学医療系)

<背景・目的>

真核生物の細胞は細胞小器官と呼ばれる二重膜で覆われた区画を持っており、それらは他の細胞小器官や細胞膜と膜や内容物の交換を行っている。物質を交換する際には、運ばれる対象 (積み荷分子=cargo) と標的 (=行き先) が厳密にコントロールされており、メンブレントラフィックと呼ばれる輸送システムが働く。メンブレントラフィックとは、輸送小胞の形成、小胞の輸送、輸送小胞の標的膜への繫留、膜の融合といったダイナミックな膜動態の総称で、輸送小胞の移動によって制御されている。本研究で対象とするタンパク質 X はメンブレントラフィックのうち繫留に必要なタンパク質複合体の構成要素で、その遺伝子欠損 (knockout; KO) マウスは胚性致死となることが報告されている。このため、成体での機能はほとんど明らかでない。精子は、精巣内の精細管と呼ばれる長い管の中で連続的に生産され、精細管の外側から内側に向かって、精原細胞、精母細胞、精子細胞、精子の順に分化が進む。また、精子形成では細胞質が完全に分離せずに直径 0.5~3.0 μm の細胞間架橋 (Intercellular bridge; ICB) によって細胞同士が連結された状態で分化が進むことが知られている (図 1)。本研究では Cre/LoxP システムを利用して作出した条件付き X 遺伝子欠損 (conditional knockout; cKO) マウスを用いて成体マウスの精子形成における X の機能を明らかにすることを目的とした。

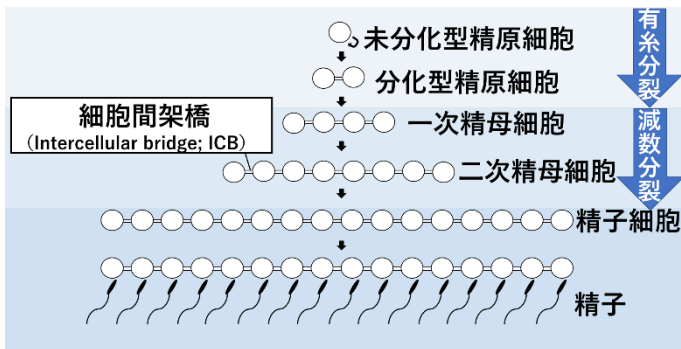


図 1 精子形成の概略

<実験・結果>

○精原細胞特異的 cKO マウスの解析

精原細胞から Cre を発現する Nanos3-Cre マウスと遺伝子 X の floxed マウスを交配し、cKO マウスを作出した。この雄マウスからは精子がほとんど採取できなかった。わずかに採取できた精子を野生型の未受精卵と体外受精し受精卵の遺伝子型を解析した結果、遺伝子 X の KO アレルを持つものはなかった。次に、cKO マウスにおいてどの段階で精子形成が停止しているのかを確認する目的で連続切片を作成し、HE 染色及び精子形成の各分化ステージのマーカーに対する免疫蛍光染色を行った。HE 染色では多核の細胞が観察され (図 2)、精子細胞のマーカーである PNA レクチンのシグナルは観察されなかった。また、分化型精原細胞のマーカーである c-Kit のシグナルに異常は見られず、一次精母細胞のマーカーである γ H2AX のシグナルが多核細胞中に見られた (図 3)。

○精母細胞特異的 cKO マウスの解析

精母細胞から Cre を発現する Prl3b1-Cre マウスと遺伝子 X の floxed マウスを交配し、cKO マウスを作出した。この雄マウスでは一次精母細胞の多核化は見られず、野生型の未受精卵と体外受精して得た受精卵の遺伝子型解析を行った結果、遺伝子 X の KO アレルが検出された。

<考察・展望>

精母細胞で遺伝子 X を KO したマウスでは正常に精子が形成された一方で、精原細胞で遺伝子 X を KO したマウスでは精子形成が停止したことから、遺伝子 X はマウス精子形成過程において精原細胞の段階で重要な機能を持っていると考えられる。また、cKO マウス精巣で観察された多核細胞と γ H2AX のシグナルが一致したことから、一次精母細胞が多核となり、その後の精子形成が停止したことが示唆された。遺伝子 X が精原細胞で欠損するとその後の精母細胞の形態に異常が生じる原因として、X が精原細胞の段階で細胞内に蓄積し、その後の細胞質分裂の膜追加に関与している可能性がある。また、減数分裂時には迅速な膜追加が必要であるという報告と合わせて考えると、X が欠損すると有糸分裂が起こる精原細胞の細胞質分裂は進行できるものの、減数分裂が起こる精母細胞では膜追加が間に合わない可能性がある。さらに、膜融合に機能している、ある SNARE タンパクの null 変異体では本研究で観察されたものと同様に異常な形態の精母細胞が観察されることが報告されているため今後はその SNARE タンパクとタンパク質 X の共免疫沈降を行い、相互作用を調べる予定である。

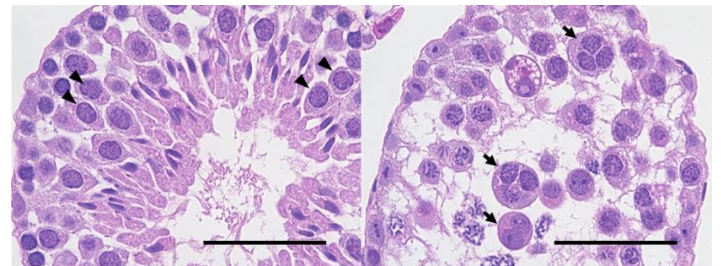


図 2 マウス精巣の HE 染色像

矢頭; 正常な細胞、矢印; 多核細胞 Scale bar: 50 μm

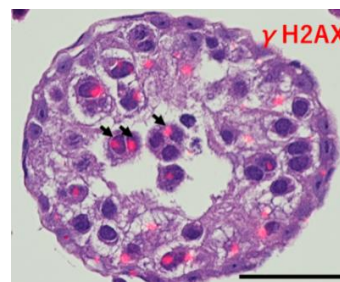


図 3 cKO マウス精巣の HE 染色像と免疫蛍光染色の MARGE

矢印; 多核細胞内の γ H2AX シグナル Scale bar: 50 μm

鳥インフルエンザウイルスの哺乳類適応を規定する細胞種特異的な自然免疫抑制機構

亀山 響子 (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】

A 型インフルエンザウイルスはウイルス粒子表面に存在する 2 種類のタンパク質、ヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の血清型によって 140 以上の亜型に分類され、全ての亜型は自然宿主であるカモで単離される。一方、季節性インフルエンザとしてヒト間で流行するのは H1N1、H1N2、H3N2 といった一部の亜型のみであり、これら以外の亜型がヒトに伝播した場合、新型インフルエンザウイルスとして大流行を引き起こす恐れがある。しかし、鳥インフルエンザウイルスが宿主域を越えヒトを含む哺乳動物に適応する分子機構は不明である。本研究では、A 型インフルエンザウイルスの哺乳類適応を規定する分子メカニズムを解明することを目的とする。特に、鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への適応を規定する要因として宿主の自然免疫応答に着目し、免疫細胞であるマクロファージ及び非免疫細胞として 3T3 細胞 (マウス繊維芽細胞由来) でのウイルス感染時の *IFN-β* 転写量を測定した。

【材料と方法】

1. ウイルス株

1997年にH5N1亜型鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染事例で単離された、A/Hong Kong/483/97 (以下 HK483 と略記) と A/Hong Kong/486/97 (以下 HK486 と略記) を用いた。これらの鳥インフルエンザウイルス株は、アミノ酸配列の相同性が非常に高いが、HK483 は哺乳動物でよく増殖するのにに対し、HK486 は哺乳動物に適応しておらず、その増殖性は低い。

2. マウス腹腔マクロファージの採取

マウス (11 週令) に 4.05%チオグリコレート溶液を 2 ml 腹腔内投与し、投与から 3 日後に腹腔浸出液を回収した。回収した浸出液をディッシュに播種し、底面に接着した細胞を腹腔マクロファージとして実験に用いた。

3. ウイルス感染細胞における *IFN-β* 転写量の解析

3T3 細胞 (マウス繊維芽細胞由来)、及びマウス腹腔マクロファージに各ウイルスを MOI (多重感染度) =3 または 5 で感染させ、感染から 2、5、8 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から AGPC 法によって RNA を抽出し、Oligo (dT)₂₀ プライマーを用いた逆転写反応後、リアルタイム PCR 法により *IFN-β* mRNA の転写量を検出した。

【結果と考察】

リアルタイム PCR の結果、3T3 細胞では、HK483 及び HK486 が感染しても *IFN-β* の発現は観察されなかった。よって、インフルエンザウイルスは非免疫細胞では自然免疫応答の抑制能をもつことが示唆された。一方、マクロファージでは HK486 感染によって顕著に *IFN-β* mRNA が誘導されるのに対し、HK483 感染では 3T3 細胞と同様に *IFN-β* 応答が抑制されていた。従って、HK483 はマクロファージでの *IFN-β* 産生抑制能を獲得したことにより、哺乳動物での効率的な増殖が可能になったと推測される。

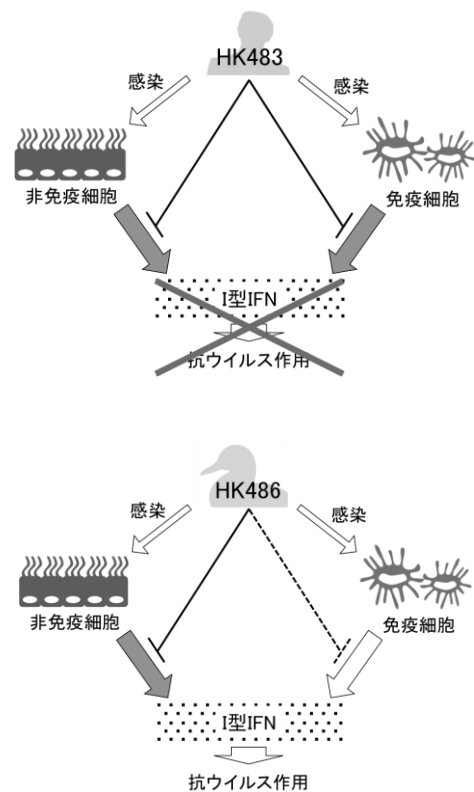


図 1. HK486 はマクロファージでの *IFN-β* 産生を抑制できない

次に、マクロファージでの *IFN-β* 産生を抑制するウイルス遺伝子を同定するため、HK486 に HK483 のウイルス遺伝子を 1 つずつ置換したキメラウイルスを用いて、ウイルス感染にตอบสนองした *IFN-β* mRNA 量を検出した。その結果、単独のウイルス遺伝子置換では、マクロファージにおける *IFN-β* 産生抑制能をもつ変異株は得られなかった。このことより、マクロファージでの *IFN-β* 産生抑制には HK483 由来の複数のウイルス遺伝子が必要であることが示唆される。現在は、複数のウイルス遺伝子を置換したキメラウイルスを作製し、責任遺伝子を探索中である。

ダイナミックに変動する報酬価値をコードする線条体ニューロンの探索

豊島 理 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 正幸 (筑波大学 医学医療系)

導入

我々ヒトは、日常生活の中で得られる報酬の価値を最大化するように行動する。その神経メカニズムを解明するため、これまで多くの研究が線条体を含む脳の様々な領域のニューロンから神経活動を記録し、報酬価値(得られる報酬が多いのか少ないのか等)に関する情報をコードしていることが示されてきた。一方、日常生活の中では、時間とともに得られる報酬の価値がダイナミックに変動する場合が多く、行動の最適化のためには変動する価値をモニターする仕組みが必要であると考えられる(例えば、料理をしているときに丁度良い焼き加減で肉をフライパンから上げる、自宅で映画鑑賞をする際に部屋や画面の明るさを調節して丁度良い音量に設定する場合等)。しかしながら、ダイナミックに変動する価値が脳内でどのようにコードされているのかについては明らかにされてこなかった。

本研究では、ダイナミックに変動する価値をモニターする神経メカニズムを解明するため、報酬価値をコードすることが知られている線条体領域から神経活動を記録し、ダイナミックに変動する価値の表現様式について解析した。

方法

行動課題実行中のニホンザル(*Macaca fuscata*)一頭において、金属電極を線条体領域に刺入し、細胞外記録法によるシングルユニットレコーディングを行った。

行動課題

以下に示す control 課題と、メイン課題である increase 課題/decrease 課題の3つの条件の行動課題をサルに行わせた。3種類の課題はそれぞれ独立したブロックでサルに行なわせた。

< control 課題 >

0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml の液体報酬(それぞれ small, medium, large) を予告する3つの視覚刺激(バー)のうち1つだけをランダムにサルが見えているモニターに 2900ms 呈示し、その間サルがバーを注視し続けることに成功すると、刺激に対応した液体報酬が与えられた(図1)。緑のバーが長いほど得られる報酬が多い。

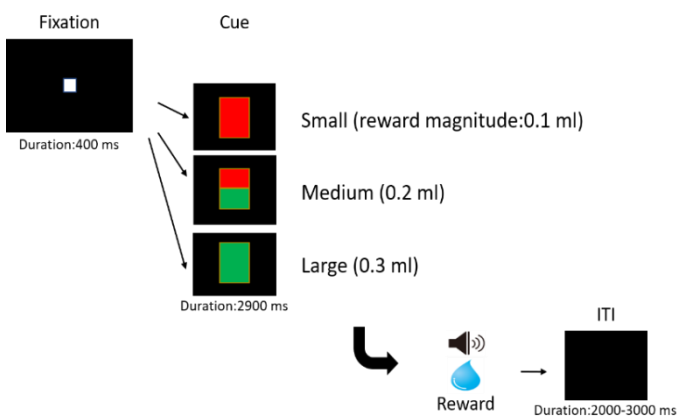


図1. control 課題

< increase / decrease 課題 >

control 課題同様にバーが呈示されるが、そのバーは0~2450 ms のあいだ伸びる (increase 課題) あるいは縮む (decrease 課題)。バーは control 条件同様合計で 2900 ms 呈示され、その間サルがバーを注視し続けることに成功すると、バーの長さに対応した量の液体報酬が与えられた。バーの伸縮がいつ止まるのかは、サルには予測できないようになっている。バーは常に一定の速度で伸縮をする(図2は increase 課題の例)。

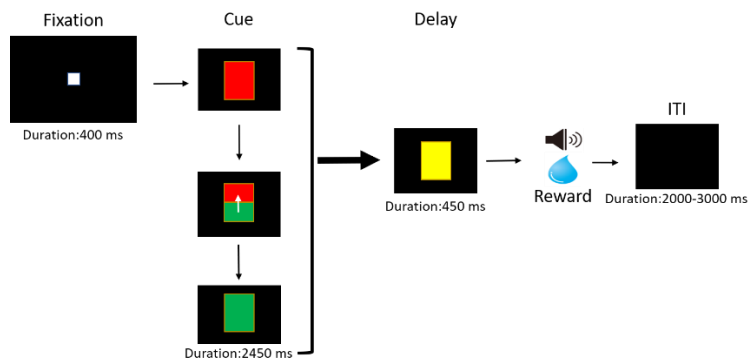


図2. increase 課題 decrease 課題では、バーは最も長い状態から徐々に短くなってゆく。

結果

線条体からは全部で 106 個のニューロンについて活動を記録した(2018/01/12 現在)。そのうち、40 個(38%)が control 課題において報酬価値をコードしており、大きな報酬価値が呈示されたときに大きな活動上昇を示す positive coding ニューロンと、小さな報酬価値が呈示されたときに大きな活動上昇を示す negative coding ニューロンが見つかった(単回帰分析、 $p < 0.01$)。control 課題で価値コーディングしていたニューロンの中で、1: increase 課題/decrease 課題実行中、バーの変化に合わせて(つまり価値の変化に合わせて)ダイナミックに発火頻度を減少若しくは増加させるニューロン、2: 報酬価値の決定後(バーの伸縮停止後)に価値に応じて発火頻度を変化させるニューロン、3: 1 と 2 両方の特性を持つニューロンが見つかった(25/106 = 24%)。一方、control 課題で報酬価値をコードしていないニューロン(単回帰分析、 $p > 0.01$)にも上記の1, 2, 3のタイプが見つかった(9/106 = 8%)。

考察

以上の結果から、ダイナミックに変化する報酬価値をコードする線条体ニューロンは存在すると考えられるが、その価値コーディングの様式は、ダイナミックに変動する価値を online でコードする場合(上述した1のタイプ)や、変動が終了した際にコードする場合(2のタイプ)、両方の特性を持つ場合(3のタイプ)など、ニューロン毎に様々であると推測される。

人為的レム睡眠操作マウスの解析によるレム睡眠の機能の探索

中井 彩加 (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】

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、私たちは一晩にレム睡眠、ノンレム睡眠、短い覚醒を繰り返している。レム睡眠は夢の主な生成源として古くから注目されており、さらに記憶の形成や消去に関わることがこれまで提唱されてきた。しかし、確たる証拠はほとんどなく、レム睡眠の意義は未だ不明である。研究が進んでいない原因として、レム睡眠を有効に阻害できる方法がなかったことが挙げられる。そのような中で、私が所属している研究室では、レム睡眠の制御に関わる脳部位を複数同定している。そこで、本研究では、これらの脳部位の機能を遺伝学的に操作することでレム睡眠を減少させ、その際の表現型を探ることで、レム睡眠の機能的意義の一端を明らかにすることを目標とした。

古典的なレム睡眠の阻害方法として、動物がレム睡眠に陥るたびに物理的刺激を加え覚醒させる方法がある。しかし、これらの方法は起こすための刺激そのものによるストレスが大きく、レム睡眠を減少させた効果というよりもストレスの影響を見ている可能性が否定できなかった。

私が所属している研究室では、これまでに、脳幹橋の特定の部位にジフテリアトキシンのAサブユニット(DTA)を発現させて細胞死を誘導することで、レム睡眠量を大きく減少させることに成功している(Liuら、未発表)。これは、この脳領域にレム睡眠の制御に重要な役割を担う神経細胞があるためと考えられる。このような遺伝学的にレム睡眠量を減少させる方法では、マウスへのストレスの影響を抑えることができる。そこで、私はこの遺伝学的レム睡眠阻害マウスに注目して、どのような影響が現れるかを解析することにした。

レム睡眠を低下させたマウスの解析にあたり、私は、レム睡眠が脳の恒常性維持に必要ではないかと仮定した。そして、レム睡眠の減少は脳の恒常性に異常をきたし、脳内に損傷をもたらすと予想した。損傷は炎症応答により判断することができるため、私はレム睡眠量を減少させたマウスの脳内における炎症応答に着目した。脳内での炎症応答ではミクログリアがその中心的役割を果たしている。炎症の状況に応答してミクログリアは活性化し、形態の変化や発現因子の変動が起こる。そこで、本研究ではまずミクログリアの形態や活性化状態などを調べるため、免疫組織化学の確立を試みた。

なお、ここで破壊した神経細胞がレム睡眠の制御以外の機能を担っている可能性もあり、観察された表現型が本当にレム睡眠量の減少がもたらした影響かを考慮する必要がある。本研究ではさらに柏木らによって特定された別のレム睡眠制御神経細胞群(柏木ら、未発表)にも DTA を発現させ、レム睡眠を減少させることも試みることにした。そして、これらのレム睡眠阻害マウスに共通してみられる表現型を探ることで、レム睡眠の機能を探索することにした。

【方法】

(1) Iba-1 および CD68 の免疫組織化学によるミクログリアの状態の観察

ミクログリアの状態を観察するために、まず、野生型の C57BL/6J マウス、アルツハイマーモデルマウスを用いて、最適な免疫組織化学の条件を決定した。染色にはミクログリア全般のマーカーとして Iba1 に対する抗体を、活性化型ミクログリア特異的なマーカーとして CD68 に対する抗体を用いた。条件決定後、レム睡眠減少マウスの免疫組織化学を実施した。

(2) 新規レム睡眠量減少マウスの作成

(i) ウイルスベクター注入と睡眠解析

マウスの脳幹被蓋野の左右両側に、DTA を発現するウイルスベクター、または対照群として、蛍光タンパク質 mCherry を発現するウイルスベクターを微量注入した。さらに、マウス頭部に電極を取り付けることで、脳波および筋電位を記録した。記録した脳波と筋電位を 4 秒ずつのエポックで区切り、ノンレム睡眠、レム睡眠、および覚醒の 3 つの状態に振り分け、それぞれのマウスの睡眠状態を解析した。

(ii) ウイルスベクター由来の外來遺伝子の発現の確認

睡眠記録が終わったマウスの脳を固定し、冠状断面の脳切片を作製した。mCherry に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学により、目標の脳部位にウイルス由来の遺伝子が発現しているかを確認した。

【結果】

(1) ミクログリアの状態の観察

Iba1 の免疫組織化学により、典型的なミクログリアの形態の細胞(図)を検出することができた。また、CD68 に関しては、Iba1 との二重染色の結果、一部の Iba1 陽性ミクログリアにおいて、CD68 由来のシグナルが検出でき、活性化型ミクログリアの検出に成功した。

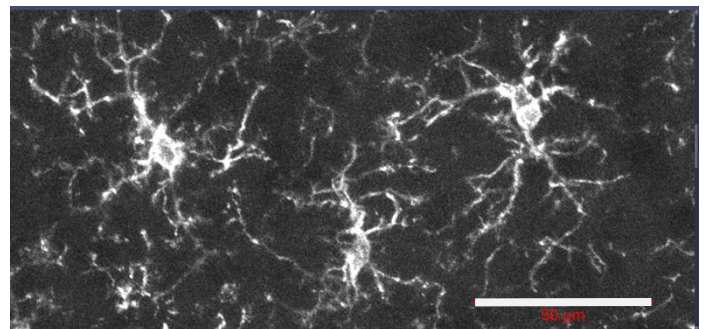


図. 野生型 C57BL/6J マウスの海馬のミクログリアの Iba-1 免疫組織化学による観察 (スケールバー: 50 μ m)

(2) 新規レム睡眠量減少マウスの作成

現在、睡眠状態を解析中である。

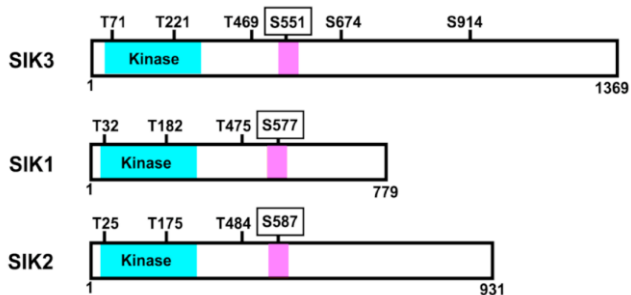
Sik1, Sik2 点変異マウスの作製

Park Minjeong (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・目的】

本研究では、新規睡眠制御遺伝子の同定を目指して、ランダム点突然変異マウスの睡眠異常スクリーニングにもとづくフォワード・ジェネティクス研究に取り組んでいる。この研究によって睡眠量の多い家系を樹立し、さらに責任遺伝子変異を *Sik3* 遺伝子に同定した。遺伝子変異はスプライス変異であり、*Sik3* 遺伝子のエクソンスキップを生じる。*SIK3* タンパク質はリン酸化酵素であるが、遺伝子変異があると一部が欠失した変異型 *SIK3* タンパク質になる。変異型 *SIK3* タンパク質で欠失する部位にはプロテインキナーゼ A に認識されるリン酸化部位 S551 が含まれている (図 1)。このプロテインキナーゼ A 認識部位は、ショウジョウバエや線虫の *Sik3* オルソログにも保存されている。ショウジョウバエにおいて、このプロテインキナーゼ A 認識部位をアラニン置換した *SIK3* を過剰発現させると、睡眠時間が大きく増加することから、このリン酸化部位が無脊椎動物の睡眠様行動の制御に関与していることが示唆される。脊椎動物において、*SIK* ファミリーは *SIK1*、*SIK2*、*SIK3* からなり、図 1 に示すように *SIK3* S551 に相当するプロテインキナーゼ A リン酸化部位は *SIK1* および *SIK2* にも保存されていることから、このリン酸化部位が睡眠覚醒行動を含め様々な行動制御に関与している可能性がある。

本研究は、*SIK3* のタンパク質ファミリーである *SIK1* と *SIK2* のプロテインキナーゼ A リン酸化部位をアラニン置換させる点変異マウスを作製し、*SIK1* と *SIK2* のプロテインキナーゼ A 認識部位を欠損させたマウスでも *SIK3* と同様に睡眠に影響を及ぼすのかを調べることを目的とする。

図 1. *SIK* ファミリーの構造とプロテインキナーゼ A の認識部位

【方法】

(1) CRISPR/Cas9 システムによる点変異マウスの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子変異マウスを作製するためには、標的配列に対する gRNA、Cas9 タンパク質、およびノックインの場合にはドナーDNA を野生型受精卵にインジェクションする必要がある。本研究では、点変異マウスを作製するため、まず gRNA とドナーDNA の配列を設計した。まず、ドナーDNA 設計の段階で候補となる配列をいくつか選び、一番適切なドナーDNA 配列を選択した。次に、標的とする 20 塩基の後ろに PAM 配列を含むことを確認し、GeneArt を用いて gRNA を作製した。ドナーDNA は設計した配列を発注し、Cas9 タンパク質は市販のものを利用した。

(2) 点変異マウスのシーケンス確認

gRNA、Cas9 タンパク質、およびドナーDNA を野生型受精卵にインジェクションすると、受精卵内で標的遺伝子が直接改変され、約 3 週間後に遺伝子改変マウスが産まれる。作製されたマウスの標的遺伝子の部位に設計通りに変異が入っていることを確認するため、まずマウスの遺伝子型を調べ、最終的にはシーケンスを読み取る必要がある。マウスの遺伝子型を調べるため、標的配列からゲノム上で約 200 塩基離れた部位にフォワードとリバースプライマー、および変異が入った標的配列を認識するプライマーの計 3 種類のプライマーを設計した。最初に 3 種類のプライマーを利用してマウスの遺伝子型を同定し、次に変異の入っているヘテロ型やホモ型と予想されるマウスのシーケンスを確認した。

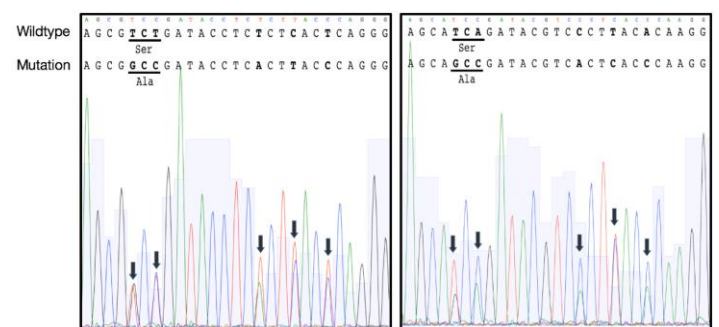
【結果】

(1) 作製されたマウスの結果

Sik1 点変異マウスについては、約 100 個の受精卵を 5 匹の偽妊娠マウスに移植し、そのうち 10 匹が個体として産まれた。遺伝子型を制限酵素処理により調べた結果、10 匹のうち野生型が 6 匹、ヘテロ型が 3 匹、ホモ型が 1 匹だった。*Sik2* 点変異マウスは、約 120 個の受精卵を 6 匹のマウスに移植し、そのうち 19 匹が個体として産まれた。遺伝子型は 19 匹のうち、野生型が 7 匹、ヘテロ型が 7 匹、ホモ型が 5 匹だった。

(2) 作製されたマウスのシーケンス結果

制限酵素処理によりヘテロ型やホモ型と判定されたマウスについては、DNA シーケンシングを行い、標的部位に変異が入っていることを確認した。また、標的部位以降にシーケンスのずれや欠損、挿入なども無いことを確認した。ヘテロ型 *Sik1*、*Sik2* 点変異マウスのシーケンス結果を図 2 に示す。

図 2. *Sik1*、*Sik2* (左、右) 点変異マウスのシーケンス結果

【考察・展望】

最初に産まれた G_0 世代のマウスはモザイクの可能性が高く、そのままでは遺伝子改変マウスとして使用することができない。そのため、 G_0 世代のマウスを C57BL/6N 野生型のマウスと交配させ、 F_1 世代のマウスを作製した。現在、 F_1 世代のヘテロ型マウスから F_2 世代のマウスを作製中である。今後、 F_2 世代のマウスを用いて脳波を計る電極手術を行い、睡眠の測定と解析を行う予定である。

Concanavalin A 誘導性肝炎における活性化免疫受容体 DNAM-1 の機能解明

松尾 壯一 (筑波大学 生物学類)

指導教員：澁谷 彰 (筑波大学 医学医療系)

背景

急性肝障害は急速に多臓器不全を誘導し生命を脅かし得る疾患であり、肝炎ウイルス感染による肝炎や薬剤誘導性肝炎、自己免疫性肝炎が知られている。肝障害の発症要因として、病原体及び毒素による肝細胞の傷害に加え、免疫応答や炎症による肝細胞の細胞死が挙げられる。また、T細胞による免疫応答が急性肝障害の発症に関与していることが知られており、T細胞が関与する急性肝障害の実験動物モデルの代表例として Concanavalin A (ConA) 誘導性肝炎が挙げられる。ConA はタチナタマ由来のレクチンであり、マンノースに富んだ糖タンパク質に結合する。ConA は投与後に肝臓類洞に到達した後、類洞内皮細胞やクッパー細胞が発現する糖タンパク質と T細胞が発現する T細胞受容体を架橋し、T細胞を活性化し、活性化した T細胞はインターフェロン (IFN) γ や腫瘍壊死因子 (TNF) α などのサイトカインを放出し、肝細胞のアポトーシスを誘導する。また、ConA 誘導性肝炎は T細胞依存的であり、T細胞を持たないマウスや T細胞を除去されたマウスは ConA 肝炎を発症しないことが知られている。

DNAM-1 は、T細胞や NK細胞などに発現する活性化免疫受容体であり、NK細胞や CD8陽性 T細胞の細胞傷害活性や、CD8陽性 T細胞の活性化及び増殖やサイトカイン産生の共刺激分子であることが知られている。しかしながら、肝臓内の T細胞における肝炎における役割は未だ明らかにされていない。

目的

本研究では、肝臓 T細胞に発現する DNAM-1 が ConA 誘導性肝炎の増悪に関与しているとの仮説を立て、これを検証した。

材料・方法**・ConA 投与実験**

C57BL/6J 野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} (DNAM-1 欠損) マウスに対し、20 mg/kg body weight の ConA を静脈投与して投与後 48 時間の生存率を評価した。更に、ConA 投与 12 時間後の血漿中 ALT 値・AST 値を測定して肝障害を評価した。また、野生型マウスに DNAM-1 中和抗体 (TX42.1) 或いはコントロール抗体 200 μ g を ConA 投与 24 時間前に腹腔内投与し、その後 ConA を投与して生存率を評価した。

・CBA (Cytometric Bead Assay)

ConA 投与 12 時間後の血漿中のサイトカイン濃度 (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α) を定量した。

・フローサイトメトリーによる肝臓 T細胞の評価

ConA 投与 12 時間後の肝臓 T細胞を単離し、フローサイトメトリーにて T細胞活性化マーカー、分化マーカー、及び DNAM-1 の発現を評価した。

・In vitro アッセイ

野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} マウス由来肝臓 T細胞を単離し、ConA 3 μ g/ml を加えて 12 時間培養した。その後、T細胞活性

化マーカーと IFN- γ 及び TNF- α の産生をフローサイトメトリーにて評価した。

結果

予想に反し、ConA 投与後に *Cd226*^{-/-} マウスは野生型マウスよりも低い生存率を示した。DNAM-1 中和抗体を投与された後に ConA を投与された野生型マウスも同様に低い生存率を示した。しかしながら、ALT 値・AST 値に関しては野生型マウスと *Cd226*^{-/-} マウスの間に明確な差は確認できなかった。野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} マウスは ConA 投与後に IFN- γ , TNF- α , IL-10 濃度の上昇を示したが、*Cd226*^{-/-} マウスは野生型マウスよりも低い IL-10 濃度を示した。更に、ConA 投与後 12 時間の肝臓 T細胞をフローサイトメトリーにて解析した結果、*Cd226*^{-/-} マウス由来 T細胞は野生型マウス由来肝臓 T細胞と比較し、活性化マーカーである CD69 及び CD25 を強く発現していた。また、野生型マウス由来肝臓 CD4 陽性 T細胞は ConA 投与後に DNAM-1 の発現を上昇することが確認できた。

In vitro アッセイでは、野生型マウス由来肝臓 T細胞と *Cd226*^{-/-} マウス由来肝臓 T細胞ともに ConA 刺激による CD69・CD25 の発現上昇及び IFN- γ ・TNF- α 産生を確認できたが、*Cd226*^{-/-} 肝臓 T細胞の方が野生型 T細胞よりも CD69 を強く発現した。

結論

以上から、ConA 投与後、*Cd226*^{-/-} マウスでは野生型マウスよりも肝臓 T細胞がより強く活性化することが抑制性サイトカインである IL-10 の産生が少ない為に、肝障害が増悪して低い生存率を示すことが示唆された。従って、DNAM-1 は活性化した肝臓内 CD4 陽性 T細胞による IL-10 産生の亢進に必要であることが示唆された。

考察と今後の予定

ConA 投与後、*Cd226*^{-/-} マウスは野生型マウスと比較して低い生存率を示したが、肝障害の指標となる ALT 値・AST 値には明確な差が確認できなかった。従ってマウスの死因が急性肝障害そのものではなく、急性肝障害の合併症である脳浮腫、凝固障害、循環障害、腎不全である可能性が考えられる。この可能性を検証する為、今後これらの臓器の組織学的解析を計画している。また、肝臓 CD4 陽性 T細胞を CD4 陽性細胞除去抗体を用いて除去し、ConA 投与後の生存率及び肝障害の比較を行って、*Cd226*^{-/-} マウスが示す低い生存率の原因が CD4 陽性 T細胞であるか否かを確認する。更に、野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} マウス由来肝臓 T細胞を単離し、ConA 存在下で培養した後に IL-10 の産生を評価し、DNAM-1 が肝臓内 T細胞による IL-10 産生の亢進に必要であることを確認する。

異なる脂肪組織由来間葉系幹細胞の乳がん細胞転移能に対する影響

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

【背景】

乳がんは女性が罹患するがんの中で最も多く、転移や再発を伴うケースが多い。転移には、がん細胞を取りまくがん微小環境が大きく影響する。この微小環境にはマクロファージをはじめとした免疫系の細胞、血管内皮細胞や間質細胞などが含まれる。乳腺組織を取り巻く間質細胞の中には間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) が存在する。MSC は脂肪細胞や骨細胞、軟骨細胞への分化能を有する組織幹細胞の1種で、骨髄や脂肪組織を始めとして多くの組織から容易に単離することが可能である。豊富な脂肪組織に囲まれる乳がん細胞の微小環境には MSC が存在しており、先行研究によって、脂肪組織由来 MSC は *in vitro* でがん細胞の遊走能・浸潤能を促進することが報告された[1]。 *in vivo* でも脂肪組織由来 MSC ががんの転移を促進することが報告されている[1]。

活性化白血球細胞接着分子 (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule: ALCAM/CD166) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する I 型膜貫通タンパクであり、CD6-ALCAM の異種結合、もしくは ALCAM-ALCAM の同種結合を形成する接着因子の一つである。Davies らによって、乳がん患者由来がん組織では、転移や再発などの予後が ALCAM の発現と負の相関性を示すことが報告された[2]。さらに ALCAM の発現をノックダウンさせた乳がん細胞株 MDA-MB-231 で遊走能が上昇することや、逆に ALCAM を過剰発現させた乳がん細胞株 MCF-7 では遊走能が減少することが報告されている[3]。これらの報告から乳がん細胞の ALCAM 発現ががんの転移に大きく影響している可能性が高い。

一方、がん微小環境においてはがん細胞が間質細胞の性質を変化させることが多く報告されているが、そのほとんどがサイトカイン等の液性因子に着目しているものであり、ALCAM 等の細胞接着因子に着目した件は少ない。

【目的】

本研究では、がん転移における ALCAM 発現の影響について、がん細胞だけではなく MSC における ALCAM 発現に着目し、乳がん細胞が MSC の ALCAM 発現に対してどの様に影響を及ぼしているのかについて解析を行う。

【材料と方法】

乳がん患者腫瘍内組織由来 MSC (Breast Cancer derived MSC: BC-MSC) の ALCAM 発現の定量を行った。さらに乳がん細胞と健常者脂肪組織由来 MSC (Adipose tissue derived MSC: AT-MSC) の間接 / 直接共培養系を用いて乳がん細胞が AT-MSC の ALCAM 発現を減少させるかどうかを解析した。

① 乳がん患者腫瘍内組織由来細胞の解析

MSC のクライテリアとして、細胞表面マーカー (CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34-, CD14-, CD19-, HLA-DR-) と分化能 (脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞への分化) がある[4]。乳がん患者腫瘍内組織から単離した細胞が MSC であることを確認するため、培養した細胞の表面抗原マーカー発現をフローサイトメトリーで解析した。分化能の評価では細胞をコンフルエントになるまで培養した後、脂肪・骨・軟骨それぞれの分化培地に切り替えた。数週間後、分化能を評価するため Oil Red O・Alizarin Red・Toluidine Blue により染色した。

② 乳がん患者腫瘍内組織由来 MSC の ALCAM 発現の解析

BC-MSC の ALCAM 発現をフローサイトメーターと RT-PCR 法で解析し、ALCAM を含む MSC マーカー発現を AT-MSC と比較した。

③ 乳がん細胞と健常者脂肪組織由来 MSC との間接 / 直接共培養系の構築

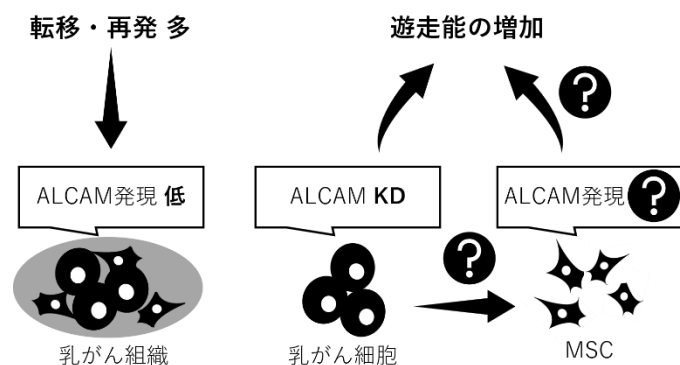
乳がん細胞からの MSC への影響を解析するために、MDA-MB-231 もしくは MCF-7 乳がん細胞株を用いる。これらの乳がん細胞株由来の培地上清を含む培地にて AT-MSC を培養した。並行して、乳がん細胞株と AT-MSC を直接混ぜ合わせた共培養系を用いて解析した。数日間共培養した後、MSC を単離し、ALCAM 発現変化をフローサイトメーターと RT-PCR 法で解析した。

【結果と考察】

発表会当日にて報告させていただきます。

【参考文献】

- 1) Rowan et al.(2014) PLOS ONE 9: e89595
- 2) Davies et al. (2008) Oncology Reports 19: 555-561
- 3) Hein et al. (2011) Breast Cancer Research and Treatment 129:347-360
- 4) Dominici et al. (2006) Cytotherapy 8:315-317



多能性幹細胞から副腎性腺原基 (Adreno-gonadal primordium) への分化誘導条件の探索

LI JINGYUE (筑波大学 生物学類)

指導教員: 久武 幸司 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

副腎は人体においてホルモン分泌に重要な役割を果たしており、その機能異常はアジソン病 (原発性慢性副腎不全) などの疾患を引き起こす。副腎機能不全症に対してステロイド補充療法が行われているが、多くの場合一生の補充が必要とし、副作用の問題も少なからず存在する。そのため、ステロイドホルモンを必要としない根本的治療法として多能性幹細胞から副腎を誘導し、移植する再生医療が期待されている。しかし、多能性幹細胞から副腎が作製された報告例はない。

副腎は 2 層構造をしており、中胚葉由来の副腎皮質および外胚葉由来の副腎髄質から構成される。副腎皮質は性腺と同様、中胚葉由来の生殖隆起より発生する副腎性腺原基 (Adrenogonadal primordium, AGP) に由来する。すなわち、副腎皮質、性腺は同じ副腎性腺原基から発生し、後に将来成人副腎皮質に分化する副腎原基 (Adrenal primordium) と性腺原基 (Gonadal primordium) に分離する。AGP の発生・分化の過程において、NR5A1 (Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1; steroidogenic factor-1, SF-1 と呼ばれる)、WT1 (Wilms' tumor-related gene 1) などの転写因子が重要な働きをしている。中でも NR5A1 は当初、ステロイド合成酵素遺伝子に対する転写因子として同定されたが、その遺伝子欠損マウスでは副腎、性腺ともに形成されないことから、AGP の発生・分化の必須因子として考えられている。副腎原基にはのちに外胚葉由来の神経堤細胞が侵入し、髄質を形成する[1,2]。多能性幹細胞から副腎髄質となる神経堤細胞への分化誘導の条件はすでに報告されているが、副腎皮質の起原である副腎性腺原基への分化誘導の条件はまだ確定されていない。

本研究では、AGP 発生の構成的理解と将来的な再生医学応用を目指し、哺乳類多能性幹細胞から AGP を誘導することを目的とする。多能性幹細胞から中胚葉への分化誘導系はすでに確立されている[3]。そのため、本研究では NR5A1 などの発現を指標としながら、中胚葉から副腎性腺原基細胞への分化誘導条件を探索する。

【方法】

(1) 副腎性腺原基の発生に関連する候補因子の選出

副腎発生に関わる因子やシグナル伝達経路について解明されてきた先行研究を参照に、AGP の発生に関連する候補因子を選出した。

(2) 多能性幹細胞との培養

ヒト iPS 細胞 (WTC11) を StemFit AK02N 培地(+supB, supC; Ajinomoto) に Rock Inhibitor(Y-27632, 和光) と Recombinant Human Laminin 511(iMatrix-511, Nippi) を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 日間培養した後、Day 1 から 6 日間 Stemsure DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地 (+2% B-27 supplement, 1% N-2 supplement, 1% Nonessential Amino Acids, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1%

Monothioglycerol, 1% Penicillin/streptomycin) に候補因子を添加して、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を続けた。

ポジティブコントロールとして用いた NR5A1 の高発現が知られている副腎がん細胞株 NCI-H295R (ATCC® CRL-2128™) を Stemsure DMEM 培地 (+2% B-27 supplement, 1% N-2 supplement, 1% Nonessential Amino Acids, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1% Monothioglycerol, 1% Penicillin/streptomycin, 2.5% Fetal Bovine Serum)、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を続けた。

(3) 目標遺伝子発現量の評価

・定量的 PCR

細胞から RNA 抽出後、逆転写により cDNA を作成し、TaqMan Assay を用いて AGP マーカー遺伝子に対する定量的 PCR を行った。

・免疫染色

細胞を 4% Paraformaldehyde で固定後、PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄し、AGP マーカー遺伝子である NR5A1 に対する 1 次抗体(STF-1(D1Z2A) XP Rabbit mAB antibody, Cell Signaling TECHNOLOGY) を希釈率 1:100 で加え、続いてそれらの 1 次抗体に対する 2 次抗体を希釈率 1:200 で添加した。さらに核染色のため DAPI を加え、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果・考察】

定量的 PCR および免疫染色の結果より、未分化ヒト iPS 細胞に比べ、Retinoic Acid 添加により NR5A1 の発現量に増加が見られた。これらの結果により、Retinoic Acid は直接的または間接的に NR5A1 の発現制御に関係している可能性があると考えられる。しかし、ポジティブコントロールである NCI-H295R に比べ、非常に低い発現レベルにとどまっていた。そのため、現在の条件では、完全な AGP が誘導されたとは考えられない。

そこで、今後は公共の遺伝子発現プロファイルのデータベースなどを用いて、さらに候補因子を選出する予定である。また、培養期間について、ヒト AGP の発生に必要な期間に比べ、7 日間の培養は短いと考えられる。そこで、今後は長期培養による分化誘導実験を計画している。

【参考文献】

- [1]. Ikeda Y. *et al.*, Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol*, 7, 852-60 (1993)
- [2] Luo, X. *et al.*, A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77, 481-490 (1994)
- [3]. Sumi, T. *et al.*, Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*, 35, 2969-79. (2008)

REMI 法を用いた細胞性粘菌集合異常株の探索

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

背景と目的

単細胞から多細胞への移行は、細胞の誕生、真核生物の誕生、陸上化に並ぶ生命進化の歴史における重要なイベントの一つである。多細胞化によって、単細胞では成し得なかった大型化を果たし、また個体を構成する細胞の分化によって多様な機能を獲得することで、生態系における競争力が高まり、ニッチを拡大した。さらに個々の細胞が死滅しても個体は活動を続けるため、長い寿命を持つことができるようになった。多細胞性の不連続な系統分布と様態の違いから、多細胞化は真核生物で独立に何回も起こったと考えられている (Bonner, 1998; King, 2004; Rock, 2008; Knoll, 2011)。各生物群において多細胞性への移行は、分裂した娘細胞が分離せずに成長することによるクローン多細胞性と、個々の細胞が集合することによる集合多細胞性のどちらかのメカニズムで起こったとされている (Brunet and King, 2017)。しかし、その生物学的重要性にも関わらず、多細胞性の起源はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、多細胞性の起源に関する新たな知見を得るための研究材料として細胞性粘菌を用いた。

細胞性粘菌は、Amoebozoa に属する、土壌遍在性の真核微生物である。好適な環境下では単細胞アメーバとして自由生活を行い、周囲のバクテリアを捕食しながら二分裂によって増殖する。アメーバは、哺乳類の免疫系や神経系の細胞に見られる、アクチン-ミオシン細胞骨格系を用いた運動を行う。飢餓状態になると、cAMP を始めとした走化性物質への応答によって集合し、単純な発生過程を経て、24 時間以内に胞子と柄系列に分化した多細胞性の子実体を形成する。この集合発生の過程には、細胞間シグナル伝達や形態形成運動、利他主義といった多細胞性の素過程が内包されている。このように、細胞性粘菌は単細胞段階と多細胞段階を行き来する集合多細胞性を示す。また、細胞性粘菌は、培養系が確立されており、実験室での扱いも容易である。特徴的な多細胞発生の間、半数体であるため遺伝子破壊や相同組換えといった様々な分子生物学的手法が用いやすく、また全ゲノム配列が解読されている。そのため、集合多細胞性の研究において優れたモデル生物であると考えられる。

細胞性粘菌の多細胞発生は、集合中心にある細胞から走化性物質がパルス的に分泌されることによって始まる。集合中心形成については、ペースメーカー細胞の様な単一の特殊な細胞が集合中心となる仮説 (Ennis and Sussman, 1958; Shaffer, 1961) と、均質な細胞の相互作用による協調的な振る舞いによって生じる仮説の 2 つが提唱されている (Gregor et al., 2010)。集合中心の形成は、集合多細胞性を示す細胞性粘菌における多細胞段階への第一歩であるにも関わらず、あまり研究が進んでおらず、その分子メカニズムや遺伝的背景もほとんど明らかでない。

本研究では、集合中心の形成に関わる遺伝子を明らかにすることを目的とし、REMI 法という変異挿入法を用いて、集合に異常の見られる変異株の収集・探索を行い、集合多細胞性における単細胞から多細胞へ至る道のりの解明を目指した。

材料と方法

(1) REMI 法による変異株作製

REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) 法とは、粘着(突出)末端を形成する制限酵素で処理した遺伝子カセットを、同様の末端を形成する制限酵素とともにエレクトロポレーションによって細胞に導入することによって、ゲノムに制限酵素認識配列依存的ランダムに遺伝子カセットを挿入し、遺伝子を破壊する方法である。(図 1)

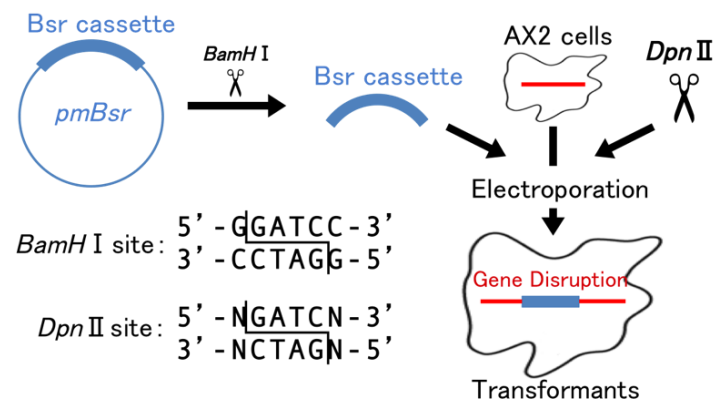


図 1 REMI 法の概略図

遺伝子カセット作製には *pmBsr* を用いた。*pmBsr* は BlasticinS 耐性遺伝子(Bsr)を持つプラスミドである。Bsr 領域を PCR によって増幅し、*BamHI* で処理した Bsr カセットを精製することで導入する遺伝子カセットを作製した。変異を挿入する細胞には *Dictyostelium discoideum* の無菌培養株 AX2 を用いた。HL5 培地で震盪培養し、細胞密度が $1.0\text{-}2.0 \times 10^6$ cells/mL となるように調整した。その後リン酸緩衝液に懸濁して 1 時間震盪して飢餓状態にした。作製した Bsr カセットを *DpnII* と共に、調整した AX2 細胞にエレクトロポレーションによって導入した。

(2) 目的とする変異株のスクリーニング

細胞を 96well に分注し、BlasticinS によって Bsr カセットがゲノムに組み込まれた変異体を選択した。得られた変異体は *Klebsiella aerogenes* を塗布した 5LP 寒天培地上で発生させ、表現型を観察し、集合に異常の見られる変異株を選択した。

結果と考察

1 月 12 日時点で、42 回の REMI を行い、変異体を計 3733 株得た。そのうち集合に異常の見られた株は 3 株であり、さらなる探索を進めている。

今後の展望

得られた集合異常株の解析を行う予定である。cAMP への応答性や運動性といった細胞学的性質を調べると共に、挿入されている Bsr カセットをマーカーとして変異が起こった遺伝子を同定し、AX2 株の遺伝子破壊や変異遺伝子の導入によって確認する。また引き続き REMI によって集合に異常の見られる変異株の探索を行う。

細胞性粘菌カフェイン耐性株の原因遺伝子の探索

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

背景と目的

カフェインはプリン環を持ったアルカロイドの1種である。身近な食品ではコーヒーやお茶に含まれる。また、アデノシン受容体に拮抗することによって覚醒作用、解熱鎮痛作用、強心作用、利尿作用を示す。一方で、カフェインを過剰摂取した場合、重篤な中毒症状を発症することが知られている。さらに、細胞レベルではDNA修復阻害作用や細胞死を引き起こすことが報告されている。

これまで上記の分子メカニズムはいまだ不明であった。しかし、細胞性粘菌のアラキドン酸合成酵素 (PLA2) 欠損株が、高濃度のカフェインに耐性を示すことが発見された (Kuwayama, Scientific Reports, 2012)。

細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) は土壌に生息する真核アメーバ細胞であり、単細胞として増殖しながら多細胞の生活環も有する。また、実験室での培養や保存が簡便である点、遺伝子操作が容易である点、全遺伝子情報の解読が終わりゲノム配列も公開されている点から、モデル生物として利用されている。細胞性粘菌は、栄養が存在する状態ではアメーバ状の単細胞として増殖する。しかし、飢餓状態では一部の細胞がcAMPを分泌し、ナメクジ状の多細胞体を形成し、最終的に胞子と柄からなる子実体を形成する。そして、細胞性粘菌にはアポトーシスを引き起こすカスパーゼが存在しないので、アポトーシスの関与を無視することも細胞死解析する際の利点である。

先行研究において、細胞性粘菌やヒト由来の細胞 (HeLa 細胞) でカフェインが細胞死を誘導するメカニズムは以下のとおりである。まず、カフェインは遺伝子 *plaA* の活性化を行う。この活性化された PLA2 が細胞膜中のリン脂質に存在するアラキドン酸を遊離させる。その後、遊離したアラキドン酸が細胞死を促進させる。

アラキドン酸は細胞膜リン脂質にエステル結合した形で貯蔵されており、代謝物はプロスタグランジンなどの重要な生理活性を有している。そのため、アラキドン酸は生体維持に必要な物質であるといえる。このように、アラキドン酸は生体維持に必要な物質でありながら、細胞死を誘導する働きを持つことが明らかになった。

しかしながら、現在まで高濃度のカフェインによる細胞死経路の詳細は明らかにはなっておらず、遊離したアラキドン酸がどのような経路で細胞死を誘導するのも不明である。そこで、私はジーンタギング法 (REMI 法) を用いて作製されたカフェイン耐性変異株を利用し、カフェイン耐性株の原因遺伝子の探索を行うことにした。

REMI 法とは制限酵素によりゲノム DNA を部分的に切断し、その部位に外来の薬剤耐性遺伝子を導入することにより突然変異を誘発させる方法である。

材料と方法

(1) ゲノム DNA の抽出

REMI 法によって得られたカフェイン耐性変異株 39 株の細胞からゲノム DNA を phenol/chloroform 方法により抽出した。

(2) ゲノム DNA の増幅

実験(1)で得られたゲノムを inversePCR 法によって増幅、精製する。

inversePCR 法は隣接する未知領域の配列を決定するときに使われる方法である。配列が既知の領域と未知の領域を含む未知遺伝子を制限酵素処理で切断する。その後、ライゲーションにより、環状 DNA になったところ配列既知の領域からプライミングすることで未知遺伝子を増幅する。この増幅された遺伝子は未知の領域も含まれているので、末端から配列決定を行うことにより既知配列に隣接する未知の領域の配列を決定することが出来る。

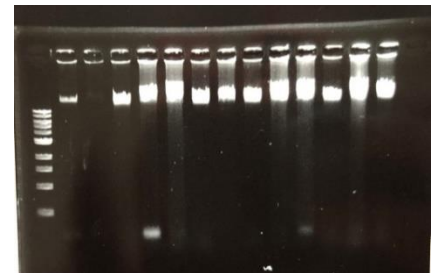
(3) 原因遺伝子の決定

実験(2)で増幅した DNA 断片の配列決定を行う。

結果と考察

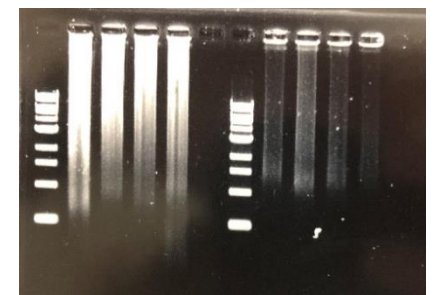
(1) ゲノム DNA の抽出

phenol/chloroform 法により抽出したゲノムを電気泳動で確認すると、右図の通りになった。ゲノム DNA は高純度で精製された。



(2) ゲノム DNA の増幅

inversePCR 法によりゲノムを増幅し、電気泳動で確認を行ったが、明確な産物を得ることはできなかった。現在、条件検討を行い、産物の解析を急いでいる。



(3) 原因遺伝子の決定

現在解析中であり、詳細は卒業研究発表会にて報告する。

今後の展望

原因遺伝子の同定に成功した後は、ノックアウト株を作製し、原因遺伝子の妥当性を検討する。さらに、それらのカフェイン耐性の強度を詳細に検討することにより、アラキドン酸経路との関係性を明らかにする。

細胞集団運動のソリトン波形成における責任遺伝子の探索と発現解析

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

背景・目的

自然界ではソリトン波と呼ばれるパルス状の波動が“津波”や“プラズマ中での非線形波動”など様々な場面で観察される。このソリトン波は高次の生命現象においては観察されていなかったが、細胞による生命現象として初めてソリトン様の現象が細胞性粘菌の走化性欠損突然変異株(ソリトン株; KI-5, KI-10)の細胞集団運動において発見された(Kuwayama and Ishida 2013)。

細胞性粘菌は土壤に生息する社会性の真核アメーバ生物である。細胞性粘菌は普段は単細胞生物として運動するが、飢餓状態に陥ると細胞同士が走化性応答により集まり、多細胞体を形成する。一方、ソリトン株は走化性を欠損しているため多細胞体は形成することはできないが、細胞密度に依存して自発的にソリトン様細胞集団運動を形成する。つまり野生株とソリトン株とは集団運動の様式が全く異なっていると言える。また、ソリトン様細胞集団運動は集団としては衝突しても形状や大きさ、運動方向や速度を維持するというソリトン様の性質を示すのに対して、細胞集団を構成する細胞は入れ替わっていることが観察された。このことは、細胞集団が動的平衡を保ちながら、細胞集団の形状を個々の細胞ではなく構造そのものによって記憶されていることを示唆している。

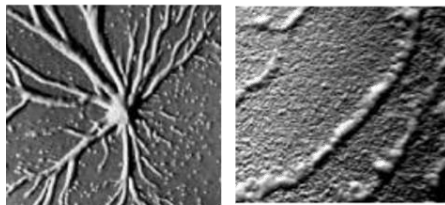


図 1. 集中中の細胞性粘菌(左)とソリトン様細胞集団運動(右)

このような動的平衡な性質やソリトンの性質が普遍的な細胞集団運動にも存在するのかわ不明である。そのため、ソリトン様細胞集団運動の形成メカニズムの解明は多細胞生物の発生における形態形成運動等の多細胞体運動のメカニズム解明に新たな視点をもたらす可能性がある。しかしソリトン株は突然変異株であるため、このメカニズムの解明の為に、突然変異株の責任遺伝子の特定と機能解析が不可欠である。

先行研究では、ソリトン株(KI-5)に正常遺伝子の発現をさせることで、ソリトン株の表現型の原因となる遺伝子の探索が行われた。その結果、走化性能の回復を部分的に示した遺伝子(DDB_G0279067, DDB_G0279449)やソリトン様細胞集団運動を消失させた遺伝子(DDB_G0272092)が選出された。しかし、これらの探索は過剰発現によるものであり、責任遺伝子であるかを確かめるには遺伝子破壊株の作製や発現解析を通じた機能解析が必要である。

そこで、本研究では先行研究により走化性に影響を及ぼすと推測される遺伝子(DDB_G0279067, DDB_G0279449)を対象に、ソリトン様運動への関連を調べる為に遺伝子破壊株を作製した(実験 I)。さらにすでに遺伝子破壊株が作製されている遺伝子(DDB_G0272092)についてはSTRING 解析によって関係性が予測された遺伝子を対象に、ソリトン株(KI-5)と野生株(AX2)との間での遺伝子発現量を比較した(実験 II)。これらの実験を通して、ソリトン株の表現型の責任遺伝子の探索や機能解析を行った。

材料・方法

実験 I 遺伝子破壊株作製による表現型の観察

(1) PCR 法を利用した遺伝子破壊コンストラクトの作製
DDB_G0279067 と DDB_G0279449 を対象の遺伝子として、PCR 法を利用した桑山の方法(Kuwayama et al, Nuc. Acids, Res., 2002)により遺伝子破壊コンストラクトを作製した。

(2) 野生株(AX2)への形質転換

振盪培養法により細胞数を調整した野生株細胞をエレクトロポレーション緩衝液で懸濁した。この細胞懸濁液に、エタノール沈殿により精製し風乾させた遺伝子破壊コンストラクト 10 µg を溶解させ、エレクトロポレーション法(250 V/mm, 100 µsec×10)による遺伝子導入を行った。その後選択薬剤(Blasticidin S)を加え、細胞の増殖が確認されるまで培養した。

(3) 表現型の観察

十分に増殖したシャーレから細胞を分取し、餌となるバクテリア(*Klebsiella aerogenes*)を撒いた 1/3 SM 寒天培地に植えた。10~14 日ほど培養を行い、集合能や子実体形成能への影響の有無やソリトン株の表現型との差異などに注目して表現型を観察した。

実験 II RT-PCR による発現量の比較

(1) 対象遺伝子の選定

STRING 解析によって、DDB_G0272092 と関連があると思われる遺伝子を 8 個選定し、primer3 プログラムによりプライマーを設計した

(2) RNA 抽出

1/3 SM 寒天培地にて培養したソリトン株と HL5 培地にて培養した野生株が十分な量になったことを確認し、それぞれ細胞性粘菌の生理的食塩水に懸濁した。このソリトン株と野生株の細胞懸濁液をそれぞれ無栄養寒天培地に滴下し飢餓状態にした。この無栄養寒天培地からソリトン株がソリトン様運動を発生させたタイミングで、ソリトン株と野生株から全 RNA を抽出した。

(3) RT-PCR

抽出した RNA を逆転写 PCR 法により一本鎖 cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として PCR を行った。RT-PCR 法により得られた PCR 産物を電気泳動にかけることで、野生株とソリトン株との間で標的遺伝子の発現量の差を観察した。

結果・考察

実験 I : DDB_G0279067, DDB_G0279449 の遺伝子破壊コンストラクトについては、PCR 産物を電気泳動法により作製を確認した。その後形質転換を行ったが、現段階で細胞の形質転換体が確認できず、今後は遺伝子破壊株を単離次第、表現型の観察を行う予定である。

実験 II : 現在は全 RNA 抽出まで行った。今後 RT-PCR 法によって、標的遺伝子の発現量の比較を行う予定である。

これらの 2 つの実験は進行中であるが、卒業研究発表会には結果を提示、紹介したいと考えている。

点突然変異型 mtDNA を有するマウスの酸化ダメージの臓器特異性

仁平 隆太 (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】

ミトコンドリアは生体エネルギーである ATP の大部分を合成する重要な細胞小器官であり、その内部には核 DNA とは異なる独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が、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、病原性突然変異が生じた mtDNA 分子種が優位に蓄積すると、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。また、最近では、がんや糖尿病などの疾患の発症にも mtDNA の突然変異が関与している可能性が示唆されている。ミトコンドリアは電子伝達の過程で、少量の電子が漏出することにより活性酸素種 (ROS) を産生することが知られている。したがって、病原性突然変異型 mtDNA が蓄積した場合はさらに ROS が産生され、この過剰産生された ROS が核酸や生体膜、タンパク質など細胞や組織の構成要素に酸化ダメージを与えることで多様な疾患誘発に関与する可能性が報告されている。

しかし、mtDNA の突然変異が多様な疾患の原因となっているという直接的な証拠はなく、両者の因果関係 (発症機構) については未だに解明されていない。疾患の発症機構の詳細理解や治療法の探索には、様々な mtDNA の突然変異に起因するミトコンドリア病モデルマウス (mito-mice) を用いた研究が効果的であり、これまでに所属研究室では複数の mito-mice を作製してきた。その中の 1 つである mito-miceND6^M は、呼吸酵素複合体 I のサブユニットである ND6 遺伝子に G13997A 点突然変異を有する mtDNA (mtDNA-G13997A) のみをホモプラスミーの状態に含有し、軽度な呼吸機能低下と ROS の過剰産生という表現型を示す。また、加齢とともに高血糖を呈し、B 細胞リンパ腫の発症頻度の増加が見られる。この事実を逆に捉えると、mito-miceND6^M は全身で mtDNA-G13997A をホモプラスミーで有しているにもかかわらず、血糖上昇とリンパ腫発症以外には異常が認められていないということであり、臓器間・組織間において ROS の産生量や ROS による酸化ダメージの蓄積に差異があることを示唆している。

このような所属研究室の先行研究をふまえ、本研究では、mtDNA-G13997A をホモプラスミーで有する mito-miceND6^M において、mtDNA は全身均一であったとしても酸化ダメージの蓄積には臓器間・組織間で差異があるのではないかと作業仮説を立て、この仮説を検証するために臓器間および同一の臓器を構成する組織間で酸化ダメージの程度を比較検討することを目的とした。

【材料・方法】

使用したマウスについて

Mito-miceND6^M の核 DNA は野生型とされている C57BL/6J (B6) 系統であり、mtDNA にのみ突然変異を有するため、核 DNA と mtDNA がともに B6 系統であるマウスをコントロールとして用い、mtDNA の突然変異のみを原因とする酸化ダメージの蓄積の差異を解析した。また、mito-miceND6^M の病態は生後約 18 か月を経過した頃から現れると考えられていることから、それぞれの系統において生後 18 か月以前 (12 か月齢) と以降 (24 か月齢) のマウスを用意して解析を行うこととした。

使用したマウス実験群

マウス	月齢
B6	12
B6	24
Mito-miceND6 ^M	12
Mito-miceND6 ^M	24

酸化ダメージの解析について

ROS はその大部分が抗酸化物質や酵素によって直ちに消去されてしまうため、臓器に存在する ROS の量を測定することは極めて困難である。そこで、ROS の過剰産生によって生じる臓器への酸化ダメージの蓄積を 1-メチルアデノシン (m¹A) に対する免疫染色を用いて解析することとした。m¹A は、tRNA に特異的な修飾核酸であり、組織が酸化ダメージを受けることによって増加するとされている。本研究では、上記 4 群のマウス個体を解剖し、各臓器の組織切片を用いて、抗 m¹A 免疫染色を実施した。

【結果】

Mito-miceND6^M の多くの臓器では酸化ダメージの蓄積に B6 との差異は見られなかった。ただ、B6、mito-miceND6^M とともに加齢による酸化ダメージの蓄積が見られる臓器と加齢による酸化ダメージの蓄積が見られない臓器が認められた。

一方、特定の臓器については B6 と比べ、大きな酸化ダメージの蓄積が見られた。その臓器は B6 と比べ、ROS が過剰産生されているか、ROS に対する抵抗性が脆弱であることが示唆された。また、同一の臓器内で、酸化ダメージの蓄積が他と明らかに異なる細胞群も認められた。この結果は臓器内の特定の組織や細胞についても ROS の産生量や ROS に対する抵抗性に差異があることを示唆している。より詳細な結果については発表会にて報告する予定である。

ミトコンドリア DNA にランダムな突然変異を有するマウスの病態形成に及ぼすミトコンドリア内タンパク質分解の影響

山田 亮仁 (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

細胞小器官の一種であるミトコンドリアは、外膜および内膜の二重膜からなり、内膜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、病原性突然変異を有する mtDNA 分子の蓄積はミトコンドリア呼吸機能低下を誘導する。

哺乳類の mtDNA の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。先行研究において、こ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、結果として、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。しかしながら、この呼吸機能欠損を誘導する詳細な分子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、ミトコンドリアには融合と分裂を介して mtDNA や遺伝子産物を交換することで、その機能を正常に保つはたらき、ならびに、逆に全てのミトコンドリアの機能を破綻させるはたらきの (ミトコンドリア間相互作用) があることを証明している。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とが明らかとなっている。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と考えられる。

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病原性突然変異を有していない異なる mtDNA 分子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病原性突然変異型 mtDNA 分子が蓄積しない限り、ミトコンドリア呼吸機能は維持 (正常化) されると考えられる。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。そこで本研究では、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 の臓器を用いて mtDNA へのランダムな突然変異が呼吸欠損を誘導する分子機構を解明することを目的とした。

材料

○mtDNA mutator mice (10 ヶ月齢) における凍結組織および、対照群として野生型の PolG を発現する同月齢のマウスの凍結組織

方法・結果

臓器から抽出した総タンパク質を用いたウェスタンブロッティング解析によって、肝臓における 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、WT と比較して、mtDNA mutator mice の Sdha の発現量は同等であったが、Cox4 の発現量は減少していた。

その他の詳細な結果は発表会にて報告する予定である。

考察

ウェスタンブロッティング解析の結果から、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、mtDNA mutator mice の肝臓では発現量において異なる挙動を示すことが確認された。注目すべきは、Sdha を含む複合体 II は核 DNA にコードされたサブユニットのみで構成されているが、Cox4 を含む複合体 IV は核 DNA にコードされたサブユニットと mtDNA にコードされたサブユニットが組み合わされて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によって mtDNA にコードされたサブユニットが不完全な状態で複合体に組み込まれ、複合体の安定性を低下させることで分解速度が早まり、核 DNA にコードされたサブユニットも同時に減少しているのではないかと考えている。この呼吸酵素複合体の分解促進によって、呼吸機能の低下が引き起こされているのではないかと仮説を立て、現在、この仮説を検証するためにさらなる実験を行っている。

HMGC_oA 還元酵素ノックアウト細胞におけるミトコンドリア機能の解析

河合 あかり (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】

コレステロールは、主に脂質二重層をもつ細胞膜の流動性の維持や、ホルモンの合成など様々な生命現象に関わっており、生体において不可欠な化合物である。このコレステロールはメバロン酸経路によって合成され、この反応は細胞において主に細胞質基質上で行われている。

メバロン酸経路とは、アセチル CoA から始まり、中間体としてヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMGC_oA) からメバロン酸が合成され、最終的にコレステロールが合成される反応経路である。この経路における律速段階は HMGC_oA 還元酵素によって HMGC_oA がメバロン酸に還元される反応である。そのため HMGC_oA 還元酵素はメバロン酸経路における重要な酵素となっている。事実、HMGC_oA 還元酵素阻害薬は、コレステロール降下薬として広く臨床で用いられている。また、発症機構は不明であるが HMGC_oA 還元酵素を阻害した際、生体において筋障害が見られることが知られている。これらのことから、メバロン酸経路は筋分化や筋再生に関わっていることが示唆される。さらに、筋障害発生時にミトコンドリア機能障害がみられることや、ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系において電子伝達体、ユビキノンの生合成にメバロン酸経路由来のポリプレニル側鎖が関与していることなどから、メバロン酸経路のミトコンドリア機能への関与も予想される。

そこで本研究では、筋芽細胞株 C2C12 において HMGC_oA 還元酵素をノックアウトした細胞モデルを用い、メバロン酸経路が筋細胞における分化や増殖、ミトコンドリア機能に与える影響の解析を目的とする。

【方法】

1. HMGC_oA 還元酵素ノックアウト C2C12 細胞の樹立

本実験で用いる細胞株は、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞である。CRISPR-Cas9 により、HMGC_oA 還元酵素の遺伝子上に HDR プラスミドを挿入することで HMGC_oA 還元酵素ノックアウト C2C12 細胞を樹立した。これに対し、プラスミド未挿入の C2C12 細胞をコントロール (Ctrl) とし以下の実験を行った。

2. C2C12 細胞における cell growth の検証

上記の C2C12 Ctrl/KO 細胞に対し、通常培養下での細胞増殖速度の比較を行った。細胞は 10% FBS (ウシ胎児血清) を含む high glucose DMEM で培養し、細胞播種から 6、12、24、30、36、42、48 時間後の細胞数をカウントした。

3. C2C12 細胞における筋細胞分化形態の観察

筋芽細胞である C2C12 細胞は、特定の分化誘導培地で培養すると筋芽細胞同士が融合して多核の筋管を形成し、筋分化する。そこで本実験では C2C12 Ctrl/KO 細胞を 80-90% コンフルエン

トになるまで培養し、その後分化誘導培地である 2% HS (ウマ血清) を含む high glucose DMEM に交換し、1 日置きの培地交換で最大 96 時間観察を行った。加えて、筋分化の程度を示す指標として Fusion index の測定も行った。測定にあたり、細胞をギムザ染色液で染色した。Fusion index は、無作為に選んだ 4 つの領域において、総核数あたりの多核細胞質になっている核数のパーセンテージを算出することで求めた。

4. メバロン酸添加時の C2C12 細胞の筋分化形態の観察

筋分化不全とメバロン酸経路の関連性を検討するため、メバロン酸経路において HMGC_oA 還元酵素の直下にあるメバロン酸を添加し、分化不全の改善の有無を調べた。通常分化誘導培地に加え、メバロン酸をそれぞれ 10 μM、5 mM 含む分化誘導培地を作成し、これを 1 日置きに交換した。観察は最大 96 時間行い、形態観察と Fusion index の算出により分化不全改善の程度を比較した。

5. HMGC_oA 還元酵素ノックアウト C2C12 細胞におけるミトコンドリア機能の解析

ATP は細胞質基質で行われる解糖系と、ミトコンドリア内で行われるクエン酸回路、電子伝達系の反応によって生成される。解糖系はグルコースをピルビン酸などの有機酸に異化し、グルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP を生成する。これに対しクエン酸回路は解糖系によって得られたピルビン酸をアセチル CoA へ変換して電子伝達系で用いる NADH を生成し、電子伝達系では解糖系に比べて大幅に効率よく ATP が生成される。ミトコンドリア機能障害が起きると、この電子伝達系が十分に機能しなくなり、代わりに解糖系の亢進が起こる。解糖系の亢進は副産物として合成される乳酸の増加につながる。このため、低 ATP・高乳酸の状態はミトコンドリア機能障害の指標の一つとなっている。

本実験では、ATP と乳酸の定量キットを用い、C2C12 Ctrl/KO 細胞におけるミトコンドリア機能の評価を行った。

【結果】

今回の実験において、HMGC_oA 還元酵素をノックアウトした筋芽細胞において筋分化不全が引き起こされることが半明した。4 の実験において、この分化不全がメバロン酸の添加により部分的に改善された。

この他の詳細な結果、考察については発表会にて報告予定である。

病原性突然変異型 mtDNA が B 細胞の分化・機能に及ぼす影響の解析

小谷 知広 (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

ミトコンドリアは呼吸酵素複合体 I-V によって、生体エネルギー (ATP) を産生する細胞小器官である。ミトコンドリアには、ミトコンドリア DNA (mtDNA) が複数コピー存在し、呼吸酵素複合体を構成するタンパク質と、その翻訳に必要な遺伝子がコードされている。ミトコンドリアは ATP の産生に加え、活性酸素種 (ROS) の産生など多様な機能を持ち、シグナル伝達の調節を担う細胞小器官でもある。ミトコンドリアはこれらの機能を通して、細胞の代謝、分化、増殖、生存などを制御している。

免疫細胞は造血幹細胞から分化し、機能的な細胞が生存、増殖して免疫系を構成し、抗原に暴露されると生体防御に働く。本研究では免疫担当 B 細胞に着目し、これまで知られていなかった B 細胞におけるミトコンドリアの役割を検討した。

B 細胞は抗体産生を行うリンパ細胞であり、骨髄で造血幹細胞からプロ B 細胞、プレ B 細胞、未熟 B 細胞へと分化した後、脾臓では T1-B 細胞、T2-B 細胞を経て、成熟 B 細胞である MZ-B 細胞と濾胞 B 細胞に分化する。濾胞 B 細胞は抗原に暴露されると、プラズマ細胞 (抗体産生細胞) に分化するとともに、一部は記憶 B 細胞に分化する。本研究では、B 細胞の分化・機能におけるミトコンドリアの役割を検討するため、軽度ミトコンドリア機能不全を呈するマウスを用いて解析を行った。

方法

呼吸酵素複合体 I のサブユニット ND6 遺伝子に G13997A 病原性点突然変異を有する mtDNA をホモプラスミーの状態で含有し、ROS の過剰産生や軽度 ATP 産生不全などの表現型を示す mito-miceND6^M を、野生型マウスと比較し、以下を解析した。

- (1) 骨髄と脾臓における B 細胞分化の解析: フローサイトメーターで、骨髄と脾臓における各分化段階の B 細胞亜集団の割合を、細胞表面マーカーを用いて調べた。骨髄では、プロ/プレ B 細胞、プレ B 細胞から未熟 B 細胞への移行期にある細胞、未熟 B 細胞の各亜集団の割合を、脾臓では、T1-B 細胞、T2-B 細胞、MZ-B 細胞の各亜集団の割合をそれぞれ測定した。
- (2) 抗原に対する一次抗体応答と二次抗体応答の解析: 抗原 NP₃₉-CGG を投与して、経時的に採血し、血清中に含まれる NP 特異的な IgM と IgG1 の抗体量を ELISA で測定した (一次抗体応答)。初回免疫後 40 日目に、再び NP₃₉-CGG を投与し、その 5 日後と 10 日後の血清で同様の実験を行った (二次抗体応答)。
- (3) 記憶 B 細胞形成の解析: 初回免疫後 40 日目に、フローサイトメーターで、脾臓の NP 特異的記憶 B 細胞の存在頻度とその大きさを測定した。

結果

- (1) 骨髄において、プレ B 細胞から未熟 B 細胞への移行期にある細胞 (IgM^{mid}IgD) の割合が、野生型では 14.1% であった一方、mito-miceND6^M では 5.8% であり、有意に減少していた ($p < 0.05$: Student's *t* test)。脾臓において、MZ-B 細胞

(IgD⁺CD23⁺CD21⁺IgM⁺) の割合が、野生型では 0.82% であった一方、mito-miceND6^M では 0.45% であり、有意に減少していた ($p < 0.01$)。その他の B 細胞亜集団には有意差がなかった。(2) 初回免疫後 1 週目の mito-miceND6^M において、低親和性 IgM 抗体量が有意に減少していた ($p < 0.05$)。一方、2 週目における高親和性 IgG1 抗体量が有意に増加していた ($p < 0.05$)。その他の抗体クラスには有意差が見られず、追加免疫後の抗体量にも有意差がなかった。

(3) NP 特異的記憶 B 細胞 (IgM⁺IgD⁺CD38⁺IgG1⁺NIP⁺) の割合は、野生型では 0.009% であった一方、mito-miceND6^M では 0.033% であり、有意に増加していた ($p < 0.05$)。その一方で、mito-miceND6^M では、細胞の大きさを反映する FSC-A の MFI が有意に小さくなっていった ($p < 0.001$)。

考察

骨髄において、プロ B 細胞期に抗体 H 鎖が合成されるとプレ B 細胞に分化する。そこでプレ B 細胞受容体 (preBCR) シグナルを受けると、クローン拡大、抗体 L 鎖の合成を経て、未熟 B 細胞に分化する。Mito-miceND6^M では、この移行期の細胞が有意に減少しており、preBCR シグナルに誘導されるクローン拡大が阻害されていることが示唆された。

Mito-miceND6^M では、免疫後 1 週目の低親和性 IgM 抗体量が有意に減少しており、抗原に应答する B 細胞の増殖阻害が示唆された。一方、免疫後 2 週目の高親和性 IgG1 抗体量は有意に増加していた。B 細胞の増殖過程では、Bach2 依存的な体細胞突然変異導入やクラススイッチにより、親和性成熟が起こる。Bach2 は ROS 存在下で活性化するという報告 (Jang et al., *Nat. Commun.* 6:6750, 2015) があり、本研究の結果は、ROS が B 細胞の親和性成熟に重要であることを支持している。また mito-miceND6^M では、MZ-B 細胞が有意に減少しており、ミトコンドリア機能不全がその分化を阻害することが示唆された。

Mito-miceND6^M では、記憶 B 細胞が有意に増加していた。Bach2 は記憶 B 細胞の分化を誘導する因子でもあり (Shinnakasu et al., *Nat. Immunol.* 17:861, 2016)、本研究の結果から ROS は Bach2 の活性化を介した記憶 B 細胞の誘導にも働くことが示唆された。その一方で、mito-miceND6^M の記憶 B 細胞の大きさは有意に小さくなっており、ミトコンドリアがその形態に影響を与えることが示唆された。しかし 40 日後の免疫記憶応答に差異はなく、今後、長期の免疫記憶能を検討する必要がある。

本研究は、ミトコンドリア呼吸機能が、preBCR シグナルに誘導される B 細胞の増殖、MZ-B 細胞への分化、抗原に应答する B 細胞の増殖と抗体産生、記憶 B 細胞への分化に重要であることを明らかにした。今後、その作用機序の解明に向けて詳細な検討をする必要がある。

ミトコンドリア機能不全マーカーに関する基礎研究

須田和樹 (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および内膜からなる二重の膜構造を呈している細胞小器官である。特に、内膜には呼吸酵素複合体 I ~ V が存在し、酸化的リン酸化反応によって、生体エネルギーである ATP の大部分を産生している。また、ミトコンドリアには独自のゲノム (ミトコンドリア DNA : mtDNA) が細胞あたり数百から数千コピー存在している。哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体 I、III、IV、V を構成する構造遺伝子とそれらの翻訳に必要な 2 種の rRNA と 22 種の tRNA がコードされている。

mtDNA に病原性突然変異が生じることで、ミトコンドリア病と総称される全身性の代謝疾患が発症することが知られている。ミトコンドリア病では、特定の病原性変異が生じた突然変異型 mtDNA 分子種が優位に蓄積することで、呼吸酵素複合体に異常が生じ、結果としてミトコンドリアから産生される ATP 量が顕著に低下してしまう。この ATP の産生低下がミトコンドリア病の病態形成の主因であると考えられている。

一方、病原性突然変異型 mtDNA 分子が優位に蓄積した状態では、細胞質における解糖系が増強され、代償的な ATP 産生が誘導される。このような状態では、前述のように、呼吸酵素複合体による電子伝達反応が正常に駆動していないため、TCA サイクルへのピルビン酸のリクルートが低下し、結果として、細胞質や血中の乳酸濃度が上昇してしまう。このような代謝転換によって誘導された血中乳酸値の上昇は、ミトコンドリア病の発見当初から診断マーカーとして利用されてきた。

乳酸は解糖系の最終産物であるため、ミトコンドリア病における血中乳酸値の上昇は代謝転換の結果であり、ミトコンドリア病の進展には寄与しないと認識されてきた。しかし、病原性欠失型 mtDNA 分子種を含有したミトコンドリア病モデルマウスを活用した所属研究室の先行研究において、代謝転換によって過産生された乳酸の除去によってミトコンドリア機能異常の緩和、ならびに、ミトコンドリア病の症度の軽減が観察されたことから、代謝転換によって過産生された乳酸はミトコンドリア病において二次的な病原性を発揮する Deconditioning 因子である可能性が提唱された。この結果を受け、現在、過産生された乳酸の低下、あるいは、細胞質の乳酸:ピルビン酸比の低下を誘導する化合物がミトコンドリア病の症状緩和や進行抑制に有効であるとして、臨床試験が実施されている。

ごく最近、ミトコンドリア病を罹患した患者集団では FGF21 と GDF15 の血中濃度が上昇することが報告され、この FGF21 と GDF15 がミトコンドリア病の新たな診断マーカーになるとして注目を集めている。FGF21 は多機能性細胞間シグナル因子であり、飢餓や糖脂質代謝異常の改善に寄与することが知られている。一方、GDF15 は TGF- β スーパーファミリーに属し、がん、腎疾患、心疾患などの様々な病態や、代謝をはじめとする多様な生物学的な機能に関与していることが知られている。

本研究では、細胞外 (血液中) に分泌される FGF21 ならびに GDF15 は、1) ミトコンドリア病の進行と同期して産生される

産物である、2) ミトコンドリア病の進行を促進 (悪化) させる病原性を有している、3) ミトコンドリア病の進行を抑制する生体機能を有している、という異なる 3 つの作業仮説を設定し、ミトコンドリア病における FGF21 ならびに GDF15 の生物学的な機能を解析することを最終目的とした。

【材料・方法】

培養細胞

HeLamtHeLa: ヒト由来である HeLa 細胞に薬剤処理を行って mtDNA を消失させて作製した ρ^0 HeLa 細胞に、HeLa 細胞の mtDNA を再度導入した細胞株。

HeLamt3243: ρ^0 HeLa 細胞に tRNA^{Leu(UUR)} の 3243 位に A から G への点突然変異を生じた病原性 mtDNA を導入した細胞株。本研究では A3243G の変異率が 65.5% と 100% の細胞を使用した。

- ① 3×10^4 cells の上記の細胞それぞれを 6-well dish に播種して、10 mM グルコースを含む RPMI 培地で 24 時間培養後、培地を、10 mM グルコースを含む PMI 培地、5 mM グルコースを含む RPMI 培地、5 mM グルコース+5 mM ガラクトースを含む RPMI 培地にそれぞれ置換し、24 時間、48 時間、72 時間後に培養上清および細胞を回収した。細胞はトリパンブルーによる染色後、細胞数を計測し経時的な変化を観察した。乳酸定量キット、GDF15 Human ELISA キット、FGF21 Human ELISA キットを用いて培養上清中に含まれる乳酸値、GDF15、FGF21 をそれぞれ定量した。
- ② 上記と同様の細胞および培養条件で培養した細胞を用いて、培地交換時に GDF15 ヒト組換えタンパク質、FGF21 ヒト組換えタンパク質をそれぞれ添加し、24 時間後、72 時間後に培養上清および細胞を回収した。細胞は上記と同様に細胞数を計測した。また、培養上清に含まれる ATP 量および乳酸値を測定した。

【結果】

得られた結果の詳細は発表会にて報告する。

香り成分が線虫の生理作用に与える影響

遠坂 尚子（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）

【背景と目的】

食べ物や薬品など、我々ヒトへの生理作用をもつものは数多く存在する。現在、人類の福祉や健康に貢献すべく、それらについての研究が進んでいる。しかしそれ以外に、運動、睡眠、精神活動、精神的ストレス、外部環境なども生体に大きな影響を及ぼすことが知られている。それらは目に見えないものゆえ、その影響が軽視されがちだが、実際の影響力は多大だと考えられる。

外部環境としては温度、湿度、光、気圧など様々な環境要因が挙げられる。その中でも実際に日常生活に取り入れられているのが香りである。アロマテラピーは香りの「リラクセス効果」や「リフレッシュ効果」を利用した自然療法である。古くからインドやスリランカで民間療法として利用されてきた。このように香りの効果が信じられ、利用されてきたにもかかわらず、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ない。

そもそも嗅覚は生物が持つ感覚の中でも最も原始的でかつ重要な感覚である。それゆえに香りが生体に及ぼす影響も大きいと予想できる。そこで、香り成分が生体の生理作用に与える影響を明らかにするために本研究を行った。

当研究室の先行研究により 10 種類のアロマオイルそれぞれの線虫に対する作用が解析されている。その中でも特に高い作用効果をもたらした香りを選び、その機能成分を用いて研究を行った。研究はモデル生物である線虫を用いた。線虫は人と相同な配列を多く持ち、また優れた嗅覚を持っていることから、本研究に最適だと考えられる。

【方法】

大腸菌 OP50 株を餌として与えて飼育した線虫 *C.elegans Bristol* (N2 株) を用いて以下の実験を行った。香り成分は線虫の飼育プレート裏蓋に塗布した。

1 脂肪蓄積量の測定

72 時間培養した線虫に香り成分を 24 時間与えた。この線虫を Nile Red 染色し、蛍光顕微鏡で撮影した画像を解析した。

2 寿命の測定

96 時間培養した線虫を DNA 合成阻害剤 FudR で処理して不妊にした。その後 2 日毎に香り物質の塗布と生存個体数を測定した。線虫の生死判定はピッカーで触ることによって行った。

3 熱ストレスからの回復の測定

72 時間培養した線虫に香り成分を 24 時間与えた。この線虫に 35 度の熱を 4 時間与え、その後通常飼育時の 20 度に戻した。線虫は熱ストレスを与えられると運動性が低下する。本実験では線虫の Thrashing 運動を測定することで熱ストレスからの回復を評価した。

【結果】

1 脂肪蓄積量の測定

香り成分を与えた線虫の脂肪蓄積量は増加した。

2 寿命の測定

香り成分を与えた線虫の平均寿命は延伸した。

3 熱ストレスからの回復の測定

香り成分を与えた線虫では、熱により低下した運動性がより早く回復した。

【考察と今後の展望】

香り成分は線虫の脂肪蓄積量の増加、寿命の延伸、熱ストレスに対する回復促進を誘引することが明らかになった。これらの結果より、香り成分は線虫の遺伝子発現に影響を与えていると考えられる。

現在、遺伝子発現の解析や遺伝子欠損型の変異体を用いた解析などにより、香り成分の作用機構の解明を行っている。

クエン酸による線虫のストレス耐性作用の解析

太田和 勇輝 (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]

クエン酸は有機酸の一種であり、TCA 回路の中間生成物でもある。代謝の過程で作られる有機酸にはクエン酸を含めていくつかの種類があり、それらを外部から与える研究は細胞においては行われているが、個体を用いてのストレス耐性や寿命等への作用はほとんど知られていない。本研究の先行研究から、TCA 回路を駆動させるエネルギー源にあたる有機酸の一種であるピルビン酸を線虫に与えることによって寿命延伸、ストレス耐性向上が見られたことから、TCA 回路に関わる有機酸も同様に寿命延伸効果やストレス耐性の向上が期待できると考えられる。

そこで本研究では TCA 回路内に含まれる有機酸であるクエン酸に着目して線虫での生理作用の解析を行った。

[材料・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°Cで行った。

<同調処理>

発生段階を揃えるために、成虫になった線虫の表皮を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破碎し、得られた卵を S-basal で 18 時間培養した。その後、幼虫を OP プレートで 72 時間培養した。

<サンプル投与>

クエン酸は同調処理後 72 時間経過したのちに OP50 と共に線虫に与えた。この時、クエン酸が餌である OP50 に影響を与えることを防ぐため、OP50 は熱によって殺菌したものをを用いた。

<実験方法>

(1) 酸化ストレス耐性試験

クエン酸投与後 24 時間経過した線虫を 0.3% H₂O₂に移し、1 時間ごとに生存率を測定した。

(2) 熱ストレス耐性試験(生存率)

クエン酸投与後 24 時間経過した線虫を、OP50 を塗布したアンピシリンプレートに移し、35°Cの熱ストレスを与えた。10 時間目から 18 時間目まで、2 時間毎に生存率を測定した。

(3) 熱ストレス耐性試験(運動性)

クエン酸投与後 24 時間経過した線虫を無菌 NGM プレートに移し、35°Cの熱ストレスを 4 時間与えた。その後 OP プレートに移し、0,6,12 時間後に線虫のスラッシング運動(15 秒間)の回数を測定した。

(4) 寿命測定

クエン酸を投与した線虫の生存率を 2~4 日毎に測定した。

[結果]

(1) クエン酸の投与によって線虫の酸化ストレス耐性の向上が確認された。

(2) 現在実施中のため、結果及び考察は発表会にて口頭で発表する。

(3) クエン酸の投与によって線虫の熱ストレス後の運動性の回復が見られた。

(4) クエン酸の投与によって線虫の寿命延伸が確認された。

[考察・今後の展望]

本実験から、クエン酸には線虫のストレス耐性の向上、寿命延伸作用があることが確認された。これらの生理作用は長寿遺伝子の活性化によって起こることが報告されていることから、長寿遺伝子の一つである *daf-16* 等が関与していることが予想される。この結果は先行研究であるピルビン酸の結果と同様であるため、TCA 回路内の他の有機酸においても同様の結果が期待できる。また、ストレス耐性と寿命がどちらも向上したことから健康寿命の延伸にも役立つ可能性があることが示唆された。

今後は各種長寿遺伝子の変異体を用いた解析、及び遺伝子発現解析などを行い作用メカニズムの解明を行う予定である。

脂肪細胞 3T3-L1 における琥珀エタノール抽出物の生理作用解析

十河 衿香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

琥珀は、マツやスギなどの針葉樹の樹液が長い年月をかけて石化したものであり、現在では宝石として装飾品などでよく用いられている。一方で、琥珀を用いた民間療法は世界中で古くから知られており、リラクゼーション効果や傷口の治療などに広く用いられてきたという歴史がある。

先行研究では、琥珀には血管新生促進、ヒアルロン酸産生の促進やターンオーバーの促進などといった、健康や美容に関わる効果が報じられている。近年では、琥珀がもつこれらの生理作用が注目されており、本研究では未だ解明されていない琥珀の生理作用を明らかにし、琥珀を健康や産業への利用に役立てることを目的とする。

本研究では、マウス由来脂肪細胞3T3-L1を用いて、琥珀エタノール抽出物が脂肪細胞にもたらす生理作用について解析した。

【方法】

<細胞培養>

本実験では、脂肪前駆細胞(3T3-L1)細胞をDMEM培地で培養した。分化させる際にはDMIを含むDMEMで処理をし、2日後にインスリン半量処理を施した後、DMI投与後8日目までDMEMで培養したものを完全に分化した脂肪細胞とみなし、実験を行った。

<琥珀の抽出>

共同研究先((株)ヤマノビューティーケミカル)より提供された琥珀パウダーを50%エタノールで溶解しサンプルとして用いた。

<実験方法>

(1) 細胞毒性の検定

3T3-L1細胞において、分化前、分化中、分化後に様々な濃度の琥珀サンプルを投与した後、MTT溶液を用いて細胞の毒性を測定した。

(2) 脂肪蓄積の測定

3T3-L1細胞の分化中に琥珀サンプルを投与し続け、Oil Red O試薬で脂肪滴を染色し顕微鏡下で観察した後、OD=420 nmで吸光度を測定した。また、脂肪分化中のどの時期に琥珀サンプルが最も作用しているのか調べるために、脂肪細胞の分化誘導 0日目から分化完了の8日目までを2日ごとに区切り、それぞれの時期ごとに琥珀サンプルを投与した。

(3) グルコース取り込みの測定

3T3-L1細胞の分化後に琥珀サンプルを投与し、投与後6, 12, 18, 24時間後の細胞培地を回収し、それぞれの培地に含まれるグルコース量をOD=505 nmで測定した。

(4) グリセロール放出の測定

3T3-L1細胞の分化後に琥珀サンプルを投与し、投与後6, 12,

18, 24時間後に細胞培地を回収し、それぞれの培地に含まれるグリセロール量をOD=600 nmで測定した。

【結果】

(1) MTT assayによる解析では、琥珀サンプルは脂肪前駆細胞では細胞毒性は見られなかった。しかし、分化中と分化後に琥珀サンプルを投与した場合では、濃度依存的な細胞毒性を示した。

(2) 琥珀サンプルを投与したものでは、脂肪蓄積量は増加した。

(3) 琥珀サンプル投与によって、グルコース取り込みは、琥珀サンプル濃度依存的に抑制された。

(4) グリセロール放出は、琥珀サンプルの濃度依存的に増加し、琥珀サンプル投与群はコントロールに比べグリセロール放出は増加した。

【考察・今後の展望】

本実験結果から、琥珀エタノール抽出物は脂肪細胞(3T3-L1)に対して濃度依存的にグルコース取り込みを抑制する一方で、グリセロールの放出を促進していることが分かった。これらの結果から、今後は脂肪分解におけるメカニズムを解明するため、遺伝子発現やタンパク質発現を調べ、作用機構を明らかにすると同時に、有効成分の同定を行っていく予定である。

酵母遺伝学を用いたゲノム刷り込み制御因子の探索

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

[背景]

ヒトを含めた哺乳類は、精子と卵が受精してできる2倍体生物であり、父親と母親に由来する1対のゲノムを持つ。また、両者の塩基配列は基本的には同一であり、多くの遺伝子は父親と母親に由来する両方のアリル (対立遺伝子座) から同等に発現する。しかし、一部の遺伝子は一方の親から由来した時のみ発現し、この哺乳類特有の遺伝子発現様式を「ゲノム刷り込み (genomic imprinting)」という。自然界では、卵が精子と受精することなく、卵単独で新しい個体を発生する現象 (単為発生) が知られているが、哺乳類ではその例がみられない。これは、哺乳類にゲノム刷り込みがあるためであると考えられている。

ゲノム刷り込みを受ける遺伝子 (刷り込み遺伝子) は、マウスやヒトでこれまでに100個以上知られている。*Igf2/H19* 遺伝子座は、ごく初期に発見された刷り込み遺伝子座である (図1)。*Igf2* 遺伝子は父親由来アリルで、*H19* 遺伝子は母親由来アリルでそれぞれ発現する。このような「刷り込み発現」の原因は、アリル間でのDNAメチル化状態 (刷り込みメチル化) の違いにある。*H19* 遺伝子上流には、「刷り込み制御領域 (imprinting control region; ICR)」と呼ばれる配列が存在する。この*H19* ICRは、父親由来ではDNAメチル化レベルが高く、母親由来ではメチル化されていない。その結果、アリル間で転写調節因子の結合状態に差を生じ、それが遺伝子発現の差に繋がる。同配列の特徴的なDNAメチル化状態は、始原生殖細胞において「消去」される。その後、生殖細胞形成過程で、その個体自身の性別に対応したメチル化状態が「確立」する。つまり、精子では*H19* ICRがDNAメチル化されるが、卵ではメチル化されない。この刷り込みメチル化状態は、受精後の体細胞において、細胞分裂を経た後でも「維持」される。

[目的]

H19 ICR配列は精子でのみDNAメチル化されるが、この反応に関わるDNAメチル化酵素は、精子と卵の両方に存在する。つまり、*H19* ICR配列のアリル特異的なメチル化は、DNAメチル化酵素だけでは説明できないため、未だ明らかになっていないメカニズムが存在すると予想される。当研究室では以前、2.9-kbの*H19* ICR断片を用いて、トランスジェニックマウスを作製した。マウスゲノムに挿入された*H19* ICR断片は、父親由来の時にだけDNAメチル化されたことから、同断片は刷り込みメチル化に十分な情報をもつことが示された。次に、*H19* ICR配列の5'側を欠損する一連の断片を用いてトランスジェニックマウスを作製し、DNAメチル化状態を調べた。その結果、118-bpの配列を欠損すると、刷り込みメチル化が失われることが分かった。つまり、同配列が父親由来*H19* ICRを高メチル化状態にするために重要であると考えられる。また、同配列に結合するタンパク質が、P19細胞、ES細胞や精巣の核抽出液中に存在することがゲルシフトアッセイにより確認された。同タンパク質は*H19* ICRの刷り込みメチル化を制御する可能性が示唆される。

そこで、本研究では、酵母遺伝学的手法を用いることで、118-bp配列に結合するタンパク質の同定を試みた。

[方法]

Yeast one hybrid system (Y1H) は、特定DNA配列に結合するタンパク質を、酵母内でスクリーニングする方法である (図2)。酵母由来の転写活性化因子 GAL4 タンパク質の分子内には、DNAへ結合するためのDNA結合ドメイン (DBD) と、プロモーターの活性化に関わる活性化ドメイン (AD) が存在する。これら2つのドメインは機能的に独立しているため、DBDを他のタンパク質のDBDと交換した場合でも、その機能は維持される。本研究では、まず、P19、ES、精巣細胞から抽出したmRNAを逆転写反応によりcDNAへと変換し、酵母用発現ベクターに組み込むことで、GAL4-ADとの融合タンパク質を発現するcDNAライブラリーを作製した (図2左)。次に、父親由来*H19* ICRのメチル化に重要な118-bp配列を、抗生物質耐性遺伝子上流に挿入した酵母クローンを作製し (図2中)、同クローンにcDNAライブラリーを導入した。酵母内で発現した融合タンパク質のDNA結合ドメインが118-bp配列に結合した場合には、GAL4-ADを介して下流の抗生物質耐性遺伝子が発現する。その結果、酵母は抗生物質添加培地上で生育できるようになり、同酵母からcDNAクローンを回収することで、目的タンパク質をスクリーニングすることができる。

[結果と考察]

Y1Hによるスクリーニングの結果、計24個の候補cDNAクローンが得られ、シーケンス解析により各クローンがコードする遺伝子を決定した。現在、これら候補クローンにコードされるタンパク質を動物細胞で発現させ、そのDNA結合能を解析中である。今後、刷り込みメチル化に関与する可能性が高い遺伝子を特定できた場合には、ゲノム編集法によりノックアウトマウスを作製し、刷り込みメチル化に対する影響を調べる予定である。

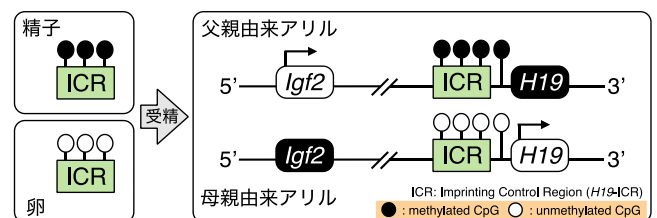


図1: *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み

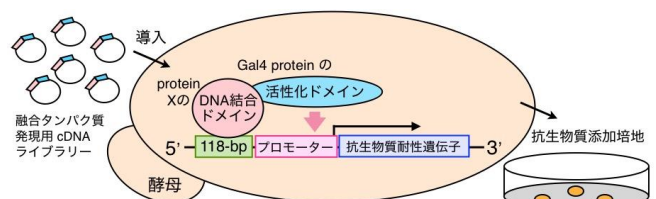


図2: Y1H システムによるスクリーニング

CRISPR/Cas 系による *cis* 配列反転マウスを用いたゲノム刷り込み制御機構の解析

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

【背景】

哺乳類は二倍体生物であり、遺伝子の大部分は、父親由来と母親由来の両方のアレルから同等に発現する。しかし、一部の遺伝子は、両親のいずれか一方に由来するアレルのみしか発現しない。同現象は「ゲノム刷り込み」と呼ばれ、父親・母親由来のそれぞれのアレルに特異的な DNA メチル化、すなわち「刷り込みメチル化」のパターンによって制御される。

ゲノム刷り込み制御を受ける遺伝子座のひとつに、*Igf2/H19* 遺伝子座がある (図 1)。同遺伝子座の 5' 上流側には、インスリン様成長因子をコードし、胚の成長を促進する機能を持つ *Igf2* 遺伝子があり、一方、3' 下流側には、非コード RNA が発現し、胚の成長抑制や転写の調節に働く *H19* 遺伝子がある。両遺伝子はそれぞれ、父親由来アレルと母親由来アレルのみで発現し、他方のアレルでは抑制されている。同刷り込み発現は、*H19* 遺伝子上流に位置する発現制御領域、*H19ICR* (Imprinting control region) が、父親由来アレルのみで高メチル化されることに起因する。

父親由来アレルでは、*H19ICR* に加えて、下流の *H19* 遺伝子プロモーター領域もメチル化されている。したがって、同メチル化が、*H19* 遺伝子発現を抑制すると考えられてきた。一方で最近、刷り込み制御を受けない別の遺伝子座 (α -fetoprotein 遺伝子座) に *H19ICR* を挿入した変異マウスの報告によって、遺伝子プロモーターのメチル化に非依存的な、*H19ICR* による発現抑制メカニズムの存在が示唆された。ただし、 α -fetoprotein 遺伝子プロモーター中の CpG モチーフの数や、*H19ICR* と遺伝子との距離などが、本来の *H19* 遺伝子座とは異なるため、同じメカニズムが再現できているのかについては疑問である。したがって、*H19* 遺伝子の発現制御機構は完全には明らかになっていない。

【目的】

H19 遺伝子は多くの機能を持つことが明らかになってきており、その発現制御機構を理解することは重要である。本研究では、このメカニズムの解明のために、父親由来アレルでの *H19* 遺伝子の転写抑制に本当にプロモーター領域のメチル化は必要なのか、を解決することを目的とした。

当研究室の先行研究において、*H19ICR* 配列を、通常はゲノム刷り込み制御を受けないヒト β グロビン遺伝子座に酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) 上で挿入し、YAC トランスジェニックマウスを作製した。同マウスの解析の結果、導入した *H19ICR* は父親由来のみでメチル化されており、*H19ICR* 配列中に刷り込みメチル化の確立に十分な情報が含まれることが示された。さらに、*H19ICR* 配列中の 5' 側部分に存在する責任配列から 3' 側へ向かってメチル化が開始される、と考えられる結果が得られた。

そこで本研究では、「父親由来 *H19* 遺伝子の発現抑制は、*H19ICR* 上流から始まったメチル化が、さらに下流の *H19* 遺伝

子プロモーター領域まで広がることで起こる」という仮説を立て、マウス内在遺伝子座において *H19ICR* の方向を反転させることで、*H19* プロモーターのメチル化状態が変化すれば、これを検証できると考えた (図 2)。

【方法】

H19ICR の反転は、CRISPR/Cas 系によって *H19ICR* の両端を切断することで誘導することにした。このために、*H19ICR* の両端を認識する 2 種類のガイド RNA と Cas9 タンパク質を発現するベクターを作製した。さらに、ICR の反転した連結が起こりやすくなることを期待して、反転後の ICR の両連結部分に相同な配列を持つ一本鎖ドナー DNA を準備した。これらをマウス受精卵の前核に顕微注入し、ファウンダー (F0) マウスを作製した。同マウスの尾からゲノム DNA を抽出し、PCR 解析とシーケンシング解析を行い、*H19ICR* が正しく反転した個体を選抜した。その後、野生型マウスとの交配によって変異マウス系統を確立した。

H19ICR 反転アレルを父親、または母親から受け継ぐ個体を交配により得た後、現在、ICR 配列内部および周辺の DNA メチル化状態をサザンブロッティング法、および、bisulfite sequencing 法を用いて解析している。今後、*H19* 遺伝子の発現量を qRT-PCR 法によって解析する予定である。

【結果】

CRISPR/Cas 系を用いたゲノム編集を行った結果、27 匹の F0 マウスのうち 3 匹で、*H19ICR* 配列全域が正しく反転していた。これらのマウスをそれぞれ野生型マウスと交配させ、最終的に 2 系統の *H19ICR* 反転マウス系統を確立することができた。

卒業研究発表会にて、DNA メチル化解析の結果の一部を発表する。

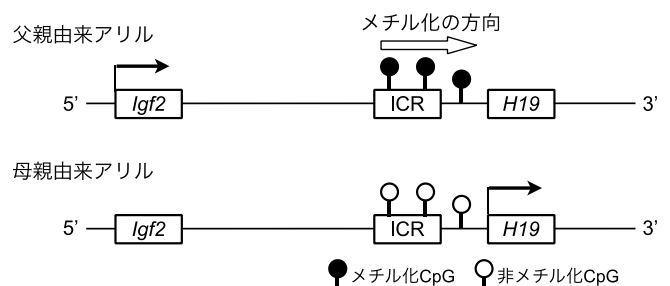


図 1: *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み

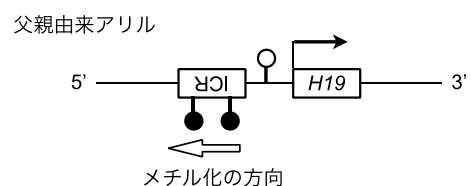


図 2: *H19ICR* 反転マウスの作製と期待される表現型

微生物によるグリコシド代謝に関する研究

堀 早苗 (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

植物や細菌、糸状菌などは、その体内でさまざまな化合物を合成し、自身の生存戦略に利用している。これらの生物による代謝産物は大きく一次代謝産物と二次代謝産物に分けられ、前者は生命を維持するために必須であるのに対し、後者は必ずしも必須ではない化合物である。

二次代謝産物の中に糖付加修飾(配糖化)を受けるものもあり、配糖化された化合物は配糖体(グリコシド)と呼ばれる。このようなグリコシドは元の化合物よりも安定性や水溶性が増大した性質をもつことが知られている。グリコシドは糖と非糖成分がグリコシド結合によって結合した化合物である。それらの中には難分解性のグリコシドが存在するが、その微生物による代謝・分解機構は未だ明らかにされていないものも多い。

先行研究では、グリコシドの代謝を担う土壌微生物が単離され、さらにその微生物よりグリコシド分解酵素が同定された。

本研究では、先行研究により同定されたグリコシド分解酵素を大量に精製するとともに、本酵素の諸性質の解明と酵素反応産物の同定を目的とした。

方法・結果

先行研究において同定されたグリコシド分解酵素(以下酵素A)を単離精製した。即ち、菌体を破碎後、無細胞抽出液を調製し、本抽出液を各種カラムクロマトグラフィーに供することによって、SDS-PAGE上で単一バンドになるまで酵素Aを精製した。

得られた精製酵素を用いて、グリコシド分解反応の代謝産物(以下化合物X)の構造を推定した。まず、酵素Aとグリコシドを混合し、28°Cでインキュベートした。インキュベート後、反応溶液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析すると、代謝産物と考えられるピークが複数検出された。さらに、同じ反応溶液を高速液体クロマトグラフィー質量分析計によって分析した結果、産物と考えられた複数のピークは全て同じ質量であった。

次に、酵素Aの諸性質を解明するために、様々な阻害剤(低分子化合物)や金属の影響の検討、酵素反応のストイキオメトリの決定、酵素動力学的パラメーターの決定、温度・pHに対する安定性や依存性の検討を行った。

今後の予定

グリコシド分解微生物は酵素Aによって変換された化合物Xをさらに変換する酵素を有しているため、その酵素を精製・同定し、機能解析を行う。

嫌気性微生物によるポリフェノール代謝に関する研究

宮尾 歩実 (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

ポリフェノール化合物はフェノール性水酸基を複数有する低分子化合物で、広く野菜や果物に存在する。一般的にポリフェノール化合物は抗酸化作用を有しており、中には心臓血管疾患や直腸がんのリスクを低下させるものもある。人が摂取したポリフェノール化合物の一部は腸内細菌によって代謝され、体内を循環することがわかっている。近年腸内細菌が人の健康に及ぼす影響について研究・臨床レベルで注目されているが、食物として摂取し腸内細菌によって変換された化合物もその一端に関わっている可能性は十分考えられる。しかしながら、腸内細菌によるポリフェノール化合物の代謝は代謝産物の一部が明らかになっているのみで代謝経路の詳細やそれに関与する酵素・遺伝子については報告されていない。そこで私は腸内細菌によるヒト糞便懸濁液を用いた *in vitro* 実験系で、あるポリフェノールが3種の腸内細菌によって分解され、分解産物が抗炎症作用やガン抑制作用を示すという研究に注目した。当研究では腸内細菌由来の本ポリフェノール分解経路に関わる酵素・その遺伝子は報告されておらず、未知である。よって本ポリフェノールを変換する腸内細菌から新規酵素を同定し、その酵素の機能解析を目的として研究を行った。

方法・結果

3種の細菌 A、B、C を用いて、本ポリフェノールの変換を試みた。まず、ポリフェノールを添加した栄養培地で細菌 A と C を共に嫌気培養 (37°C、2日間) した。培養上清に等量のアセトニトリルを添加し、フィルトレーション後 LC/MS で分析したところ、本ポリフェノールが変換されたと考えられる別の化合物由来のピークが検出された。

続いて、細菌 A、C の培養液に細菌 B を加えてさらに嫌気培養 (37°C、2日間) した。培養上清を LC/MS で分析したところ、細菌 A、C によって変換された化合物がさらに変換されていることが確認できた。また、ポリフェノール化合物変換活性を上昇させるために細菌 B を混合するタイミングや培養条件検討も行った。

培養液上清からだけでなく、それぞれの細菌の休止菌体反応でもポリフェノールは変換され、同様の反応産物が確認できた。これらの結果から、ポリフェノール代謝産物の生成に細菌 A、B、C の菌体内の酵素が関与していることが確認できた。

今後の予定

無細胞抽出液 (CFE) を調製し、細菌 A、B、C のそれぞれから本ポリフェノール化合物代謝に関与する酵素・遺伝子の同定を試みる。

アクチン阻害剤の構造活性相関検討

吉田 香里 (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

アクチンは細胞骨格タンパク質の一つであり、細胞質分裂や細胞運動、細胞の形状維持、細胞間の接着などの多くの細胞内プロセスに関わることで重要な役割を担っている。アクチンは球状 (Globular) の単量体アクチン (G-アクチン) と、G-アクチンが多数重合した繊維状 (Filamentous) の重合体アクチン (F-アクチン) の2つの状態をとって存在している。細胞内での生理的なアクチンの重合・脱重合は、多くのアクチン結合タンパク質によって時空間的に制御されている。

がん細胞の浸潤や転移は、アクチンとアクチン結合タンパク質間の相互作用などによって制御されていることが明らかとなっている。そのため、アクチンやアクチン結合タンパク質の機能を阻害する化合物やそれらの相互作用に影響を及ぼす化合物は、新規の抗がん剤開発やがん治療標的の発見に繋がると考えられる。

我々は、アクチンとアクチン結合タンパク質との相互作用阻害を介してアクチン凝集体形成 (Fig. 1) を引き起こす天然化合物を見出し、解析を行っている。今回、この生合成化合物とその類縁体の構造活性相関の検討を行った。

結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

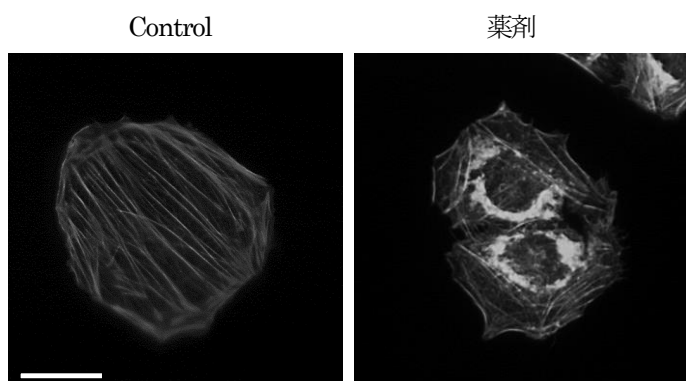


Fig. 1 Alexa⁴⁸⁸-phalloidin による F-アクチン染色像
18 時間薬剤処理した 3Y1 細胞の F-アクチンを Alexa⁴⁸⁸-phalloidin により染色。Scale bar, 25 μ m

方法

1. 細胞増殖阻害試験

HeLa 細胞 (3.0×10^4 cells/ml) を 48 時間薬剤処理した後、WST-8 を 1% (v/v) 添加し吸光度を測定した。

2. アクチン形態観察

ラット正常繊維芽細胞 3Y1 (2.0×10^4 cells/ml) を 18 時間薬剤処理した後、3.7%ホルマリンで固定した。洗浄後、核と F-アクチンをそれぞれ Hoechst 33258、Alexa⁴⁸⁸-phalloidin を用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

紅茶由来および人工合成した高分子ポリフェノールが代償性筋肥大に与える影響

三代 侑平（筑波大学 生物学類） 指導教員：沼田 治（筑波大学 生命環境系）

特許申請予定のため、記載は控えさせていただきます。

テトラヒメナのアクチンアイソフォームの繊毛内の機能解析

萩田 美乃里 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

アクチンは真核生物全般に見られる代表的な細胞骨格タンパク質の1つであり、細胞の形態形成、細胞分裂、細胞運動や細胞内物質輸送などの生命活動に必要不可欠である。アクチンをコードする遺伝子は進化的によく保存されているが、その一方で様々なアイソフォームや関連タンパク質 (Arp) が存在する。例えば Arp2 と Arp3 は重合しないが、他のサブユニットと共に複合体を形成し、アクチン繊維の側面に結合する。そして、そこから新たなアクチン重合を促す。その結果生じた枝分かれした細胞骨格構造は、アメーバ細胞の葉状仮足の運動などに重要である。また、Arp1 はダイナクチン複合体の構成因子として、細胞質ダイニンと共に微小管を介した細胞内小胞輸送に働く。さらに、核内でクロマチンモデリング複合体やヒストン修飾酵素複合体の構成因子として働く Arp も知られている。

本研究において私は、繊毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* に特有のアクチン様タンパク質である ACT3 と tArp に着目した。先行研究より、いずれのタンパク質も繊毛内に局在することが分かっている。ACT3 については、その遺伝子破壊株は遊泳運動速度が低下する。しかし、繊毛内で ACT3 がどのように働いているかは分かっていない。また、tArp が繊毛の形成や運動に必要なかは検討されていない。そこで私は、これらの細胞機能について解析を進めた。

方法

1) ACT3 遺伝子破壊株 (ACT3KO) のセルモデルの実験

野生型細胞と ACT3KO では、繊毛運動に関わるエネルギー代謝やカルシウムイオン濃度への透過性などに違いがあるかもしれない。そこで、界面活性剤を用いて細胞を部分的に除膜し、外部から ATP やイオンが透過しやすくなった細胞 (セルモデル) を作製した。ATP やイオン濃度などの条件を変え、生理状態の変化により各細胞株の遊泳運動能に違いがあるか比較した。

2) ACT3KO の繊毛の超微細構造の観察

下田臨海実験センターの柴先生と野村博士のご協力のもと、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、野生型細胞と ACT3KO の繊毛断面の構造を観察した。

3) tArp の遺伝子破壊実験

薬剤耐性マーカー *Neo4* カセットを染色体上の tArp 遺伝子座と相同組換えすることで遺伝子破壊株を作製した。コンストラクトの挿入の確認には PCR 法を用いた。テトラヒメナは大核と小核の2つの核を有しているため、固有の遺伝子破壊の方法がある。本研究では両方の方法を並行して進めた。

(a) Germline Gene KO 法

本方法では小核 (2N) の標的遺伝子をホモで破壊した細胞株を作製し、それらを交雑する。その結果、通常の細胞の生命活動における遺伝子発現に必要な大核の染色体から、目的遺伝

子を完全に破壊した細胞が得られる。テトラヒメナは有性生殖時に、小核の交換と融合を行い新たな遺伝子情報をもつ小核を形成する。そして新たな小核の遺伝子情報をもとに大核を新生する。この現象が、遺伝子破壊の操作を可能にしている。

(b) Somatic Gene KO 法

本法では、まず大核の染色体上の標的遺伝子を直接 *Neo4* カセットで破壊する。その後、高濃度の薬剤存在下で細胞株を培養し、その中から生育する株を繰り返し選別する。テトラヒメナの大核の染色体は高度に倍数化しており、それらは核分裂時に娘細胞にランダムに分配される。そのため、薬剤選別条件を段階的に厳しくすることで、より多くの標的遺伝子が *Neo4* カセットに置換した細胞株が得られる。なお本方法では、細胞増殖に不可欠な遺伝子については大核内の全標的遺伝子が破壊された株を得ることができない。

結果

1) セルモデルの実験について

ACT3KO 株は、セルモデルの実験系でも、野生型細胞と比べ遊泳速度が低下する傾向が見られた。現在、外液の条件を変えながら運動能に違いがあるか解析を進めている。

2) TEM 観察

繊毛断面の構造を観察した結果、野生型細胞と ACT3KO では明瞭な違いは認められなかった。より詳細に構造を比較するため、画像処理法を用いる計画を立てた。

3) tArp の遺伝子破壊について

Germline Gene KO 法を用いた遺伝子破壊実験については、接合中の細胞で減数分裂前期の小核が伸長している時期に、パーティクルガンを用いて *Neo4* カセットを導入した。その結果、小核の tArp 遺伝子がヘテロで破壊された G1 株を取得した。次に小核に異常があり核交換できない star 変異株と G1 を交雑し、G1 から核のみを分配させ、tArp 遺伝子がホモで破壊された G2 株を選別した。本来であれば接合型が異なる G2 同士を交雑し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットに置換された細胞株をつくるのだが、得られた G2 の接合型が全て同じであったため別法をとることにした。すなわち、G2 と star 変異株をさらに交雑し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットに置換された細胞株をつくる。現在、tArpKO の表現型について研究発表会で紹介できるよう研究を進めている。

また、Somatic Gene KO 法については実験を進めたが、これまでのところ大核内のすべての tArp 遺伝子が *Neo4* カセットに置換された細胞株の取得はできていない。そのため、tArp は細胞増殖に極めて重要な機能を担っている可能性が期待された。

織毛虫テトラヒメナの CDK アイソフォームの機能解析

牧野 瑛美 (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

細胞は自立的にそのゲノムを複製・分配し、分裂することで増殖する。サイクリン依存性キナーゼ CDK は、この一連の過程が滞りなく進行するのに、中心的な制御を担う。CDK の機能は、酵母や動物細胞でよく研究が進んでいる。また近年、複数の CDK のホモログが調和することで、細胞周期が精緻に制御されていることも分かってきた。さらに、ある種の CDK のホモログは、細胞のシグナル応答に伴う転写調節に働いている。

織毛虫テトラヒメナは、酵母や動物とは全く異なるアルベオラータ生物系統に属す単細胞真核生物である。その最たる特徴は、同一の細胞内に、形状や機能の異なる大核と小核を有することである。大核の染色体は、小核の染色体が再編成されて、高度に増幅したものである。テトラヒメナのほぼ全ての遺伝子発現は大核で起きている。一方、小核は、飢餓条件下で接合した細胞において減数分裂し、有性生殖に用いられる。これら2種類の核は、染色体の複製や分配様式が異なっている。しかし、両核の維持や分配が同一細胞内で適切に執り行われるしくみは全く不明である。そこで私は、テトラヒメナの細胞周期機構を理解するために、その CDK アイソフォームの機能について調べた。

ゲノム解読済みのテトラヒメナで、遺伝子操作が可能な *Tetrahymena thermophila* には、CDK をコードする遺伝子が 11 個存在する (Eisen et al, 2006)。それらのうち、*Tt*CDK1、TTHERM_01035490 (CDK1A)、及び TTHERM_01207660 (CDK1B) の機能については解析が進められているが、いずれも大核及び小核への局在性は認められていない。私は、細胞周期全体を通して発現量が比較的に高く、*Tt*CDK1 などと同様にテトラヒメナに特有の1次配列を有する TTHERM_00318700、及び TTHERM_00784290 について、便宜的に CDK1C、及び CDK1D と命名して解析に着手した。

方法

1) 緑色蛍光タンパク質 eGFP を用いた局在解析

図1に示したように、eGFP を目的の遺伝子産物に標識するための遺伝子カセットを、*T. thermophila* の大核ゲノムに相同組換えを利用して、挿入した。具体的には、まず挿入部位に隣接する 5' 側と 3' 側の DNA 断片を、PCR 法で増やした。次に、これらの断片と導入用の遺伝子カセットを混合し、PCR 法で融合したコンストラクトを作成した。それを用いて細胞を形質転換した結果、カドミウムイオン存在下で、CDK1C、及び CDK1D の N 末側に eGFP を連結したタンパク質を発現する細胞株 (eGFP-CDK1C、及び eGFP-CDK1D) を作成した。

2) CDK 過剰発現の細胞増殖への影響

eGFP-CDK1C 株、及び eGFP-CDK1D 株の細胞培養液に、1 µg/ml CdCl₂ を添加し、eGFP 融合タンパク質の過剰発現を誘導した。その後、細胞数について血球計算盤を用いて計測した。また、それらの細胞を固定し、間接蛍光抗体染色や DAPI 染色

を施し、細胞表層の基底小体の数や配置、核内の DNA の様子について観察した。

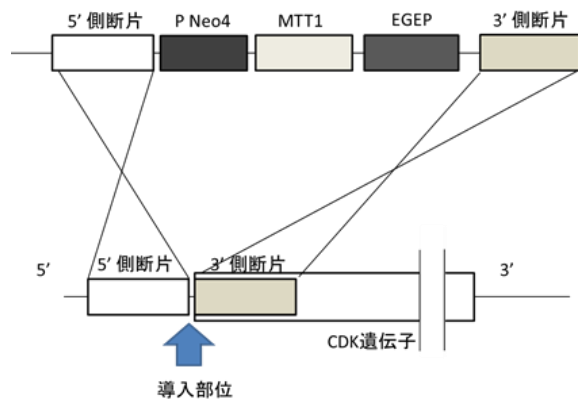


図1 eGFP 遺伝子カセットの標的遺伝子への挿入

結果と考察

大核内に遺伝子導入することで作成した eGFP-CDK1C 株、及び eGFP-CDK1D 株について、eGFP の蛍光シグナルを観察した。しかし、いずれも明瞭な蛍光シグナルは見られなかった。この時、これらの CDK を発現誘導した細胞は形が異常になり、増殖しなくなった。そのため、eGFP-CDK1C 株や eGFP-CDK1D 株では、蛍光顕微鏡観察に十分な量の eGFP 融合タンパク質が発現する前に、微量に発現した遺伝子の影響で細胞が悪影響を受けた可能性を考えた。

そこで、細胞数や細胞形状について調べることにした。その結果、CdCl₂ 添加後 4 時間培養した細胞では、eGFP-CDK1C 株では 23%、eGFP-CDK1D 株では 35% が異常な形状を呈した。同条件で、野生型株では 90% 以上が正常な形状を示していた。図2に CdCl₂ を添加し形状が異常になった細胞の様子を示す。さらに、eGFP-CDK1D 株の形状が異常になった細胞は、大核の形状や DAPI による DNA の染色量も通常とは異なる様子を示していた。現在、形状が異常になった大核の様子や、さらにセントリン抗体を用いた蛍光抗体法により基底小体の数や配置、について解析を進めている。

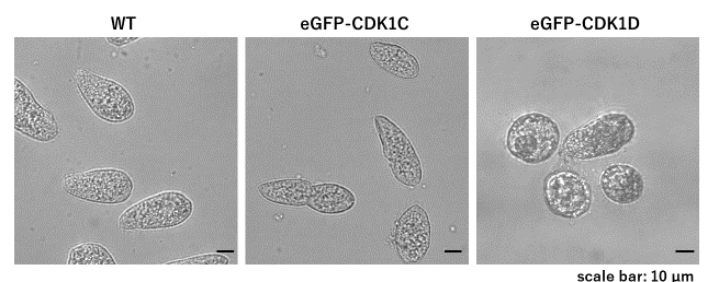


図2 CdCl₂ 添加後の細胞

カオジロショウジョウバエ類4種における分類形質の比較検討

小沼 萌 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 澤村 京一 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

ショウジョウバエ属 (*Drosophila*) のカオジロショウジョウバエ類には *D. auraria* (カオジロショウジョウバエ)、*D. biauraria* (ヤマカオジロショウジョウバエ)、*D. triauraria* (ノハラカオジロショウジョウバエ)、*D. subauraria* (キタカオジロショウジョウバエ) という4つの近縁種が存在する。これらの種は外部形態が類似しているが、雄交尾器(ゲニタリア)の形状によって明確に区別できる(図1)。これらの4種はそれぞれ人家周辺、森林、草原、北方で多く採集される。また、地域によっては複数種が同所的に生息しており、そこでは種間雑種と思われる個体も見つかっている(Kurokawa, 1967)。しかし、そのような地域での調査例は少なく、種同定も厳密には行なわれていない場合がある。そこで、本研究では、混生地内のマイクロハビタットにおいてそれぞれの種がどのように生息しているのか明らかにすることを目的とした。今回は主につくば市内と菅平高原実験所で採集し、ゲニタリアや生息域の違いに注目した解析を行なった(2018年1月7日現在1,281匹、菅平の結果のみ報告)。

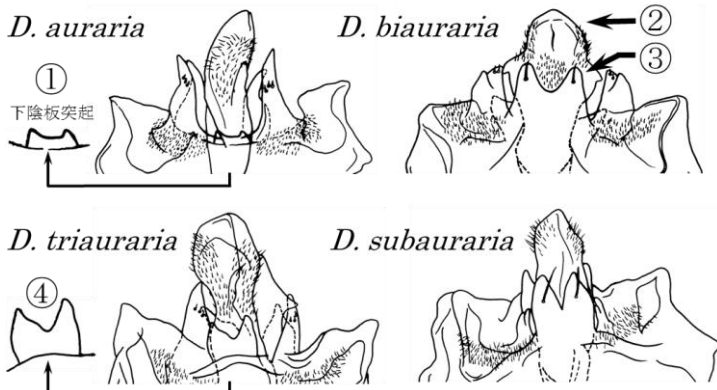


図1. カオジロショウジョウバエ類4種のゲニタリア(小沼原図)

【材料と方法】

(1) カオジロショウジョウバエ類の野外採集

Oguma *et al.* (1987) にならって、2014年7~10月に菅平高原実験所でバナナトラップを用い、ショウジョウバエを毎週採集した。トラップは草原、アカマツ林、落葉広葉樹林に4か所ずつ仕掛け、2~4日後に回収した。サンプルは80%エタノール内に保存し、カオジロショウジョウバエ類の個体数をカウントした。また同様の野外採集を2017年9月にも行なった。

(2) ゲニタリアの観察

カオジロショウジョウバエ類の雄の腹部末端を1N KOH 中で10分間加熱した。これをグリセリン内で解剖し、摘出したゲニタリアの形態を顕微鏡下で観察した。

【結果】

(1) カオジロショウジョウバエ類の野外採集

2014年の野外採集では、カオジロショウジョウバエ類が808匹採集され、このうち *D. auraria* が10匹、*D. biauraria* が370

匹、*D. triauraria* が428匹、*D. subauraria* が0匹であった。これらの中で、*D. biauraria* は7月中旬と8月下旬の個体数が特に多く、アカマツ林で最も多く採集された(図2)。また、*D. triauraria* は7月下旬と8月中~下旬の個体数が多く、草原で最も多く採集された(図2)。

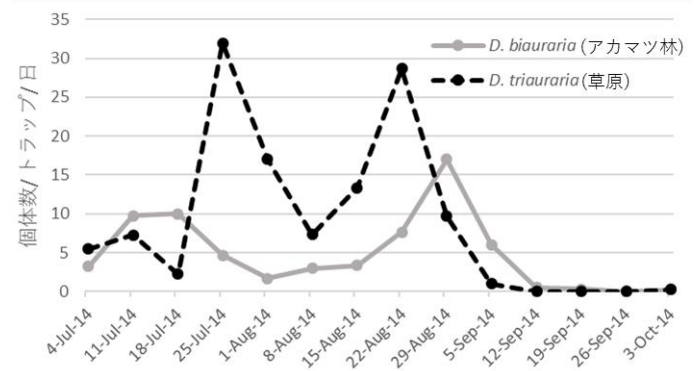


図2. *D. biauraria* と *D. triauraria* の個体数変動

(2) ゲニタリアの観察

2014年および2017年の野外採集で得られたカオジロショウジョウバエ類の中にはゲニタリアの形態が異常な個体がみられた。*D. auraria* では下陰板突起(図1①)が発達している個体が3匹、*D. biauraria* ではエデアグスの先端(図1②)が裂けている個体が1匹、下陰板に生える剛毛の本数(図1③)が異常な個体が4匹(剛毛なし1匹、剛毛が片側に1本のみ2匹、剛毛が片側に2本1匹)、*D. triauraria* では下陰板突起(図1④)に剛毛が生える個体が4匹(1本3匹、2本1匹)見つかった。

【考察】

2014年の野外採集の結果では、*D. biauraria* は森林、*D. triauraria* は草原というように、それぞれの生息域に傾向がみられた(図2)。*D. auraria* は採集された個体数が少なかったため、詳細な生息域の調査を行なうには、採集場所の再検討が必要である。また、採集個体の中にはゲニタリアの形態に異常がみられる個体が存在した。しかし、いずれの形態異常も軽微なものであり、種同定を行なう上では支障がなかった。そして、これらの形態異常が、過去におけるカオジロショウジョウバエ類の種間交配を示唆するものなのか形態のバリエーションの1つであるのかは不明であるため、さらなる解析・検討が必要である。

【謝辞】

本研究を行なうにあたり、野外採集をご指導いただいた筑波大学菅平高原実験所の佐藤幸恵博士に心から感謝申し上げます。

【引用文献】

- 1) Kurokawa, H., 1967. Ann. Zool. Jpn. 40: 154-160.
- 2) Oguma, Y. *et al.*, 1987. Bull. Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba 8: 49-55.

ペナン島のアナナスショウジョウバエ類における形質置換の可能性

濱 遥介 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 澤村 京一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

アナナスショウジョウバエ類はいくつかの種がアジア・オセアニアに生息している。種間で交配前隔離が確認されるが、実験室内で雑種が作製可能である。*Drosophila ananassae* は人家性で熱帯・亜熱帯に広く分布する。対照的に、*D. parapallidosa* の分布は限定的で、ボルネオ島、ジャワ島、蘭嶼、石垣島、西表島、波照間島で *D. ananassae* とつねに同所的に採集されている。近年、マレーシアのペナン島においても、*D. ananassae* と *D. parapallidosa* が同所的に生息していることが分かった。しかし、ペナン島の *D. parapallidosa* では Y 染色体および第 4 染色体が *D. ananassae* 由来のものに置換されており、過去に 2 種間で遺伝的交流があったことが明らかになっている (Sawamura *et al.*, 2016)。ペナン島において、これらの 2 種で遺伝的交流が過去にあったのにも関わらず、現在は隔離がある別種として同所的に存続できる理由を解明するのが本研究の目的である。

同所的に生息する近縁種間には、形質置換が見られることがある。そのため、2 種の形態的特徴や生理的特徴など多くの種間差を抽出する必要があるが、現在 2 種間では性腺と呼ばれる雄の前肢の剛毛の数しか形態的差異が知られていない。本研究では、形質置換の可能性の 1 つとして体サイズに着目し、前肢の脛節の長さを指標として 2 種間の差異を明らかにしようと試みた。また実験室で雑種 F1 や雑種系統を作製し、ペナン島における 2 種混成集団の再現を試みた。

材料・方法

I. 用いた系統

- ・ペナン島由来の *D. ananassae* 2 系統 (PN13-1-19 など)
- ・ペナン島由来の *D. parapallidosa* 14 系統 (PN13-1-01 など)
- ・*D. ananassae* の AABBg1 (全ゲノム解読済、ハワイ 1945 年)
- ・*D. parapallidosa* の T184 (原記載系統、コタキナバル 1979 年)
- ・実験室集団から作製した雑種 F1 (T184♀×AABBg1♂)
- ・雑種を掛け合わせた系統に由来する H1~H10 10 系統
- ・雑種 F1 に T184 を 9 世代戻し交配し作製した BC 系統

II. 測定方法

羽化後 3~5 日目の成虫を、70%エタノールで保存した。その際、高密度で成虫が発生しているバイアルでは、体長が小さくなる可能性があるため、100 匹を超える密度で成虫が羽化しているバイアルは除外した。保存後 7 日以内にリン酸緩衝液中で、右前肢を切り取って生物顕微鏡で観察し、対物マイクロメーターを用いて脛節の長さを測定、雄においてはさらに性腺の本数を記録した。

結果・考察

A. ペナン島集団の解析

先行研究で示された通り、性腺の本数は *D. ananassae* の方が *D. parapallidosa* より多かった。雄前脚の脛節の長さは、*D. ananassae* の方が *D. parapallidosa* より長い傾向が見られた (Figure 1)。統計解析については発表会までに実施する予定である。

B. 実験室集団の解析

F1 および H 系統は *D. ananassae* に近い数値を、BC 系統は *D. parapallidosa* に近い数値をそれぞれ示した。ペナン島の *D. parapallidosa* は、Y 染色体が *D. ananassae* 由来のものに置換されているため、para♀×ana♂の雑種由来であると考えられ、H 系統と同様に成立したはずである。しかし実際は、H 系統ではなく BC 系統に似ていることから、戻し交配がペナン島でも起きた可能性、または、*D. parapallidosa* の表現型に近づくように選択がなされた可能性が示唆された。

引用文献

Sawamura, K., Sato, H., Lee, C. Y., Kamimura, Y., Matsuda, M. (2016) *Zool. Sci.* 33: 467-475.

謝辞: 本研究を行うにあたり、研究材料を提供していただいた上村佳孝博士 (慶応大学)、Chow-Yang Lee 博士 (マレーシア科学大学)、KYORIN-FLY の方々に厚く御礼申し上げます。

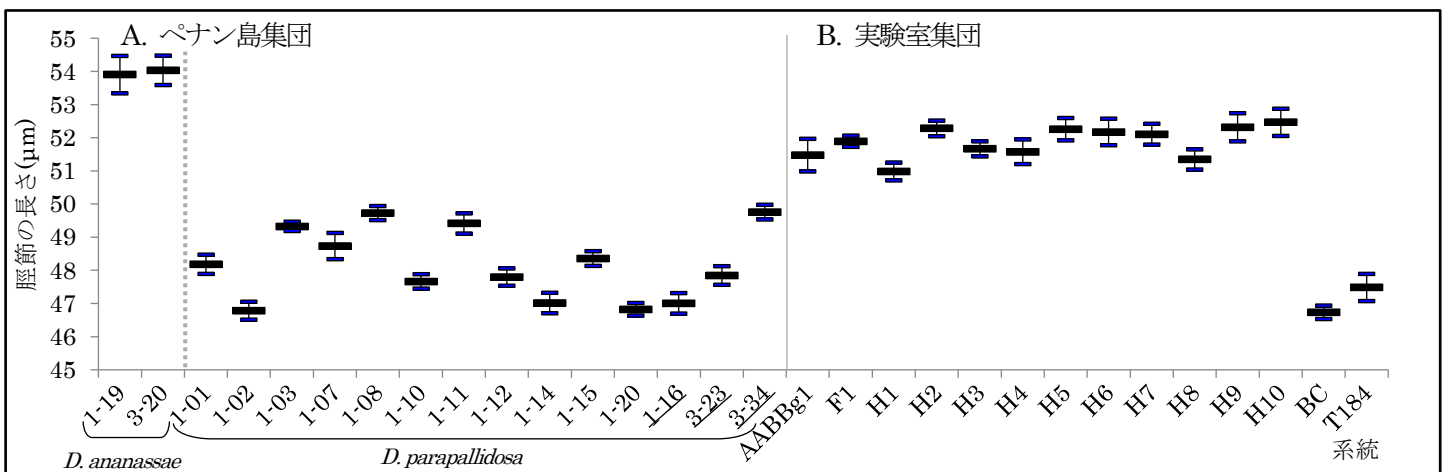


Fig. 1 各系統の雄における脛節の長さ (平均値 ± 標準誤差、それぞれ N=10)

下線を引いた系統は第 4 染色体の置換が不完全

見せてもらおうか、縮退進化したミトコンドリアの性能とやらを

岩本 亮介 (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)

【研究の背景と意義】

真核生物の中には、好気呼吸能や mtDNA、クリステといった典型的な機能と形態を二次的に失ったミトコンドリアをもつ生物が様々な系統群に存在する。このような縮退したミトコンドリアは嫌気適応や寄生適応の結果生じたと考えられており、ミトコンドリア関連オルガネラ (Mitochondrion Related Organelles: MROs) と総称されている。典型的なミトコンドリアから MRO への進化の過程を推定することは、真核生物に普遍的に存在するミトコンドリアの真の姿の理解に重要であり、真核生物の起源や初期進化に迫る糸口にもなりうる。

MRO をもつ真核生物で構成される大系統群としてメタモナス生物群がある。本生物群では、トランスクリプトームデータに基づく大規模な比較解析の結果、MRO の機能の段階的な縮退が起きたことが示唆されている¹。しかしながら、トランスクリプトームデータのみでは真に MRO に局在するタンパク質が不明であり、それ故、メタモナス生物群における MRO の進化史の理解は未だ限定的である。そこで我々は、メタモナス生物群に属する 2 種の自由生活性生物 *Dysnectes brevis* と *Kipterlia bialata* において真に MRO に局在しているタンパク質群を明らかにすることを目的に、これらのもつ MRO のプロテオーム解析に取り組んでいる。これら 2 種は、既に MRO のプロテオーム解析が実現している 2 種の寄生性生物 (*Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis*) の分岐の間に位置する為、これら 4 種の共通祖先から最も縮退した MRO をもつ *G. intestinalis* に至るまでの MRO の進化の理解に大きく貢献することが期待される。また、本研究は自由生活性真核生物のもつ MRO を対象とした初のプロテオーム解析の試みであり、本研究の実現はミトコンドリアの多様性と普遍性の更なる理解につながることも期待される。

【研究方針とこれまでの研究成果】

「分けてから壊す」のではなく「壊してから分ける」

これまで各種細胞小器官の精製が実現されてきた対象生物とは異なり、本研究の対象生物である *D. brevis* と *K. bialata* は餌となる複数種の細菌を含む混合培養系で継代培養されている。この点が本プロテオーム解析の実現において大きな障壁となっている。我々は、「対象の真核生物を完全に単離したのちに、破碎し、MRO を精製する」のではなく、「細菌をおおよそ除いた後に対象生物のみを破碎し、その後細菌を完全に除いて MRO を精製する」といった戦略をとることで、単独培養系を構築することなく対象生物の MRO のプロテオーム解析を実現することを目指している。

密度勾配遠心法による対象生物と細菌の分離方法^{2,3}と対象生物の培養方法の改良により、高純度・高密度の真核生物懸濁液の簡易的な取得方法を確認した。これにより、細胞数で比較して培養液中では対象生物の 1000 倍程度存在する細菌を、1~10 倍程度にまで減らすことが可能である。また、PBS や Tris-HCl の等張液の濃度を調べる実験を通して、対象生物の細胞形態が浸透圧

に非常に敏感であることが示唆された。そこで、低張の Tris-HCl 内での細胞の挙動を動画撮影により観察したところ、対象生物が数秒で破裂する様子が確認された。加えて、強い攪拌処理により細胞が均一に破壊されることも示された。上述の戦略による研究の実現には、真核生物の細胞膜のみを破碎し、MRO 及び細菌は破碎しない破碎方法が必要となるが、これらの結果より、その候補として低張液と攪拌を組み合わせた破碎が有力であると考えている。本発表では、現在考案している研究方針の概要を紹介するとともに、対象生物が低張液によって一瞬にして破裂する様子を紹介したい。

細菌のホモログにクロスリアクトしない抗体の作製

本プロテオーム解析の実現には、細胞破碎後の MRO の状態の確認や、密度勾配遠心による MRO 精製時の MRO 画分特定の為、MRO に局在するタンパク質に対する抗体の作製が必要不可欠である。しかしながら、MRO はミトコンドリアとなった細菌の祖先に由来する為、MRO に局在していることが十分に確からしいタンパク質である CPN60 に対してこれまでに作製された抗体³には細菌のもつホモログである GroEL にもクロスリアクトするという問題があった。そこでまず、対象生物の CPN60 と細菌の GroEL のアミノ酸配列を比較し、対象生物に特異的に存在する領域を明らかにした。そして、本領域が CPN60 の分子表面に位置していることが期待された為、本領域と同じ配列の合成ペプチドを抗原として、対象生物特異的に存在する領域に対する抗ペプチド抗体を作製した。作製後、それら抗体をウェスタンブロットによって評価した結果、少なくとも *D. brevis* の CPN60 に対する抗体については培地中の細菌のもつ GroEL とクロスリアクトしないことが示された。本発表において、抗原デザイン経緯の詳細と、作製した抗体の評価結果を紹介する予定である。

【参考文献】

1. Leger, M. M. *et al.* Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitosomes. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 0092 (2017).
2. 高林舜. *Kipterlia bialata* の大規模配列データから推測するフォルニカータ生物ミトコンドリアの縮退進化. 筑波大学生物科学専攻修士論文 (2016).
3. 井上貴史. *Dysnectes brevis* のミトコンドリア関連オルガネラ機能の推測とフォルニカータ生物におけるミトコンドリアの縮退過程の解明. 筑波大学生物科学専攻修士論文 (2017).

オピストコンタ早期分岐系統におけるオートファジー関連遺伝子の網羅的探索

上原 忠晃 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

背景

オートファジーは細胞内での物質循環に関わる機構であり、これまでに菌類・後生動物を中心に研究が進んできた。現在のオートファジーの研究は菌類、後生動物、陸上植物、一部の病原性原虫などのモデル生物に限定されているが、オートファジー機構は真核生物の広い系統で保存されていると提唱されている (Duszenko *et al.* 2011)。しかし、これまでに系統的に限定された真核系統からのデータに基づき理解されてきたオートファジー機構が、真核生物全体でどれほど普遍的かを検証するには非モデル生物からの知見が不足している。

本研究は、真核生物全体におけるオートファジー機構がどのように進化してきたかを解明することを大目標とし、その第一段階として最もオートファジー研究の進む菌類・後生動物が含まれるオピストコンタにおける早期分岐系統の基盤的知見を拡充し、この系統群におけるオートファジー機構の進化を理解しようと試みた。オピストコンタの早期分岐系統に加え、オピストコンタに近縁と考えられる生物群を研究対象とし、それらの生物種のトランスクリプトーム中にオートファジーにおいて必須のタンパクである ATG8 およびその関連タンパク質をコードする遺伝子があるかを精査した。以上の結果を基にオピストコンタ周辺におけるオートファジーの普遍性を議論する。

実験方法

1. 解析対象生物の選出およびトランスクリプトームデータ収集

オピストコンタにおける各内部系統、またオピストコンタに近縁な系統である Apusomonadida, Ancyromonadida, Breviatea, Amoebozoa のうち、NCBI の Short Read Archive (SRA) に大規模分子データが登録されている 1~5 種を探索対象とした。解析対象とした生物種は、Torruella *et al.* (2015) で解明されたオピストコンタとその近縁種の系統関係を参考にした。

2. ヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質配列データの収集

KEGG pathway に登録されているヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質 (ATG8, ATG4, ATG7, ATG3, ATG12, ATG5, ATG10) のアミノ酸配列データを取得した。

3. 相同性検索による ATG8 関連タンパク質コード配列の検出

I. トランスクリプトームデータからの配列の復元

NCBI SRA より取得したトランスクリプトームデータは、FASTX-Toolkit による配列のクオリティコントロール後、Trinity v2.5.1 によってアセンブルし、mRNA 配列の復元をおこなった。

ii. オーソログ候補の選出

復元した mRNA 配列データに対し、ヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質配列を問合せ配列とし、TBLASTN によって

ATG8 関連タンパク質コード遺伝子の候補核酸配列選出をおこなった。*E*-value が $1e^{-10}$ 以上のものは候補配列から排除した。

iii. 候補配列の精査

相同性解析により選出した候補 mRNA (核酸) 配列を EMBOSS Transeq によりアミノ酸配列に翻訳した。それらのアミノ酸配列を問合せ配列として、NCBI Non-redundant protein sequences に対して BLASTP による相同性検索を行い、問合せ配列と対象配列のアライメント、対象配列のアノテーションから、問合せ配列が ATG8 関連タンパクをコードしている配列かを精査した。精査した配列はヒトおよび酵母の ATG8 関連タンパク質配列と MAFFT v7.307 を用いてアライメントし、機能ドメインの保存性などを確認し、最終的にそれらが ATG8 関連タンパク質をコードする配列かを判断した。

結果と考察

相同性検索によって抽出した ATG8 関連タンパク質の候補を精査した結果、今回解析した Microsporidia に所属する生物種以外からは ATG8 ホモログ配列が検出された。Apusomonadida, Ancyromonadida, Breviatea において ATG8 が保存されていることから、オートファジーの機構がオピストコンタおよびその近縁系統においても保存されていることが示唆された。

ATG8 以外の ATG8 関連タンパク質に関しては、やはり Microsporidia 以外からは少なくとも 1 種類が検出されていたが、ATG4, ATG12 や ATG10 は生物種によって検出されない場合が多かった。今回の解析はトランスクリプトームを対象におこなったが、オートファジー関連遺伝子は飢餓状態などがトリガーとなる転写制御を受けており (Zhu, Gayathri & Plowey 2014)、探索対象の mRNA が検出できなかった可能性がある。

本研究により、オピストコンタおよびその近縁系統においてオートファジーの機構が保存されていることが示唆された。今後、オピストコンタおよびその近縁系統におけるオートファジー機構の全容を解明するためには、今回探索した以外のオートファジー関連の因子群をトランスクリプトーム配列に加えてゲノム配列中にも探索すべきである。

参考文献

- Duszenko *et al.* (2011) *Autophagy* 7:2, 127-158
 Torruella *et al.* (2015) *Curr. Biol.* 25, 2404-2410
 Zhu, Gayathri & Plowey (2014) *Autophagy* 10:9, 1622-1636

放射光 X 線マイクロビームを用いた細胞核限定照射による細胞致死効果

清野 晃平 (筑波大学 生物学類)

指導教員：伊藤 希 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

2011年3月11日、東北地方太平洋沖地震が発生し、それに伴う福島第一原子力発電所の事故に起因する放射性物質による環境汚染が起きた。そこで問題になったのが、セシウム 137 によるガンマ線の低線量(率)放射線被ばくの生物影響である。しかしながら、ガンマ線や X 線などの電磁波放射線のような比較的低い線エネルギー付与(Linear Energy Transfer: LET)の放射線に対する低線量生物影響についての研究は、未知の部分が多い。

そこで本研究では、低 LET かつ低線量の放射線の生物影響を調べるために、放射光 X 線マイクロビームの細胞核限定照射と X 線の細胞全体への照射を行い、細胞致死効果を調べた。

材料と方法

X 線を照射する細胞として NB1RGB(理化学研究所細胞材料開発室より購入したヒト新生児皮膚繊維芽細胞、細胞番号 RCB0222)を培養した(37°C、5%炭酸ガス培養器内)ものを用いた。培地は超純水 9L に対して、イーグル minimum essential medium (MEM)培地「ニッスイ」① 84.6 g、NaHCO₃ 9.9 g、L-glutamine 2.63 g を入れたものをフィルター滅菌し、450 ml に分注したものに牛胎児血清(HyClone Lot.No.KTE31760)を 50 ml を加えたものを使用した。

放射光 X 線マイクロビームの細胞核限定照射

細胞を照射用ディッシュのマイラーフィルム上に1000個プレーティングした。その際、細胞濃度を 200000 個/ml にした細胞懸濁液から 5 μ l をマイクロピペットで取り、照射用ディッシュの中央に静かに滴下し、培地が半球状になるようにした。この状態で培養し、細胞がマイラーフィルムに接着したのを確認後、培地を 2 ml 加えて、8~25 時間培養した。照射前にヘキスト 33342(1 μ l)を加え、染色した。ヘキスト 33342 を加えた 20 分後、培地を 2.5 ml 追加で加えた。コントロールは使用する照射用ディッシュを減らすためにひとつの照射用ディッシュに半球状の培地を作れるだけ作った(20~28 個)。

高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設(Photon Factory : PF) BL27B のシリコン結晶分光器とスリットでエネルギー 5.35 keV、サイズ 10 μ m \times 10 μ m のビームを作製し照射に用いた。照射用ディッシュをビームラインの蛍光顕微鏡にセットして細胞核蛍光画像を取得し、細胞核に照射線量 25 R(レントゲン)と 60 R の 2 種類の線量で照射した。それぞれどちらも照射用ディッシュ 33 枚分行った。

照射後、培地をマイクロピペットで吸引除去し、2 ml の Phosphate buffered saline (PBS)で 1 回洗った後、1 ml のトリプシンを加えてすぐに除去した。トリプシン除去後、1 分放置し細胞とマイラーフィルムの接着を弱めた。その後、細胞を培地で何度も洗い流すようにはがした。

はがした細胞は、直径 10 cm の組織培養用ディッシュ(P100)に指定数播き、約 2 週間培養した。その後、P100 ディッシュ内の細胞のコロニー数をカウントし、コントロールの細胞のコロニー数をもとに生存率を求めた。コロニーは 50 個以上の細胞が密集しているもののみを生細胞としてカウントした。

X 線の細胞全体への照射

細胞を 25 cm² フラスコで細胞がフラスコの底面を埋め尽くすまで培養した。

X 線照射装置で管電圧を 50 kV に設定し、細胞をフラスコに入れたまま、フラスコごとに照射する線量を変えて、照射した。

照射後、培地を吸引ポンプで吸引除去し、3 ml の PBS で 2 回洗った後、2 ml のトリプシンを加えてすぐに除去した。トリプシン除去後、細胞とフラスコの底面の接着が弱まるまで待ち、よくピッペッティングして細胞をはがした。

はがした細胞は P100 ディッシュに、ディッシュあたり 50~60 個のコロニーが生じる様に播き、約 2 週間培養した。その後、P100 ディッシュ内の細胞のコロニー数をカウントし、コントロールの細胞のコロニー数をもとに生存率を求めた。コロニーは 50 個以上の細胞が密集しているもののみを生細胞としてカウントした。

結果と考察

放射光 X 線マイクロビームの核限定照射の結果、25 R 照射したものの平均生存率は 0.45、60 R 照射したものは 0.45 となり、線量によって生存率が変わらない結果となった。

現在、1 Gy 以下の低線量での X 線の細胞全体への照射や、マイクロビームの線量の Gy への変換などを行っている。

詳細な結果や考察は発表会にて報告する。

今後の展望

使用施設の関係上、十分な回数の実験を行えていないため、今後もこの実験を継続していく。

本研究では細胞致死で放射線の生物影響を調べたが、将来的には細胞レベルの影響以外にも、分子レベルや組織レベルでの放射線の生物影響も研究し、低線量放射線の生物影響を解明していきたい。

謝辞

本研究に際して、ご指導を頂いた大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 放射光化学研究施設 放射光科学第二研究系講師 宇佐美徳子博士と国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部 上席研究員 鈴木雅雄博士のお二方に深く感謝の意を表す。

アカマツ林におけるササ群落の CO₂ 吸収量の推定

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

【背景・目的】

森林生態系は、基本的に CO₂ の吸収源である。これは、森林を構成する植物全体の光合成によって固定される CO₂ 量が、生態系全体から放出される CO₂ 量よりも多いことを意味する。森林生態系の CO₂ 吸収に多大な影響を及ぼす植物は、林冠を構成する樹木と林床を覆う林床植生に大別することができる。しかし、多くの研究では、森林全体あるいは樹木の CO₂ 吸収量や総光合成量を対象としており、林床植生のそれらを対象とした知見はほとんどない。林床植生は、森林を構成する植物全体からすると、そのバイオマスは決して大きくはない。しかし、常緑性であったり密生したりすることもあり、林床植生の CO₂ 吸収量や総光合成量が無視できない可能性もある。そこで私は、日本の冷温帯林の林床に密生するササ群落による CO₂ 交換量の推定は、当該生態系の炭素動態を正確に理解するうえで重要と考え、ササ群落の CO₂ 交換量の定量化を目的とし、本研究を行った。

【調査地と方法】

筑波大学菅平高原実験所 (長野県上田市) の冷温帯二次林内の、林床にクマイザサ (*Sasa senanensis*) が優占するアカマツ林で調査を行った。

(1) ササ群落の CO₂ 交換速度と微気象要因の計測

2017 年の 7 月から 11 月にかけて、アカマツ林内のササ群落を対象として、自作した大型透明チャンバー (縦: 0.45 m × 横: 0.45 m × 高さ: 1.7 m, n=5~6) と CO₂ センサーを用いた密封法で、ササ群落と大気間の CO₂ 交換速度を計測した。CO₂ 交換速度は、約 1 ヶ月に 1 回の頻度で早朝、朝、昼、夕方の日変化を計測した。ササ群落による光合成の光応答と、ササ群落総生産 (GPP_{sasa}) を推定するために、寒冷紗と暗幕を用いて光条件を変えつつ、CO₂ 交換速度を計測した。なお、本研究では大気から林床方向への CO₂ の流れ、つまり CO₂ 吸収を負の値で示す。ササ群落の CO₂ 交換速度の計測と平行して、ササ群落上部の気温、相対湿度、光合成有効放射束密度 (PPFD)、深さ 5 cm の土壌温度 (以下、5 cm 地温) の 4 つの微気象要因を自動連続計測した。

(2) ササ群落の光合成速度と林床呼吸速度の推定

光合成速度と呼吸速度は、各々光強度及び温度と相関があり、それぞれの相関は非直角双曲線と指数式で近似することができる。そこで本研究では、連続計測している光強度と温度データから CO₂ 交換速度を推定するために、計測した CO₂ 交換速度、PPFD と 5 cm 地温を用いて、既知の以下の 2 つの式に合うようなパラメータ (a, b, c, d) を推定した。

- 林床純生産量 = GPP_{sasa} + 林床呼吸量
- $GPP_{sasa} = (a \cdot b \cdot PPFD) / (a + b \cdot PPFD)$
- 林床呼吸量 = $c \cdot \exp(d \cdot 5 \text{ cm 地温})$

(a: ササ群落の最大光合成速度、b: 光-光合成曲線の初期勾配、c: 基底呼吸速度、d: 呼吸速度の温度係数)

【結果】

透明チャンバーで計測するササ群落と大気間の CO₂ 交換速度は、ササ群落の光合成による CO₂ 吸収と林床部の呼吸による CO₂ 放出の差し引きで表される純生産速度を表す。この純生産速度は、-10~24 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ の範囲で日変化のみならず季節変化を示し、林床植生として CO₂ の吸収源だけでなく放出源になることもあった (図 1)。測定した CO₂ 交換速度と微気象要因の関係から推定された 1 年間の累積 GPP_{sasa} は -31.3 mol CO₂ m⁻² yr⁻¹、累積林床呼吸量は 56.0 mol CO₂ m⁻² yr⁻¹ となり、その差し引きから推定された累積純生産量は 24.7 mol CO₂ m⁻² yr⁻¹ となり、本研究期間の林床植生は CO₂ 放出源となっていた (図 2)。今回得られた年間累積 GPP_{sasa} は、森林全体の総光合成量の約 1% を占めると推定され、ササ群落の生産量は小さいことが明らかとなった。

【考察】

調査を行ったアカマツ林の林床植生の CO₂ 交換速度は、林床の光環境と温度環境の影響を受けて時間変動が大きいことに加えて、この林床植生は CO₂ の放出源である可能性が示唆された。放出源となった原因として、GPP_{sasa} を推定した際、積雪によってササの光合成は約 4 ヶ月間ゼロとしたことや、例年よりもササの光合成活性が低かったことが考えられた。春季や積雪直前で GPP_{sasa} が増加したことから、今回測定できなかった時期の光合成速度によっては、吸収源に転じる可能性もある。

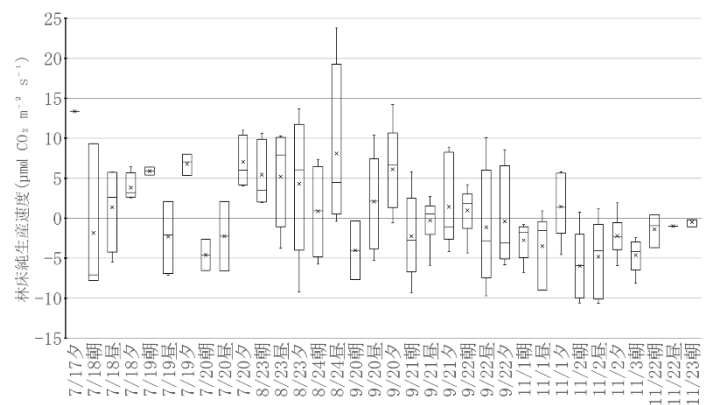


図 1: 本調査地林床の純生産速度の時間変化

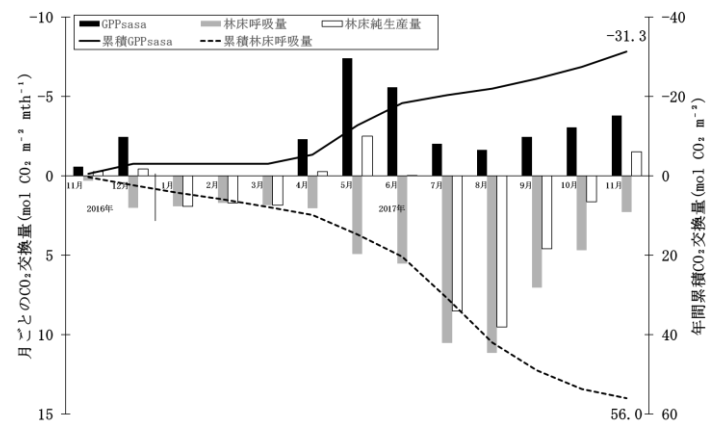


図 2: 1 年間のササ CO₂ 交換量の推定値

水の安定同位体比を用いたアカマツ・シラカバ・ミズナラ稚樹の吸水特性に関する研究

宮崎 裕希 (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】

固着性の植物は、不均一に存在する資源を獲得するために形態的・機能的にその場の環境に適応している。

不均一に存在する資源の一つに水があり、その獲得のための植物の適応が知られている。一般的に、土壌中の水は土壌表層では蒸発散が盛んに行われるため比較的少なく、深層に向かうにつれて多くなる。植物の水資源獲得に関する先行研究では、日本の暖温帯二次林に生育するアカマツ、シラカシ、アズマネザサの3種の成熟個体の吸水深度を比較し、これら3種の間で吸収する水の深度を変えている可能性を報告している(山中ら, 2006)。さらに、Dawson and Ehleringer (1991) は、乾燥地域の水辺に生育する樹木の成熟した個体と成熟前の個体で利用する土壌中の水源が異なることを報告している。このことから、植物の種類だけでなく成熟程度で樹木の吸水深度が異なる可能性があるが、直接見ることが出来ない根の吸水特性に関する知見は乏しく、その実情は未だに分かっていない。

そこで本研究では、特に知見の少ない樹木の若齢期(実生から稚樹まで)を対象として、根の形態的側面である根の分布パターンの把握に加え、機能的側面である吸水深度の推定を行うことにより、種間の吸水特性の違いを明らかにすることを目的とした。

【方法】

調査地と対象種

2017年4月から同年11月に、筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所(長野県上田市)の圃場周辺で調査を行った。

菅平高原実験所内でよく見られる林冠構成種であるアカマツ、シラカバ、ミズナラの稚樹(樹高2m以下)を対象とした。本研究で調査した個体数は、それぞれ3個体、9個体、16個体である。

調査内容

1. 根の分布調査

対象種の根を可能な限り切断しないように、注意深く掘り出し、回収した。その後、掘り出した根の泥を丁寧に落とし、平らな机のうえに静置して、各個体の地上部高、樹齢、根の最深深度(深度)、最も長い細根が位置する深度(最長根深度)、細根の総長を計測した。その後、地上部、地下部とも10cmごとに切断し、各々を乾燥させてその乾燥重量を計測した。ここでは、直径2mm以下の根を細根とした。

2. 吸水深度推定

樹木体内の水と土壌水の安定同位体比を比較し、吸水深度を推定した(山中他, 2006)。この方法では、1) 蒸発などの作用により土壌水の安定同位体比の鉛直プロファイルが形成され、さらに2) 水が植物体内に吸収される過程では同位体分別が起こらないことを利用して植物の吸水深度を推定する。

樹木体内の水は、7月から11月に採取したシラカバとミズナラの小枝サンプルから真空蒸留法(飯塚他, 2004)により抽出し、土壌水はサクシオンライシメーターを用いて、深度10, 20, 30, 40,

60, 80 cm から採取した。また同位体分析の測定結果はδ値(標準平均海水からの千分率偏差)で示した。

【結果】

1. 根の分布調査

アカマツとシラカバは、全個体で土壌表層0~10cmに最も多く細根があった。一方ミズナラには、土壌表層10cm以深にも多くの細根を持つ個体もみられた。目視による観察結果から、アカマツとシラカバは、細根が浅い表層に集中して分布していることがわかった。シラカバの地下部の総乾燥重量は、地上部乾燥重量や樹高と有意な正の相関があったが、根の深度と地上部には有意な相関が見られなかった(図1)。一方ミズナラは、地下部乾燥重量、根の深度とともに地上部と有意な正の相関があった(図2)。

2. 吸水深度推定

指標となる土壌水の安定同位体比の鉛直プロファイルを見ると、8月と9月に採取した土壌水では、いずれも表層の水の同位体比が高く、深くなるにつれて同位体比が低くなる傾向がみられた。この鉛直プロファイルと樹木体内の水の安定同位体比の比較から、8月において、ミズナラは土壌深度30cm、もしくは60cm以深の土壌水を吸水していたことが示唆された。しかし、これらの深度には根が多く分布しておらず、根の分布と吸水深度は必ずしも一致しないことが分かった。本発表では、現在分析中のシラカバの吸水深度も含めて発表する予定である。

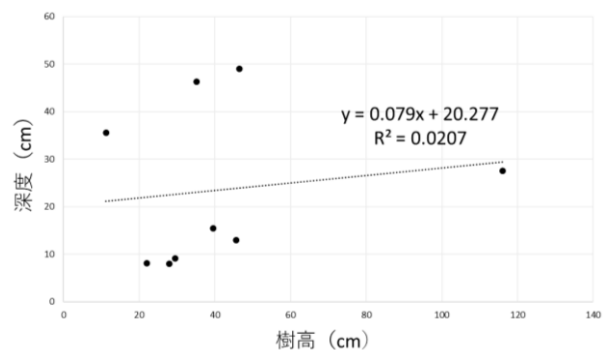


図1、シラカバの樹高と根の最深深度の関係

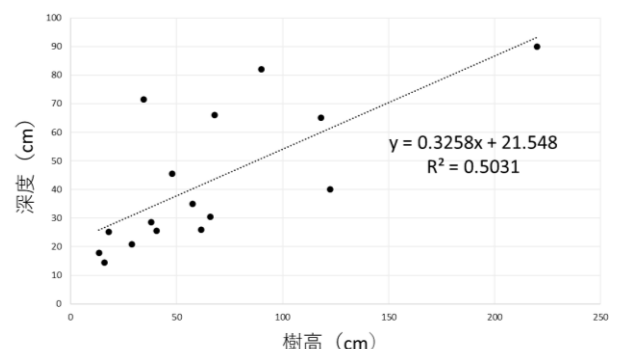


図2、ミズナラの樹高と根の最深深度の関係

海洋表層におけるアセトンの微生物学的生成・分解に関する実験的解析

高橋 俊輝 (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】

大気中には多くの有機化合物が存在しており、その一つに常温常圧で大気に気体化し存在する揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds, VOCs)がある。VOCsは、対流圏における大気化学にとって重要な働きを持つOHラジカルやオゾンの生成を促進していることが分かっており、大気化学反応にとって重要である。本研究では、大気中のVOCsとして多く含まれるアセトンに着目した。

アセトンは大気および海洋中に存在しており、海洋が大気中のアセトンの放出源か吸収源か分かっていない。その理由として、海洋表層のアセトン濃度が季節・海域によって大きく変動を示すため、海洋—大気間のアセトン収支について定量的な評価が難しいことが挙げられる。海洋表層においてアセトンは、植物プランクトンやバクテリア等といった海洋微生物による生成・分解、溶存態有機物の光化学反応による生成、など様々な生成・分解経路が知られている。よって、様々な生成・分解に経路がある海洋中のアセトン濃度の支配要因の解明は、アセトンの海洋—大気間の収支を評価するために必要である。本研究では、どの経路が海洋表層のアセトン濃度の支配要因かを知るために、海洋微生物群集の培養実験を実施し、微生物によるアセトンの生成・分解速度を定量した。

【方法】

(1)測定方法

アセトン濃度を連続的に測定するため、バブリングシステムを構築した。これは、海水を入れた試料瓶内でバブリングを行い、海水中に溶けているアセトンを気液平衡により容器中の気相内に抽出し、陽子移動反応質量分析計で検出する方法である。このシステムにより、アセトン濃度を連続的に定量することが可能となった。この際、各容器と装置はチューブでつなぎ、大気からのコンタミネーションを防止した。

(2)培養実験

東京湾沿岸で採水した海水を用いて、2017年11月21、22日に実験を行った。(1)で述べたバブリングシステムを用いて、明条件、暗条件を各12時間、合計24時間の測定を行った。6本の250 mLの試料瓶に150 mLの海水試料を移し、3本の試料(B1、B2、B3)は海水試料に対してバブリングし、アセトン濃度を測定した。他の3本の試料(B4、B5、B6)は重水素ラベルをしたアセトンを添加し、そのアセトンの濃度減少を見ることにより、アセトンの分解速度を求めた。

培養実験後植物プランクトン細胞数、バクテリア細胞数、溶存有機炭素濃度、植物プランクトンの色素濃度、懸濁態有機窒素、懸濁態有機炭素濃度の測定を行った。また、ポリカーボネート容器に採取した海水に¹³C-DICを添加し、0、12、24時間の¹³Cのatom%を測定し、比較することにより光合成生産量を測定した。

【結果と考察】

見かけの生成速度の指標であるB1-B3中のアセトン濃度は、明条件時にわずかに増加し、暗条件時には逆にわずかに減少した。一方、分解速度の指標であるB4-B6中の重水素でラベルされたアセトン濃度は、明・暗条件下において減少し続けた(図1)。これは、バクテリア等によるアセトンの分解が明・暗条件を問わず行われていることを示唆する。

今回、生成及び分解速度を定量するため、近似曲線を作成した。この時、 $[A]=A$ の濃度、 $[A]_0=A$ の初期濃度、 k =反応速度定数、 t =時間とすると、一次反応の速度式として、

$$[A]=[A]_0 e^{-kt}$$

と表すことができる。この式の反応速度定数を求めることにより、各海水試料における生成・分解速度を評価した。見かけの生成速度はB1-B3のアセトンの平均濃度を用い、分解速度はB4-B6の重水素でラベルをしたアセトンの平均濃度を用いて、それぞれ求めた。

見かけの生成速度の反応速度定数は、明条件において、 6.24×10^{-3} であり、暗条件では、 -5.29×10^{-3} であった。また、分解速度の反応速度定数は 1.22×10^{-2} であった。見かけの生成速度と分解速度の和である、生成速度の反応速度定数は、明・暗条件においてそれぞれ 1.84×10^{-2} および、 6.91×10^{-3} と算出された。これらの反応速度定数から、海洋微生物によるアセトンの生成速度は、明条件において $0.54 \text{ nM}/12\text{h}$ 、暗条件において $0.21 \text{ nM}/12\text{h}$ と求められた。分解速度は $3.74 \text{ nM}/\text{d}$ と見積もられた。このように、生成速度において、明条件下では暗条件下よりも高い値を示した。明・暗条件の違いは培養器内の光の有無によるので、この差は植物プランクトンの光合成または溶存態有機物の光化学反応による生成によって生じたものと考えられる。

今後は他の生成・分解経路の反応速度をもとめ、海洋中のアセトン濃度の支配要因を特定する。またVOCs濃度は季節・海域により多様に変化するので、アセトン以外のVOCsも含め、VOCs濃度の季節変動を研究する予定である。

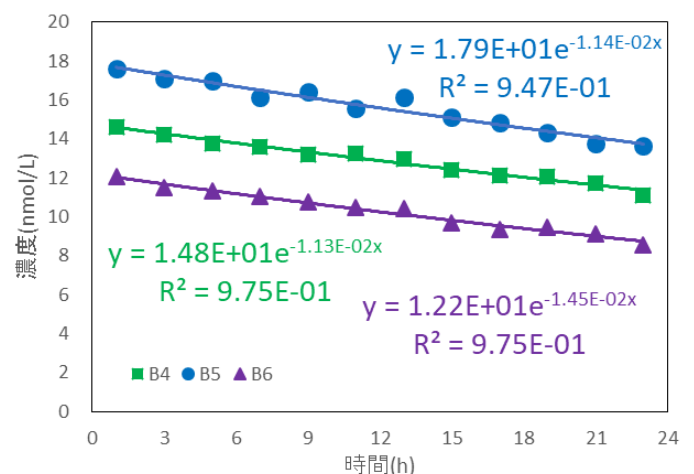


図1 3本の試料瓶(B4-B6)における重水素でラベルされたアセトンの濃度変化および各海水試料の一次反応の速度式

CO₂ シープにおける付着藻類の脂肪酸量および組成

竹内 裕貴 (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】

現在、化石燃料の消費により人為的に大気中に排出される二酸化炭素量が増加している。一部は海洋によって吸収されるため、海洋の二酸化炭素濃度も増加し、海水の pH が低下する現象 (海洋酸性化) が生じている。海洋酸性化が海洋生物に与える影響に関して、現在様々な研究が行われている。

微細藻類を主体とする植物プランクトンや大型藻類は消費者にとって重要な栄養源となっており、海洋の食物連鎖において基盤的役割を果たしている。特に藻類に含まれている必須脂肪酸である多価不飽和脂肪酸(PUFA)(18:2, 18:3, 20:4, 20:5 など)は、消費者自らが合成することができないため、藻類が食物連鎖に果たす役割は大きい。そこで、海洋酸性化が藻類に含まれている脂肪酸の量および組成にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

室内実験では、酸性化条件ではコントロールと比較して有意に必須脂肪酸の割合が低下することが判明している^{1,2}。しかし、室内実験では自然環境で生じる諸変化を再現することができず酸性化の影響を完全に説明することはできない。そこで海底から二酸化炭素が湧き出している場所である CO₂ シープにおいて実験を行なった。本研究では CO₂ シープで藻類の脂肪酸量および組成にどのような影響が出るのかを検討し、海洋酸性化の影響を明らかにすることを目的とする。

【材料・方法】

海中にプレートを設置し、これに付着した藻類の脂肪酸量および組成を検討した。

(1) プレート設置

設置実験は東京都の伊豆諸島の式根島(39°N, 134°E)御釜湾内の CO₂ シープ(CO₂分圧 約 800 ppm)および CO₂ の噴出の無いコントロール海域(CO₂分圧 約 300-350 ppm)で行なった。この海域は現在のペースで海洋酸性化が進行すると仮定した場合の 2100 年ごろの海域を再現している場所と考えられている³。

透明 PVC 製のプレートを放射状に並べ、海底から 1 m 浮かせた状態で設置した。2016 年 4 月 16 日に設置し、その 44 日後の 6 月 1 日と、72 日後の 7 月 6 日に回収した。回収後プレートを切り分け、冷凍保存した。

(2) 脂肪酸抽出

プレートを解凍し 2 時間半凍結乾燥させ、薬さじで付着藻類を剥がし、乾重量を電子天秤で測定した。これらを脂肪酸分析用および元素分析用として採取し、それぞれ乾重量を測定した。

バイアルに採取した藻類を、脂肪酸メチル化キット (ナカライテスク) を用いて脂肪酸のメチル化および抽出を行なった。

(3) 分析・定量

抽出した脂肪酸をガスクロマトグラフ/質量分析計(GCMS)で分析し、定量を行なった。結果は藻類乾重量 1 g あたりの脂肪酸量(mg/g.dryweight)、単位面積当たりの脂肪酸量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)および脂肪酸全体に対する各脂肪酸の割合として評価した。また同位体比質量分析計(EA/IRMS)にて炭素量および同位体比を計測した。

【結果・考察】

(1)GC/MS の分析で以下に示す 17 種類の脂肪酸を検出した。14:0、15:0、16:0、16:1、16:2、16:3、18:0、18:1(ω -11)、18:1(ω -9)、18:2(ω -6)、18:3(ω -6)、18:3(ω -3)、20:0、20:3、20:4(ω -6)、20:5(ω -3)。PUFA の脂肪酸量及び全脂肪酸に対する割合において、設置場所による有意差は確認されなかった。またコントロールと CO₂ シープ間で、プレートの藻類付着状況に違いは認められず、PUFA の脂肪酸量及び割合はこれと合致する結果となった。これは、群集形成初期(72 日程度)では、PUFA の脂肪酸量及び割合において、酸性化の影響は少ないことを示唆する。プランクトン群集を対象としたメソコスム実験の先行研究^{4,5}においても PUFA の有意差は確認されておらず、短期間では PUFA の脂肪酸量及び割合に対する酸性化の影響は少ないと考えられる。(2)1 日あたりの脂肪酸増加量($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$)は、0-44 日と 45-72 日間で脂肪酸全量の実験区による差異が認められた。45-72 日において CO₂ シープではコントロールに比べて脂肪酸増加量が大きく低下していた。特に差異が見られた脂肪酸は 16:0 および 18:1(ω -9)である(図 1、2)。16:0(細胞膜等の構造を構成)と 18:1(ω -9)(葉緑体を構成)は藻類の組織を構成する脂肪酸であるため、これらの脂肪酸量は藻類の現存量に依存すると考えられる。このように、72 日目のプレートにおいて脂肪酸増加量の低下といった、酸性化の影響の兆候が生じていることが予想される。(3)本実験では酸性化による PUFA 組成の大きな差異は認められなかった。しかし、今回実験を行なったコントロール海域と CO₂ シープでは現存の群集組成に大きな差異が確認されており、脂肪酸組成にも違いが見られると推定される。本実験でも 45 日目以降、脂肪酸増加量において酸性化の影響が生じたことが示唆されたため、酸性化は長期的なスケールで影響を及ぼす可能性がある。

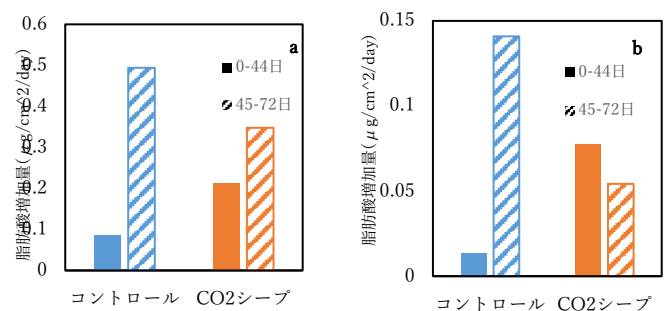


図 1、2: 一日あたりの脂肪酸増加量($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$) (a : 16:0、b : 18:1(ω -9))

方法の(1)の作業は下田臨海実験センターの和田茂樹助教授および職員の方々に行なっていただき、謝辞を申し上げます。

【引用文献】

- 1: Rossoll et al. *PLoS ONE* **7** e34737(2012)
- 2: Bermudez et al. *Sci. Rep* **6** 27749(2016)
- 3: Agostini et al. *Reg Stud Mar Sci* **2**, 45-53(2015)
- 4: Leu et al. *Biogeosciences* **10**, 1143-1153(2013)
- 5: Jacob et al. *J. Mar Biol Assoc UK* **21**, 225-233(2017)

海洋酸性化はオカダウミウシ *Vayssierea felis* の行動様式に影響を及ぼすのか？

佐々木 悠子 (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]

海洋酸性化とは、大気中の二酸化炭素が海洋に吸収される事で長期的に海水 pH が低下する現象である。海水の炭酸カルシウム飽和度も減じられるため、貝類や造礁サンゴ類、石灰藻などの貝殻・骨格形成が妨げられ、それら石灰化生物の成長や生存を低下させることが広く知られている。他方、海水のイオン濃度変化が生物体内の生理的機構を攪乱し、餌料探索や捕食者回避といった行動様式を改変することも示唆されている。こうした行動は個体の成長や生存に深く関わる要素であり、それ故、海洋酸性化の影響評価には行動的応答の理解も欠かせない。

腹足綱に属する多くの種は炭酸カルシウムの貝殻を持つ典型的な石灰化生物であり、これまで酸性化による貝殻形成阻害の知見が豊富に蓄積されてきた。一方で、酸性化は行動様式にも潜在的に影響を及ぼし得るが、その知見は極めて乏しい。オカダウミウシ *Vayssierea felis* (Collingwood, 1881) は裸鰓目に属する炭酸カルシウムの貝殻を持たない腹足綱の一種であり、インド洋から太平洋西部を分布圏とする岩礁域の普遍種である。餌生物と捕食者が既に判明しており、餌料探索や捕食者回避への影響評価が容易である為、石灰化阻害を除いた腹足綱への行動改変の調査に適している。本研究ではオカダウミウシを対象に、個体の生存に深く関わる餌料探索行動および捕食者回避行動に対する海洋酸性化の影響を明らかにすることを目的とした。

[材料と方法]

静岡県下田市鍋田湾の岩礁潮間帯で、2017年10月～2018年1月にかけて、オカダウミウシ、餌生物であるウズマキゴカイ、捕食者となるキヌハダウミウシ属を採集した。オカダウミウシを pH 7.8 ± 0.05 (酸性化区) および pH 8.2 ± 0.05 (対象区) に調整した濾過海水下で3日間馴致し、以下の実験に供した。

1. 平時の運動性に対する影響

酸性化が平時の運動性に与える影響を検証するため、本種の運動量を評価した。直線型ガラス管に馴致槽と同条件の海水 (酸性化区および対象区) を満たし、その中央にオカダウミウシ1個体を静置した。試供個体の行動を15分間観察し、その間の総移動距離と方向転換回数を記録した。それらを酸性化区と対象区で Wilcoxon の順位和検定にて比較した。

2. 餌料探索に対する影響

本種の餌料探索に対する酸性化の影響を検討した。Y字型ガラス管の上端2カ所から馴致槽と同条件の海水を掛け流し、上端の一方にウズマキゴカイを配した。ウズマキゴカイを配した上端からY字の分岐までの餌のある部位をA、それ以外の餌のない部位をBとした。下端にオカダウミウシ1個体を静置し、15分後に試供個体が定位した部位を記録した。酸性化区と対象区間で各部位への定位率の相違を χ^2 検定にて検証した。

3. 捕食者回避に対する影響

本種の捕食者回避に対する酸性化の影響を検討した。直線型ガラス管の上端にキヌハダウミウシ属を配した槽 (捕食者あり槽)

と何も配さない槽 (捕食者なし槽) を用意し、それぞれ上端から馴致槽と同条件の海水を掛け流した。ガラス管の中央にオカダウミウシ1個体を静置し、中央より上流側の部位をA、下流側をBとしたうえで、15分後に試供個体が部位した区画を記録した。捕食者あり槽と捕食者なし槽についてそれぞれ、各部位への定位率の差異を酸性化区と対象区間で χ^2 検定にて比較した。

[結果]

1. 平時の運動性に対する影響

総移動距離および方向転換回数は、いずれも酸性化区と対象区間で有意差は検出されなかった (Wilcoxon test, それぞれ $p > 0.05$)。

2. 餌探索に対する影響

オカダウミウシの各部位への定位率には、酸性化区と対象区間で有意差が認められた (Chi-squared test, $p < 0.05$)。対象区ではAに、酸性化区ではBに定位した個体が多かった。

3. 捕食者回避に対する影響

捕食者なし槽では、酸性化区と対象区間で定位率に有意差は検出されなかった (Chi-squared test, $p > 0.05$)。一方、捕食者あり槽については、酸性化区と対象区間で定位率に有意差が認められ (Chi-squared test, $p < 0.05$)、対象区ではBに、酸性化区ではAに定位した個体が多かった。

[考察]

実験1より、海洋酸性化はオカダウミウシの平時の運動性そのものに大きな影響を与えないことが示唆された。一方、餌料探索には負の影響が認められ、対象区では餌のある部位に移動する個体が多いのに対し、酸性化区では餌のない部位に留まる個体が多いことが示された (実験2)。加えて実験3の結果より、対象区では捕食者の下流へ逃避するのに対し、酸性化区では逃避行動を執る個体が減少し、捕食者の存在する上流へと移動する個体も存在した。

魚類では高CO₂環境がGABA受容体に影響を与えることで神経伝達機能が阻害され、嗅覚障害に伴う餌料探索や捕食者回避などの行動に変化が生じることが報告されている (Nilsson et al. 2012)。GABA受容体は軟体動物の神経系にも存在し、接近・回避行動に関わる可能性が示唆されている (Gunaratne et al. 2013)。このことから、酸性化した海水に含まれる高濃度のCO₂がオカダウミウシの神経伝達機能を阻害し、餌料探索や捕食者回避などの生存に関わる行動を改変していることが推察される。

以上より、腹足綱に対する海洋酸性化の影響は、石灰化のみならず行動様式にも及び、結果として成長や生残を減じる可能性がある。

DTW と DP を用いた MPA : Voronoi 図を添えて

中泉 雄登 (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】

昨今化石燃料の枯渇や地球温暖化などといった問題が後押しをし、再生可能エネルギーを利用した発電が普及してきている。再生可能エネルギーを利用した発電方法の中でも発電効率のいい風力発電所の建設が相次いでいるが、その一方で風車に鳥が衝突するバードストライクが問題になっている。このバードストライクによって、渡り鳥や希少な猛禽類が死亡し個体群に影響が出ることが危惧されている。

このバードストライクは風車の位置と鳥の飛行経路が重なることで起きるため、この問題を解決するために鳥、特に渡り鳥の飛行経路を知る必要がある。日本では鳥類標識調査により捕獲地点と再捕獲地点を結んだ 2 地点間データは数多くある。が、実際に移動した経路がわかる GPS などを利用したデータは数が少ない。

そこで私は、鳥の渡りの経路をインターネット上の飛来記録から推測しようと考えた。鳥の渡りは日本でも様々な場所で見ることができ、多くのデータが残っている。この情報を利用して飛行経路を明らかにすることができると考えた。今回は、個体数の時間的変化のパターンが北から南にかけて伝播するという仮説のもと、渡り鳥の飛行経路を Dynamic Time Warping (DTW) と Dynamic Programming (DP) を使って推測した。

【方法】

(1) 生物種

本研究にはサシバ *Butastur indicus* という渡り鳥の飛来記録を用いた。サシバは、全長およそ 50 cm で、蛇やトカゲ、カエルと言った小動物を食べる。本種は春と秋に渡りをするので知られており、特に秋では大規模な群れを作り、渡りをする。サシバは、夏は本州の里山などに生息しており、秋に沖縄や東南アジアに渡る。

サシバは本州のほとんどの場所に生息していることや、秋に大規模な渡りをすることから、飛来記録が多く残っている。これらの理由から、本研究ではサシバの飛来記録を用いた。

(2) データ

本研究では「タカの渡り全国ネットワーク」(<http://www.gix.or.jp/~norik/hawknet/hawknet0.html>)に掲載されている、全国各地のサシバの飛来記録を使用した。飛来記録は 2012 年から 2016 年の 9 月 1 日から 10 月 31 日に調査されたものになっている。

(3) 解析

年ごとに各地点の飛来記録を用いて、波形を描画した。そして、その波形の類似度を、DTW を用いて求めた。DTW では、まず 2 つの時系列データの各点の差分を総当たりで求め距離行列を作る。この距離行列上の経路を考え、要素の和が最小になるものを最適な経路とする。最短の経路を求める際に、DP を用いた。

DP は、問題を複数の部分問題に分割して、部分問題の計算結果を利用して元の問題を解く手法で、今回のような最短経路を求める際に適している。このとき、その経路における要素の和を DTW 距離とする。DTW 距離が小さいほど、2 つの時系列データの類似度は高い。DTW のメリットは、総当たりで各点における差分を計算するため、時系列データの長さや周期が違う場合であっても、類似度を求められることである。今回は類似度を定義するために、要素の和が最小の経路となる DTW 距離と、要素の和が最大になる経路の距離を求めた。その距離に対する DTW 距離の割合を、2 つの時系列データの類似度とした。

そして、求めた類似度をもとに飛行経路を推測した。飛行経路を推測する際に、サシバの飛行経路を、Voronoi 図を用いることで経路の候補を絞った。Voronoi 図とは、平面上にいくつかの点(今回の場合、地図上における全国各地点)において、どの点に最も近いかによって分割してできる図のことである。この図によって、全国各地が最も近い場所ごとに結ばれる。今回はサシバの飛行経路を単純化し、最も近い地点を選び移動していると考えた。Voronoi 図に従い、類似度が小さいところを結んだものを飛行経路とした。

【結果と考察】

求めた全国各地の類似度は下の表のようになった。表は各地点同士の類似度をあらわしており、青梅と静岡の類似度は 0.035 である。値が小さいほど類似性があり、サシバはその小さいところに移動していると考えられる。青梅から移動する場合、静岡との値が一番小さいので、静岡に移動していると考えられる。Voronoi 図でルートを絞った上で、類似度の小さいもの同士を結んでみると、青梅、伊良湖、みつえ、高茂、屋久島のようになった。

	静岡	金華山	伊良湖	みつえ	宝塚	高茂	油山	屋久島
青梅	0.035	0.0376	0.0500	0.0272	0.0322	0.0407	0.0490	0.0261
静岡		0.0382	0.0274	0.0257	0.0361	0.0298	0.0471	0.0359
金華山			0.0611	0.0270	0.0364	0.0419	0.0456	0.0279
伊良湖				0.0444	0.0530	0.0448	0.0796	0.0519
みつえ					0.0273	0.0283	0.0306	0.0181
宝塚						0.0433	0.0466	0.0231
高茂							0.0682	0.0223
油山								0.0270

表 1. 各地点における類似度

指導教員の徳永先生はこの要旨を修正すべきとのお言葉をいただきました。

ちーがーうーだーろー！これ以上私の適応度を下げるな！！

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

背景・目的

生物間相互作用を理解することは生態系管理を行う上で非常に重要である。中でも競争は興味の尽きない現象であり、近年では繁殖干渉 (Reproductive Interference : RI) という競争の様式が関心を集めている。RI は配偶行動を通じて、ある種が別種の適応度を下げることであり、室内実験系ではアズキゾウムシ *Callosobruchus chinensis* (以下：アズキゾウ) とヨツモンマメゾウムシ *C. maculatus* (以下：ヨツモン) の例が知られている。アズキゾウ、ヨツモン共にオスは種の見境なく求愛を行うが、アズキゾウのオスのみヨツモンのメスと交尾を行うことで、ヨツモンの適応度を下げることが知られている。

マメゾウムシにおける RI では、アズキゾウのオスの形質 (交尾器形態や求愛指向性など) と RI の強さとの関係は調べられているが、ヨツモンのメスの形質に着目した研究はない。本研究は、メス側の形質に着目し RI の効果がどの形質により左右されるかを調べることを目的とした。

材料・方法

ヨツモンについては地理的に異なる地点で採集した後、研究室内で累代しているいくつかの系統 (bcQ,tQ,hQ,hQb,iQ,icQ) を用いた。複数系統を用いた理由は、系統ごとに異なる形質を持ち合わせているからである。アズキゾウについては研究室で 70 年以上累代している系統の jC 系統を用いた。また、体長を揃えるため、1 つの緑豆に 1 つの卵をつけた条件で羽化させた個体を用いた。

【系統ごとの RI】

同系統のオスと一回交尾したヨツモンの各系統のメスについて、オスなし (NOM)、同系統オス 1 匹 (CON)、jC のオス 1 匹 (HET) と同居条件を変え、適応度の指標として生涯孵化卵数を計測した。また、用いた個体の鞘翅長を計測した。

【系統ごとの配偶行動】

ヨツモン各系統のオスもしくは jC のオスに対して、同系統のメスと閉所で同居させ、配偶行動を行うかどうかについて観察した。オスがメスに求愛を行うかどうか、メスはその求愛を受け入れるかどうかを記録した。

結果・考察

【系統ごとの RI】

NOM と CON の生涯孵化産卵数についてはどの系統でも有意な差が認められなかったが、NOM と HET では tQ と hQ において有意な差が認められた。ここで、RI の強さの指標として、

$$1 - \frac{HET}{NOM}$$

を用いた。ただし、RI の強さは非負であるとし、負のものに関しては 0 とみなした。

tQ と hQ では jC からの強力な RI が生じたが、iQ と icQ と hQb においては jC からの RI が生じなかった (図 1)。鞘翅長

は iQ や icQ、hQb ほど大きいことが明らかになった。しかし、tQ や hQ よりも小さい系統である bcQ では、tQ や hQ ほどの RI は生じていなかった。

【系統ごとの配偶行動】

jC は bcQ 以外のどの系統にも求愛を行うことがわかった。またメスは、交尾を行わせないような防御行動が生じることが知られているが、その成功率は hQ に比べると hQb の方が高かった。

以上のことから、ヨツモンのメスの体長がある程度より小さければ jC からの求愛が生じにくくなり RI が起こりにくくなること、また体長が大きければ交尾前の防御の成功率が高くなり RI が起こりにくくなることが推測される。先行研究では RI はアズキゾウからヨツモンへの一方向で生じると知られているが、RI の強さは種内の体長によっても変わることを見逃した上で述べるべきであると提言する。

本研究では、jC のオスの体長が同じくなるように成虫を得たが、今後は jC のオスの体長を変化させ、メスとの体長差と求愛指向性の関係どのように変化するかについて調べていきたい。同時に、アズキゾウの系統を変え、ヨツモンの系統を固定した時にも RI の効果が体長で変化するかどうかについても調べていきたい。

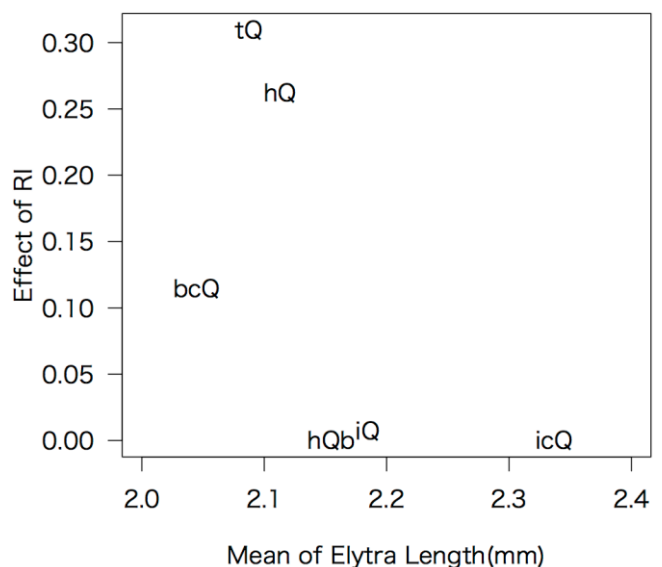


図 1：各系統における平均体長と RI の強さ
横軸は各系統の平均体長、縦軸は RI の強さを示す

草原の時間的連続性が植物と蝶類の種組成に与える影響

井上太貴 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 田中健太 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

日本では 1950 年代以降、草原資源の経済価値が減少し、草原の管理放棄と森林化が急速に進み、かつて国土の 3 割を占めた草原が 1%にまで減ったと言われている。それに伴い、多くの草原生動物植物が絶滅の危機にさらされている。スウェーデンでも 80 年間で 90%以上の半自然草原が失われたなど、草原の減少は日本国内に留まる問題ではない。そのため、生物多様性が特に高い草原の特定と保全は世界的な課題である。私達のグループは最近、100 年以上続いている古い草原と、そうした草原がいったん森林化を経た後に約 50 年間続いている新しい草原では、植物の種組成が大きく違い、草原生希少植物が古い草原に多いことを見出した。しかし、(1) この効果は森林生群集の残存によるものなのか、(2) 草原の時間的連続性が動物にも影響を与えるのか、は分かっていない。そこで、草原と森林の両方を調査地にするるとともに、幼虫の餌植物への選択性が強い蝶類にも対象に広げ、植物・蝶類の種組成が森林・新しい草原・古い草原の間で異なるか、特に影響を受ける種は何かを明らかにすることを目的とした。過去の履歴が生物群集に与える影響を明らかにすれば、生物群集の形成過程への基礎的理解も大きく前進する。

【方法】

長野県の菅平高原・峰の原高原のスキー場で、過去の地形図と航空写真を用いて 1937 年から現在までの植生を調べて地理情報 (GIS) 化した。100 年以上続いている古い草原 (n=6)、44~69 年続く新しい草原 (n=6)・森林 (n=7) の 3 タイプの植生と、スキー場管理を受けていない対照区として菅平高原実験所内草原 (n=1) を調査地を選んだ。各調査地に 1×20 m の植生調査区を設け出現する移管束植物種を 7・9 月に記録した。また、各植生調査区を含むように 5×20 m の蝶類調査区を設置して出現蝶種と個体数を 8・9 月に記録した。

調査地	明治以前	1937	1947	1974	2007	歴史
実験所	草原	草原	草原	草原	草原	古
表太郎草原	草原	草原	草原	草原	草原	古
白銀草原	草原	草原	草原	草原	草原	古
裏夕ボス草原	草原	草原	草原	草原	草原	古
奥夕ボス草原	草原	草原	草原	草原	草原	古
峰の原B	草原	草原	草原	草原	草原	古
峰の原C	草原	草原	草原	草原	草原	古
天狗草原	草原	森林	森林	草原	草原	古新
日の出草原	草原	森林	森林	草原	草原	新
裏太郎草原	草原	森林	森林	草原	草原	新
つばくる	草原	森林	森林	草原	草原	新
大松元	草原	森林	森林	草原	草原	新
大松東	草原	森林	森林	草原	草原	新

表 調査した草原の植生履歴。明治以前の古地図と、各年代の空中写真で草原と森林を判別した。1947 年以前から続く草原の歴史を「古」、それ以外の草原を「新」と区分した。

【結果・考察】

維管束植物は 254 種が確認された。植物種組成は、草原全体と森林の間でも、古い草原と新しい草原の間でも異なった (PERMANOVA, $p < 0.005$)。非計量多次元尺度法 (NMDS)

では古い草原の種組成は調査地間で似る傾向があり、新しい草原の種組成は古い草原と森林の間に位置していた (図 1)。森林化を経験している新しい草原には森林生の植物種が残存している可能性がある。各植生の指標種を調べる IndVal 分析によって、森林ではツタウルシ・クマイザサ・イヌエンジュ・アカマツが、草原全体ではヨモギ・ミツバツチグリ・ススキ・シシウド・アヤメなど 14 種が、古い草原ではワレモコウ・ツリガネニンジン・アマドコロ・ヤマハギ・アザミ属が指標種に選ばれた。一方、新しい草原には指標種がなかった。植物種数に対する植生タイプの効果をポアソン回帰によって調べた結果、古い草原の植物種数が最も大きく、新しい草原、森林の順で続くモデルが、赤池情報量基準 (AIC) によって選択された。

これらの結果は、古い草原には特徴的で種多様性の高い植物群集が存在し、森林化を経た新しい草原ではそうした群集が回復しないことを示している。

蝶類は 28 種 398 個体が確認された。蝶類種組成は草原と森林で異なったものの (PERMANOVA, $p < 0.01$)、古い草原と新しい草原では有意に異ならなかった ($p = 0.49$)。ただし、NMDS では古い草原の蝶類種組成は調査地間で似る傾向があり (図 2)、特有の蝶類相を持つ可能性がある。また、植物の結果と異なり、新しい草原の蝶類種組成が森林に近いということはなかった (図 2)。IndVal 分析によって、森林ではクロヒカゲが、草原全体ではミドリヒョウモン・イチモンジセセリ・ウラギンヒョウモンが指標種に選ばれた。植物の結果と異なり、古い草原の指標種はジャノメチョウ 1 種にとどまり、新しい草原では植物同様に指標種はなかった。蝶類の種数と個体数に対する植生タイプの効果をそれぞれポアソン回帰と負の二項回帰によって調べた結果、蝶類種数は草原全体の方が森林より高いというモデルが、蝶類個体数は古い草原で最も高く、新しい草原、森林の順で続くモデルが選択された。

これらの結果より、古い草原には特有の蝶類相がある可能性があるものの、植物よりも移動能力が高い蝶では再草原化した場所への移入が起きやすく、古い草原に依存する種は植物より蝶の方が少ないのかもしれない。

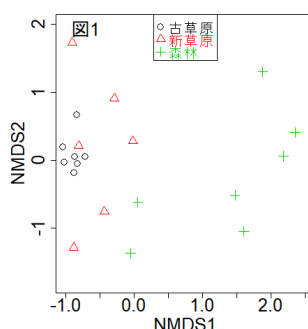


図 1 各調査地間の植物種組成の非類似度。jaccard 指数を用いた非計量多次元尺度法 (NMDS) による。

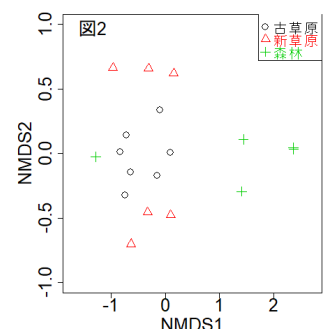


図 2 各調査地間の蝶類種組成の非類似度。chao 指数を用いた NMDS による。

進入初期ニホンジカ *Cervus nippon* の採食生態：餌植物嗜好性と生息密度影響

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

【背景・目的】

ニホンジカ (*Cervus nippon*、以下シカとする) は日本の多くの地域に生息しており、その大部分で個体数が増えている。シカの過剰な採食による自然植生の劣化・裸地化は、現在進行している全国最大の環境問題の一つである。シカは低密度期には餌を選び好み、高密度になるにつれて利用する植物種や植物組織の幅が増えていく。しかし、低密度期のシカの研究は限られており、観光資源植物が消失・減少した事例報告はあるものの、植物群集を対象とした嗜好性の定量的研究はほとんどない。本研究では、低密度期のシカにおける植物種ごとの嗜好性度合い・生息密度と餌資源利用の関係を明らかにし、シカの採食生態の理解、シカ管理、優先度・緊急度を考慮した植物の保全に役立てることを目的とし、長野県菅平高原の4地域でシカの相対生息密度・採食植物種とそれらへの嗜好性を評価した。

【方法】

調査地

長野県菅平高原の4地域（菅平高原実験所・峰の原スキー場・奥ダボススノーパーク・菅平牧場）の半自然草原・森林に菅平牧場の牧草草原を加えた計9調査地で調査を行った。

相対生息密度評価

糞塊法による生息密度評価を行った。2017年7月中旬～8月上旬に各調査地を1km ずつ幅1mの範囲で踏査し、糞塊数をカウント・サンプリングした。糞塊密度（糞塊数/100 m²）を算出し、調査地ごとの生息密度指標とした。なお、本研究では、1糞粒から1m 範囲内に5糞粒以上確認できたものを1糞塊とし、排糞様式からシカ・カモシカ糞塊を識別した。

採食植物調査

2017年8月下旬～9月に各調査地に10×1m トランセクトを10個ずつ設置し、トランセクト内の出現植物種を記録し、食痕があった植物種に関しては、全出現個体数と有食痕個体数をカウントした。植物種ごとに採食頻度（有食痕個体数/全出現個体数）を算出し、それぞれの採食嗜好度合いとした。調査地ごとに有食痕種数割合（有食痕植物種数/全出現種数）を算出した。また、有食痕植物種を1トランセクトにつき、1個体をサンプリングした。

DNAによるシカ・カモシカ識別

菅平高原で同所的に生息しているシカとカモシカの糞・食痕の形状は似通っており、糞は排糞様式から推定可能ではあるが、食痕を形状から識別する方法はない。そこで糞と食痕に対し、LAMP法によるDNA分析によってシカ・カモシカの識別を行うべく、現在、解析を進めている。

【結果・考察】

相対生息密度評価

4地域間で糞塊密度に差が見られ、菅平牧場（平均0.64糞塊/100 m²）、峰の原スキー場（0.55）、奥ダボススノーパーク（0.50）

の順に多く、菅平高原実験所では0であった。また、植生タイプ間では、森林（平均0.75糞塊/100 m²）で最も高く、牧草草原（0.40）、半自然草原（0.15）の順に下がった。

採食植物調査

植物種は調査地全体で56科121属158種が出現し、そのうち食痕が見られたのは22科36属39種だけだった。jaccard指数を用いた非計量多次元尺度法（NMDS）によると、有食痕植物の種組成は森林と草原の間で異なり、同一の植生タイプでは調査地域間で類似していた（PREMANOVA, $p < 0.01$ ）。特に嗜好されていた植物として、草原ではオオバギボウシ・ツリガネニンジン・イタドリ等が、森林では、シシウド・イタドリ・ハウチワカエデ等が挙げられる（図1）。全出現植物種を食痕の有無と人間による山菜利用の有無によって分けたところ、山菜利用されている植物ほど食痕があった（フィッシャー正確検定, $p < 0.05$ ）。人間が山菜利用する柔らかく苦味が少ない植物種をシカが好んでいると考えられる。以上より、低密度下でシカは特定の植物を採食すること、および、特に嗜好される植物が明らかになった。

生息密度影響

各調査地の有食痕植物種数と有食痕種数割合に与える糞塊密度の効果を調べるポアソン回帰の結果、有食痕植物種数と有食痕種数割合はいずれも糞塊密度とともに増えた（Wald検定, $p < 0.01$, $p < 0.05$ ）。シカ密度が増加するほど、シカが採食する植物種の幅が増えることが定量的に明らかになった。

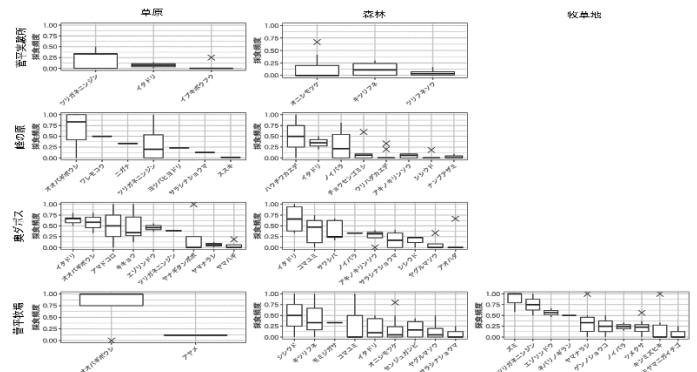


図1 各調査地における有食痕植物種の採食頻度。グラフの並び方が調査地域、列が植生タイプを示す。採食頻度は10×1m トランセクトごとに調べた。採食頻度の平均値が高い順に有食痕植物種が並んでいる。

クロマルハナバチにおける花粉摂取と卵巣発達

田中千聡 (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】

一般的にハナバチ類の訪花目的は、活動源となる花蜜と仔の食糧となる花粉の採餌であることが知られている。加えてハナバチ類のメス個体は産卵の前に卵巣を発達させる必要があり、そのための栄養源に花粉を利用していることは、これまで当然視されてきた。しかしながら、その直接的な関連性を検証した例は少なかった。そこで本研究では、花粉摂取によって卵巣発達が生じるかを明らかにするために、クロマルハナバチ, *Bombus ignitus*, のワーカーを用いた室内実験を行ない、ハナバチ類における卵巣発達と花粉摂食の関係について考察した。

【方法】

国内で販売されているクロマルハナバチのコロニー(ナチュポールブラック, Koppert 社)内で羽化したワーカーを24時間以内に取り出し、1頭ずつプラスチックカップに入れ、20°C・全暗の恒温室内で飼育した。個別飼育時に、花粉と花蜜(蜂蜜を希釈し、糖度50%に調整したもの)もしくは花蜜のみを与える2つの条件を用意した(図1)。飼育期間中に死亡した個体はデータから除外した。

飼育開始から0、7、14日後に80%エタノールで固定し、解剖した。その際、体サイズ(ITスパン)と卵巣発達度、消化管内の花粉の有無を確認した。卵巣発達度は、卵巣内の卵細胞と栄養細胞の状態によって次の4つのステージに分けて評価した。St. 1: 栄養細胞と卵細胞の区別がつかず、卵巣が糸のように観察される, St. 2: 栄養細胞と卵細胞の区別が付き、栄養細胞の方が卵細胞よりも大きい, St. 3: 栄養細胞が卵細胞よりも小さい, St. 4: 卵巣内に成熟卵(栄養細胞を伴わず、卵細胞の周囲に殻が形成されている)が存在し、卵巣が完全に発達している(図2)。

【結果】

羽化直後全ての個体において、卵巣は発達していなかった(n=9)。個体の平均体サイズは4.53 ± 0.70 mm (n=134)であり、出身コロニーによる影響はなかった。また、卵巣発達度と体サイズ・出身コロニーについて相関は見られなかった。

花粉と花蜜処理区の個体は、花蜜のみ処理区の個体よりも卵巣を発達させていた。また、7日目よりも14日目、つまり羽化後の経過日数が長くなるほど発達していた(図3)。

消化管内に花粉が観察された個体は、花粉が観察されなかった個体よりも卵巣を発達させていた(図4)。

【考察】

花粉を摂食した個体の卵巣は、花蜜のみを摂食していた個体よりも発達しており、羽化後の時間経過に伴って卵巣を発達させた個体は増加していた。したがって、クロマルハナバチのワーカーにおいて、花粉摂取は卵巣発達を促進させ、羽化後の時間経過に伴ってさらに卵巣発達は進むと考えられた。本研究より、ハナバ

チ類における卵巣発達は花粉の栄養分が必要であることが示唆された。

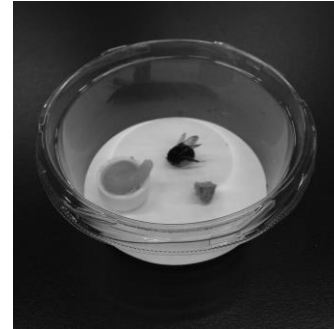


図1 飼育実験時の様子(写真は花蜜+花粉処理区)

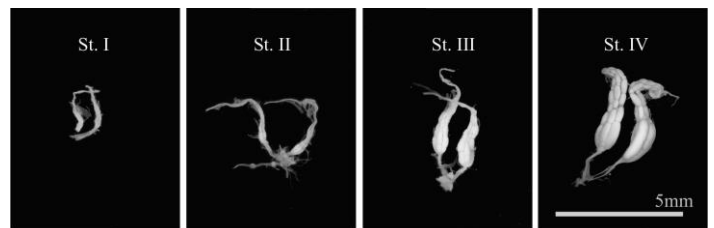


図2 卵巣発達度

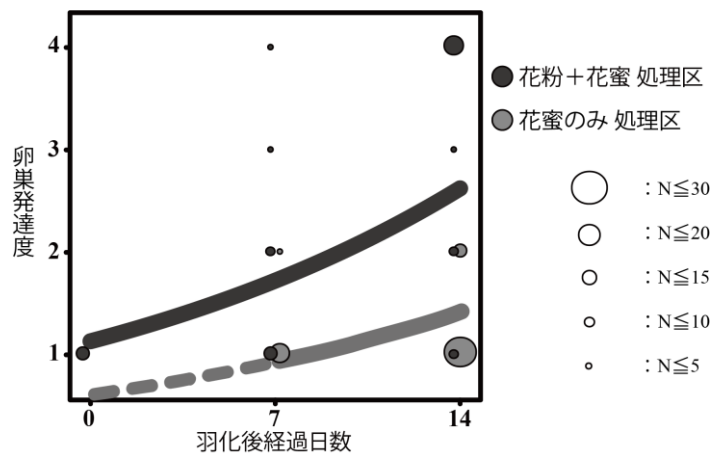


図3 処理区による羽化後の時間経過に伴う卵巣発達度合

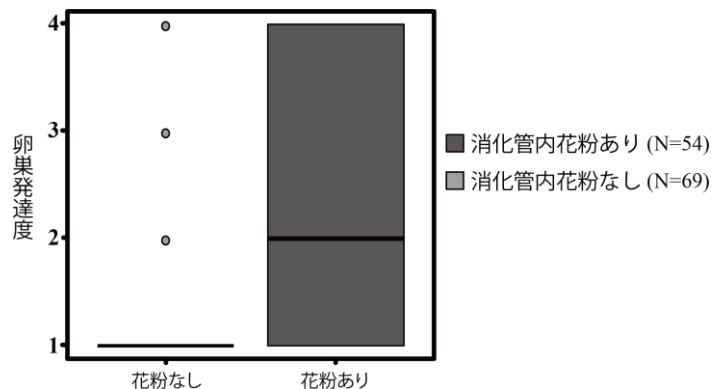


図4 消化管内花粉の有無と卵巣発達度合

水田管理と周辺環境が水生昆虫群集に与える影響

渡辺 黎也 (筑波大学 生物学類)

指導教員：横井 智之 (筑波大学 生命環境)

【背景】

水田は自然湿地に生息していた多様な動植物の代替生息地であり、生物多様性保全の場として注目されている。水生昆虫に着目すると、その多くは自然湿地の減少に伴い、現在では水田を繁殖場所として利用しており、水田の非湛水時にはため池などの止水域を利用している。特にカメムシ目やコウチュウ目を始めとする水生昆虫は水田生態系における上位捕食者であるため、生物多様性保全を考える上で重要な生物群である。しかし農薬の使用や圃場整備などの農業の集約化に伴い、多くの種は姿を消しつつある。一方で近年、無農薬や減農薬などの生物多様性に配慮した環境配慮型農法を推進する動きがある。環境配慮型農法の水田（以下、有機水田）では、慣行農法の水田（以下、慣行水田）よりも水生昆虫の個体数や種数が多いことが報告されている。しかし先行研究の多くは、農薬の効果のみに焦点を当てており、他の要因が水生昆虫群集に与える影響について調査した事例はない。

本研究では、水生昆虫の多様性を維持するための水田管理と立地条件を明らかにすることを目的として、農薬以外の水田管理様式や餌個体数などの圃場レベルの要因を探ると共に、水田周囲の景観要因が水生昆虫群集に与える影響について検討した。

【方法】

つくば市近郊の5地域から有機水田と慣行水田を各1枚以上選定し、計16枚を調査地とした。調査は2017年4月から9月に水田が入水してから落水するまでの期間、水田1枚につき月2回ずつ行なった。

圃場での調査として、タモ網を用いた1m反復掬い取りを水田1枚当たり原則20回行ない、採集された水生昆虫と餌生物の個体数を種もしくは分類群ごとに記録した。現地でも同定できなかった生物は80%エタノールで固定し、研究室で同定した。各水田につき1箇所において、水温及び水深、pH、COD、電気伝導度、全窒素濃度、リン酸濃度を測定した。水田1枚当たり8箇所において2m×0.5mの区画を設置し、区画内に生育する植物の植被率を種ごとに記録した。

農事歴及び湛水日数、薬剤使用の有無と使用回数を水田管理者から聞き取った。Google Earth Proを用いて、水田面積、各水田に最も近い止水域までの距離及び止水域の面積を算出した。

最後に圃場、景観レベルの要因を以下のように設定した。

i) 圃場レベルの要因

薬剤使用、湛水日数、水質、植被率、餌個体数、水田面積

ii) 景観レベルの要因

水田から最も近い止水域までの距離（以下、止水域距離）

止水域の面積（以下、止水域面積）

【結果】

1) 圃場、景観レベルの要因が水生昆虫の群集組成に与える影響
各水田における水生昆虫の群集組成の違いを明らかにするため、Bray Curtis の非類似度指数を利用した非計量多次元尺度構成法

(NMDS) による座標付けを行なった（図1）。次に、群集組成のばらつきを説明する要因を明らかにするため、並び替え検定を行なった（図1）。その結果、圃場レベルでは薬剤使用の有無や湛水日数、餌個体数、水温が、景観レベルでは止水域距離と止水域面積が群集組成のばらつきを示す要因であることが明らかになった。また、有機水田と慣行水田の群集組成が異なるかどうかをperMANOVAを用いて解析した結果、水生昆虫の群集組成は有機水田と慣行水田で異なることが示された。

2) 圃場レベルの要因が水生昆虫群集に与える影響

薬剤使用の有無及び湛水日数、餌個体数、水温を説明変数とする一般化線形混合モデル (GLMMs) による解析から、水生昆虫の種数及び個体数に対して餌個体数が正の効果を与えることが示された。また、種数に対しては水温も正の効果を与えていた。

3) 景観レベルの要因が水生昆虫群集に与える影響

止水域距離と止水域面積を説明変数とする GLMMs による解析から、水生昆虫の種数に対して止水域面積が負の効果を与えていることが示された。

【考察】

薬剤使用の有無によって水生昆虫の種数及び個体数には違いがみられなかったが、群集組成は異なっていた。このことから、環境配慮型農法の保全効果を検討するためには種数や個体数だけではなく、群集組成にも着目する必要があることが示唆された。また餌個体数は、水生昆虫の種数及び個体数を維持する上で重要な要因であり、そのため餌個体数の多い有機水田は水生昆虫の保全に有効であることが示された。止水域面積が大きいと水生昆虫の種数は減少する傾向がみられたが、この結果は水生昆虫の種数によって左右されないという先行研究の結果を支持していた。今後は、より多くの調査地において、水生昆虫群集と餌生物の群集組成や個体数との関係に着目した研究を行なう必要があるだろう。

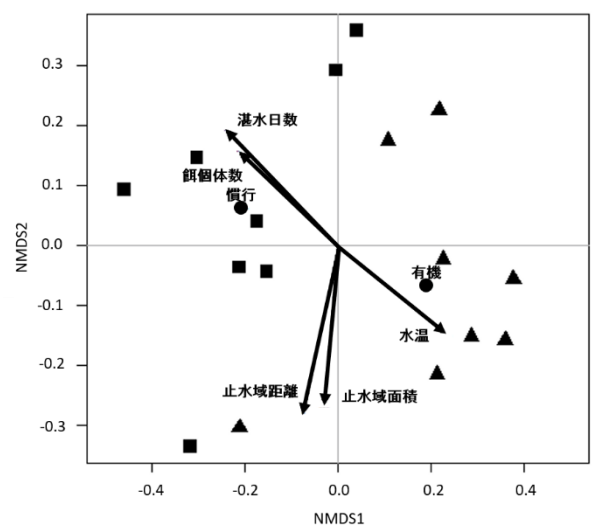


図1. NMDSによる各水田の水生昆虫群集の座標付け。

■：有機水田、▲：慣行水田

●：有機水田、慣行水田の重心

「広腰亜目」(昆虫綱:膜翅目)の発生学的研究に向けて—完全変態類のグラウンドプランの再構築—

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

【背景・目的】

昆虫類は全動物種の 75% を占める地球上で最も繁栄した動物群である。その 80% 以上を占める完全変態類は、多様性を誇る昆虫類を理解するうえで非常に興味深い一群である。

この完全変態類を理解するためには、最原始系統群からの情報は特に重要である。これまでは脈翅上目 [= 脈翅 (アミメカゲロウ) 目 + 鞘翅 (コウチュウ) 目] がその候補であった¹。しかし、近年の分子・形態双方の系統学的研究から、膜翅 (ハチ) 目を完全変態類の最原始系統群候補とする見解が合意を得られつつある²。したがって、完全変態類の理解、すなわちグラウンドプラン (GP) の再構築において、膜翅目は最も集中的な検討が望まれる系統群となってきたのである。

対象群の GP の再構築において、比較発生学的アプローチは極めて有効な手段である。膜翅目は原始的な「広腰亜目」と派生的な細腰亜目の 2 亜目で構成されているが、膜翅目における発生学的研究は、ほとんどはミツバチ³や寄生蜂類、アリ類、ハナバチ類などを材料とした細腰亜目に関するものであり、「広腰亜目」に関してはハバチ科のカブラハバチ⁴のほかにもとまった研究はない。したがって、膜翅目の比較発生学的理解のためには、原始的な「広腰亜目」の検討が急務である。

「広腰亜目」において、膜翅目の最原始系統群と目されているナギナタハバチ科、ヒラタハバチ科と細腰亜目への移行段階を示すと考えられているキバチ科の 3 科は、最も注目すべき系統群である。しかし、これら 3 科の成虫はいずれも年 1 化であるうえ、出現期間も約 2 週間と短い。また、基質の内部に産卵するものが多いため、採卵は容易ではない。このような採集・採卵の困難さは、発生学的研究を試みるうえでの大きな障壁である。

以上の背景から、膜翅目の GP の理解および完全変態類の系統進化の再構築を目的とし、「広腰亜目」の発生学的研究を開始した。その第一段階として、本研究では、ナギナタハバチ科、ヒラタハバチ科、キバチ科の採集地の確保、採集法、採卵法の確立を目指すとともに、これらの卵構造の観察を行った。

【材料・方法】

◇採集法

① ナギナタハバチ科: 成虫は、体長 4~7 mm で、3~6 月のアカマツの開花期間前 (約 2 週間) のみ出現し、花粉生成期のアカマツの雄花に産卵する。触角の第 4 節以降は細く鞭状で、名前の由来である薙刀状の産卵管鞘をもつ。これらの特徴をもとに、3~6 月にかけて東京都、栃木県、長野県 (上田、菅平、須坂) の 5 地点で採集を試みた。

② ヒラタハバチ科: 成虫は、体長 13~15 mm で、4~6 月の寄主植物の若葉期 (約 2 週間) に出現し、主にバラ科の植物の葉に産卵する。胴部は扁平、大顎は鎌状に発達。これらの特徴をもとに、6 月に長野県 (菅平、峰の原) で採集を試みた。

③ キバチ科: 成虫は、体長 14~25 mm で、5~10 月に出現し、主にマツ科、スギ科などの針葉樹の幹に産卵する。胴体、触

角は細長く、産卵管は棒状で長い。これらの特徴をもとに、7~8 月に長野県 (菅平) で採集を試みた。

◇採卵法

野外および飼育下で産下された卵を産卵基質より摘出、あるいは雌を解剖し未受精卵を得た。卵はブアン液あるいは FAA 液で固定し、70% EtOH で保存した。また、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて、生卵および固定卵の外部形態観察を行った。

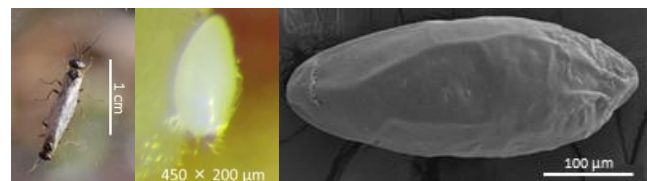
【結果・考察】

ナギナタハバチ科ナギナタハバチ、マダラナギナタハバチの成虫約 360 個体を、アカマツ雄花周辺のスウィーピングにより、3 月下旬~4 月上旬に東京都大田区・渋谷区、4 月中旬に栃木県宇都宮市、4 月下旬~5 月上旬に長野県上田市真田町、5 月中旬に長野県上田市菅平高原、5 月下旬~6 月上旬に長野県須坂市豊岡で採集した。また、飼育下で 10 卵、アカマツの雄花から 35 卵、および約 300 の未受精卵を得た。ナギナタハバチ科の卵は白色で長径 450 μm 、短径 200 μm ほどの回転楕円体である。

ヒラタハバチ科ツヤヒラタハバチの成虫 2 個体を、6 月中旬~下旬に、長野県上田市菅平高原および須坂市峰の原高原のモミジイチゴから採集した。飼育下で 1 卵、野外から 10 卵、2 つの未受精卵を得た。ヒラタハバチ科の卵は黄色で、長径 1.1 mm、短径 0.5 mm ほどの回転楕円体である。

キバチ科オナガキバチの成虫 3 個体を、7 月下旬~8 月上旬に長野県上田市菅平高原のマツ科の切り株より採集した。約 200 の未受精卵を得た。キバチ科の卵は白色で長径 1.5 mm、短径 0.2 mm ほどの回転長楕円体である。

また、ナギナタハバチとオナガキバチの卵には前極のやや後方に卵門が確認された。いずれも十数個の卵門が集合して存在し、それぞれ後方に向けて開口する。



研究材料であるナギナタハバチおよびその卵

このように「広腰亜目」のナギナタハバチ科、ヒラタハバチ科、キバチ科の採集地の確保、採集法、採卵法の確立に成功し、卵を観察することもできた。「広腰亜目」の発生学的研究に必要な材料を確保することが可能となったので、次年度、胚発生過程の検討を開始する。

【参考文献】

1. Wheeler (2001) *Cladistics* 17: 113-169.
2. Misof et al. (2014) *Science* 346: 763-767.
3. Nelson (1915) *The Embryology of Honey Bee*, Princeton University Press.
4. Oishi et al. (1989) *Zoological Science* 6: 541-547.

塩濃度の低下が平板動物に与える影響

浅井 仁 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 裕昭 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

平板動物は筋肉や神経系を持たない海産無脊椎動物である。体は不定形で風船をつぶしたような構造であり、体表面、特に下面にある大量の繊毛の打動で這うように移動する。個体は分裂により増殖するが有性生殖の可能性も示唆されており、現在では H1-19 の遺伝子型 (ハプロタイプ) が確認されている。下田臨海実験センターでは H2 系統の水槽での培養系を実験室内で確立している。

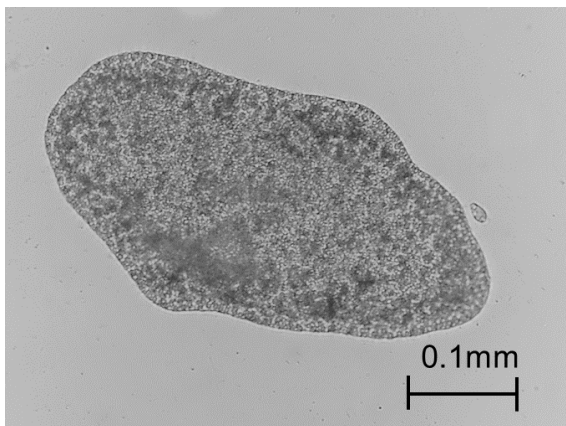


図 平板動物 (H2 系統飼育個体)

Pearse & Voigt (2010) は 50% および 75% の濃度に調整された自然海水に平板動物を暴露したところ、平板動物の体の縁がめくれ上がり底面に張り付くことができなくなり、動かなくなったと報告している。さらに同研究ではフィールドで降雨後に平板動物が採集できなかった理由に対し、海水中塩濃度の低下を根拠としている。当研究室でもこれまでの研究で下田臨海実験センターの屋外水槽や野外採集にて降雨後に採集できる平板動物の個体数が少なくなることが経験的に知られている。

しかし、Eitel et al. (2013) の論文では、汽水域で塩濃度が急激に変化するマングローブ林や 20ppt (塩濃度) の海水中から生きた平板動物が採集されたとの記述があった。

本研究では、低塩濃度に調整した海水への暴露が平板動物にどのような影響を与えるか調べることを目的とした。

方法

塩濃度測定は卓上電気伝導度計を用いて psu (実用塩分) の値を測定した。また、11 月 7 日から 1 月 6 日にかけて屋外水槽内に塩濃度センサーを設置し、降雨時の塩濃度の変化を記録した。psu (実用塩分) の値は‰ や ppt (絶対塩分) の値と同等とされている。

実験室内にて濾過自然海水 (FSW, psu 約 34.4) 中で培養した平板動物 H2 系統個体のうち、1 mm² 以下のサイズの個体を選出し、以下の実験を行った。

(1) 平板動物 10 個体を着底させたスライドガラスを FSW で満たした水槽内に立てかけ、ピペットマンにより 30 秒に 2ml ずつ濾過した雨水を水槽に滴下していき水槽中の海水の塩濃度を低下さ

せた。その過程で、平板動物が剥がれ落ちるかを観察した。なお、水槽内の海水は 30 回転分の羽付きモーターによって攪拌されていた。

(2) 平板動物 10 個体を着底させたスライドガラスを、約 26 (75% 海水に相当)、24、22、20、18 (50% 海水に相当) に塩分濃度 (psu) を調整した FSW で満たした水槽内に暴露し、10 分間目視で観察後、30 分後、1 時間後に何個体スライドガラス上に残存しているかを確認した。なお、水槽内の海水は攪拌されていた。

(3) スライドガラス上に平板動物を一個体ずつ含む FSW100 μL を滴下し、スライドガラス上に平板動物が着底後、濾過した雨水によって塩分濃度 (psu) を 28~20 まで調整した FSW200 μL で置換した。その後、30 分、1 時間後にそれぞれ位相差顕微鏡で平板動物の様子を観察した。

結果

塩濃度センサーの記録では円柱水槽の塩濃度は 34.613-33.214 の間で推移していた。

(1) 水槽内の psu を 34 から約 18 まで低下させたが、psu18 でも 8 個体がスライド上に残存していた。

(2) psu24 までは 1 時間後でも全個体がスライド上に残存していた。psu 20 や 18 では、いずれも暴露後 5 分程度で全個体がスライド上から剥がれ落ちる様子が観察された。

(3) psu24 以下の時、暴露後 1 時間以内に体がバラバラに崩壊する現象が多く個体で見られた。体が崩壊する個体数は塩濃度が低い方がより多かった。

考察・展望

屋外水槽の psu は降雨後でも約 33 までしか低下しなかったことから、多少の降雨では屋外水槽の塩濃度は実験で設定したほど著しく変化しないのではないかと考えられる。

平板動物は psu26 以上の海水への暴露によってスライドから剥がれ落ちることはなく、体の崩壊した個体も少なかった。

これらの結果から雨によって海中や潮溜まり、屋外水槽の塩濃度が psu26 よりも低くなる可能性は低いと考えられ、塩濃度の低下だけでは、降雨後に平板動物が採集できなくなる理由を説明できないと考えられる。

降雨時には塩濃度の低下以外にも砂やごみが舞い上がって海水が濁ることや、フィールドでは波が強くなるなど、様々な状況の変化が考えられる。今後は海での環境データの収集や、実際の雨の前後での平板動物採集数の計測、塩濃度以外の要因 (にごりや流速) を検討する実験なども実施していきたい。

顎の進化を無顎類の発生から探る

横山 広真 (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

脊椎動物は顎を獲得することで捕食者として繁栄することができたと考えられているが、顎の獲得プロセスについてはまだ不明な点が多い。顎の進化プロセスを研究するためには、脊椎動物の系統において顎を獲得する前に分岐した無顎類の口部発生について理解することが重要である。

脊椎動物の顎骨は胚の第1咽頭弓と呼ばれる領域の神経堤細胞から形成される。顎口類の顎の発生における顎骨形態のパターニング遺伝子と顎関節の位置を制御する遺伝子が無顎類ヤツメウナギの神経堤細胞でも発現していることが分かっている。しかし先行研究よりヤツメウナギの場合、顎口類と異なり顎骨形態のパターニング遺伝子のホモログを発現する神経堤細胞集団と、軟骨分化に関わると考えられる *LjSoxE3* 及び顎関節位置を制御する遺伝子のホモログ *LjEndra* を発現する神経堤細胞集団が前後に分かれて分布していることが分かっている。また、三叉神経の伸長パターンもヤツメウナギの第1咽頭弓に筋肉を含め前後に分かれた細胞集団が存在していることを示唆している。

このことから、先行研究で次のような顎骨の進化プロセスが提唱された。無顎類の第1咽頭弓では細胞集団が前後で分かれており、前方の神経堤細胞集団では顎骨形態のパターニング遺伝子、後方の神経堤細胞集団では軟骨分化と顎関節形成を制御する遺伝子が発現していたが、顎口類ではこれらの遺伝子の発現領域がシフトして重なり共に発現するようになることで顎骨を獲得したというものである。

しかし、無顎類の第1咽頭弓の神経堤細胞集団が中胚葉など他の細胞タイプも含めて前後に分かれているかは分かっていなかったため、本研究では中胚葉および筋肉マーカー遺伝子の発現領域を調べることでヤツメウナギ胚の第1咽頭弓における中胚葉の分布を解析した。さらに *LjSoxE3*、*LjEdnra* を発現する神経堤細胞集団から顎骨と相同であると考えられる第1咽頭弓軟骨が分化すること及び第1咽頭弓軟骨基質の遺伝学的な背景は分かっていなかったため、第1咽頭弓における軟骨マーカー遺伝子の探索を行いその発現領域を調べた。

材料・方法

○サンプル: カワヤツメ *Lethenteron camtschaticum* を人工授精させ胚を得た。

○中胚葉の組織学的解析: 第1咽頭弓中胚葉で発現することが知られる *LjEnD*、*LjMRFA*、筋肉のマーカー遺伝子として *LjMA2*、また比較対象として神経堤細胞のマーカーとして *LjSoxE*、*LjDlxA* を用い st23~st26 にかけて *in situ* hybridization を行った。その後、凍結切片を作成し詳細に観察した。

○第1咽頭弓軟骨マーカー遺伝子の探索: 第1咽頭弓軟骨のマーカー遺伝子の候補をマウスや近縁種ウミヤツメの既知のアミノ酸配列を参考にプライマーを作成し、カワヤツメ st25 胚およびアンモシート幼生の cDNA を用いて PCR 法により単離した。

次に単離した遺伝子から DIG で標識をした RNA プローブを作成し、軟骨が形成される st26~st30 にかけて *in situ* hybridization を行い遺伝子の発現領域を調べた。

結果

○中胚葉の組織学的解析

whole-mount *in situ* hybridization の結果、st26 で *LjMA2* は上唇、下唇、縁膜と三叉神経第2枝・第3枝に沿う領域で、*LjMRFA* は st25 では上唇、下唇、縁膜を含む一つの領域、st26 では上唇、下唇を含む口周囲と縁膜の二つの領域、*LjEnD* は st24 以降に縁膜でシグナルが観察された。また、*LjDlxA* は st24 から st25 までは上唇・下唇を含む口周囲、st26 以降は加えて縁膜、*LjSoxE3* は st24 以降で口周囲よりも後方の縁膜を含む領域でシグナルが観察された。

現在、凍結切片を作成しこれらの遺伝子を発現する細胞がどのような位置関係で分布しているかを調べる解析を行っている。

○第1咽頭弓軟骨マーカー遺伝子の探索

第1咽頭弓軟骨のマーカー遺伝子は現在も進行中である。ただし、近縁種ウミヤツメの軟骨基質タンパク質のアミノ酸配列の一部をもとに新しく単離した lamprinlike、及び既に単離されていたプロテオグリカン的一种 lectican の *in situ* hybridization の結果、st27 から st30 にかけてエラスチン様軟骨として知られている第3~第9咽頭弓軟骨でシグナルが観察された。

考察・今後の展望

ヤツメウナギの第1咽頭弓軟骨は背側から梁軟骨、縁膜、側口板と呼ばれている。生化学的には梁軟骨はエラスチン様軟骨、縁膜、側口板はムコ軟骨に分類される。現時点では梁軟骨におけるエラスチン軟骨のマーカー遺伝子としてヤツメウナギに特有な軟骨基質である lamprin を候補として挙げており *in situ* hybridization による解析を行う予定である。

顎口類の主要な軟骨基質はII型コラーゲンであるのに対し、無顎類ヤツメウナギの主要な幼生軟骨基質については非コラーゲン性であるがその遺伝学的背景はよく知られていない。本研究では幼生軟骨の一部で lamprinlike、lectican が発現していることが分かり、ヤツメウナギの幼生軟骨について新たな知見が得られたと考えられる。

また、今後はヤツメウナギの第1咽頭弓の発生を詳細に調べるために神経堤細胞や筋肉の起源となる中胚葉の細胞系譜を生体染色によって解析したいと考えている。

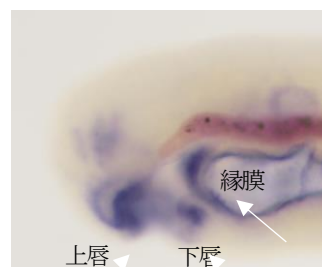


図: ヤツメウナギ胚の第1咽頭弓領域。神経堤細胞マーカー遺伝子 *LjDlxA* の *in situ* hybridization の結果。シグナルが上唇・下唇を含む口周囲と縁膜の前後に分かれた神経堤細胞集団で見られる。

液体振盪発芽実生によるユーカリ属林木の新規形質転換法の開発

熊岡未奈子 (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>

近年、大気中の二酸化炭素濃度の急激な上昇により地球温暖化が深刻化している。それにより、気温や海水温の上昇、海水面の変動、異常気象など様々な問題が生じている。そこで、この問題への効果的な解決策の1つとして、木本バイオマスの増産・活用や環境植林が挙げられる。そして、植林木の中でも特に注目されているのがユーカリ属林木である。ユーカリ属はオーストラリア原産であり、600種以上あると言われている。そのうち、*Eucalyptus globulus*、*E. camaldulensis*、*E. nitens*を含む10種程度が主に林木として利用されている。他の温帯林木と比べ成長速度が速く、非生物ストレス耐性が高い。更に、材は質のよいパルプ、材木、燃料として利用できる。そのため環境植林と商業植林の両方に使用されており、世界2000万ha以上で栽培されている。

遺伝子組換え技術による分子育種は、トウモロコシ等の作物で既に効果を上げている。永年性の木本植物では交配育種による改良は困難であるため、分子育種による改良は非常に有効と考えられる。ユーカリ属林木の形質転換については、既にいくつかの報告があるが、形質転換効率や完全な個体への再分化、研究室間での再現性などに課題がある。そこで、本研究では液体振盪発芽実生を使用することで簡便かつ高効率なアグロバクテリウム媒介形質転換法を開発することを目的とする。

<実験材料>

植物材料には、Australian Tree Seed Centre, CISRO Plant Industry から購入したオーストラリア産の *E. camaldulensis* var. *camaldulensis* 種子を用いた (19871)。

<実験方法>

1) 液体振盪発芽実生の調製及び再分化シュートの誘導

E. camaldulensis 種子 400 mg は、を3日間、明所、25°Cで振盪し吸水後、次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した。その後、種子を液体培地 (Gamborg B5 基本培地+ 4-PU 0.2 mg/mL + NAA 0.1 mg/mL) 50mL を含むxx mL容三角コルベシへ移し、14日間、暗所、25°C、100rpmで振盪培養した。得られた実生は、再分化培地1 (McCown 基本培地 + NAA 0.1 mg/mL + tZatin riboside 10 mg/mL) へ移植し7日間、暗所、25°Cで静置した。7日後、実生の茎頂と子葉を除去し、新たな再分化培地1で14日間、明所、25°Cで静置した。その後、再分化培地2 (1/2 McCown 基本培地 + 1/2 MS 基本培地 + NAA 0.1 mg/mL + tZatin riboside 10 mg/mL) へ移植し14日間、明所、25°Cで静置した。以降14日毎に再分化培地2へ移植した。

2) 再分化効率の検証

培地交換の際に再分化シュートを形成した外植片 (実生) 数を計測した。再分化効率は、再分化体数 / 再分化培地1へ移植した実生数として算出した。また、最初に再分化培地1に移植した際

の胚軸長を画像解析により計測し、胚軸長と再分化効率の関係を調査した。

<結果>

液体振盪培養により種子400mgから約370の実生が得られた。得られた実生の胚軸の長さを image-j を用いて測定したところ、1.1~20mmに分布し、5~10mmのものが最も多いことが分かった。シュートの再分化培地に移植してから約3週間目から再分化シュートが見られはじめた6週目での再分化効率は、全体で5.7%であった。また、それぞれの胚軸の長さにおける再分化効率を見ると、0~5mmの長さの胚軸を使用したときに、16.4%と最も高い値を示した。胚軸の長さが長くなるにつれ、再分化効率は減少し、15mm以上では0.0%であった。

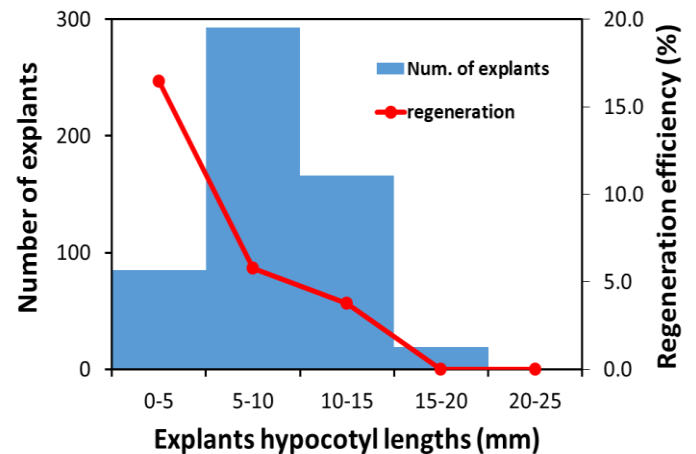


図 胚軸の長さとの再分化効率の関係

<考察と展望>

胚軸の長さが0~5mmの外植片を使用することで高い再分化効率を得られたことから、液体振盪培養の条件を検討することにより短い外植片を多く調整することでより再分化効率が向上できると考えられる。今後は、今回の結果を踏まえ、更に再分化効率を上げ、形質転換効率を向上させるために培地組成や条件、ホルモン濃度などを検討したいと考えている。今後、形質転換体の選抜条件も検討する。

水耕栽培によるユーカリ挿し木からの不定根発生評価系の開発

町野 弘明 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小口 太一 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

ユーカリ属林木はパルプ原料や材木として、特に南半球において広く植栽されており、経済的に重要な植物の一つである。一方商業植林において、質の良いパルプ、木材生産を行うには、精鋭樹と呼ばれる材の質や成長速度に優れた樹木を選抜し、それをクローン増殖して利用することが効率的である。その際使用する増殖技術としては、主に組織培養と挿し木の2種類が挙げられる。挿し木は、切除した枝を土に挿すだけで苗生産となる容易な手法であり、古くから活用されてきた。しかし、種間・品種間・個体間で挿し木の発根効率は変動する。ユーカリ属林木でも、挿し木で不定根が発達する種としない種があることが知られる。例えば、良質なパルプ原料として広く商業的に植栽されている *Eucalyptus globulus* 種は難発根性であり種子による増殖が一般的である。そこで、ユーカリのクローン増殖を可能とすることで、より均質かつ高収量のパルプ生産が可能となると期待される。

私の所属する研究室では、ユーカリ属林木種間での不定根形成能の相違に着目した、ユーカリ属林木における不定根形成の分子生理学的研究に取り組んでいる。本研究では、ユーカリ属林木の不定根形成能を比較・検討できる実験系の開発を試みた。加えて、挿し木の不定根形成過程の変化を追跡するためのマーカーとなる遺伝子を探した。

【材料】

特定網室において栽培された樹高 1~2 m、直径約 3 cm の *Eucalyptus camaldulensis* を母木とした。そして先端に若芽があり、根元の直径が 1.8 mm~2.3 mm の若い枝から、腋芽 2 つを含む断片を切り出し、挿し木とした。

【実験方法】

(1)実験系の開発

不定根形成過程の観察を容易にするため、水耕培地系による実験系の確立を試みた。最終的に、挿し木を発泡スチロール材のフロートに固定して液体培地に浮かせることとし、その液体培地として DW と 0.1x MS 液体培地を検討した。尚、水耕液には水槽用エアポンプにより常時通気を施した。液体培地を含む容器は、温度 25°C、光強度 80~100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明期 16 時間に制御したチャンバー内に設置した。

(2)遺伝子マーカーの探索

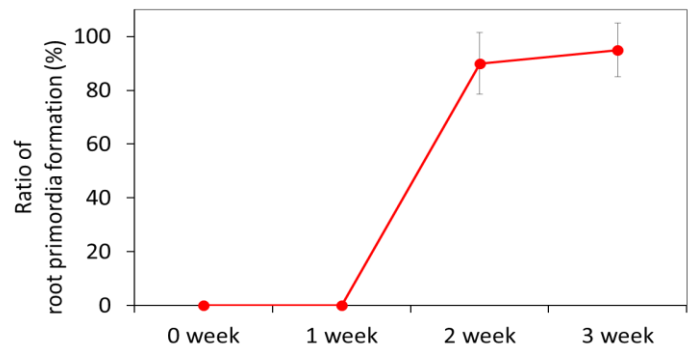
候補遺伝子からプライマーを設計し、定性及び定量 RT-PCR によって評価した。器官特異性評価では、*E. camaldulensis* の根、茎、葉から RNA を抽出、その逆転写反応物を鋳型に定性及び定量 RT-PCR を行った。また、不定根原基形成における発現解析は、水耕開始後 0、3、7、14 日の挿し木から RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行った。

【結果】

(1)実験系の開発

不定根形成の観察が容易な、水耕培地による実験系を考案・構築した。検討した DW と 0.1x MS 液体培地だが、後者の方が不定根原基形成にかかる日数が短く、その同調性も優れていたため、0.1x MS 液体培地を今後は用いることとした。また、培養初期は水耕培地における藻発生が問題となったが、培養器に遮光等の改良を加えることで抑制することができた。

構築した水耕培養系では、培養開始から 1 週目と 2 週目の 1 週間に 90% の挿し木で同調的に不定根原基の形成が見られた(下図)。一方で、その後の根の伸長は、不定根原基を形成した挿し木のわずか 5% でしか観察できなかった。



(2)遺伝子マーカーの探索

文献およびゲノムデータベースの検索により、根器官で特異的に発現する遺伝子の候補を 3 つ (*EcPT2*, *EcPLT1*, *EcWOX5*)、またオーキシンの動態を見るためのマーカーとして *EcGH3* を選択した。器官特異性の検証では、*EcPT2*, *EcWOX5* で根特異的な発現が認められた。一方、*EcGH3* はすべての器官で発現が見られたが、根の発現量が最も高かった。

不定根原基形成過程での発現の変化は、*EcPT2* は原基の発達段階に対応した発現の増加が観察された。*EcWOX5* も発達段階に応じて発現が増加したが、変動量は小さかった。

【考察と展望】

挿し木後 2 週間で、同調的に不定根原基形成の観察を可能とする実験系を確立することができた。本系は、今後ユーカリの不定根形成を分子生理学的に解析するのに有効と考える。一方、不定根原基形成後、根が伸長する挿し木の割合は、5%(4 週間後)と低いことから、不定根原基形成と根の伸長には相関性がないことが推察された。根の伸長に関しては今後の検証が必要である。

遺伝子マーカーの探索では、*EcPT2* は根特異的な発現を示し、不定根原基の発達に伴う発現量の増加が観察されたことから、不定根原基形成の遺伝子マーカーとなりうることを示唆された。

今後、本研究で開発した実験系がユーカリ属林木の不定根原基形成のモデル実験系として、ユーカリ属林木種間での不定根形成能の評価等に活用されることが期待される。

ベタレイン合成経路導入による新規花色アサガオ作出に関する研究

澁谷 美乃里 (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

アサガオ(*Ipomoea nil*)は日本独自に発展した園芸植物である。江戸時代にはさまざまな色や形をしたアサガオが作られ、現在のナショナルバイオリソース(NBRP)にも保存されている。一方で、江戸時代の文献には残されているが、現存しないものもある。黄花のアサガオもその一つで、図版は多数見られるが現存しない。そのため、黄花のアサガオの作出は育種家の夢となっている。

植物色素はフラボノイド、カロテノイド、ベタレイン、クロロフィルの4種の化合物に分類することができる。クロロフィル以外の3種の色素は黄色の化合物を含む。フラボノイドは最も広く植物界全体にみられる色素であり、アサガオは赤から紫色を呈するフラボノイドの一種のアントシアニンを花卉で合成する。先行研究において、フラボノイドの一種であるオーロンの合成やカロテノイドの蓄積による黄花アサガオの作出が行われたが、薄い黄色にとどまっている。

ベタレインはチロシンを出発物質として合成される二次代謝産物であり、黄色のベタキサンチンと赤色のベタシアニンに分類される。2016年までに主要な合成経路とその酵素遺伝子が明らかとなった。理論的にはベタキサンチン合成には2つの遺伝子、ベタシアニン合成には3つの遺伝子を導入することで合成経路の導入が可能である。ベタレインはナデシコ目の限られた植物のみで合成される。アントシアニンとベタレインの合成はナデシコ目においては互いに排他的であり、両方の色素を合成する植物は自然界に存在しない。そのため、ベタレインとアントシアニンの両方を花卉で合成させることで、新規花色花卉作出が期待できる。本研究では、アサガオが本来合成しないベタレインの合成経路を遺伝子組換え技術により導入することで新規花色アサガオの作出を目的とする。

材料

植物材料はアントシアニン合成に関わる酵素 *DFR-B* (*dihydroflavonol 4-reductase*)の変異体で白花のアサガオ系統 AK77 を用いた。ベタキサンチン合成にはビート(*Beta vulgaris*)由来の *BvCYP76AD6* とオシロイバナ(*Mirabilis jalapa*)由来の *MjDOD(DOPA 4,5-dioxygenase)*、ベタシアニン合成には *MjDOD* とビート由来の *BvCYP76AD1*、オシロイバナ由来の *MjcDOPA5GT(cyclo-DOPA-5-O-glucosyltransferase)*を、それぞれカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで恒常的に発現させた。また、形質転換体選抜のためにカナマイシン耐性遺伝子を用いた。さらに、アントシアニン合成に関わる *DFR-B* よりも上流の酵素や、転写因子の変異体である白花のアサガオ系統 Q0260, Q0261, Q0263, Q1211 を用いて、得られた形質転換体と交配を行った。

方法

アサガオの組織培養した不定胚に対してアグロバクテリウム法により目的遺伝子を導入した。アサガオの不定胚はアグロバク

テリウムと2日間共存培地で培養した後、カナマイシン等を含む選択培地に移植し、2-3週間後にサイトカニン等を含むシュート誘導培地に移植した。個体が再生したらPCR解析によって目的遺伝子の導入を確認した。目的遺伝子の導入が確認できた個体は順化させ、短日条件下での栽培による開花を誘導して表現型を確認した。必要に応じて、形質転換体と他のアサガオ系統との交配を行った。

結果

1. 形質転換体の表現型

詳細は発表会にて報告する。

2. 他のアサガオ系統との交配

現在、交配により得られた種子を播種し、F1を栽培中。

考察・展望

HPLC解析により花卉で合成された色素の定性、定量を行う。色素の合成量の増加を目指し、形質転換体に導入したコンストラクトの改良を行う。

謝辞

ベタレイン合成経路のコンストラクトを提供いただいた、岩手生物工学研究センター 西原昌宏博士、ベタレインのHPLC解析を行っていただいた、東洋大学 佐々木伸大博士、アサガオの種子を提供いただいた、NBRP 九州大学 仁田坂英二博士に御礼申し上げます。

アサガオの頂端花芽形成に関わる *TFL1* 遺伝子の研究

藤原 麻衣 (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】

日長の変化に制御される花芽形成を光周性花成とよぶ。光周性花成の誘導は、連続した暗期が一定時間 (限界暗期) より長くなると花芽形成が誘導される短日植物と、短くなると花芽形成が誘導される長日植物との 2 つのグループに分けられる。代表的な短日植物であるアサガオ (*Pharbitis nil*あるいは*Ipomoea nil*) の系統 Violet は芽生えの段階でも 1 回の 16 時間連続暗期処理によって主茎の頂端まで花芽形成の誘導を受ける (頂端花芽形成)。一方、同じアサガオの系統 Kidachi では、同じ暗期処理を 10 回与えても頂端花芽形成を示さない (Imamura *et al.*, 1966)。先行研究の交配実験等から、Violet の頂端花芽形成は単因子劣性形質であり、この原因遺伝子の候補としてシロイヌナズナの *TFL1* (*TERMINAL FLOWER1*) 相同遺伝子である *PnTFL1a* と *PnTFL1b* が単離されていた。Violet と Kidachi の *PnTFL1a* は、エクソンとイントロンの塩基配列には違いは無いが、5'非翻訳領域の繰り返し配列のリピート数に違いがあり、これを指標として両者を区別できる。Kidachi x Violet の自殖後代では、Kidachi 型の *PnTFL1a* をホモに持つ個体でも頂端花芽を形成するものがあり、それは Violet と Kidachi の遺伝的背景の違いである *PnTFL1a* 以外の遺伝子座の影響と推察されてきた。

本研究では、Kidachi x Violet の一代雑種に Violet を 5 回戻し交配することにより遺伝的背景を Violet に近づけた世代 (BC5) を用いて、Violet が頂端花芽を形成する形質と、*PnTFL1a* 遺伝子の関係を明らかにするための解析を行った。

【材料】

Kidachi x Violet の一代雑種に Violet を 5 回戻し交配して作出した、Kidachi 型 *PnTFL1a* をヘテロで持ち、*PnTFL1a* 以外の遺伝的背景が Violet とほぼ同一となった世代 (BC5) の自殖種子を用いて実験を行った。

【方法】

(1) 戻し交配 5 世代の花成調査

播種後 7 日目の芽生えに 16 時間連続暗期を 1 回与え、約 14 日間恒明条件で栽培後、花成調査を行った。調査後、5'非翻訳領域の繰り返し配列のリピート数の違いを用いた genomic PCR 分析を行い、Violet 型の *PnTFL1a* をホモに持つ個体、Violet 型と Kidachi 型の両方の *PnTFL1a* も持つヘテロ型の個体、Kidachi 型の *PnTFL1a* をホモに持つ個体の 3 グループに分け、花芽数と頂端花芽形成率を比較した。

(2) *PnTFL1a*, *PnTFL1b* の発現パターンの解析

Violet と Kidachi を用いて、16 時間連続暗期を 1 回与えた芽生えと連続明期を与えた芽生えの頂芽、子葉、子葉柄における *PnTFL1a* と *PnTFL1b* の発現パターンを qRT-PCR によって解析中である。芽生えの各器官は、暗期処理開始から 0, 16, 24, 48 時間後にサンプリングした。

【結果】

(1) 戻し交配 5 世代の花成調査

頂端花芽の形成率は、Violet 型 *PnTFL1a* をホモに持つ個体は親系統の Violet と同様に高く、Violet 型と Kidachi 型の両方の *PnTFL1a* も持つヘテロ型の個体は低く、Kidachi 型 *PnTFL1a* をホモに持つ個体では頂端花芽を形成しなかった (図 1)。

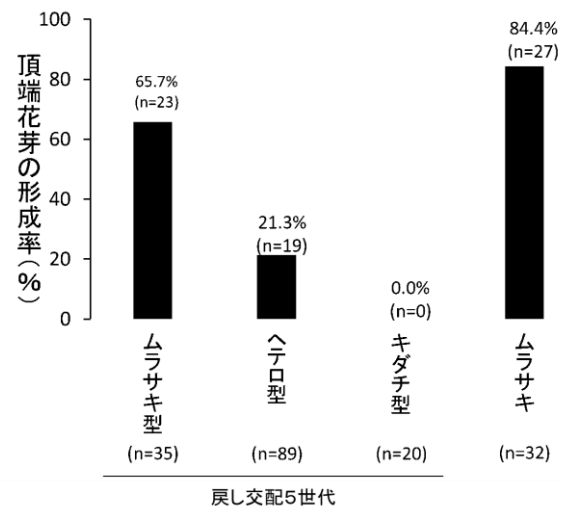


図 1 戻し交配 5 世代の頂端花芽の形成率

左から、戻し交配 5 世代で Violet 型の *PnTFL1a* をホモに持つ個体 (ムラサキ型)、Violet 型と Kidachi 型の両方の *PnTFL1a* を持つヘテロ型の個体 (ヘテロ型)、Kidachi 型の *PnTFL1a* をホモに持つ個体 (キダチ型)、及び親系統 Violet (ムラサキ) の頂端花芽の形成率を示す。

(2) *PnTFL1a*, *PnTFL1b* の発現パターンの解析

詳細は発表会にて報告する。

【考察・展望】

詳細は発表会にて報告する。

【謝辞】

ナショナルバイオリソースプロジェクト「アサガオ」の仁田坂英二博士 (九州大学) にはアサガオの種子と情報提供をいただきました。深く感謝いたします。

午後開花アサガオの光周性花成と開花時刻の解析

本山 星香（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]

植物にとって花の形成時期は繁殖の成功率を左右する重要な要因である。植物は可能な限り種内で花を咲かせる時期を揃え、繁殖の成功率を上げるべく、環境要因や内的要因の情報を元に適切な時期に花をつける。環境要因の中でも日長は、一年のうちの特定の時期を把握する上で信頼できる環境要因である。そのため、光周性を示す植物においては、花芽形成や開花時刻が日長の影響を強く受ける。日長に依存した花芽形成、すなわち光周性花成の研究は、植物生理学の基礎を成すと共に、その知識が穀類の収量や生花の供給に応用されている重要な分野である。開花時刻の研究についても、真夏の高温時における穀類の不稔対策に応用され、重要性が高まっている。

アサガオ (*Ipomoea nil*) は不適な日長条件では花芽形成が起こらない絶対的短日植物である。特に系統 Violet は 10 時間以上の暗期を 1 回経験するだけで花芽形成が誘導される性質を持つため、光周性花成研究のモデル生物として研究が進んでいる。開花時刻に関しても、アサガオは蕾部分で日長を感知し、系統 Violet では暗期開始 10-12 時間後、すなわち早朝に開花することが知られている。このように、アサガオは日長に対して敏感に反応し、それに基づいた花芽形成、開花時刻の決定を行うことから、植物における日長と生殖の関係性を探るという点において適した生物であると言える。

光周性花成や開花時刻といった量的形質は、複数の遺伝子と環境要因によって決定され、連続的な測定値によって表現される。そのため、量的形質はエンドウ種子の形状（丸／しわ）のような質的形質と異なり、遺伝子と形質の関係が解明しづらい。この難点を解決するため、統計学の考えを用いた QTL (Quantitative Trait Loci: 量的形質遺伝子座) 解析の手法が確立された。

QTL 解析には異なる表現型を持つ 2 つの系統が必要となる。アサガオの開花時刻については、自然変異体が 1 系統のみ知られている。系統 Afternoon Flower-Opening Morning Glory (AFOMG) は、系統 Violet と異なり、暗期開始から 2-3 時間後に開花する。また、光周性花成についても、系統 AFOMG は 16 時間の暗期を 1 回経験するだけでは花芽形成が行われず、系統 Violet と対照的である。本研究では、系統 AFOMG と系統 Violet の QTL 解析によるアサガオにおける光周性花成・開花時刻関連遺伝子の探索を試みた。

[材料]

実験には、アサガオの系統 AFOMG 6 個体、系統 Violet 6 個体、そして系統 AFOMG と系統 Violet を交配させて得た雑種第 1 代 (F1) 1 個体を自殖させることによって得た雑種第 2 代 (F2) 180 個体の計 192 個体を用いた。

[方法]

QTL 解析は形質の記録と遺伝子解析の結果を合わせて行われる。本研究では、光周性花成と開花時刻の形質が異なる 2 系統

(Violet、AFOMG) の雑種について、1. 形質の記録と 2. Restriction Site Associated DNA Sequence (RAD-seq) による遺伝子解析を行った。

1. 形質の記録

1-1 光周性花成の評価

播種後恒明条件で 1 週間育て、16 時間の暗期を 1 回与えた。その後は再び恒明条件で 3 週間育て、花芽を計数した。

1-2 開花時刻の評価

光周性花成の評価の終了後、アサガオを 10 時間明期 / 14 時間暗期の短日条件で育て、すべての個体について花成を促した。着花後、翌日開花見込みの蕾を切り取り、水を満たしたチューブに挿した。暗室にて 30 分間隔で写真撮影を行い、暗期開始からの開花時刻を調査した。

2. RAD-seq

アサガオの本葉を切り取り、直ちに液体窒素で凍らせた後、-80°Cフリーザーで保存した。その後、DNeasy Plant Mini Kit (株式会社 QIAGEN) によって DNA 抽出を行った。抽出した DNA は、RAD-seq による解析に用いた。

[結果・考察]

詳細は発表会にて報告する。

[展望]

今回の調査で判明する量的形質遺伝子座 (QTL) と、ゲノムデータベースを比較することにより、原因遺伝子の推定と機能解析を進めていく。

[謝辞]

系統 AFOMG を提供して頂いた米田芳秋先生 (静岡大学名誉教授) と中村信雄先生 (函館白百合学園中学高等学校) に感謝いたします。RAD-seq 解析をして頂いた白澤健太先生 (かずさ DNA 研究所) に深く御礼を申し上げます。ナショナルバイオリソースプロジェクト「アサガオ」の仁田坂英二先生 (九州大学) には情報提供をいただきました。感謝いたします。

交差反応性食物アレルギー治療へ向けたダイズアレルギーの生産系に関する研究

飯島 優香 (筑波大学 生物学類)

指導教員：三浦 謙治 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

アレルギーとは、免疫系の全身性疾患であり、本来は無害であるアレルギーに対し免疫機構が過剰応答することで発症する。植物の花粉がアレルギーとなって発症するアレルギーが花粉症である。花粉症には野菜や果物に対する食物アレルギーが付随することがある。これは花粉と野菜・果物に構造が非常に類似したアレルギーが含まれているため、交差反応性を示すためである。食物アレルギーのうち、約60%が、花粉等の吸入アレルギーによるアレルギーと関連するとされている。例えば、シラカバ花粉の主要アレルギーは、バラ科の果物やセリ科の野菜、ダイズ等の豆類においても相同性の高いタンパク質が存在する。そのため、シラカバ花粉アレルギーに対するIgE抗体をもつ患者では他の食物における相同タンパク質に対しても強い交差反応を示す。特にダイズアレルギーとの交差反応性食物アレルギーは、アナフィラキシー症候群を含む全身反応を起こすほど危険である。

交差反応性食物アレルギーの治療法として、現在、アレルギー特異的免疫療法が注目されている。アレルギー特異的免疫療法とは、継続的に大量のアレルギーを摂取させることで、免疫寛容を誘導し、アレルギーに対する免疫応答を変化させる治療法である。抗ヒスタミン剤やエピネフリン等の投与により症状を抑える対症療法とは異なり、根治治療が可能と考えられている。しかし、この治療法の問題点として、治療には大量のアレルギータンパク質が必要とされることが挙げられる。そのため、大量生産系と効率の良い精製が現在求められており、遺伝子組換え技術を用いて他の植物や菌にアレルギーを生産させる方法が多く研究されている。

そこで本研究では、アレルギー治療への利用を目的として、ダイズのアレルギータンパク質について大量生産と精製方法の確立を試みた。

【方法】

• ブレヴィバチルスを用いた大量調製

ブレヴィバチルスをNTP法により形質転換した。形質転換体を培養し、ダイズアレルギーを発現させ、Histagを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。

• ベンサミアナタバコを用いた大量調製

ベンサミアナタバコ用にコドンを変換したダイズアレルギー遺伝子を所属研究室で開発された大量発現用ベクターに挿入した。作製されたベクターをアグロバクテリウムに導入し、アグロインフィルトレーション法により、ベンサミアナタバコの葉でダイズアレルギーを一過的に発現させた。タバコの葉をすりつぶし、タンパク質を溶出した。その後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。

【今後の展望】

- 各生産系におけるアレルギー生産量を定量する。
- ダイズアレルギー特異的IgE抗体との反応性を調べる。
- 大量生産系が確立すれば、他の相同タンパク質についても大量調製を行う。

植物を用いた医薬タンパク質の生産に関する研究

林 遼馬 (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】

感染症の治療に用いる重要な医薬タンパク質として中和抗体が挙げられる。中和抗体とは体内に侵入したウイルスや細菌等の特定の病原体に結合することで、それらの宿主細胞への感染・傷害作用を中和する役割を持つ抗体のことである。中和抗体は投与後すぐに体液性免疫を獲得することが可能であるため、迅速な感染症の治療及び感染拡大の抑制を行うことが可能である。

本研究では、中和抗体として複数の A 型インフルエンザウイルスの亜型に対して抗体活性を示すインフルエンザ万能抗体 (IgG) を用いた。また抗体の生産宿主として、将来の生産規模の拡大等を目的として、植物を用いた。使用した植物材料はレタス及びトマトである。

本研究では先行研究にて作成されたインフルエンザ中和抗体を発現するレタス及びトマトの形質転換体からの抗体の精製、及び精製サンプルの収量の測定を目的とした。

また、植物内で生産される糖タンパク質は植物特異的な糖鎖修飾を受ける。抗体が病原体を認識し中和する機能は糖鎖の構造に影響を受けることが知られている。ヒトが生産した抗体の糖鎖は、抗体が体内で機能するために必要な構造をとっている。そのため、植物で生産した抗体の糖鎖の構造解析を行い、必要に応じて糖鎖を植物型からヒト型へと改変することが必要ではないかと考えている。本研究では糖鎖の構造解析を lectin microarray により行う予定である。そこで、糖鎖の構造解析に必要なレクチンをレタスを用いた一過性発現により生産することを 2 つ目の目的とした。

【材料】

1. 中和抗体の生産

導入遺伝子はインフルエンザ万能抗体の H 鎖をコードした *IgGH*、L 鎖をコードした *IgGL* の二つである。それぞれレタスのコドンに改変したものを使用した。

形質転換植物体は先行研究にて作成したレタス (*Lactuca sativa* cv. Red Fire) 及びトマト (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) である。レタスではカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター、トマトでは果実特異的に発現する E8 プロモーターにより発現させた。

2. レクチンの生産

導入遺伝子はインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 由来の *Agglutinin-E* (*PHA-E*)、*PHA-L*、タチナタマメ (*Canavalia ensiformis*) 由来の *Concanavalin-A* (*Con-A*) の 3 種類である。それぞれレタスのコドンに改変したものを用いた。

植物材料としてレタス (*Lactuca sativa* cv. Red Fire) を用いた。

【方法】

1. 中和抗体の生産

抗体の精製はレタスでは葉から、トマトでは果実から行った。超音波破碎によりタンパク質を抽出した後、抗体の C 末端に融合した His-tag を利用した Ni Sepharose カラムによるアフィニティー精製を行った。

精製したサンプルの抗体収量の定量は、大腸菌を用いて作成した濃度既知の H 鎖タンパク質標品を用いて、ウェスタンブロッティングのバンドの濃さを比較することにより行った。

2. レクチンの生産

PHA-E、*PHA-L*、*Con-A* の cDNA をそれぞれ infusion-cloning により一過性発現ベクターに組み込み、3 種類のプラスミドを作成した。塩基配列を確認の後、アグロバクテリウムへ形質転換を行った。

形質転換したアグロバクテリウムを用いてレタスへの agroinfiltration を行った。感染後、数日を経たレタスの葉をサンプリングし、超音波破碎によりタンパク質を抽出した。抽出したサンプルは SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、CBB 染色のバンドの分子量等により、発現の確認を行った。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【今後の予定】

1. 中和抗体の生産

精製したサンプルを用いてインフルエンザウイルスへの抗体活性の試験、及び糖鎖の構造解析を行う。糖鎖の解析結果をもとに植物の糖鎖改変のための新たな形質転換体を作成する。

2. レクチンの生産

発現させたレクチンの精製と糖鎖の構造解析を行う。

花粉症治療に向けたシラカバ花粉アレルゲン Betv1 の生産系に関する研究

山田 侑希 (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】

アレルギーとは、通常、免疫応答を起こさない無害なアレルゲンに対し体内の免疫機構が過敏に反応する事によって起こる全身性の反応である。アレルギーによって起こる疾患の一つとして花粉症が挙げられる。

日本において主要な花粉症のアレルゲンはスギやヒノキであるが、ヨーロッパではシラカバ花粉であり、患者数の規模は日本のスギ花粉患者を大きく上回っている。

アレルギーに対する治療方法は大きく分けて対症療法と根治療法がある。対症療法は抗ヒスタミン剤などを用いて症状そのものを抑える治療法である。この療法は症状を軽減するのに有効であることが分かっているが、アレルギーの根本的な治療ではないため、疾患の進行を防ぐことはできない。

一方で、根治療法はアレルギーを引き起こす因子を治療の標的とする治療法であり、アレルゲン特異的免疫療法がこれに含まれる。この治療法はアレルギーを根本から治療することができると考えられている。アレルゲン特異的免疫療法には皮下免疫療法と舌下免疫療法があり、皮下免疫療法は皮下組織にアレルゲンエキスを注射する方法で、舌下免疫療法は舌の下にアレルゲンエキスを投与する方法である。従来から行われてきた皮下免疫療法は、注射時の痛みや長期の通院などの患者に対する負担が多い。舌下免疫療法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、初回以降は自宅で投与が可能のため患者の負担が少ない。そのため、近年は舌下免疫療法が採用されつつある。但し、舌下免疫療法の場合、皮下免疫療法の約5倍のアレルゲンが必要になるとされている。

現在ヨーロッパにおいてシラカバ花粉症に対する舌下免疫療法に用いられている薬剤は、シラカバ花粉から粗抽出したアレルゲンが使用されている。しかし、この粗抽出アレルゲンには実際に薬剤として有効な物質の他に多くの不純物が含まれている。また、花粉からアレルゲンを調製するためには莫大な量の花粉が必要である。そのため近年では、遺伝子組換え生物を用いてシラカバ花粉の主要アレルゲンである Bet v1 を生産する研究が行われている。先行研究では大腸菌において培養液 1 L に対して 100 mg、タバコモザイクウイルスによって作出されたタバコ葉 1 kg に対して 200 mg の収量が報告されている。これらは天然のアレルゲンと同様の機能を持っていることが明らかにされたが、収量が低いなどの問題がある。

そこで本研究ではシラカバ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、シラカバ花粉アレルゲンの大量調製を試みた。

【方法】

1. ベクターの作製

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。

2-1. *Bacillus brevis* への形質転換

NTP 法 (New Tris-PEG 法) を用いて作製したベクターを *Bacillus brevis* へ導入した。

2-2. タンパク質の回収・精製

形質転換を行った *Bacillus brevis* を培養し、遠心して得られた上清を回収して His カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製をおこなった。

3-1. 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一過性高発現用ベクターに導入し、目的とするベクターを作製した。このベクターをアグロバクテリウムに形質転換を行った。

3-2. タバコへのインフィルトレーション

ベンサミアナタバコに、vacuum agro-infiltration 法を用いてアグロバクテリウム溶液を浸漬させた。

3-3. 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。

シアノバクテリアの推定 Cl⁻輸送体をコードする *slr0753* 遺伝子変異体に関する研究

下城 彩 (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)

【背景及び目的】

Synechocystis sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis* と省略) は淡水性のシアノバクテリアであり、全ゲノム情報が利用可能であることや相同組換えによる遺伝子改変が容易であることなどから光合成研究のモデル生物として広く利用されている。

酸素発生型光合成において、塩化物イオン (Cl⁻) は光化学系 II の水分解反応や、イオン恒常性に関わる不可欠な無機イオンの一つである。*Synechocystis* の必須遺伝子である *hik2* は Cl⁻濃度変化を検知するヒスチジンキナーゼであることが報告されており、本種においても Cl⁻恒常性の維持が重要な課題であると考えられるが、シアノバクテリアにおける Cl⁻の代謝制御機構について研究はあまり進んでいない。

Synechocystis の光化学系 II 表在タンパク質シクロコム c550 をコードする *psbV* 遺伝子破壊株は、光独立栄養生長において Cl⁻要求性を示す。この表現型を回復する欠失変異の原因遺伝子として報告された *slr0753* は、その構造及び相同性検索の結果から Cl⁻輸送体として推測されている。またトランスクリプトーム解析より *slr0753* は塩ストレスなどとの関連が示唆されてきた。

本研究の先行研究では Cl⁻欠乏培地で培養した *Synechocystis* のトランスクリプトーム解析を行い、*slr0753* の発現が Cl⁻欠乏条件下で継続的に著しく上昇していることを発見した (Ooi *et al.*, 2016 未発表)。これを受けて本研究では、シアノバクテリアの Cl⁻代謝制御における *slr0753* の生理学的役割を明らかにするため、Cl⁻欠乏条件下での *slr0753* 発現上昇の確認及び *slr0753* 遺伝子欠失変異体の作成とその表現型の解析を行った。

【材料と方法】

Synechocystis sp. PCC 6803 のグルコース耐性株を野生型株 (WT) として使用し、BG-11 で培養した。通気培養条件は 1% CO₂ 混合気、34°C、70 μmol photons m⁻² s⁻¹ の連続光照射とした。

今回 Cl⁻欠乏条件の検討にあたり、通常組成の BG-11 に含まれる CaCl₂ を Ca(NO₃)₂、MnCl₂ を MnSO₄ にそれぞれ置換した BG-11 と、CaCl₂ のみを Ca(NO₃)₂ に置換した BG-11 を作成し、前者を Cl⁻欠乏培地、後者を Cl⁻準欠乏培地と呼ぶことにした。

・ *slr0753* の発現量定量

初期濁度 OD₇₃₀ = 0.2 となるよう植菌し、BG-11、Cl⁻欠乏培地でそれぞれ通気培養した WT を培養開始後 0、6、12、24 時間の時点で回収した。これらのサンプルから total RNA を抽出し、逆転写後 real time-qPCR により *slr0753* の mRNA 定量を行った。

・ *slr0753* 欠失変異体の作成

slr0753 の ORF 中にカナマイシン耐性遺伝子カセットを相同組換えにより挿入し、*slr0753* 欠失変異体 (Δ*slr0753*) を作成した。Δ*slr0753* の培養にはカナマイシン 25 μg ml⁻¹ を添加した。

・ Cl⁻欠乏条件下での細胞の生育

BG-11 で通気培養した細胞を、実験によってもう一度 BG-11 あるいは Cl⁻欠乏培地で通気培養し前培養とした。前培養の細胞を遠心回収後 Cl⁻欠乏培地で 3 回洗浄し、本培養の培地へ植菌した。通気培養を 4 日間行い、細胞濁度とクロロフィル濃度の推移を測定した。

【結果】

slr0753 の発現量は BG-11 で培養した場合 24 時間後まで徐々に低下したのに対し、Cl⁻欠乏培地では 24 時間後まで発現量はほぼ維持された。このことから *slr0753* は Cl⁻欠乏条件下に応答し発現が上昇することが示唆された。

BG-11 で培養した場合、WT と Δ*slr0753* で生育に明らかな差はみられなかった。

前培養を BG-11 で行い本培養を Cl⁻準欠乏培地で行ったところ、Δ*slr0753* のみダブリングタイムがやや遅延し、この差は Cl⁻欠乏培地でさらに大きくなった。一方前培養を Cl⁻欠乏培地で行った場合 Δ*slr0753* の本培養でのダブリングタイムは、Cl⁻準欠乏培地では WT と同程度であったのに対し、Cl⁻欠乏培地では明らかに遅延し、さらに細胞濁度の低下もみられた (図)。以上より *Synechocystis* は微量の Cl⁻ を効率的に利用することができ、*slr0753* がこの代謝機構に関与していると考えられた。

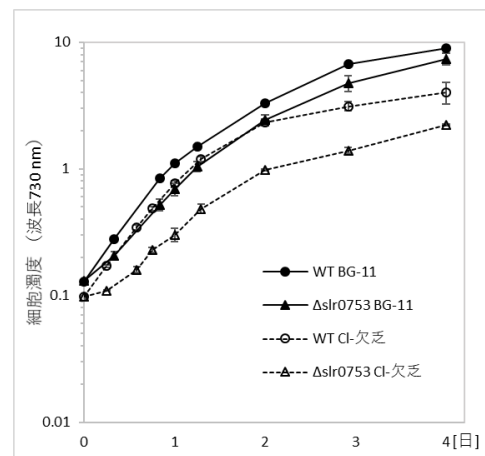


図. Cl⁻欠乏培地で前培養した細胞の生育。

【今後の展望】

シアノバクテリアには *slr0753* 以外にも複数の推定 Cl⁻輸送体遺伝子があり、現在それらの遺伝子欠損株を作成中である。今後これらの変異体で *slr0753* の発現に影響がみられるかどうかを調べたい。また *slr0753* が Cl⁻の輸送体であることをより直接的に確認するため、放射性同位体を用いて Δ*slr0753* の Cl⁻取込み能を評価したいと考えている。

【参考文献】

- Kotajima, T. *et al.* *FEMS Microbiol Lett.* 2014.
 Kobayashi, M. *et al.* *Plant cell Physiol.* 2006.
 Hagemann, M. *FEMS Microbiol Rev.* 2010.

Nostoc punctiforme のスキトネミン合成の制御に関する研究

森岡 諒 (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】

ほとんどすべての生物にとって過剰な太陽光、特に UV などの短波長の光は有害な環境因子である。このような光を吸収し、細胞を保護するサンスクリーン物質を生産することは、重要な光防御機構として知られている。

糸状性藍藻の一部が合成するスキトネミンは、UV-A の波長領域を主に吸収する (吸収極大は 370 nm)。日焼け止めクリームなどに使われる物質の多くは、UV-A より

も波長が短い UV-B に吸収極大があり、UV-A を吸収する物質は肌への刺激が強いためあまり使われていない。なので、藻由来の新しい紫外線吸収材としてスキトネミンが注目されている。

Nostoc punctiforme ではスキトネミンの生合成は UV に照射によって促進され、細胞外の多糖層に蓄積されることが分かっている。近年、UV 以外の窒素飢餓、酸化ストレス、乾燥、温度などの環境ストレスによってもスキトネミンの蓄積が誘導とされることがわかってきた。

N. punctiforme のゲノム解析により、スキトネミン合成遺伝子クラスター (Npun_R1260 - R1276) が特定された。また、その上流域にシグナル伝達系の二成分制御系の遺伝子群 (Npun_F1277 - F1278) が発見され、これらがスキトネミンの生合成の制御をしていることが示唆された。一方で、この二成分制御系が実際に何を感知し、どのように働いているのかは、明らかにされていない。本研究は、スキトネミン関連ヒスチジンキナーゼ Npun_F1277 の機能、すなわち実際に検知するシグナルを明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. キメラセンサーによる活性測定

N. punctiforme のヒスチジンキナーゼ Npun_F1277 のセンサードメインと *Synechocystis* PCC6803 のリン酸欠乏センサーである Hik7 のシグナル伝達ドメインを融合させたキメラセンサーを作製し、Hik7 の欠失させた Δ SphS 株で異種発現させた。このキメラセンサーの Npun_F1277 由来のセンサードメインが特定

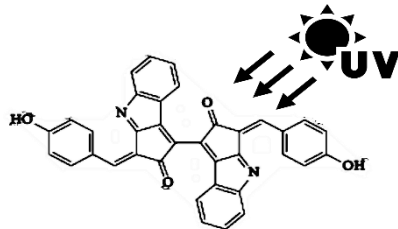


図 1：スキトネミンの分子構造式

の環境因子によって活性化されると、Hik7 のキナーゼドメインが活性化されリン酸転位を介してアルカリフォスファターゼ活性 (以下 AP) を誘導する。したがって、特定の環境因子に対する AP 活性を測定することで、Npun_F1277 のセンサードメインの機能を探ることができる。

Synechocystis の野生型と Hik7 を完全に欠失した Δ SphS 株、Hik7 のセンサー領域の一部を欠失し恒常的に活性型な Δ PAS 株、そしてキメラセンサーを持つ n1277_Hik7c 株に、異なる光条件、酸化ストレス、窒素飢餓などを与え AP 活性を測定した。

2. GFP レポーターアッセイ

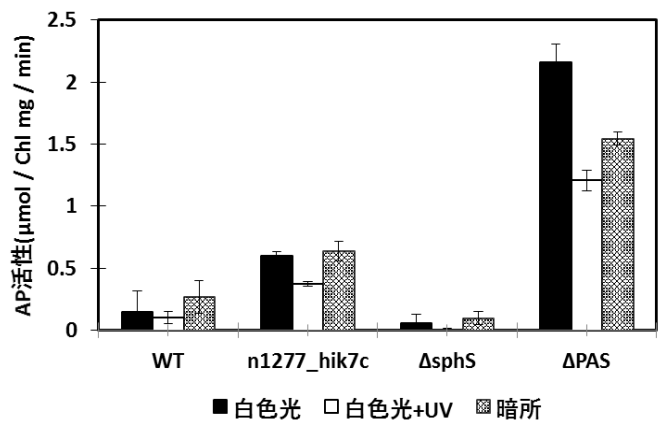
N. punctiforme の二成分制御系 (Npun_F1277 - F1278) とスキトネミン合成遺伝子クラスターの上流域を GFP の上流に In-Fusion により組み込んだプラスミドを大腸菌で異種発現させ、さまざまな環境因子に対する GFP レポーターの活性測定を行った。

【結果】

1. キメラセンサーによる活性測定

異なる光条件 (白色光、白色光+UV、暗所)、酸化ストレスの有無、窒素欠乏の環境ストレス下で *Synechocystis* を培養し AP 活性の変化を測定したが、n1277_hik7c 株の AP 活性に有意差は認められなかった

AP活性の測定 (培養 16 時間)



2. GFP レポーターアッセイ

プラスミドの作成を終え、現在測定中である。本発表には間に合わせたい。

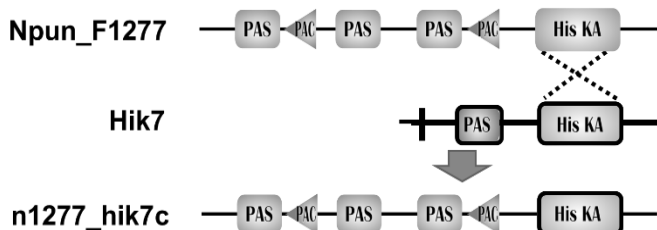


図 2：キメラセンサー n1277_hik7c 遺伝子のコンストラクト

ニンジンストレス不定胚誘導系を用いた新たなゲノム編集手法の開発

崔 リベカ (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】

ニンジンは不定胚誘導系が確立されており、古くから種子胚発生研究のモデル材料として用いられてきた。一方、シロイヌナズナでは突然変異体を用いた胚発生の研究が進んでおり、胚発生に重要である遺伝子がいくつか明らかになっている。これらの遺伝子のオーソログがニンジンでも見つかったり、全てのオーソログが見つかったりではなく、対応する遺伝子が存在していない可能性など、ニンジンの胚発生に関わる分子種はシロイヌナズナとは完全に一致しないことが考えられる。

これまで、植物では標的遺伝子をノックアウトすることが難しかったため、ニンジンで発見された胚発生関連遺伝子をノックアウトし、これらの遺伝子がニンジンの胚発生においてどのような機能を持つのかを明確にした研究はまだ報告されていない。そこで、近年開発された標的遺伝子の DNA 配列を自在に改変することができる CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用い、ニンジンの胚発生関連遺伝子をノックアウトしてニンジン胚発生におけるそれらの機能を解明することを目指すこととした。

植物でゲノム編集を行う際、CRISPR/Cas9 といったゲノム編集ツールがコードされた配列を植物のゲノムに組み込む方法が主に用いられる。しかし、一般的なニンジンの形質転換系を利用すると、合成オーキシンである 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を用いることから、残留している 2,4-D が不定胚形成過程に影響を及ぼす事が考えられる。また、カルスから不定胚を誘導するため、編集を受けなかった細胞を含むキメラ個体ができるなどといった問題が生じる。一方、ニンジンでは、2,4-D などの植物ホルモンを用いず、かつ、カルスを経ずに不定胚を誘導できるストレス不定胚誘導系があり、この系を用いた形質転換系を確立することができるれば、前述の問題は解決できると考えられる。

そこで本研究では、ニンジンのストレス不定胚誘導系を用いたゲノム編集個体の作成を目指し、まず、ストレス不定胚誘導系を利用した形質転換系を開発することとした。

【方法】

ニンジン (*Daucus carota* 品種: US-harumakigosun) の播種後 9 日目の芽生えの茎頂部を用いた。導入遺伝子は、胚的組織特異的プロモーター制御下の GFP 遺伝子とし、アグロバクテリウム法での導入を試みた。

茎頂片をアグロバクテリウム培養液につけた後、0.7M スクロースを含む MS 培地でストレス処理を行った。6 週間のストレス処理後、ストレス物質を含まない MS 培地に茎頂片を移植し、4 週間後に GFP の蛍光観察を行った。また、アグロバクテリウムの感染効率を高めるために、ストレス処理前に 1 日ほど非ストレス条件での共存培養を行う実験系も試みた。一方、形質転換効率の比較を目的として、一般的なニンジンの形質転換法を用いての形質転換もあわせて行った。

【結果・考察】

現在のところ、ストレス不定胚誘導系を利用した実験系では GFP 蛍光を示す不定胚は観察されていない。また、アグロバクテリウムの感染によって不定胚形成率が著しく低下したが、ストレス処理前にアグロバクテリウムとの共存培養をさせることによって不定胚形成率が少し回復した。

GFP を発現する不定胚を得るためには、さらに不定胚形成率を高める、もしくは遺伝子導入効率を高めることが必要であると考えられる。

一般的な形質転換法で行った形質転換では、GFP 蛍光を示す胚性カルスが得られた。現在は不定胚を誘導し、GFP 蛍光を示す不定胚の観察を行うとともに、再分化体を培養・維持している。

【今後の予定】

- ・アグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を向上させる化合物である Chloroxylinil をストレス処理前の共存培養用の培地に加え、引き続き新たな形質転換系の開発を行う。
- ・一般的な手法で得られた形質転換体を用い、ストレス不定胚誘導系を介して、導入した GFP 遺伝子を破壊するゲノム編集を行う。

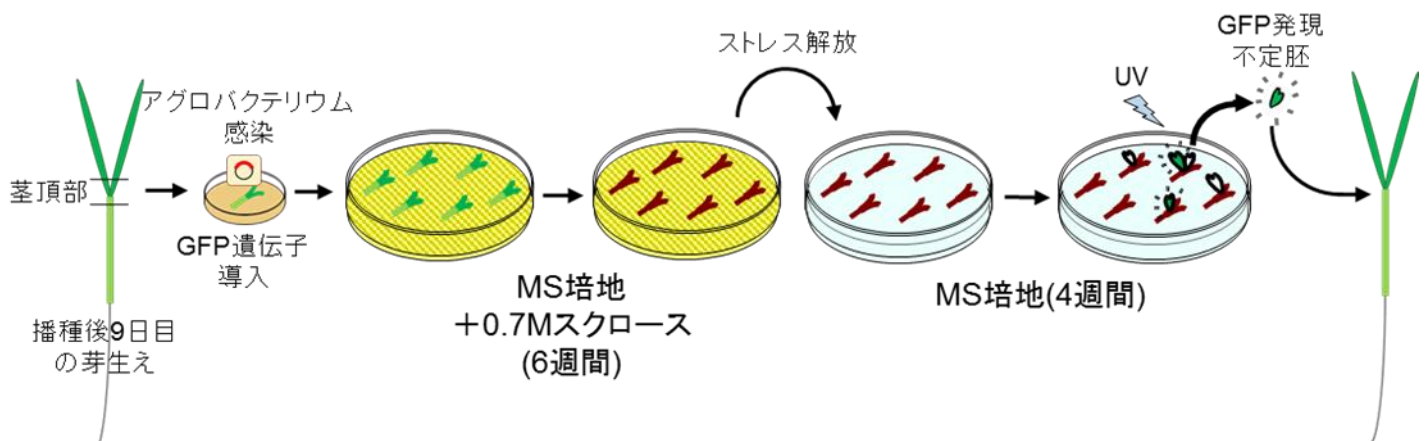


図. ニンジンのストレス不定胚誘導系を利用した新たな形質転換系開発のための実験系の概略図

L-DOPA の低濃度領域における植物生育抑制作用の機序

高山 由妃 (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

L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)は、マメ科のムクナ (*Mucuna puruensis* L.)に多く含まれるアレロケミカルであり、いくつかの植物種に対し生育抑制作用を示すことが知られている。L-DOPA に対して感受性の強いレタスにおいて枯死が誘導される高濃度域では、取り込まれた L-DOPA がメラニンに代謝される過程で発生する活性酸素による酸化障害が生育抑制作用の主たる要因であることが示されている。また、キュウリはレタスよりも生育阻害に必要な濃度は高いが L-DOPA に対する感受性は比較的高い。特に根部の成長が顕著に抑制されるが、L-DOPA 処理により遊離システインの顕著な減少とキノントタンパク質の急激な増加が確認され、L-DOPA の代謝により生じたドーパキノンやドーパミンキノンが遊離システインおよびタンパク質のシステイン残基に結合したことによるものと考えられている。さらに、キュウリミトコンドリアの複合体 I の活性低下を引き起こしていることが明らかとなっている。このように、植物種によって生育抑制をもたらす主要な作用機構は異なることが示唆されている。さらに、先行研究において、レタスではこれまで研究されてきた濃度より低い濃度で生じる生育抑制には活性酸素による酸化障害が関与していない可能性が強く示唆されている。

本研究では L-DOPA 感受性植物種であるレタスを用いて、これまで研究されてきた枯死が起こる濃度より非常に低い濃度領域で生育阻害を起こす作用機序の解析を行うことで、植物における L-DOPA の生育抑制作用のメカニズム解明に向けて新たな知見を得ることを目的とする。

材料

供試植物;

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Legacy)

供試薬剤;

L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

実験方法

1. 生育抑制活性試験

L-DOPA を DMSO (最終濃度 0.5%) に溶解し、最終濃度が 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.1 mM の L-DOPA を含む 0.5% の寒天培地に 25°C の暗条件下で発芽させたレタスの発芽種子を移植し、グロースチャンバー (明 12h, 25°C / 暗 12h, 20°C) で 3 日間生育させた後、根部の伸長を測定した。

2. レタス根部形態の顕微鏡観察

生育抑制活性試験と同条件で生育させたレタスの根部形態を光学顕微鏡で観察した。

3. エチレンの定量

25°C の暗条件下で発芽させたレタスの発芽種子を 0 mM の L-DOPA 溶液 (0.5% DMSO) を含む 0.5% の寒天培地に移植し、グ

ロースチャンバーで 3 日間生育させた。根部を先端から 1 cm ずつ採取し 0, 0.07, 0.09, 0.1 mM の L-DOPA 0.5 ml を入れた 5 ml バイアル瓶に 15 本ずつ 1 日封入し、ガスクロマトグラフ (GC/FID) によって発生したエチレンをヘッドスペース法によって定量した。

4. AgNO₃ 含む培地での生育抑制活性試験

最終濃度が 0, 0.07, 0.1 mM の L-DOPA 溶液に最終濃度が 0, 0.07, 0.5, 1 μM の AgNO₃ を加え、0.5% の寒天培地を作製した。レタスの発芽種子を移植し、グロースチャンバー (明 12h, 25°C / 暗 12h, 20°C) で 3 日間生育させた後、根部の伸長を測定した。

結果・考察

0.05 mM 以下の濃度では根部伸長の有意な増減は見られなかったが、0.07 ~ 0.1 mM の濃度領域においてはコントロールと比較して根部伸長の有意な減少が確認され、0.05 mM 以上の処理濃度ではレタスの根端が黒っぽくなっていた。また顕微鏡観察の結果、0.01, 0.03 mM の L-DOPA で処理した場合にはコントロールと比較して根部形態の変化が見られなかったが、0.05 mM 以上の濃度で処理した場合、根先端部分に濃度依存的なこぶ状の肥大が確認できた。そして肥大部分には根毛が密に形成されていた。これらの結果から、低濃度領域では L-DOPA の代謝の進行および根毛形成が、こぶ状の肥大の形成および根部の伸長抑制に影響を与えているのではないかと推定された。

レタスの根毛形成には、pH の低下やオーキシンおよびエチレンの作用、皮層微小管のランダム化等が関与していることが先行研究で示唆されており、まずエチレンの関与を検討することにした。ガスクロマトグラフによる発生したエチレンの定量では根部伸長に有意な減少が見られた 0.07 ~ 0.1 mM の処理濃度を設けたが、コントロールと比較して有意な増減は確認できなかった。そこで、エチレン作用阻害剤として知られる AgNO₃ を L-DOPA を含む培地に加えたところ、根部伸長の回復傾向および肥大作用の軽減が確認できた。よって、L-DOPA の低濃度領域における植物生育抑制作用にはエチレンが何らかの影響を与えている可能性がある。エチレンの定量は今回の条件下では、極微量の変化のため差が検出できなかった可能性がある。根毛形成に関連する作用への関与を裏付けるために、RT-PCR を用いたエチレン生合成/受容体遺伝子の発現変化や ACC および IAA、オーキシン作用阻害剤などを培地に加えた場合の根部の伸長の変化、緩衝液や水耕液など pH の変化の少ない培地を用いて pH を変化させたときの根部への影響などを今後、さらに研究する必要がある。

ビワの花の含窒素香気成分生合成に関与する CYP79 について

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

【背景・目的】

植物の生殖器官である花の香気成分は、花粉媒介昆虫の誘引と、植食性昆虫や病原体に対する化学防御に関与している。花の香気成分はベンゼノイド、テルペノイド、脂肪酸誘導体から構成されることが多いが、ビワ (*Eriobotrya japonica*) の花は特徴的な成分として、含窒素化合物であるフェニルアセトアルドキシム、(2-ニトロ)エチルベンゼンおよびフェニルアセトニトリルを放出する。これらの化合物は L-フェニルアラニンから生合成される。すなわち、L-フェニルアラニンがフェニルアセトアルドキシムに変換され、フェニルアセトアルドキシムが (2-ニトロ)エチルベンゼンまたはフェニルアセトニトリルへと変換される (図 1)。

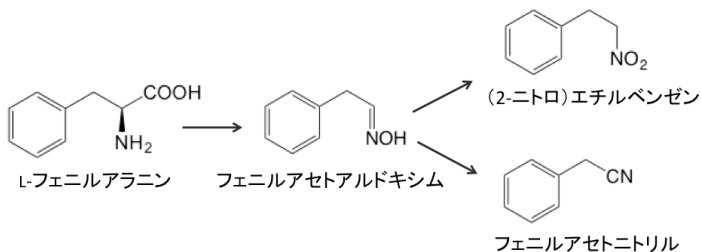


図 1. ビワの含窒素化合物の生合成経路

また、フェニルアセトアルドキシムはウメ (*Prunus mume*) の青酸配糖体生合成経路の中間体であり、シトクロム P450 (CYP79D16) が L-フェニルアラニンをフェニルアセトアルドキシムに変換することから (1)、ビワの含窒素香気成分生合成の初発反応にも CYP79 が関与すると推察された。

本研究の先行研究で、ビワの花と葉の RNA-seq 解析から花で高発現する遺伝子群が選抜された。そこで本研究では、ビワのアルドキシムを介した含窒素化合物の生合成経路を酵素と遺伝子レベルで解明することを目的とし、ビワの花で高発現する遺伝子群から CYP79 をコードする遺伝子を見出し、クローニングした。さらに、出芽酵母で発現し、酵素活性の検出を行った。

【材料・方法】

・材料

ビワ *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.

・方法

1. ビワの花由来 CYP79 のクローニング

ビワの花から CYP79 をコードする cDNA をクローニングするため、CYP79D16 と同一性を有する配列を RNA-seq データから検索した。得られた配列から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR で部分配列を増幅し、ダイレクトシーケンス法で部分配列を決定した。EjapCYP79 のコード配列を、PCR により増幅し、ギブソンアッセムブリーによって pYeDP60 ベクターの *KpnI-EcoRI* 部位につなぎ込み、pYeDP-EjapCYP79

を得た。その後、EjapCYP79 の全長を決定し、既知の CYP79 との系統樹を作成した。

2. 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) における CYP79 の発現と酵素活性の検出

pYeDP-EjapCYP79 を用いて出芽酵母 WAT11 株を形質転換し、EjapCYP79 とシトクロム P450 のレドックスパートナーであるシトクロム P450 レダクターゼの共発現系を構築した。形質転換体からマイクロソーム画分を抽出し、L-フェニルアラニンを基質とした酵素反応を行い、フェニルアセトアルドキシムを高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて検出した。

3. 開花ステージにおけるフェニルアセトアルドキシムの定量

ビワの花を 4 つのステージ (つぼみ、咲きかけ、満開、枯れ) に分類し、各ステージからフェニルアセトアルドキシムを、メタノールを用いて抽出した。メタノール抽出物のフェニルアセトアルドキシム含有量を LC-MS/MS を用いて測定した。

【結果・考察】

本研究によって見出した EjapCYP79 は、ウメ由来 CYP79D16 と 79% の同一性を有していた。シトクロム P450 は一次構造の同一性によって分類されており、55% 以上の同一性を有していれば同じサブファミリー分類される。よって、EjapCYP79 は CYP79D に分類されると考えられた。形質転換酵母から調製したマイクロソームと L-フェニルアラニンを反応させた結果、フェニルアセトアルドキシムが検出された。しかし、酵母における発現量が低かったため、EjapCYP79 の酵素化学的諸性質 (至適 pH、至適温度、酵素・基質親和性等) の解明には至らなかった。

ビワの花に含まれるフェニルアセトアルドキシムは 4 つのステージのうち咲きかけと満開のときのみ検出された。このことから、ビワでは花が咲いている時期にのみ含窒素香気成分を放出していると考えられる。今後、各開花ステージにおける EjapCYP79 の発現変動も調査することで EjapCYP79 がビワの花の含窒素香気成分の生合成に関与する酵素であることを明確にできると考えられた。

【参考文献】

(1) Yamaguchi et al., *Plant Mol. Biol.*, **86**, 215-223(2014).

根粒菌の侵入形式を決定するミヤコグサの新規遺伝子 *LAN*に関する研究

星野 元泉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 壽崎 拓哉 (筑波大学 生命環境系)

【導入】

多くのマメ科植物は、窒素固定能を持つ土壌細菌である根粒菌との間に、根粒共生と呼ばれる相利共生関係を築いている。共生の初期過程において、マメ科のモデル植物ミヤコグサは根の細胞内に感染糸と呼ばれるトンネル構造を形成し、根粒菌はこれを通して植物内部へ侵入する。対して一部のミヤコグサ変異体では、感染糸を伴わないにもかかわらず根粒菌が根の傷や細胞間隙を通して侵入し、共生が成立することが知られている。植物側の変異によって根粒菌の侵入形式が変化することは、植物がその形式を決定する仕組みを持つことを示唆する。しかし、背後にある分子機構はほとんど明らかにされていない。

この謎に迫る手掛かりとして、当研究室ではミヤコグサ新規変異体 *late nodulation (lan)* を単離した。*lan* 変異体は野生型と比較して根粒共生が遅れるという表現型を示す。先行研究において、*lan* では感染糸を伴わずに共生が成立すること (図1を参照) や、原因遺伝子は新規のタンパクをコードする一遺伝子 *LAN* であることが明らかにされている。これらの知見は *LAN* 遺伝子が根粒菌の侵入形式決定に働くことを示唆する。

以上を踏まえ、ミヤコグサにおける *LAN* を介した根粒菌の侵入形式決定機構の実体に迫ることを目的として、本研究では既知の共生遺伝子と *LAN* の関係性を調査した。

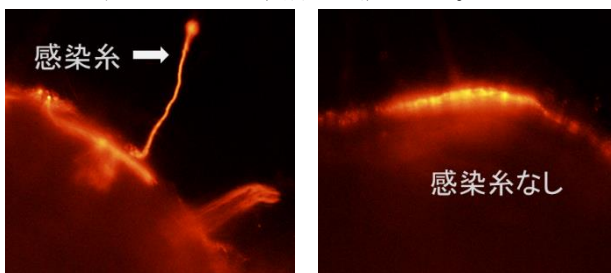


図1 野生型 (MG-20 系統、左) と *lan* (右) の根粒原基

【方法】

根粒共生は主に「根粒菌の感染成立」と「根粒の器官形成」という二大イベントからなり、両者が同調的に進行することで共生が成立する。この観点から、本研究では根粒共生の主要な遺伝子として *CCaMK*, *CYCLOPS*, *LHK1* の三因子に注目し、*LAN* との遺伝学的な関係について調べた。

CCaMK は根粒共生の最中枢に位置づけられるキナーゼであり、根粒菌の感染、根粒の器官形成双方に必須である。*CYCLOPS* は直接 *CCaMK* に活性化される転写因子であり、主に根粒菌の感染成立に寄与する。*LHK1* はサイトカニン受容体であり、*CCaMK* の下流で根粒形成に働く (以上図2)。

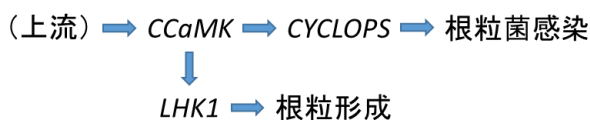


図2 *CCaMK*, *CYCLOPS*, *LHK1* の関係性

CCaMK, *LHK1* の機能獲得型変異である *CCaMK^{T265D}*, *snf2* は、根粒菌非存在下で植物の根に自発的根粒と呼ばれる根粒様構造を誘導する。*lan* と各因子の二重変異体における自発的根粒の形成を調べることで、両者の関係性を分析した。

また、*cyclops* 変異体は根粒菌存在下で未熟な根粒を形成するものの、根粒菌の感染は成立しない。*lan cyclops* 二重変異体における共生の表現型を観察し、両因子の関係性を分析した。

【結果・考察】

LAN と *CYCLOPS* の関係について最も注目すべき結果が得られたので、本要旨ではこれについて報告する。

lan cyclops に根粒菌を接種し共生の表現型を調べたところ、同変異体では根粒形成が完全に抑制されることがわかった (図3左)。これは *LAN*, *CYCLOPS* 各一遺伝子の変異体とは異なる表現型であり、両因子が根粒形成の過程で分岐して働くことを示唆している (図3右)。

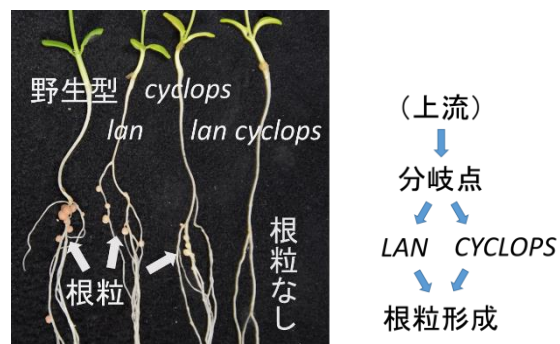


図3 左: 各ミヤコグサ系統における根粒形成の表現型 右: 示唆される *LAN* と *CYCLOPS* の関係

これを受けて、*lan cyclops* における根粒菌感染の表現型を調べた。根粒菌接種に際し、*lan* および *cyclops* では根毛の変形が起こり根粒菌をトラップするが、二重変異体では根粒菌に応じた根毛の変形がほぼ見られなかった。この結果は根粒形成に限らず、根粒菌感染の過程でも *LAN* と *CYCLOPS* が分岐して働くことを示唆する。

以上の形態的な観察に加え、遺伝子発現の観点からも *lan cyclops* の共生について調べた。qRT-PCRにより根粒共生誘導性のマスター遺伝子 *NIN* の発現量を測定したところ、*lan cyclops* では根粒菌の存在下でも *NIN* の発現上昇がほとんど見られなかったことがわかった。この結果は変異体の共生表現型と整合的である。

【結論】

本研究の結果から、根粒共生の過程で *LAN* と *CYCLOPS* が分岐して働くことが強く示唆された。この知見は *LAN* を共生の分子機構に位置づけるうえで重要なものと言える。

CYCLOPS 以外の因子と *LAN* の関係や、その他得られた結果については卒研発表会にて報告させていただく。

根粒共生における窒素応答に関わる *nitrate unresponsive symbiosis 3 (nrsym3)* 変異体の解析

三澤 文香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 寿崎 拓哉 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

マメ科植物は土壌細菌である根粒菌と相互作用を行い、根粒と呼ばれる共生器官を形成する。植物は根粒共生を行うことで、根粒菌が固定した大気中の窒素を利用することができる。この共生系では、植物は土壌中の窒素栄養状態を感知して、窒素欠乏時には根粒の形成を促進し、窒素栄養が豊富にあるときには共生を抑制することが知られている。窒素に応答した共生の抑制は、感染糸形成、根粒発生開始、根粒成長、根粒の窒素固定といった共生の成立に必須な様々な過程を多面的に作用する。しかし、その制御に関わる分子機構はほとんど未解明である。そこで、本研究では、窒素源に応答した植物による根粒共生の抑制機構を明らかにすることを目的に、高濃度硝酸存在下でも根粒を形成する *nitrate unresponsive symbiosis 3 (nrsym3)* 変異体の原因遺伝子の特定と表現型解析を行った。

【材料】

本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を実験材料に研究を行った。野生型植物として MG20 および MG52 を使用した。 *nrsym3* 変異体は、以前に当研究室において実施された、根粒共生における窒素抑制に耐性を示す突然変異体のスクリーニングによって単離されたものである。

【結果】

● *nrsym3* 変異体の原因遺伝子の特定

nrsym3 変異体と MG52 を交配した植物の F2 植物の中から硝酸耐性を示す植物体を選抜し、ラフマッピングと次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列の決定を行い、原因遺伝子候補を定めた。その結果、 *nrsym3* 変異体では、ある遺伝子にアミノ酸置換を伴う一塩基置換が生じていることが判明した。次に、この遺伝子を原因遺伝子候補として相補実験を行った。まず、候補遺伝子の野生型ゲノム断片を、 *nrsym3* 変異体に毛状根形質転換法を用いて導入した。形質転換根をもつ植物の表現型を解析したところ、形質転換された植物は、硝酸に応答して根粒形成が抑制されることがわかった。従って、 *nrsym3* の表現型が回復したといえ、この遺伝子が *nrsym3* の原因遺伝子であることが結論づけられた。

● *NRSYM3* の発現解析

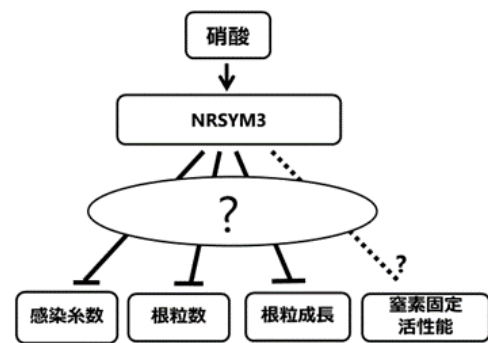
リアルタイム PCR を用いて、野生型植物と *nrsym3* 変異体における *NRSYM3* の発現を調べた。その結果、 *NRSYM3* の発現は硝酸誘導性があることが明らかとなった。

次に、 *GUS* 遺伝子をレポーターとし、 *NRSYM3* のプロモーターの活性部位を調べた。遺伝子の導入には、毛状根形質転換法を用いた。その結果、 *NRSYM3* は、地上部に近い主根、根粒の表皮で発現していることが明らかとなった。一方、主根の根端付近や側根の表皮では発現は見られなかった。

● *nrsym3* 変異体の表現型解析

nrsym3 変異体と野生型植物の根粒共生における様々な局面 (感染糸数、根粒の数、根粒の成長) の比較を行った。その結果、 *nrsym3* 変異体では硝酸による感染糸、根粒形成数の減少、根粒の成長の抑制が緩和されていることが明らかとなった。次に、 *nrsym3* 変異体と野生型植物を、硝酸カリウムが含まれた溶液に一定時間つけ、植物体(地上部、根)の硝酸態窒素濃度、亜硝酸態窒素濃度の測定を行った。その結果、地上部、根において *nrsym3* 変異体では硝酸態窒素濃度が野生型植物と比べて低いことが示された。また根の亜硝酸態窒素濃度においても、 *nrsym3* 変異体が低いことが示された。

【考察と今後の展望】



(図 1: *NRSYM3* と根粒共生の関係)

nrsym3 変異体の表現型の多面的な異常から、 *NRSYM3* は、硝酸に応答した根粒共生の様々な局面の制御に関わることが考えられる(図 1)。また、硝酸窒素濃度が野生型と比べて減少することから、 *NRSYM3* は硝酸の取り込みの制御に関わることが推察される。

今後は、 *nrsym3* 変異体を用いたより詳細な表現型解析や遺伝子発現解析を行う。また、 *NRSYM3* を介した硝酸に応答した根粒共生の抑制機構を、他の *NRSYM* 因子、既知の硝酸応答性因子との制御関係も考慮に入れながら明らかにしていきたい。また、現在ゲノム編集技術を用いて *NRSYM3* の機能を完全に喪失させる植物を作成中である。その植物を用いた解析は、 *NRSYM3* の機能の深い理解につながることを期待される。さらに、 *NRSYM3* が非共生時や硝酸非存在時においても機能する可能性についても検証していきたい。 *NRSYM3* と構造が類似したタンパク質の機能解析も並行して進める予定である。これらの解析を統合して、植物の土壌中窒素源の利用機構、根粒共生促進および抑制機構の制御関係の詳細を明らかにしていきたい。

クロララクニオン藻の高発現機能未知タンパク質に関する研究

福田 耕大 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 平川 泰久 (筑波大学 生命環境系)

【研究の背景】

葉緑体がシアノバクテリアの細胞内共生により誕生したことは広く知られており、葉緑体内ではシアノバクテリア由来のタンパク質が多く機能している。葉緑体タンパク質の多くは核遺伝子にコードされており、一般的にその転写量は高く、概日周期で変動することが知られている。中でも、炭素固定反応に関連する酵素や光化学系タンパク質の発現量は極めて高く、厳密に発現制御されている。モデル植物において数千あると言われる葉緑体タンパク質の中には、シアノバクテリア以外に起源をもち、機能が明らかにされていないものも多く存在している。これらのタンパク質の起源や機能を明らかにすることは、葉緑体進化を理解するうえで重要な鍵となると考える。

本研究で用いたクロララクニオン藻類は海産の単細胞藻類で、緑藻の細胞内共生(二次共生)により二次葉緑体を獲得したグループである。先行研究で行われたトランスクリプトーム解析により、本藻の一種 *Bigeloviella natans* の核遺伝子の約 1/3 は概日周期で発現変動する DEG (differentially expressed gene) であり、その中には多くの葉緑体タンパク質の遺伝子が含まれることが解っている (Suzuki et al. 2016)。本研究では、*B. natans* の約 7,000 ある DEG の中でも発現量の高いものに着目し、クロララクニオン藻における未知の葉緑体タンパク質の探索を行った。

【結果①: 高発現の機能未知葉緑体タンパク質の探索】

B. natans の DEG の中で、概日周期を通して転写量の高い遺伝子を見ると、上位 50 番までの遺伝子の約 8 割が葉緑体の光合成関連タンパク質をコードしていた。その中で、40 番目に高い転写量を示す遺伝子は、これまでに報告されている葉緑体タンパク質配列と相同性がなく、機能未知タンパク質であった。この 607 amino acids のタンパク質を HEP40 (Highly Expressed Protein 40) と呼称する。概日周期を通じた HEP40 の発現変動パターンは、他の光合成関連遺伝子と類似しており、暗期後半から明期前半にかけて発現上昇するものであった。また、HEP40 の N 末端には葉緑体へ輸送されるタンパク質に特有の輸送シグナル配列が予測された。

【結果②: 細胞内局在の解析】

HEP40 の細胞内局在を明らかにするため、緑色蛍光タンパク質 GFP を用いて解析を行った。HEP40+GFP の融合タンパク質は葉緑体に局在し、ストロマ内の一部に集積しているように見えた (図 1)。この局在パターンは、これまでクロララクニオン藻で報告されている葉緑体タンパク質のものとは異なっていた。この結果は、HEP40 が新規葉緑体タンパク質であることを強く示唆するものであった。

【結果③: 相同性検索による起源の推定】

HEP40 に相同なタンパク質が他の生物にも存在するのかを検証するため、利用可能なゲノム配列とトランスクリプトーム配列を用いて Blast 検索を行った。葉緑体をもつ渦鞭毛藻やハプト藻、不等毛藻、緑藻、ユーグレナ藻を含む藻類グループで、HEP40 に相同な配列が検出された。一方、陸上植物や動物、菌類、また従属栄養の原生物からは相同配列が検出されなかった。HEP40 に相同な配列が多様な光合成真核藻類に保存されていることから、このタンパク質が葉緑体と深い関わりをもつことが考えられる。また、HEP40 の相同配列は、シアノバクテリアを含む多様なバクテリアからも検出され、それらは COG4337 と呼ばれる機能未知な配列 (約 160AA) として登録されていた。興味深いことに、真核藻類で検出された遺伝子は、どれも複数の COG4337 配列を含んでおり、HEP40 は 3 つの COG4337 がタンデムにリピートする配列であった。クロララクニオン藻の HEP40 の起源はバクテリアの機能未知遺伝子 COG4337 であり、おそらく遺伝子重複により、葉緑体で機能するタンパク質へと進化したのだと考えられる。

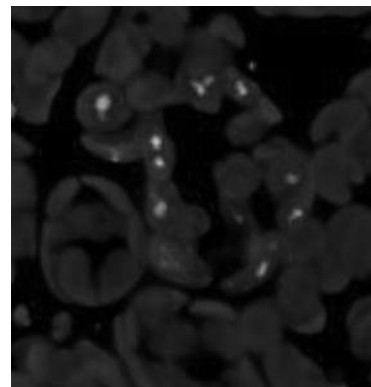


図 1. HEP40+GFP の融合タンパク質を発現するクロララクニオン藻 *Amorphochlora amoebiformis* の細胞の共焦点顕微鏡像。葉緑体の自家蛍光 (グレー) の内部で HEP40+GFP (白色) の蛍光が観察された。

【今後の展望】

クロララクニオン藻の HEP40 に特異的な抗体を現在作製しており、免疫電子顕微鏡でより詳細な局在解析を行い、このタンパク質の機能の推定を試みる予定である。

【引用文献】

Suzuki S, Ishida K, Hirakawa Y (2016) Diurnal transcriptional regulation of endosymbiotically derived genes in the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*. *Genome Biol. Evol.* 8; 2672-2682.

菅平高原における変形菌類のフロラ

坂梨 瑠南 (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】

広義の“粘菌”は生活環の中で子実体を作るアメーバの総称であり、そのうち巨大な多核単細胞の変形体を作るグループが変形菌類(真正粘菌類)である。変形菌類はバクテリアやカビなどの微生物を摂食し、ある程度まで成長すると子実体を形成して胞子を散布する。変形菌類の分布は主に気温の影響を大きく受け、種によっては特定の微小生息場所(落葉、倒木、生木樹皮など)に対する嗜好性を示すことが知られている。

変形菌類のフロラは主に目視による子実体の採集によって調査されてきたが、微生物としてはよく進展している方である。日本でも変形菌類のフロラはよく調べられており、県ごとの調査例も多い。長野県では、主に八ヶ岳で調査が行われ、2011年までに168種16変種4品種が報告された。一方で、同じく長野県に位置する菅平高原では、日本変形菌研究会による採集活動が頻繁に行われてきたにも関わらず、そのデータが統括的にまとめられてこなかった。他方、菅平高原実験所では「山岳域の全生物群生物多様性観測 ATBI (All Taxa Biodiversity Inventory)」というプロジェクトが進められており、菅平高原に生息する全生物相とその相互作用の解析を目指した調査が行われてきた。しかし、変形菌類の調査方法は他生物とは異なっており、また過去の標本データもまとめられていないため、菅平高原の変形菌類相の解明を主とした研究が求められた。本研究では、菅平高原にある異なる植生下での変形菌類の生息状況を調査し、同地域で過去に得られた標本をも再検討することで、菅平高原における変形菌類の多様性を評価した。

【材料と方法】

1) 調査

定期調査：菅平高原実験所内の植生の異なる4区画(ススキ草原、アカマツ林、広葉樹林、大明神滝(以下、滝と称す))を通る決まったルートを通り1回程度歩き、目視によって変形菌類の子実体を探して採集した。また、各区画の種の多様度(H' ; Shannon-Wienerの多様度指数)、均衡度(J' ; Pielouの均衡度指数)及び区画間の類似度(Dice係数)を算出し、植生と種類相の関係について考察した。

不定期調査：定期調査では採集を行わない場所(実験所内の樹木園や拋水林、実験所外の菅平湿原等)でも不定期に採集を行った。

標本の作成：採集した子実体を標本箱に木工用ボンドで固定し、採集データを記録した。カビや虫の害を防ぐため、作成した標本は熱風乾燥機で乾燥した後、防虫剤を入れたプラスチックケースに保管した。

種同定：実体顕微鏡及び光学顕微鏡によって子実体の観察を行い、日本産のモノグラフ(山本, 1998)を参照して種同定を行った。また同定の困難な種については、変形菌類の分類を専門とされる松本淳氏(福井総合植物園)に同定確認してもらった。

2) 菅平高原産変形菌リスト

定期調査・不定期調査で採集、同定された種に加え、過去に菅平高原で採集された種も調べ、菅平高原産変形菌リストを作成した。過去に採集された種については、実験所に保管されていた標本や、国立科学博物館(TNS)及び神奈川県立生命の星・地球博物館(KPM)の標本データを参照して調べた。

3) 菅平高原産変形菌図版資料

菅平高原実験所での実習や研究で利用できるように、同定した変形菌類の形態的特徴を写真とともに記録した図版資料を作成した。

【結果】

1) 調査

定期調査：5月4日から11月27日まで、計25回実施した。ススキ草原で1標本1品種、アカマツ林で83標本23種6変種、広葉樹林で17標本8種1変種、滝で41標本16種1変種、計142標本35種6変種1品種を採集した。種の多様度(H')は、アカマツ林(4.17)、滝(3.70)、広葉樹林(3.01)の順で高く、ススキ草原は0.00であった。種の均衡度(J')は、アカマツ林で0.86、滝で0.91、広葉樹林で0.95であった。類似度(Dice係数)は、広葉樹林-滝間で最も高く(0.38)、次いでアカマツ林-滝間(0.30)、アカマツ林-広葉樹林間(0.21)であった。

不定期調査：4月4日から11月28日まで、計16回実施した。計161標本を採集し、定期調査で採集されなかった22種4変種を得た。4月末から5月頭にかけては、定期調査では殆ど採集されていない好雪性種(融雪期に子実体形成する種)の標本が多く採集された。

2) 菅平高原産変形菌リスト

今年度の調査で303点の標本が得られ、57種10変種1品種に同定された。過去の標本に基づいて73種3変種2品種が確認されたことから、これらを合わせると菅平高原産の変形菌類は30属98種11変種2品種となった。

3) 菅平高原産変形菌類図版資料

菅平高原実験所のウェブサイトより公開予定である。

【考察】

定期調査の結果、アカマツ林で特に標本数が多く、種の多様度も最も高かった。これは、アカマツ林に倒木が多いこと、また、針葉樹の腐木に嗜好性を示すとされているアミホコリ属がアカマツ林で8標本3種3変種と多数採集されたことが要因として考えられる。一方で、ススキ草原では1標本しか得られなかった。これは、倒木やリター層が乏しく、変形菌類の生育しづらい環境であったためだと考えられる。類似度は広葉樹林-滝間で最も高かった。滝付近は湿度が高く広葉樹が優占していることを考えると、湿度よりも植生の違いが分布に影響を与えたことが示唆される。今回の調査では、主に倒木から採集を行ったため、倒木量の多いアカマツ林に標本が偏り、落葉生の変形菌類があまり採集されなかったため、継続調査では改善の余地がある。

カニクサ属植物に寄生するサビキンの分類学的再検討と系統位置の推定

森 政貴 (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

サビキンは植物病原菌最大の種数を抱える担子菌門サビキン目に属する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、異種寄生を行う種が含まれる。シダ類であるカニクサ属 (*Lygodium*) 植物に寄生するサビキンとしては、サビキンの中で最も多い約 4000 種が報告されている *Puccinia* 属 (*Pucciniaceae*) の *Puccinia lygodii* の 1 種が知られている。一方で、このサビキンの冬孢子はシダ類を宿主とする *Desmella* 属 (*Uropyxidaceae*) のサビキンに類似した形態であることが認められている。

そこで本研究では、*P. lygodii* の分類学的帰属と系統位置を明らかにすることを目的として、形態的特徴の観察と、D1/D2 領域において分子系統解析を行い、*P. lygodii* のサビキン全体における系統位置や、*Puccinia* 属や *Desmella* 属との系統関係を推定した。

材料と方法

(1) 冬孢子と夏孢子堆及び夏孢子子の形態観察

標本は次の菌類標本庫所蔵のものを供試した、茨城大学 (IBA)、米国パデュー大学 (PUR)、米国農務省 (BPI)、筑波大学 (TSH)。形態観察には *P. lygodii* を 4 標本、*Desmella gymnogrammes* 1 標本、*D. aneimiae* 1 標本、タイで発見された *Lygodium* 属に寄生しているサビキン 2 標本の計 8 標本を供試した。これらの標本から冬孢子を採取してプレパラートを作成し、光学顕微鏡で長径、短径、壁厚、孢子柄の長さを測定した。夏孢子堆及び夏孢子子については、形態観察に加えて走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面構造の観察を行った。

(2) 分子系統解析

形態観察で使用したサビキンを含めた *P. lygodii* を 17 標本、*D. aneimiae* 2 標本、*Desmella gymnogrammes* 1 標本、*Desmella* 属と同じ *Uropyxidaceae* である *Didymopsorella toddaliae* を 1 標本供試した。これらの標本の夏孢子から DNA を抽出し、28S rDNA D1/D2 領域を PCR 増幅させた。そして増幅が確認された標本と、筑波大学と Genbank のサビキンの DNA データから各科の代表的な種を選択して、最尤法 (ML 法) により系統解析した。

結果及び考察

(1) 冬孢子と夏孢子堆及び夏孢子子の観察

各標本の冬孢子、夏孢子堆、夏孢子子を観察したところ、冬孢子については *Desmella* 属に類似した孢子が観察されたが (図 1)、*Desmella* 属よりも *P. lygodii* の夏孢子子が大型で、後者には刺が存在しない平滑部分が観察された (図 2)。

(2) 分子系統解析

D1/D2 領域塩基配列に基づく系統解析の結果 (図 3)、*P. lygodii* が *Desmella* 属と高いブートストラップ値で 1 つのクレードを形成したことから、両者が系統的に近縁であることが明らかとなった。また、これらのサビキンが含まれるクレードは *Pucciniaceae* と姉妹群を形成した。

まとめ

本研究において *P. lygodii* の形態と分子系統を調べたことで、このサビキンが *Puccinia* 属ではなく *Desmella* 属に近縁であることが明らかとなった。一方で解析法による系統関係の異同も認められ、さらに解析遺伝子領域を増やして精査する必要がある。また本研究で供試した一部の古い標本においては、PCR 増幅が認められずすべてを系統解析に供することができなかった。従って、D1/D2 領域以外の遺伝子領域からも DNA データが得られる新しいサンプルを多く用意する必要がある。

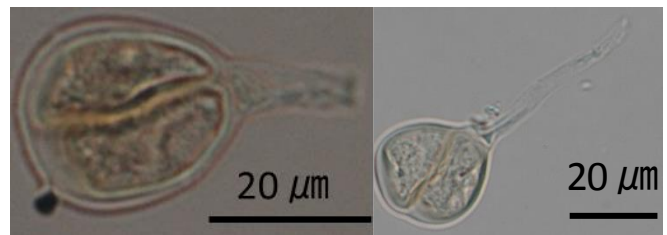


図 1 IBAR-10744 *Puccinia lygodii* の冬孢子 (左) と BPI020025 *Desmella gymnogrammes* の冬孢子 (右)

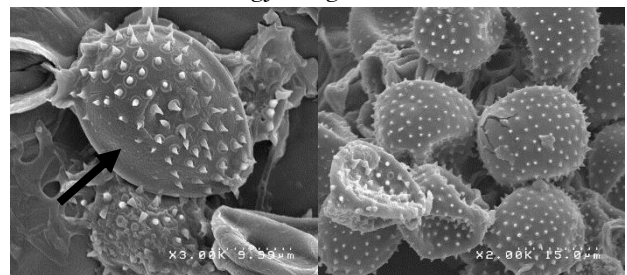


図 2 IBAR-10744 *Puccinia lygodii* の夏孢子 (左; 矢印: 刺の無い平滑部分) と IBA-10002 *Desmella aneimiae* の全面が細刺に覆われた夏孢子 (右)



図 3 D1/D2 領域に基づく ML 法系統樹

新奇捕食性バクテリアの運動とアクチン様タンパク質に関する研究

栢澤 侑花子 (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

真核生物の誕生は生命進化上の最も重要なイベントの一つである。近年の分子系統解析によって真核生物に最も近縁な原核生物の系統が明らかになりつつあるが[1]、原核生物から真核生物への進化のプロセスは未だ解明されていない。真核生物と原核生物は細胞やゲノム構造など様々な点で大きく異なるが、中でも真核生物だけがもつ機能であるファゴサイトーシスは、ミトコンドリアや葉緑体の獲得にも関係しているとされており、真核生物の誕生や多様化に重要な役割を果たしたと考えられている。

SRT547 株はパラオ共和国の表層海水サンプルから白鳥峻志氏 (筑波大学) により単離された自由生活性バクテリアの培養株である。細胞形態や動きから、当初はアメーバ状の真核生物であると思われたが、SSU rRNA 遺伝子配列を用いた分子系統解析の結果、バクテリアのプランクトミクス門に近縁な原核生物であることが明らかにされた。本生物の基本的な細胞構造は他のプランクトミクス類と一致するが、プランクトミクス類を含む一般的なバクテリアとは異なり、大きく柔軟な細胞をもち、基質上を変形しながら移動する。さらに本生物は培地中の他のバクテリア細胞を真核生物のファゴサイトーシスのように自らの細胞膜に包み込んで捕食する。これまでの研究から、本生物は細胞内に発達した繊維様構造を有すること、ゲノムにアクチンホモログである MreB に加えて、真核生物のものに近縁なアクチン様タンパク質遺伝子がコードされていることが明らかになっている。このことから、アクチン様タンパク質が、発達した繊維構造を形成し、本生物で見られる細胞の運動や捕食能に関連していると推測された。

そこで本研究では、このアクチン様タンパク質が本生物の細胞運動や捕食能に関連していると仮定し、1) 光学顕微鏡による細胞運動や捕食行動の観察と、2) アクチン様タンパク質の細胞内局在の解析を行った。これらの結果を比較し、アクチン様タンパク質の細胞内局在が本生物の真核生物的な特徴に影響しているか考察することを目的とした。

方法

本実験で用いた SRT547 株は餌として *Alteromonas macleodii* NBRC102226 株を加えた上で、フィルター付き培養フラスコを用いて ESM 培地、20°C で培養した。

1) 形態観察

光学顕微鏡を用いて細胞の状態や分裂、捕食の様子などを観察し、タイムラプス撮影により記録した。

2) アクチン様タンパク質の局在解析

真核生物の F アクチン検出に用いられる蛍光ファロイジンによるアクチン様タンパク質の染色が可能か検討した。また、本アクチン様タンパク質の詳細な細胞内局在を調べるため、この目的タンパク質に特異的な抗体を作製した。初めに、ゲノム配列からアクチン様遺伝子に特異的なプライマーを作成し、RT-qPCR を行い細胞内で目的遺伝子が発現していることを確認した。次に、ク

ローニングした目的遺伝子が大腸菌に形質転換し、タンパク質を発現させた。大腸菌からタンパク質を抽出し、His タグカラム精製によって目的タンパク質を回収し、抗体作製に用いた。作製した抗体がアクチン様タンパク質を特異的に検出することをウェスタンブロッティングで確認した後、蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法で細胞内における目的タンパク質の局在を調べた。

結果・考察

光学顕微鏡による観察から、SRT547 株は細胞の形を変えながら這うように動き、接触した餌バクテリアを自身の細胞膜を陥入させて取り込むことがわかった。また、短時間に連続で捕食することもあった。培養状態によって細胞のサイズが変化することがあり、直径 15 μm 程度にまで大きくなる細胞もあった。細胞分裂様式は、まず細胞の中央がくびれ、引きちぎるようにして徐々に 2 つの娘細胞に分かれることがわかった。また、巨大細胞では細胞の中央ではなく一部がくびれ、出芽のような形式で分裂することがわかった。

蛍光ファロイジンを用いた細胞染色の結果から、コントロールとして用いた真核生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* sp. の細胞では蛍光が見られたが、本生物の細胞では蛍光が見られなかった。ファロイジンは F-actin に結合する性質であるため、本生物のアクチン様タンパク質が重合しない、もしくは重合体が F-actin と異なる構造であるためにファロイジンでは染色できないのかもしれない。

そこで、本生物のアクチン様タンパク質に特異的な抗体を作製して局在を調べることにした。作製した抗体が抗原であるアクチン様タンパク質に特異的に結合するか確認するため、初めにウェスタンブロッティングを行った。アクチン様タンパク質の細胞内局在に関する詳細な結果は卒研発表会にて報告する。

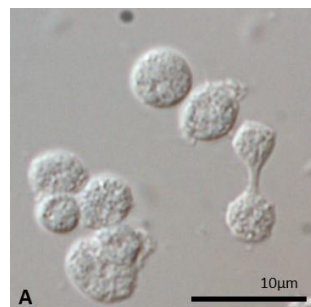


図 1. SRT547 株 光学顕微鏡写真

参考文献

[1] Spang, A. et al. (2015). Complex Archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179

Photosynthesis and biomass allocation in parasitized clover plants

Renina Gale O. Navarro (201318025) Supervisor: Louis J. Irving

Introduction

Parasitic plants are estimated to cause approximately US\$10 billion of damage to agriculture globally. There are about 4000 species of parasitic plants, split into hemiparasites which steal nutrients and water, and holoparasites which also steal carbon from their host plant. *Orobanche minor* and *Phtheirospermum japonicum* are holoparasitic and hemiparasitic plants found in Japan. While the effects of *O. minor* on host plants have previously been established, the effects of *P. japonicum* are poorly understood. It has been suggested that nitrogen (N) nutrition is an important determinant of the host-parasite relationship.

Purpose of the Study

To determine how the parasitic plants *P. japonicum* and *O. minor* affect biomass allocation and photosynthesis of host clover plants in different N conditions.

Methodology

Host clover seeds were planted with *P. japonicum*, and *O. minor* parasite seeds. Clover and *P. japonicum* were also planted on their own as control plants. Seeds were given an N-free nutrient solution during the germination period, which was swapped to treatment solutions containing 1 mM N, 5 mM N, and 25 mM N after two weeks. Plants were grown for a further 6 weeks before photosynthesis and biomass measurements were recorded.

Measurement and data collection

A LICOR 6400XT Portable Photosynthesis System was used to measure the photosynthesis of host plant leaves. The leaves were scanned, and ImageJ was used to measure and account for the varying leaf sizes and obtain the correct photosynthesis measurement values.

Root and shoot fresh weights of all plants were recorded. The roots and shoots were then dried to obtain dry biomass.

Results

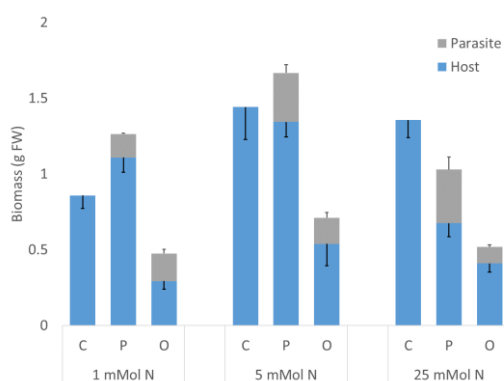


Fig. 1. Plant fresh weight after 6 weeks of different nitrogen level treatments. C is control host plants, P is host + *P. japonicum*, O is host + *O. minor*.

Control plants were bigger than those parasitized by *O. minor* at all N levels, with the proportionate difference in biomass between control and parasitized plants unaffected by N supply. N level did not have a significant effect on the total biomass of the host and *O. minor* system.

P. japonicum infection caused significant decrease in host biomass at 25 mM N but not at lower N levels. *P. japonicum* did not have an effect on host plant biomass at 1 and 5 mM N. The mass of parasitic *P. japonicum* plants tended to increase with N supply, while no effect of N was noted on the mass of *O. minor*.

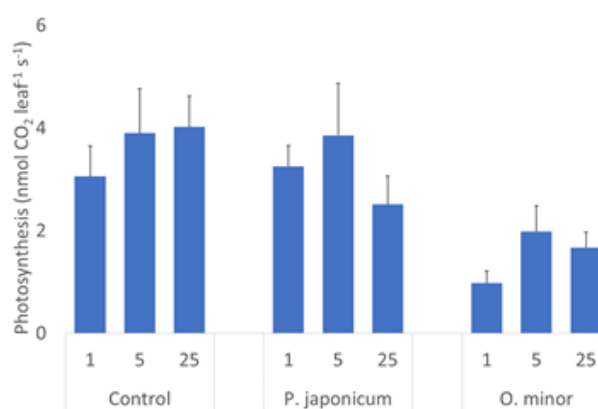


Fig. 2. Photosynthesis of host plant leaves after 6 weeks of growing with parasitic plants at different nitrogen levels.

Host plants parasitized with *O. minor* showed a decrease in photosynthetic rate on a *per leaf* basis at all N levels. *P. japonicum* did not have an effect on the photosynthesis performed by leaves of host plants at 1 or 5 mM N, but may have caused a slight decrease at 25 mM N. Decreases in host leaf size was an important factor in photosynthetic declines.

Conclusion

Orobanche minor infection caused a decrease in both biomass and photosynthesis of host clover plants regardless of N supply. In the case of clover plants infected by *Phtheirospermum japonicum*, no significant effects were detected in the plants supplied with low N levels. However, plants grown with a *P. japonicum* at 25 mM N exhibited a significant decrease in biomass, suggesting that *P. japonicum* affects host plant growth more at higher N levels.

Preliminary experiments have previously shown that *P. japonicum* can cause an increase in photosynthesis of host clover leaves. While this was not found in this experiment, it is possible that this only holds true for young plants. We plan to explore the effects of *P. japonicum* parasitism on host photosynthesis in subsequent experiments.

乾癬モデルマウスを用いた新規 VEGF に関する基礎研究

末満きらり (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)

【背景と目的】

乾癬は皮膚の慢性的な炎症をともなう自己免疫疾患である。主要な症状としては、血管新生による皮膚の紅斑、ケラチノサイト増殖による表皮過形成、フケ状の鱗屑形成などが観察され、また、乾癬患者体内では Th-1 や Th-17 といった炎症性細胞や TNF、IL-17、IL-23 といった炎症性サイトカインの増加が見られる。このような乾癬における炎症性の変化に着目し、その治療には TNF- α などの分子を標的とした乾癬治療薬が使用され、一定の治療効果が報告されている。しかしながら、現状、効果的な治療法の確立には至っていない。

乾癬の病理に関与すると考えられる因子に VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor=血管内皮細胞増殖因子)がある。VEGF は主に血管新生を司る因子であり、様々なシグナル経路を介して血管内皮細胞の分化、生存、移動、増殖、細管形成および血管透過性を誘導する。さらに乾癬患者の体内の VEGF レベルと症度に相関があることが報告されている。そこで、本研究では、抗 VEGF 薬の乾癬治療に対する可能性に着目し、眼科領域の疾患、及び、がん治療に既に用いられている Aflibercept を乾癬マウスモデルに適用した際の治療効果を検証した (実験 1: 乾癬モデルにおける抗 VEGF 薬の治療効果)。

さらに VEGF 由来のペプチドを標的としたワクチンが VEGF を標的として作用することにより関節リウマチモデルの症状を改善したという報告を受け、抗 VEGF ワクチンの乾癬治療応用への可能性についても検証することとした (実験 2: 乾癬モデルにおける抗 VEGF ワクチンの治療効果)。

【材料と方法】

● 乾癬モデルマウスの作製

C57BL/6 マウスを用いた。Aldara 塗布開始前日に背中の中毛を剃り、1~2週間に渡り一定期間 Aldara クリームを塗布することで乾癬モデルマウスを作製した。また、同日程でコールドクリームを塗布したマウスをコントロールマウスとした。

● 治療薬/ワクチンの作製と投与

抗 VEGF 薬の Aflibercept はマウス 1 g 体重あたり 12.5 μ g または 25 g、抗 TNF- α 薬の Etanercept はマウス 1 g 体重あたり 15 mg または 30 mg を投与した。1回の注射における総投与量を 100 μ L になるようにした。治療薬の投与は全て Aldara クリームの塗布とともに開始し、2日おき、または、3日おきに行った。

VEGF を構成する一部のペプチドを KLH (Keyhole limpet hemocyanin) と結合させることで VEGF を標的としたワクチンを作製した。ワクチン投与は Aldara クリーム塗布開始日を Day 0 とし、Day 0 以前の Day - 32、Day - 25、Day - 11 に行った。

● クリニカルスコアの評価

PASI (Psoriasis Area and Severity Index)にもとに、マウスの皮膚の形成された紅斑・浸潤・鱗屑の状態を 0~4 点計 12 点満点で評価した。

● 組織学的解析

採集した皮膚サンプルのパラフィン切片を作製後、HE 染色を行い、表皮の過形成を評価した。

● 炎症性サイトカインレベルの測定と脾臓構成細胞の解析

血中ならびに皮膚における炎症性サイトカインレベル (IL-6/17/23, VEGF) を ELISA キットによって測定した。Flow cytometry を用いて脾臓における CD4+ T cell、CD19+ B cell、Ly6G+ neutrophil の割合を測定し、Aldara クリームの全身への影響とそれに対する治療の効果を検証した。

【結果と考察】

● 実験 1: 乾癬モデルにおける抗 VEGF 薬の治療効果

Aflibercept は乾癬の代表的な症状である皮膚の紅斑と表皮過形成を改善した。また、Aflibercept 12.5 mg/kg を投与した治療群において最も高い治療効果が観察された。特に、紅斑の改善は抗 VEGF により血管新生が抑制されたことによるものだと考えられた。抗 VEGF 薬である Aflibercept は、既に乾癬治療に用いられている抗 TNF- α 薬である Etanercept の治療効果と比較し、優れた乾癬改善効果を発揮していることから、主にかん治療に用いられてきた Aflibercept が乾癬に対する新たな治療薬になり得ると結論した。

● 実験 2: 乾癬モデルにおける抗 VEGF ワクチンの治療効果

抗 VEGF ワクチンは乾癬モデルの皮膚領域において乾癬に代表的なサイトカイン (IL-17, IL-23, VEGF) のレベルを減少させた。しかし、クリニカルスコアと表皮過形成評価においては改善効果を見出せなかった。乾癬モデルの脾臓において脾腫が見られたが、抗 VEGF ワクチンがそれを改善することはなかった。

【謝辞】

本実験を行うにあたり、右も左もわからない私の面倒を見てくださったフランスパリ第 13 大学研究室 Li2P の Dr. Eric ASSIER、またその研究室長の Prof. Marie-Christophe BOISSIER、帰国後ご指導して下さった中田先生を始めとする中田研究室の皆様から御礼申し上げます。

【参考文献】

Semerano L, Duvallat E, Belmellat N, Marival N, Schall N, Monteil M, Grouard-Vogel G, Bernier E, Lecouvey M, Hlawaty H, Muller S, Boissier MC, and Assier E. Targeting VEGF-A with a vaccine decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *Angiogenesis*. 19(1):39-52 (2016).