



生物学類

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.19 No.1 January 2020

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.19 No.1 January 2020
www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

令和元年度
生物学類卒業研究発表会要旨集

令和2年2月8日

筑波大学
生物学類

第一会場 2B411 教室

9:40 ~	田中 萌奈 香り物質によるホルモン代謝作用の解析	2
9:55 ~	萩久保 朝香 ショウジョウバエ胚前極に異所的に形成された PGC 様細胞の性状解析	3
10:10 ~	増川 柁樹 ショウジョウバエ始原生殖細胞における Gal4/UAS を用いた遺伝子強制発現の性差	4
10:25 ~	海野 太一 ニジマスを用いた精原幹細胞濃縮法の開発 ~代理親魚技術における移植の効率化を目指して~	5
10:40 ~	古賀 結花 ショウジョウバエ始原生殖細胞における母性 Ovo タンパク質下流遺伝子の解析	6
11:10 ~	水野 陽介 ショウジョウバエの幼若ホルモン合成器官に投射する神経細胞の探索	7
11:25 ~	阿部 真生子 ショウジョウバエの高糖耐性に影響を与える遺伝的要因と栄養的要因	8
11:40 ~	清家 和樹 ショウジョウバエのニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性に関する研究	9
11:55 ~	金谷 彩 交尾刺激による腸の神経ペプチド放出のメカニズムの追究~ショウジョウバエを用いた解析~	10
12:10 ~	塩井 一馬 個体発育におけるセロトニン合成の役割	11
13:15 ~	越後谷 知樹 イモリの再生を解析するための新たな条件付き遺伝子発現系の開発	12
13:30 ~	飯島 綾菜 C型レクチン受容体に対する新規のモノクローナル抗体の樹立	13
13:45 ~	佐々木 寛明 MiR-126 and GAG are involved in HUVEC vascular network formation	14
14:00 ~	福島 誠生 バキュロウイルスを用いたインフルエンザウイルス抗原の発現	15
14:15 ~	飯塚 美桜 コラーゲン分泌阻害剤ケミカルスクリーニング法の樹立	16
14:30 ~	鈴木 希愛 目で見える悪性度-iRFPを用いた腫瘍随伴マクロファージの追跡-	17
15:00 ~	谷口 心平 レム睡眠の意義の解明に向けた生涯にわたってレム睡眠量の多いマウスの確立	18
15:15 ~	三村 明日香 概日リズム制御タンパク質 BMAL1 の <i>in vivo</i> インタラクトーム解析	19
15:30 ~	渡邊 朝美 香辛料由来の各種成分がもつ抗酸化能についてのゼブラフィッシュを用いた検討	20
15:45 ~	SEMINARIO MONDEJAR GONZALO ALFREDO Identification and functional analysis of novel proteins involved in retroviral silencing	21
16:00 ~	桜井 健祥 NeedEx®-GC/MSによる薬毒物の一斉分析	22

第二会場 2B412 教室

9:40 ~	山口 孝太 タンパク質の長時間ダイナミクスを短時間 MD で作る	23
9:55 ~	倉田 勇斗 天然変性タンパク質の溶解性に ATP が与える影響の分子メカニズム解析	24
10:10 ~	川原 瞳 Investigating the effect of familial Alzheimer's disease mutations on Amyloid - β deposits on 3D cell culture	25
10:25 ~	阿久津 智晃 <i>Tetrahymena thermophila</i> の Latrunculin-A に対する耐性能獲得に関わる因子の研究	26
10:40 ~	KIM HYOMIN 分裂酵母を用いた Rho の研究	27
11:10 ~	吉永 真理 真核生物における SMC タンパクファミリーの多様化と二次的喪失	28
11:25 ~	渡邊 闘也 緑色鞭毛藻 <i>Pyramimonas parkeae</i> の眼点サイズに対する光強度の影響	29
11:40 ~	窪谷 ひかり 発達過程におけるミクログリア cGAS-STING 経路の活性制御	30
11:55 ~	顧 伊晨 神経活動を感知するミクログリアのメカニズム解明	31
12:10 ~	濱田 千晴 自閉症責任遺伝子 USP15 によるシナプス形成の制御	32
13:15 ~	小林 祐介 嫌気・微好気性鞭毛虫の系統メタモナスにおける解糖系関連酵素の進化	33
13:30 ~	小林 彩子 大規模欠失突然変異型 mtDNA を導入したマウス骨格筋の萎縮における炎症性反応の関与の有無	34
13:45 ~	松浦 佑実子 点突然変異型 mtDNA が骨格筋タンパク質の分解・合成に及ぼす影響の解析	35
14:00 ~	田中 海帆 レチナール類似体により長波長シフトさせたチャネルロドプシンの電気生理学的解析	36
14:15 ~	西岡 悠輝 セサミン代謝微生物に関する研究	37
14:30 ~	常陸 カイル 脂溶性ビタミン代謝微生物の探索	38
15:00 ~	松室 康平 水溶性ビタミン代謝微生物に関する研究	39
15:15 ~	小綿 慧莉 フラボノイド代謝腸内細菌に関する研究	40
15:30 ~	河股 純仁 土壌細菌が生産する黒色物質に関する研究	41
15:45 ~	JIAN PU 植物由来アルカロイド代謝微生物に関する研究	42
16:00 ~	川村 風太 ゲノム刷り込みに関わる DNA 結合タンパク質の探索	43

第三会場 2C404 教室

9:40 ~	山下 遼 ゲノム編集によるアサガオ矮性小型品種の分子育種	44
9:55 ~	山内 花菜 2 遺伝子同時ゲノム編集による枝垂れ・花卉老化遅延アサガオの作出	45
10:10 ~	大野 唯 光周性花成誘導におけるアサガオ <i>CONSTANS</i> 遺伝子の役割	46
10:25 ~	松村 康平 イネとタイヌビエ由来除草剤代謝酵素遺伝子 <i>CYP81A</i> の大腸菌発現系の構築	47
10:40 ~	松崎 奏 アイスプラント由来 RBP 遺伝子の導入によるジャガイモの耐塩性強化の試み	48
11:10 ~	吉川 樹 木質バイオマス改変に向けた <i>Lac-CBD</i> 融合遺伝子導入ポプラの作出	49
11:25 ~	石塚 結希乃 バクテリアとの混合培養による好熱性シアノバクテリアの細胞凝集に関する研究	50
11:40 ~	中川 朔良 緑藻 <i>Monoraphidium nelgectum</i> の細胞形態と Ca^{2+} の関係についての研究	51
11:55 ~	蔡 一涵 ブナ老齢林におけるササ群落の GPP 推定：林床のササの役割とは？	52
12:10 ~	板鼻 大樹 小笠原諸島西之島における未発達土壌の微生物活性および理化学性	53
13:15 ~	米田 陸 2000 年に噴火した三宅島における約 20 年後の土壌呼吸：7 年間でどう変化したのか？	54
13:30 ~	桜井 貴仁 菅生沼におけるオオブタクサとオギの群落構造と物質生産の比較	55
13:45 ~	長谷部 有紀 ホソミオツネトンボの可逆的体色変化 - 青色と褐色の異なる役割 -	56
14:00 ~	三谷 郁佳 一過的タンパク質発現システムを用いたスギ花粉アレルギーの収量向上に関する研究	57
14:15 ~	斎藤 大夢 イネを用いた細胞壁への蓄積によるアルミニウム毒性作用機序機構の解明	58
14:30 ~	矢野 優貴 海洋酸性化がカサガイ群集に与える影響	59
15:00 ~	小井土 凜々子 日本におけるツキノワグマ (<i>Ursus thibetanus</i>) の遺伝構造および集団動態の歴史～野生動物管理にむけて～ Genetic structure and demographic history of Asian black bear (<i>Ursus thibetanus</i>) in Japan: Implications for wildlife management	60
15:15 ~	赤池 真樹 福島県帰還困難地域におけるイワナの遺伝的多様性：その保全と管理の意味について Genetic diversity of white-spotted char in the Difficult-to-Return zones, Fukushima, Japan: Implications for conservation and population management	61
15:30 ~	平野 莉帆 ニホンカモシカとニホンジカの糞・食痕 DNA を用いた識別法についての再検討：カモシカは畑を荒らす犯人なのか？ Faecal and feeding scar DNA based identification of Japanese serow and sika deer: Is Japanese serow the culprit of crop damage?	62
15:45 ~	川本 晟司 高標高は多年生、低標高は一年生：ミヤマハタザオの生活史の遺伝的な違い	63
16:00 ~	坂本 浩輝 32 年間の菅平湿原の植生変化：土砂堆積と河道直線化の影響	64
16:15 ~	李 知彦 異なる昆虫から分離される腸内生キクセラ目菌類の宿主特異性の検討	65

第四会場 2C410 教室

9:40~	橋本 佳応 ショウジョウバエ侵害受容におけるストレスと下行性抑制機構の関係性	66
9:55~	桑原 舞衣 嫌悪記憶を指標としたショウジョウバエの痛み様感覚の検討	67
10:10~	岡本 遼太郎 JOKER 上下 ~本当の点は写真の中にある~	68
10:25~	八尾 晃史 Project Y ~空飛ぶメダカを追え~	69
10:40~	寺田 昂平 「浮気」するのはどんな虫? : イボタノキの訪花昆虫間における体表異種花粉率の比較	70
11:10~	栞原 良輔 茨城県から得られたババヤスデの分類学的検討 (倍脚綱: オビヤスデ目)	71
11:25~	中岡 陸 フサヤスデの頭部器官に関する新知見	72
11:40~	日高 達貴 生物多様性教材としてのスライドガラス沈水法の検討	73
11:55~	新中 健斗 系統特異的転写因子 Lopx のらせん卵割型発生における役割	74
12:10~	岩澤 遥 都市化が筑波山周辺域の中大型哺乳類に与える影響:カメラトラップ調査からみえるもの	75
13:15~	Levin Nina M. Evolution of mesoderm specification mechanism in echinoderms with insight from functional change of the <i>hesC</i> gene	76
13:30~	PARGAIEN MAITREYEE Investigating Developmental System Drift in germ-layer specification in the lamprey <i>Lethenteron camtschaticum</i>	77
13:45~	CHUNG YOUYEON Functional Analysis of Coenzyme A Disulfide Reductase in Thermo-Acidophilic Red Alga, <i>Galdieria sulphuraria</i>	78
14:00~	VAUGHAN JULIA KEIKO Taxonomic Study on a New Granofilosean Strain JV1801	79
14:15~	竹歳 桃芳 ナйкаイムチョウウズムシ <i>Praesagittifera naikaiensis</i> の共生藻は何か?	80
14:30~	南沢 季実香 赤くなるイカダモの利用可能性を探るための基礎研究	81
15:00~	柏木 志乃 <i>Goniomonas</i> 属の系統分類学的研究	82
15:15~	諸見里 怜奈 クロララクニオン藻のピレノイドの複製に関する研究	83
15:30~	曾山 紀瑛 カルシウム欠乏条件下のトマト果実形態変化における細胞壁構築制御機構の解析	84
15:45~	板野 愛都 塩ストレス下のトマト果実サイズ変化における細胞壁構築メカニズムの解析	85
16:00~	木田 朋宏 根の伸長とオーキシン応答におけるイネ細胞壁タンパク質 THRGP の機能解明	86
16:15~	佐藤 佑哉 イネ-いもち病病害応答におけるキシロオリゴ糖誘導抵抗性反応機構の解析	87

令和元年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

川本 晟司

金谷 彩

岸田 雄真

古賀 結花

小林 永歩

高田 一成

照屋 林一郎

富田 溪斗

野口 瑞穂

長谷川 咲希

森山 直人

矢野 朱華

若島 朋幸

渡邊 瑛

表紙画

松浦 佑実子

表紙画の解説：

テーマは「Biol」です。生物学類と学士、2つの英語表記の頭文字にかけたBをモチーフに、縁あり筑波に集った仲間の未来が豊かに彩られていくよう願いを込めてデザインしました。お声がけくださった先生、制作にあたって助言してくださったみなさま、この場を借りて御礼申し上げます。

令和元年度卒業研究発表会要旨の巻頭にあたって

川本 晟司 (筑波大学 生物学類)

卒業研究発表会は、生物学類の集大成といっても過言ではない素晴らしい会です。私たちは講義や実習を通して大学4年間で生物について学び、そしてこの4年生の時期を卒業研究のために費やしました。その費やした時間を、努力を、ともに歩ませてもらった皆さんの前で発表することができることを本当にうれしく思います。

1年生で習った『基礎生物学実験』に私はとても衝撃を受けたことを覚えています。スケッチの細かさ、実験段取りの複雑さ、データ収集の膨大さ等、どれをとっても私には高等で新鮮で、そして実験や実習とはこんなにも楽しいものなのだと興奮し、そのような環境に自分が居ることに満足感を得ていました。1年生で基礎的な実験や講義を学び、2、3年生になってより専門的な生物知識を収集した私たちはそれを生かして研究に臨みました。しかしその3年間で積み上げてきたものではとても足りないほど、研究は大変なものとなりました。実験が思うようにいかない、結果が自分の想定通りにならない、期限までに間に合うか分からないなど様々な苦しみを4年生は体験してきたのではないのでしょうか。その苦しみも素晴らしい結果が出たときの喜びも一緒に合わせて、自身の成果をこの発表会にぶつけてほしいと思っております。

卒業研究発表委員会に私は2年生から所属していたのですが、その時は具体的なものが何も見えないまま、先輩に先導されて仕事をこなしていました。そして委員会では中心的な3年生になり、

当時の3年生の皆さんや先生方からの支えを受けながら、発表会の運営をつつがなく終えることができました。その時私は4年生の発表が良いものであることが、より発表会を内容の濃いものに行うことができると感じました。その役目を今年私たちが引き受けることになり、後輩に向けて卒業研究について正確に知ってもらうため、4年生は発表に真摯に向き合ってください。

2年生の皆さんにはこの発表を通して今後自分がどのような研究をしたいか、どの研究室に入りたいかを考えるいい機会になれば幸いです。そして3年生の皆さんには来年度の自身の研究の参考になる発表会となることを期待しております。またこの卒業研究発表会の準備・運営をしていただいたこと、心より感謝しています。そして、指導教員の方々にはこの1年間私たちの研究を支え、この発表会まで私たちの研究を導いてくださったこと、本当にありがとうございました。重ねてこの場で感謝の意を述べさせていただきます。

最後になりますが、多くのことを経験し過ごしてきたこの大学4年間の糧に、私たちは卒業します。お世話になった方々の思いを背負いながら様々な進路で活躍していくことを心に決め、歩みだしていこうと思っております。

Communicated by Jun Furukawa, Received December 23, 2019.

香り物質によるホルモン代謝作用の解析

田中 萌奈（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】

アロマオイルはストレス緩和やリラックス効果がありアロマセラピーやフレグランスとして一般に広く利用されているが、それらの具体的な生理作用の科学的研究は十分ではない。本研究室ではアロマオイルの香り刺激が線虫のストレスホルモンの代謝にどのように作用するか解析した先行研究がある（久保、修士論文、2018）。

ストレスホルモンとはコルチゾールやコルチコステロンなどの糖質コルチコイドのことで、特にコルチゾールは抗ストレス作用があり、その分泌がストレスと関係することからストレスのバイオマーカーとなっている。哺乳類において糖質コルチコイドは、コルチゾンからコルチゾール、コルチゾールからコルチコステロンへと代謝される。先行研究で、線虫にも同様な代謝系が存在することがわかっている（久保、修士論文、2018）。また、アロマオイルの揮発性物質を線虫にさらすと、これらの代謝酵素を介してストレスホルモンの代謝量の変化が起こること、香り物質の種類によって代謝の度合いが異なるということが分かっている。そこで、本研究ではアロマオイルに含まれる単一の香り化学物質がストレスホルモンの代謝を変化させるかどうか解析を行った。

【材料・方法】

<モデル生物>

大腸菌 OP50 株を餌として与えて飼育した線虫 *C. elegans* Bristol (N2 株) を用いて実験を行った。

<同調処理>

発生段階をそろえるために、成虫になった線虫の表皮を次亜塩素酸ナトリウムで破碎し、得られた卵を S-basal で 18 時間培養した。

<ストレスホルモン>

Cortisone(SIGMA) (東京化成工業、東京、日本) は DMSO で 350 mM になるよう調整したものを -80°C で保存した。これを解凍し、LB medium 中の大腸菌 OP50 株、DMSO と混合して 7.5 mM になるようにした。調整した溶液を NGM プレートに塗布した。同調処理で得られた幼虫をこのプレートで培養した。

<香り物質投与>

香り物質として、Linalool(和光純薬、東京、日本)、Benzyl Acetate、Phytol、(1R)-(+)- α -Pinene、(1S)-(-)- α -Pinene (東京化成工業、東京、日本) を DMSO で 1% に希釈して使用した。線虫を 72 時間培養したプレートの裏蓋にろ紙を貼り、ろ紙に香り物質を塗布して、24 時間培養した。

<コルチゾール定量>

コルチゾールを定量するにあたり、Cortisol ELISA kit(Cayman Chemical, Michigan, USA)を使用した。香り物質を与えてから

24 時間後に線虫を破碎し、遠心分離にかけた後、その上清をサンプルとして使用した。各サンプルを 96well プレートに加え、そこに Cortisol AChE Tracert と Cortisol monoclonal antibody を加え、4°C で一晩反応させた。Well 中の液を除去し、洗浄後、Ellman's Reagent を加え、2 時間振とう後、412 nm で吸光度を測定した。

【結果】

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。

【考察と今後の展望】

代謝変化させる香り物質をピックアップして、その物質を中心に線虫のストレス耐性や脂肪蓄積、寿命に対する効果などの生理的作用を研究する予定である。また、コルチゾールからコルチコステロン、コルチゾンからコルチコステロンへの代謝に対する香り物質の効果についても解析を行う。先行研究でリナロールがインスリンシグナル経路に作用していることがわかっていることから、香り物質にさらしたときの線虫の遺伝子発現を調べ、香り物質がインスリンシグナル経路を含め、どの経路に作用しているか明らかにする予定である。

シヨウジョウバエ胚前極に異所的に形成された PGC 様細胞の性状解析

萩久保 朝香 (筑波大学 生物学類)

指導教員：小林 悟 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景・目的

シヨウジョウバエの初期胚の後極には生殖質と呼ばれる特殊な卵細胞質が局在している。生殖質を取り込む細胞は、始原生殖細胞 (PGC) と呼ばれ、卵や精子である生殖細胞に分化する。生殖質を胚の前極に移植すると、その細胞質を取り込んだ体細胞は PGC となり、生殖細胞に分化する能力を獲得する。このことから、生殖質中には、体細胞への分化を抑制し、生殖細胞への分化を活性化するために必要十分な母性因子が含まれていることが明らかである。体細胞分化に必要な遺伝子 (体細胞性遺伝子) の発現を抑制する生殖質中の母性因子として *Nanos*、*Polar granule component (Pgc)*、*Germ cell-less (Gcl)* タンパク質が、生殖細胞への分化に必要な遺伝子を活性化する母性因子として *Ovo* と *Mamo* タンパク質がこれまでに同定されている。しかし、これら 5 つの母性分子が生殖細胞形成に十分な働きを持つかどうかについては明らかになっていない。

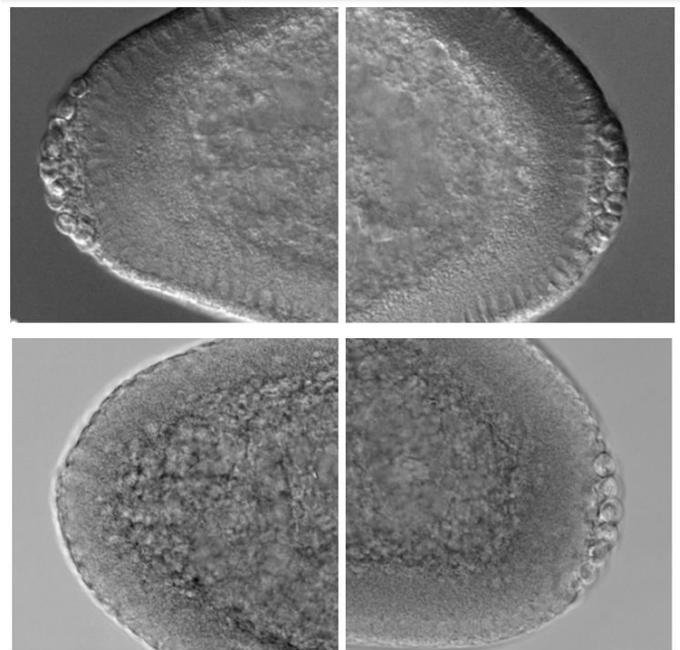
本研究では、この点を明らかにするため、生殖質に局在する母性 RNA の一つである *tao1* mRNA に注目した。*tao1* mRNA を異所的に胚の前極に局在させると、そこに PGC とよく似た形態の細胞が形成されることが報告されている。この前極に形成された PGC 様細胞は生殖質中の母性因子の一つである *Vasa* タンパク質を含まないため、生殖質を含まないと考えられている。そこで、この前極に形成された PGC 様細胞に上記の 5 つの母性因子を局在させ、その細胞が PGC と同じ性質を持つようになるか、さらに胚の後極に移植した時に生殖細胞に分化するかを調べることで、これらの母性因子が生殖細胞形成に十分であることを明らかにしようと考えた。その前段階として、本研究では、*tao1* により前極に形成される PGC 様細胞の性状を調べた。

方法

tao1 mRNA を前極に局在させることができる *tao1-bcd3' UTR* 遺伝子を Gal4-UAS システムを利用して卵母細胞中で発現させた。この卵母細胞に由来する胚 (*tao1* 胚) を PGC が形成されるステージ 3-5 まで発生させ、胚の前極に形成された PGC 様細胞を顕微鏡下で観察した。さらに、*in situ* hybridization 法および蛍光免疫染色法により、生殖質に局在する母性因子 (*Nanos*, *Pgc*, *Gcl* は、mRNA として生殖質に局在したのち、タンパク質に翻訳される) や *Bicoid (Bcd)* タンパク質が PGC 様細胞に含まれるか調べた。

結果

tao1-bcd3' UTR 系統は 6 系統存在する。これら 6 系統について、PGC 様細胞の形成率を調べ、最も PGC 様細胞形成率の高い 1 系統を選出した。しかし、その形成率は移植実験を行うためには低く不十分であった。そこで、Gal4 遺伝子のコピー数を 2 倍に増加することで、*tao1* mRNA の発現量を増加させ、PGC

図 1 上: *tao1* 胚の前極 (左) と後極 (右)下: 正常胚 (*yw* 胚) の前極 (左) と後極 (右)

様細胞の形成率を上昇させることを試みた。その結果、移植に十分な頻度 (約 80% の胚) で十分な数 (平均 7 個、最高 25 個) の PGC 様細胞を形成させることに成功した。次に、この条件下で、*nanos* mRNA、*pgc* mRNA、*gcl* mRNA、*Gcl* タンパク質の発現を調べた。これらはすべて、後極の PGC 中に検出されたが、前極に形成された PGC 様細胞中では検出されなかった。さらに、胚前方の体細胞のマーカである *Bcd* タンパク質がすべての PGC 様細胞中で発現することも明らかとなった。

考察

本研究では *tao1* mRNA により前極に形成された PGC 様細胞が、正常な PGC とは異なり、体細胞性遺伝子を発現抑制する母性因子をコードする *nanos*, *pgc*, *gcl* mRNA および *Gcl* タンパク質を含まないことが明らかとなった。さらにこれらの細胞は、前極の体細胞と同様に前方の体細胞マーカである *Bcd* タンパク質を含むことも明らかとなった。これらのことから、PGC 様細胞は PGC の性質を持たず、体細胞に近い性質を持つことが示唆される。今後は生殖細胞分化に必要な遺伝子を活性化させる母性因子 (*Ovo*, *Mamo*) についても同様に発現を調べた後、この PGC 様細胞に *Nanos*, *Pgc*, *Gcl*, *Ovo*, *Mamo* などの母性因子を局在させ、PGC 様細胞が生殖細胞に分化できるかを調べる予定である。

ショウジョウバエ始原生殖細胞における Gal4/UAS を用いた遺伝子強制発現の性差

増川 柁樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 悟 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景と目的

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, 以下ショウジョウバエ) において組織・細胞特異的な遺伝子強制発現系として、Gal4/UAS システムが広く用いられている。このシステムは、特定のプロモーター下に Gal4 配列を導入した系統と、Gal4 タンパク質の結合配列である UAS (Upstream Activation Sequence) の下流に遺伝子を導入した系統を用いる (図 1)。この二つの系統を交配することにより、次世代において組織・細胞特異的に Gal4 タンパク質が発現し、UAS 配列に結合することで UAS 配列下流の遺伝子を強制発現することができる。

これまでに UAS システムを作製するためのコンストラクトとして、3 種の UAS コンストラクト (UAS_t, UAS_{sp}, UAS_z) が知られており、これらの違いはプロモーター/5'UTR と 3'UTR である (図 1、表 1)。これらのうち、UAS_{sp} を用いて EGFP をショウジョウバエ始原生殖細胞 (PGC) で強制発現させた場合、胚発生期後期 (St. 16-17) のメス PGC に比べオス PGC で EGFP タンパク質の発現が高いことを示唆する結果が得られている¹。そこで本研究では、この結果を確認するとともに、他 2 種類の UAS コンストラクトを用いて生殖系列特異的に EGFP を発現させた場合に、発現の性差が観察されるかを明らかにする。

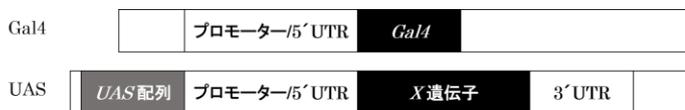


図 1 Gal4 コンストラクトと UAS コンストラクト

表 1 各コンストラクトの比較

コンストラクト	プロモーター/5'UTR	3'UTR
UAS _{sp}	P因子	K10
UAS _t	<i>Hsp70</i>	SV40
UAS _z	<i>Hsp70</i> の一部	P10

方法

・ UAS_t-EGFP 及び UAS_z-EGFP 系統の作製

UAS_{sp}-EGFP は特定の染色体上の位置 (86Fa) に挿入されている既存の系統を用いた。これと同様な位置に UAS_t-EGFP と UAS_z-EGFP を挿入した 2 系統を以下のように作製した。UAS_t-attB 及び UAS_z 1.0 ベクターを制限酵素処理し、PCR で増幅した EGFP 全長配列を挿入することで UAS_t-EGFP 及び UAS_z-EGFP コンストラクトを作製した。これらコンストラクトをショウジョウバエ初期胚 (86Fa 系統) にマイクロインジェクションし、attP-attB 間における部位特異的組換え反応により、特定の遺伝子座 (86Fa) に導入した。

・ Gal4/UAS システムによる EGFP 強制発現及び観察

UAS_{sp}-EGFP、UAS_t-EGFP、UAS_z-EGFP 系統および 86Fa

に挿入されていない既存の UAS_t-EGFP 系統 (既存 UAS_t-EGFP) のショウジョウバエオスと、生殖系列特異的に発現する Nanos 遺伝子のプロモーターで制御される Gal4 を持つ系統 (Nanos-Gal4 系統) のメスを交配し、次世代の生殖系列において EGFP を発現させた。胚は、4%PFA で固定し、EGFP タンパク質、生殖系列マーカーの Vasa タンパク質、及びメスマーカーの Sxl タンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

結果

各コンストラクトを用いた場合の PGC における EGFP タンパク質の発現量を調べた。その結果、UAS_{sp}-EGFP と UAS_z-EGFP 系統を用いた場合、胚発生ステージ 15-16 (St. 15-16) において、メスに比べてオス PGC で EGFP 発現が有意に高く観察された。一方、既存 UAS_t-EGFP 系統を用いた場合では、St. 15-16 において EGFP 発現の性差は観察されなかった。

これに対し、St. 14 では逆に、既存 UAS_t-EGFP 系統を用いた場合、メスに比べてオス PGC で EGFP 発現が有意に高いのに対し、UAS_{sp}-EGFP と UAS_z-EGFP 系統では、その性差が観察されなかった。

現在、UAS_t-EGFP からの EGFP 発現解析を行っており、既存 UAS_t-EGFP 系統からの発現と同様であるか確認する予定である。

考察と展望

本研究で、UAS_{sp} と UAS_z を用いて EGFP を強制発現させた場合、St. 15-16 の PGC において EGFP の発現に性差が観察されることが明らかになった。この性差は UAS_t を用いた強制発現では観察されないことから、各コンストラクト間で異なるプロモーター/5'UTR と 3'UTR 内の配列が性差に寄与すると考えられる (表 1)。一方、UAS_t を用いて EGFP を強制発現させた場合、St. 14 では、PGC における EGFP 発現の性差が観察されることが明らかになった。この性差は UAS_{sp} および UAS_z を用いた強制発現では観察されなかったことから、St. 14 と St. 15-16 では、性差を生み出す機構が異なり、St. 15-16 と St. 14 で観察された性差に寄与する配列は異なると考えている。今後は、これらの性差に寄与する配列を特定するために、プロモーター/5'UTR と 3'UTR を各コンストラクト間で入れ替えた改変コンストラクト系統を作製し、今回と同様の解析を行う予定である。また性差を生み出す配列を特定した後、その領域に既存の発現制御配列が存在するかを解析する予定である。

参考文献

1. 石崎優木. (2019). ショウジョウバエの始原生殖細胞における性特異的な遺伝子発現制御機構の解明. 修士論文.

ニジマスを用いた精原幹細胞濃縮法の開発 —代理親魚技術における移植の効率化を目指して—

海野 太一 (筑波大学 生物学類)

指導教員：林 誠 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【背景・目的】

ドナーとなる魚種の精原細胞を近縁種の孵化稚魚の腹腔に移植すると、一部の精原細胞のみが宿主の生殖腺に生着し、ドナー由来の機能的な配偶子を生産する¹。この技術は、代理親魚技術と呼ばれ、水産上有用な魚種の生産や、絶滅危惧種の保全に利用されている。しかし、精巣から分散した細胞（全精巣細胞）を、孵化稚魚腹腔に移植しても、一部の精原細胞しか生着しない。このため、代理親魚技術を多様な魚種へ応用し実用化するためには、全精巣細胞から精原細胞、特に高い生着能を有する精原細胞を濃縮し移植に用いることで、生着率を向上させることが必要不可欠である。そこで私は、生着能の高い細胞を濃縮する方法の開発を目指して研究を行ってきた。

これまでの研究から、宿主生殖腺へと生着した精原細胞は、生殖腺内で増殖し、継続して精子を生産し続けることから、精原幹細胞であると考えられてきた。実際、生着能の高い精原細胞は、組織幹細胞の特徴のひとつである Side population (SP) 中に濃縮されることが知られている²。SP とは、細胞膜透過性の蛍光色素で染色しフローサイトメーター (FCM) で解析することにより検出できる染色性の低い細胞集団である。先行研究において、生殖細胞特異的に GFP を発現する *vasa-GFP* 遺伝子導入ニジマスを用いることで、GFP 陽性の精原細胞中から SP を指標に、高い生着能を有する精原幹細胞を濃縮できることが報告されている²。しかし、SP のみを指標として、全精巣細胞から高い生着能を有する精原幹細胞を濃縮できるか否かは未だ明らかになっていない。そこで、そこで本研究では、SP のみを指標に、全精巣細胞から生着能の高い精原幹細胞の濃縮を試みた。

【方法】

・全精巣細胞の染色

材料には代理親魚技術が確立されているニジマスの野生型と、赤色蛍光タンパク質である DsRed を生殖細胞で特異的に発現する *vasa-DsRed* 遺伝子導入ニジマスを用いた。本研究では、まず SP を検出するための蛍光色素による染色条件の検討を試みた。蛍光色素にはマウス造血細胞で SP の検出に用いられた報告がある MitoTracker Green (MTG) を用いた³。マウス造血細胞の染色は、MTG 濃度 30 nM で 37°C にて 20–30 分間行われていた。しかし、冷水魚であるニジマスの細胞は 20°C を超えると死滅してしまう。そこで、温度を 16°C に下げ、染色時間を 45 分に設定し、MTG 濃度を 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 nM と変えて最適な染色条件を検討した。SP の表現型は、幹細胞の細胞膜上に存在する ATP-binding cassette (ABC) transporter の働きによることが報告されている。そこで、染色性の低い細胞集団が SP であるか否かを判別するために、ABC transporter の阻害剤である verapamil を染色時に終濃度 30 µg/mL で加えた。また、MTG 染色が生着率に影響を与えるか否かを検証するため、FCM に供する直前にヨウ化プロピジウム (PI) を終濃度 1 µg/mL で加えた。

・FCM による計測

各細胞の蛍光シグナルは、488 nm と 561 nm の sapphire laser 搭載の MoFlo XDP を用いて検出した。MTG の蛍光シグナルは 529/28 バンドパスフィルター、DsRed の蛍光シグナルは 579/16 バンドパスフィルター、PI の蛍光シグナルは 620/29 バンドパスフィルターにより検出した。SP 分画の設定は、染色時に verapamil を加えていない細胞と加えた細胞間での MTG 蛍光シグナル強度の比較をもとに行った。

・qRT-PCR

SP に生殖細胞が濃縮されているかを検証するため、体細胞マーカーとして *gonadal soma-derived growth factor (gsdf)*、*11-beta-hydroxylase (11β-hyd)*、*3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-hsd)* の発現量を、生殖細胞マーカーとして *vasa*、*dead end (dnd)* の発現量を q-RT-PCR により定量し、全精巣細胞と SP 細胞間で比較した。

【結果・考察】

全精巣細胞を MTG 濃度 200 nM で 45 分間染色を行うことにより SP が検出された。SP 細胞の割合は、全精巣細胞の 4.82±0.46% であった。この染色条件下で PI 陽性細胞の割合は増加しなかった。以上の結果から、魚類の精巣細胞においても、MTG を用いて、細胞の生存に影響を及ぼすことなく、SP を検出できることが明らかになった。先行研究では、SP の検出に Hoechst 33342 という別の蛍光色素が用いられたが、この色素の検出には UV レーザーを必要とする。一方、本研究で用いた MTG は一般に普及している 488 nm のレーザーで検出できるため、MTG を用いた SP の検出はより汎用性の高い方法であると考えられる。

次に、SP に生殖細胞が濃縮されているかを検証するため、*vasa-DsRed* 遺伝子導入ニジマスの全精巣細胞と SP 細胞間で生殖細胞の割合を比較した。その結果、全精巣細胞中の生殖細胞の割合 (36.57±2.76%) に比べて SP 細胞中の生殖細胞の割合 (76.57±2.93%; *P*-value < 0.01; Student's *t*-test) は有意に増加していた。さらに qRT-PCR の結果においても、SP 細胞では全精巣細胞に比べ、体細胞マーカーである *gsdf*、*11β-hyd*、*3β-hsd* の発現は著しく低下し、生殖細胞マーカーである *vasa*、*dnd* の発現は上昇していた。以上の結果から、SP に精原細胞が濃縮されていることが明らかになった。

今後、移植実験により、SP 細胞の宿主生殖腺への生着率が、全精巣細胞に比べ有意に上昇していることを確認することで、本研究で開発した「SP を指標とした生着能の高い精原幹細胞濃縮法」が代理親魚技術の効率化に大きく貢献することを示していきたい。

【参考文献】

1. Okutsu et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2725-2729 (2006).
2. Hayashi et al. *Biol Reprod* 91: 23 (2014).
3. de Almeida et al. *Cell Stem Cell* 21: 725-729 (2017).

ショウジョウバエ始原生殖細胞における母性 Ovo タンパク質下流遺伝子の解析

古賀 結花 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 林 誠 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【背景と目的】

世代を超えて命をつなぐために次世代を生み出すことは、多くの動物に共通した特質であり、これを担う唯一の細胞が生殖細胞である。このため、生殖細胞の形成機構は、進化的に保存されていると考えられてきた。実際に、Ovo タンパク質 (Ovo) と呼ばれる転写因子が、ショウジョウバエとマウスという進化的に異なる 2 種において、共通して生殖細胞の形成に必要であることが明らかになっている[1]。このことから、Ovo は動物間で共通した生殖細胞形成機構を解明するためのカギとなる分子だと考えられる。しかし、Ovo の機能を阻害すると、ショウジョウバエ、マウスともに生殖細胞が消失するため、その詳細な役割は明らかになっていない。そこで本研究では、ショウジョウバエを用いて、生殖細胞形成過程における Ovo の役割を明らかにすることを目指した。

ショウジョウバエでは、受精卵後極の特殊な細胞質 (生殖質) を取り込んだ細胞が始原生殖細胞 (PGC) となり、これが生殖細胞へ分化する。これまでに、生殖質中には、生殖細胞の形成に必要な十分な分子が含まれることが示唆されている[2]。Ovo は、生殖質に偏在し、胚期 PGC で高発現する遺伝子の転写を活性化することが明らかにされている[1]。したがって、Ovo は、生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化することで、PGC から卵や精子である生殖細胞への分化を引き起こしている可能性が考えられる。しかし、前述したように、Ovo の機能を阻害すると幼虫期に生殖細胞が消失するため[1]、Ovo が生殖細胞の分化過程においてどのような機能を果たしているかは明らかになっていない。そこで、本研究では、PGC において Ovo が転写を活性化する遺伝子 (Ovo 下流遺伝子) を同定し、その機能を解析することで、生殖細胞形成過程における Ovo の役割を明らかにすることを目指した。

【方法】

・胚期 PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子の同定

これまでに、マイクロアレイ解析により、Ovo が転写を活性化する遺伝子として 401 個の遺伝子が同定されている[1]。そこで本研究では、これらの遺伝子の発現パターンを解析することで、胚期 PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子を同定した。401 個の遺伝子のうち、233 個については、発現パターンがデータベース [BDGP *in situ* hybridization (ISH) database] 上に公開されていたため、この記載に基づき、後期胚の PGC で発現するものを選別した。一方、残りの 168 個については記載がなかったため、ISH 法による発現解析を試みた。ISH は、DIG ラベルした RNA プローブを使用し、yw 系統の後期胚で行った。プローブの検出は、anti-DIG-AP 抗体を用い、NBT/BCIP により発色させることで行った。

・RNAi 法を用いた、Ovo 下流遺伝子の機能解析

Gal4/UAS システムにより、Ovo 下流遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現することができる系統 (UAS-dsRNA 系統) を、Bloomington Drosophila Stock Center から譲り受けた。これら

の系統のオスに、生殖細胞特異的に Gal4 を発現する *nos-Gal4-VPI6* 系統のメスを交配し、生殖系列特異的に Ovo 下流遺伝子をノックダウン (KD) した個体を得た。KD 個体の表現型は、以下の点に着目して解析した。まず、羽化後 4 日の成虫を解剖し、生殖巣の形態を解析した。さらに、KD 個体に由来する卵や精子が機能的か否かを明らかにするために、KD 個体と正常個体である *yw* 系統を交配し、生み出された次世代の孵化率を計測した。

【結果と考察】

1. 胚期 PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子の同定

401 個の Ovo 下流遺伝子[1]のうち、発現パターンがデータベースに記載されている 233 個の遺伝子については、「gonad」もしくは「germ cell」の記載がある遺伝子を選別した。その結果、21 遺伝子が後期胚の PGC において発現しており、うち 5 遺伝子は PGC 特異的に発現していた。一方、発現パターンの解析が行われていない 168 個の遺伝子については、ISH 法による発現パターンの解析を試みた。発現解析にあたり、本研究室のマイクロアレイ解析のデータを用いて、PGC における発現量が高い (シグナル値が 8 以上) 54 個の遺伝子を選定した。このうちクローニングができた 37 遺伝子について、ISH 法により発現パターンを解析した。その結果、後期胚の PGC において 17 遺伝子が発現しており、うち 5 遺伝子は PGC 特異的に発現していた。

以上の結果より、後期胚の PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子を 38 個同定した。そのうちの 10 遺伝子は PGC 特異的に発現していた。

2. Ovo 下流遺伝子の機能解析

後期胚の PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子の機能を明らかにするために、これまでに、17 遺伝子の機能を生殖系列特異的に KD し表現型を解析した。その結果、KD することにより成虫の卵巣と精巣の退縮が観察される遺伝子を 4 遺伝子同定した。また、卵巣特異的に成熟卵の形成が阻害される遺伝子を 2 遺伝子同定した。これら 6 遺伝子は生殖系列の細胞の維持や、卵成熟に機能していることが示唆された。さらに、KD することにより次世代の孵化率が有意に低下する遺伝子を 9 遺伝子同定した。これら 9 遺伝子は、機能的な卵や精子の産生に機能していることが明らかになった。

以上より、Ovo は、これらの遺伝子の転写の活性化を介して、正常な卵や精子への分化に関与していると考えられる。今後、KD により表現型が観察された Ovo 下流遺伝子の機能をより詳細に解析するとともに、それらのオルソログがマウスの生殖細胞形成過程においても機能しているかを調べることで、進化的に保存された生殖細胞形成メカニズムの一端が明らかになると考えている。

【参考文献】

- Hayashi et al. 2017. Sci Rep. 7(1):40056.
- Illmensee and Mahowald. 1974. PNAS 71(4):1016-1020.

ショウジョウバエの幼若ホルモン合成器官に投射する神経細胞の探索

水野 陽介 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景・目的

生物が環境の変化に対応し生存するためには、様々な器官が適切に制御される必要がある。その機構を担う重要な生体分子がホルモンである。ホルモンとは、内分泌系にて合成・放出され、体液中を循環し、標的に働きかける物質である。

所属研究室が扱うキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を含む昆虫では、幼若ホルモン (Juvenile Hormone; 以下 JH) が様々な生理現象を制御している¹。JH は、成虫の脳近傍にあるアラタ体と呼ばれる内分泌器官において合成され、血中へ放出される。JH が成虫の生理現象に果たす役割については研究が進んでいる一方で、JH の合成・放出を制御するような外部からのシグナルについては未だ理解が乏しい。脳はアラタ体の近くに存在し、環境情報を統合する中枢であるので、脳からアラタ体への直接的な神経支配が存在すると考えられる。しかし、ショウジョウバエ成虫の脳からアラタ体へ直接投射する神経の記載は十分に進んでいない。そこで私は、成虫における脳からアラタ体に投射する神経を同定することを目的とした。

方法

(1) アラタ体投射神経の免疫組織化学染色

ショウジョウバエ成虫を phosphate-buffered saline (PBS) の中で解剖し、脳とアラタ体を取り出した。それらを 3.7%ホルムアルデヒド/PBS に入れ、45 分間室温で処理した。その後サンプルを PBS で 3 回洗浄したのち、0.3%PBT (PBS+0.3% TritonX-100) に入れ、15 分間置いた。次に、blocking solution (PBS with 0.3% TritonX-100 and 2% Bovine serum albumin) にサンプルを入れ、1 時間室温で処理した。続いて、一次抗体を blocking solution で希釈した溶液にサンプルを入れ、4°C暗所で一晩処理した。翌日、サンプルを PBS で 3 回洗浄したのち、0.3%PBT に入れ 15 分間置いた。その後、二次抗体を blocking solution で希釈した溶液にサンプルを入れ、室温暗所で 2 時間処理した。最後に PBS でサンプルを 3 回洗浄し、プレパラート上にマウントした。Alexa Flour 488 or 555 (1:200; Thermo Fisher Scientific) マウント処理のために、FlourSave (Merk Millipore) を用いた。

(2) GAL4-UAS システムを用いたアラタ体投射神経の標識

GAL4-UAS システムとは、酵母由来の転写因子 *GAL4* を特定のエンハンサーの制御下で発現させ、*GAL4* が結合する配列である UAS の下流に配置した遺伝子を発現させる手法である²。今回は、アラタ体投射神経で発現すると予測される *GAL4* システムとレポーター遺伝子である *GFP* を発現する UAS システムを掛け合わせて実験を行った。

(3) GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) 法を利用したアラタ体投射神経の上流の特定

GRASP 法は、神経のシナプス形成を可視化するための手法である³。まず蛍光物質である GFP を 2 つの spGFP に分け、それぞれの spGFP を膜結合タンパクとして別々の神経で発現させる。神経がシナプスを形成していた場合、2 つの spGFP は接近して結

合し、蛍光を発する。この手法を用いて、アラタ体投射神経と、その上流にあると予想される神経がシナプスを形成しているかどうかについて調べた。

結果・考察

所属研究室では、ショウジョウバエの幼虫において脳からアラタ体へと投射する神経を同定していた (井村英輔ら、未発表)。そこで私は、これらの神経で *GAL4* を発現するシステムを用いて、成虫においてもアラタ体投射神経が見られるかを確認した。免疫組織化学染色の結果、候補に挙がっていた系統のうち、3 つの系統にて成虫においてもアラタ体投射神経を確認することができた。

これら 3 系統のうち、上位の神経の推測が容易であるという理由から、*Dh44-R2* (*Diuretic hormone 44-Receptor 2*) のエンハンサー領域の一部によって *GAL4* の発現が制御されている系統に注目した。*Dh44-R2* は G タンパク質共役型受容体であり、神経ペプチド *Dh44* の受容体である⁴。*Dh44* はショウジョウバエにおいて多面的な役割を担う^{5,6,7}。上記のアラタ体投射神経は *Dh44-R2* を発現している可能性が高いので、その上位神経は *Dh44-R2* のリガンドである *Dh44* (*Diuretic hormone 44*) を産生する神経だと推測される。GRASP 法を用いて、*Dh44-R2-GAL4* でラベルされるアラタ体投射神経と *Dh44* 産生神経が接続しているかを検討したところ、これら 2 種の神経群の接続部位と予想される位置に GFP の蛍光が観察された。よって、これらの神経はシナプスを形成していることが示唆された。

今回の解析から、*Dh44* 産生神経から *Dh44R2* 神経、さらにアラタ体へとつながる一連の神経回路の存在が確認された。一方で、今回同定したアラタ体投射神経がどのような神経伝達物質を介してアラタ体を制御しているのか、また今回着目した神経の活性化により、アラタ体の機能がどのように変化するのかについては不明である。アラタ体の制御機構を解明する上で、上記 2 つの課題は非常に重要であると考えられる。

参考文献

1. Flatt, T., Tu, M.P., and Tatar, M., *BioEssays* (2005) 27, 999-1010.
2. Brand, H. A., and Perrimon, N., *Development* (1993) 118, 401-415.
3. Feinberg H. E., VanHoven, K M., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, D. R., Shen, K., and Bargmann, I. C., *Neuron* (2008) 57, 353-363.
4. Hector, C. E., Bretz, C. A., Zhao, Y., and Johnson, E. C., *Journal of Experimental Biology* (2009) 212, 3142-3147.
5. Chen, D. Y.C., and Dahanukar, A., *Cell Research* (2008) 28, 1048-1049.
6. C. E., Dornan, A. J., Halberg, K. A., Terhzaz, S., Dow, J. A. T., and Davies, S. A., *Peptide* (2016) 80, 96-107.
7. Lee, K.M., Daubnerová, I., Chung, J., and Kim, Y.J., *Current Biology* (2015) 25, 790-797.

ショウジョウバエの高糖耐性に影響を与える遺伝的要因と栄養的要因

阿部 真生子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【背景・目的】

動物の成長や生殖能力の獲得、そして生存には、栄養摂取が重要である。動物の栄養状態は、その動物が摂取可能な食物の種類に大きく依存する。いくつかの種は様々な食糧資源を摂取するジェネラリストであり、それ以外の種は限られた食糧資源を摂取するスペシャリストである。しかし、ジェネラリストあるいはスペシャリストの種が、それぞれどのように異なる栄養条件に適応していくのかについては、不明な点が多く残されている。この疑問の一端に答えるべく本研究では、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* とセイシェルショウジョウバエ *Drosophila sechellia* を用いて実験を行った。これらの2種は近縁種だが、その食性は大きく異なる。*D. melanogaster* はジェネラリストであり、様々な糖度の果物や野菜、腐生植物をエサとできる。これに対して、*D. sechellia* はスペシャリストであり、*Morinda citrifolia* という糖含有量の少ない植物のみを摂取する¹。そこで、これら2種のショウジョウバエ、および2種間の雑種個体を、8%グルコースを含む標準餌 (Standard-Diet, SD) あるいは30%グルコースを含む高糖餌 (High-Sugar-Diet, HSD) で飼育し、その際に個体寿命や血糖に及ぼす影響の種間差を調べた。また、これらの糖に対する反応性が、*M. citrifolia* の摂取によって変化するかどうかも合わせて検討した。さらに、糖に対する反応性の種間差に影響を与える遺伝的要因の解明を目指した。

【方法】

①グルコースエサおよび *M. citrifolia* 添加エサの作成

滅菌蒸留水 50 ml, コーンミール 4.5 g, 粉末寒天 0.5 g, 乾燥酵母 2 g, プロピオン酸 150 μ ml に対して、グルコースを 5 g 添加したものを SD (8%グルコース)、25 g 添加したものを HSD (30%グルコース) とした。また、*M. citrifolia* の粉末を終濃度 4.5% あるいは 8% で含む SD あるいは HSD も合わせて使用した。

② *D. melanogaster* と *D. sechellia* の F1 雑種成虫の作出

異種間雑種を作出するために未交尾の *D. melanogaster* メスと *D. sechellia* オスを交配した。交配して得られた F1 雑種個体を、幼虫期では 25 °C、蛹期では 17 °C、そして成虫期では 25 °C で飼育した。この温度変化によって、雑種の成虫への発生率が著しく高められるためである。

③寿命の測定

D. melanogaster と *D. sechellia*、および F1 雑種の幼虫を SD で飼育し、成虫への羽化後は SD あるいは HSD で飼育した。異なるグルコース濃度のエサ上で飼育している成虫の個体数を 2 日に 1 回カウントし、それぞれの生存率を求めて寿命の測定を行った。なお、寿命比較には生存率が 50 % になった時点の寿命を用いた。

④体液中グルコース濃度の測定

異なるグルコース濃度のエサで 7 日間飼育されたメス成虫を用いた。それぞれの成虫の胸部を虫ピンで刺し、遠心 (9,000 rpm, 4°C, 5 分) した。得られた体液中に Glucose oxidase/peroxidase

reagent (Sigma) と 6 M 硫酸溶液を添加し、プレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定した。吸光度の値を用いて体液糖度値を割り出した。

⑤ Df 系統を用いた責任遺伝子の探索

Df 系統は、染色体の特定の一部分が欠失している系統である。先行研究によって、欠失位置が正確に決定された欠失系統が多数樹立されており、それを 120 系統用いることで、*D. melanogaster* の常染色体領域を 80 % 近くカバーすることができる²。これらの Df 系統は京都ストックセンターより入手した。特定の Df 系統と *D. sechellia* 野生型個体を交配し、F1 雑種を得た。もし、雑種寿命および体液中グルコース濃度が *D. sechellia* に似ている場合、欠失領域に存在する *D. melanogaster* の遺伝子が糖に対する反応性に対して顕性 (優性) 的な影響を与えている可能性がある。

【結果・考察】

D. sechellia の HSD における寿命は *D. melanogaster* と比較して著しく短く、またこの際の体液中グルコース濃度は *D. sechellia* の方が顕著に高くなることが分かった。この結果を受けて、糖に対する反応性に顕性 (優性) 的に影響を与える遺伝子は 2 種のどちらに存在するのかを調べるために、2 種を交配させることで得られた雑種において同様の実験を行った。その結果、雑種において HSD 条件下での寿命と体液中グルコース濃度は、*D. melanogaster* のそれに似ることが明らかになった。よって、糖に対する反応性に顕性 (優性) 的に影響を与える遺伝子は *D. melanogaster* 側に存在すると考察した。

次に、*D. melanogaster* のどの染色体座位が糖に対する反応性に影響を与えているのかを解明するために、*D. melanogaster* の染色体を部分的に欠失した系統 (Df 系統) を用いて、*D. sechellia* との雑種の寿命測定と体液中グルコース濃度の測定を行った。しかし、Df 系統雑種を作出することはできたが、雑種にすることでほとんどの Df 系統雑種において寿命が減少してしまったため、Df 系統を用いることによる糖に対する反応性を決定付けている責任遺伝子群の解明は困難であることが分かった。

D. sechellia において HSD を与えると顕著な寿命減少が確認できたが、HSD に *M. citrifolia* の粉末を添加すると、寿命の顕著な延長を確認でき、体液中グルコース濃度は減少した。よって、遺伝的要因に加え、*M. citrifolia* 中の何らかの栄養素が *D. sechellia* の生活環に有益な効果を与えていると考えられる。

これらの実験結果から、遺伝的要因と栄養的要因の相互作用が近縁種の *Drosophila* 種において、糖に対する反応性の違いを生み出す要因となっていることが示唆された。

【参考文献】

1. Watanabe et al., 2019, Cell Reports 28, 2594-2607
2. Ryder et al. (2007) Genetics, 177: 615-629

ショウジョウバエのニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性に関する研究

清家 和樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景・目的

ネオニコチノイドはクロロニコチニル系殺虫剤の総称である。その昆虫殺虫活性の高さから、ネオニコチノイドは現代社会で最も使用されている殺虫剤の1つである。しかし近年になり、ネオニコチノイドはミツバチの大量死の原因と考えられるようになり、その使用の是非が世界的な問題になっている。それゆえ、ネオニコチノイドの適切な使用を検討する上で、その作用機序を正確に理解することは極めて重要な科学的課題である。

ネオニコチノイドは、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) のアゴニストとして作用する。この農薬を摂取した昆虫は nAChR にネオニコチノイドが結合し続けることにより、神経が活性化し続けるため死に至ると考えられている。より具体的には、ネオニコチノイドは、nAChR を形成するサブユニットである nAChR α 1 に物理的に結合して、チャネルとしての機能を活性化することが報告されている¹。また、nAChR α 1 機能欠損ショウジョウバエの幼虫は、ネオニコチノイドに対する耐性を示す²。これらの結果は、nAChR α 1 がネオニコチノイドの生体内における主要な標的であることを示唆する。

しかし一方で、所属研究室において近年、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、「ハエ」と略す) の nAChR α 1 機能欠損体のネオニコチノイドに対する耐性は、幼虫では認められるが成虫においては観察されないという予備的結果が得られた (吉成祐人ら、未発表)。そこで本研究では、この nAChR α 1 機能欠損個体と対照群個体に対してネオニコチノイドを摂取させた際の蛹化および成虫運動性を調べることで、ネオニコチノイドの作用における nAChR の意義について検討した。

方法

(1) ネオニコチノイド存在下でのハエ幼虫の蛹化率の検討

キイロショウジョウバエの系統は、標準的な酵母・コーンミール・寒天エサで飼育・維持した。nAChR α 1 機能欠損株として、所属研究室の吉成祐人氏によって樹立された系統 (未発表) を用いた。また本研究では、ネオニコチノイドとしてイミダクロプリド (CAS 138261-41-3 ; 近畿大学の松田一彦先生より分与) を用いた。

未交尾のハエ成虫のメスとオスを交尾させ、24 時間の間グレーププレートの上に産卵させた。孵化した第一齢虫を取り、2g のエサと 0 ppm、1 ppm、2ppm、4 ppm、10ppm イミダクロプリド溶液を混ぜて入れた小さなバイアルに 1 バイアル 20 匹ずつ幼虫を入れた。エサが乾燥しないように配慮した上で 25 °C 条件下でハエを飼育し、蛹化したハエの数を数えた。

(2) ネオニコチノイドのない条件下でのハエ成虫の運動性の測定

羽化後 5 日から 7 日間の間 25°C 条件下でオスとメスに分けて飼育した。CO₂ でハエに麻酔をして眠らせ、空バイアルに 10 匹ずつに分けて移した。バイアル内でハエが麻酔から完全に覚めてから、バイアルを叩いてハエを底面に落とし、その後バイアルの壁面を登っていく様子を 15 秒間ビデオカメラで撮影した。

(3) ネオニコチノイド滴下条件下でのハエの運動性の測定

前節(2)と同じバイアルに 1%寒天+5%スクロース溶液 1.5 ml を入れて固めた。終濃度が 0.1 mM になるように調製したイミダクロプリド溶液を 50 μ l 入れて、水分を飛ばすため 1 晩置いた。各バイアルに成虫を 10 匹ずつ入れて、バイアルに移してから 0 分、30 分、60 分、180 分後にバイアルを叩いて底面に落とし、その後バイアルを登るハエの動きを 15 秒間ビデオカメラで撮影した。

(4) ハエの運動性の解析

前節(2)および(3)の実験で得たデータを 2 つの観点から解析した。

i) バイアルの底面もしくは寒天溶液の上部から 7 cm のところに境界線を引き、その境界線に到達した個体数を解析した。

ii) ハエがバイアルの壁面にくっついて登ろうとしている個体数を解析した。

これらの 2 つの項目の解析にあたっては、バイアルを叩いてすべてのハエが底面に落ちたタイミングを 0 秒として、15 秒後の時点での当該個体数を数えた。

結果・考察

幼虫の蛹化実験から、対照群個体では 1ppm でもネオニコチノイドが存在すればほぼ全ての幼虫が蛹化しないのに対し、nAChR α 1 機能欠損個体では 10 ppm のネオニコチノイド存在下であっても蛹化した個体が見られた。このことから、先行研究²と同様、nAChR α 1 機能欠損幼虫はネオニコチノイドに対して耐性を持つことが示唆された。

成虫の運動性の実験では、nAChR α 1 機能欠損個体の運動性は、対照群個体と比べて有意に落ちていた。さらに、ネオニコチノイド存在下での運動機能は nAChR α 1 機能欠損個体と対照群において同様に運動性が低下しており、成虫では幼虫ほどの顕著なネオニコチノイドに対する耐性を認めなかった。以上の結果は、ネオニコチノイドが昆虫の成長段階によって作用する機構が変化している可能性をはじめて提示するものである。

今回の研究や先行研究¹では nAChR α 1 機能を完全に欠損した個体を用いたため、これらの変異株には nAChR α 1 が生体内にまったく存在しない。一方で、近畿大学の松田一彦教授らの研究から、ネオニコチノイドが結合するのに重要な nAChR α 1 のアミノ酸残基が幾つか同定されている³。今後、完全機能欠損個体ではなく、nAChR α 1 のネオニコチノイド相互作用アミノ酸に変異を持つハエ系統を用いて、ネオニコチノイドの作用に対する nAChR α 1 の成虫における必要性より詳細に調べる実験を計画している。

参考文献

1. Ihara, et al. (2003) *Neuropharmacology* 45, 133-144
2. Somers et al. (2017) *Genetics* 205, 263-271
3. Ihara et al. (2008) *Invert. Neurosci.* 8, 71-81

交尾刺激による腸の神経ペプチド放出のメカニズムの追究 ～ショウジョウバエを用いた解析～

金谷 彩 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景・目的

生物の生理状態は、個体外部からの情報や刺激に応じて柔軟に変化する。交尾はそうした外部刺激その1つであり、多くの動物において行動や生理状態が交尾により劇的に変化することが知られている。

2016年に所属研究室において、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) の成虫メスをを用いた研究から、交尾が卵子の元となる生殖幹細胞の数を増加させることを報告した¹。この過程は、オスの精液に含まれるペプチド Sex peptide がメスに受け渡されることから始まる。Sex peptide を受容したメスショウジョウバエにおいては、Sex peptide 受容体発現ニューロンを介した情報伝達の後、何らかのメカニズムを介して腸の分泌細胞からペプチドホルモン Neuropeptide F (以下 NPF) が放出される。そして、この腸由来 NPF が卵巣に存在する NPF 受容体を受容されることで、メス生殖幹細胞の増殖が促される²。しかし、交尾の情報がどのようにして神経系から腸から伝わり、NPF の放出を制御するのかについては不明である。

そこで私は、交尾の情報を腸 NPF 分泌細胞で受容するために必要な因子として、腸 NPF 細胞において発現する膜受容体に着目した。私は、先行研究によるメスショウジョウバエの腸を用いたトランスクリプトームの情報³から、腸 NPF 分泌細胞において強く発現する膜受容体遺伝子として *Dopamine/Ecdysteroid receptor* (*DopEcR*) を見出した。*DopEcR* は、ドーパミン、および昆虫ステロイドホルモンであるエクジステロイドを受容する、Gタンパク質共役受容体である⁴。また、所属研究室の研究において、交尾が卵巣でのエクジステロイドの産生を促進することが報告されている¹。これらのことから私は、「交尾により卵巣から放出されたエクジステロイドが、腸 NPF 分泌細胞に存在する *DopEcR* に受容されることで腸の NPF の放出を制御しているのではないか」という仮説を立て、研究を行なった。

方法

(1) 個体の飼育と交尾・解剖

羽化後 25°C で飼育したショウジョウバエのメス個体を用いた。羽化後 4~6 日目の間のメスを、野生型オス個体と 24 時間交配させた個体を「交尾後メス」とした。一方、オス個体を存在させずに同等の時間を経過させたメス個体を「未交尾メス」とした。交尾後メスと未交尾メスをそれぞれ解剖し、腸を摘出した。

(2) *DopEcR* ノックダウンの方法

DopEcR のノックダウンを組織特異的に行うために、異所的遺伝子発現系である GAL4-UAS システムを用いた⁵。本研究では、腸分泌細胞で特異的な GAL4 系統あるいは NPF 細胞において発現する GAL4 系統を、*UAS-DopEcR-RNAi* 系統とかけ合わせることで、*DopEcR* 遺伝子がノックダウンされたメス個体を得た。

(3) 腸 NPF の免疫組織化学染色

4%パラホルムアルデヒド/PBS で腸を固定した後、2%仔牛血清アルブミン/PBS でブロッキング処理した。腸分泌細胞の核と NPF を可視化するために、1次抗体として抗 Prospero 抗体 MR1A (マウス; Developmental Studies Hybridoma Bank より購入) と抗 NPF 抗体 (ウサギ; 所属研究室で作出) をそれぞれ用いた。その後、Alexa 蛍光標識 2次抗体を加え、染色した。

DopEcR の発現を確認するために、*DopEcR* 遺伝子領域の終始コドン手前に 2A-GALA 配列の挿入された *DopEcR-2A-GALA* 系統⁶を用いて、*GFP* を強制発現させた。*GFP* を明瞭に可視化するために1次抗体として抗 *GFP* 抗体 ab13970 (ニワトリ; Abcam より購入) を用いた。その後、Alexa 蛍光標識 2次抗体を加え、染色した。蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて撮影した。

(4) 腸内分泌細胞における NPF 量の定量

抗 NPF 抗体を用いた免疫化学像を LSM700 を用いて撮影し、腸内分泌細胞での NPF の蛍光強度を ImageJ を用いて定量した。

結果・考察

DopEcR-2A-GALA の発現は、中腸の腸分泌細胞で認められた。また、7~8割の細胞において抗 NPF 抗体のシグナルと *DopEcR-2A-GALA* によって誘導された *GFP* のシグナルがオーバーラップすることが分かった。次に、交尾後の NPF の放出に対する *DopEcR* の機能を評価するために *NPF*⁺細胞特異的に *DopEcR* をノックダウンした。その結果、*DopEcR* ノックダウン個体の腸分泌細胞において、コントロールと比べて NPF の放出が抑えられている傾向が見られた。このことから、*DopEcR* が交尾依存的な NPF の放出を促進している可能性が示唆された。

エクジステロイドは *DopEcR* を介して MAPK シグナリングを活性化する⁴。そこで、腸 NPF 分泌細胞で MAPK シグナリング活性化しているかを調べるために、下流である ERK の活性を抗リン酸化 ERK (pERK) 抗体を用いて観察した。その結果、抗 pERK 抗体のシグナルは腸分泌細胞において見られなかった。このことから、腸分泌細胞における *DopEcR* がエクジステロイドを受容することは支持されなかった。

本研究によって、交尾依存的な NPF 放出の制御に関わる因子として *DopEcR* が提示された。今後、*DopEcR* のもう1つのリガンドであるドーパミンに注目した解析を実施し、交尾がどのようにして *DopEcR* を介して NPF の放出を制御するかを明らかにする予定である。

参考文献

1. Ameku, et al. (2016) PLOS Genet 12(6), e1006123
2. Ameku et al. (2018) PLOS Biol 16(9), e2005004
3. Buchon et al. (2013) Cell Rep 3, 1725-1738.
4. Srivastava et al. (2005). J Neurosci 25(26), 6145-6155
5. Brand & Perrimon (1993) Development 118(2), 401-15
6. Diao & White (2012) Genetics 190(3), 1139-1144

個体発育におけるセロトニン生合成の役割

塩井 一馬 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 島田 裕子 (筑波大学 生命環境系)

《背景・目的》

セロトニンは、アミノ酸のトリプトファンから産生される生体アミンであり、神経伝達物質やホルモンとして重要な生理活性を持つ。昆虫から脊椎動物に至るまで、セロトニンが記憶学習・概日リズム・睡眠・摂食・社会行動・生殖を制御することは広く知られている。一方、動物の個体発育に果たす役割については、未解明な部分が多く残されている。

所属研究室では、モデル生物であるキロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、新規セロトニン産生神経 SEO_{PG} が、栄養を感知して脱皮ホルモン生合成器官である前胸腺 (prothoracic gland, PG) に投射することを見出した。脱皮ホルモンは、昆虫の脱皮や蛹化を制御し、発育の進行と成熟を司る。 SEO_{PG} 神経の機能を阻害すると、脱皮ホルモン生合成量が低下し、蛹化のタイミングが遅れたことから、セロトニンが脱皮ホルモン生合成を調節することで、個体発育に関与する可能性が示された。

この可能性を検証する目的で、2つのセロトニン生合成酵素遺伝子 *TRH* と *Henna* の完全機能欠失変異体が作製された。予想外なことに、*TRH* と *Henna* の完全機能欠失変異体、およびダブル変異体は蛹化し、成虫まで発育した。そこで本研究では、これらの変異体の発育過程を詳細に解析することで、セロトニンが脱皮ホルモン生合成調節と個体発育に果たす役割を追究した。

《方法》

・蛹化タイミングの測定

野生型ならびに変異体の1齢幼虫を通常栄養条件・25°Cにおいて飼育し、孵化後7日間で蛹化した数を1日2回カウントした。

・蛹サイズの測定

蛹を実体顕微鏡付カメラで撮影し、その画像をImageJを用いて解析した。

・*Henna-GALA* 系統の作製

Henna 遺伝子上流のプロモーター領域 1169 kb をクローニングし、*GALA* 遺伝子上流に挿入したプラスミドを作製した。そして、*Henna* プロモーター領域の支配下で *GALA* が発現するトランスジェニック系統を作製した。

・免疫組織化学染色法

3齢幼虫をリン酸緩衝液中で解剖し、脳神経系組織を3.7%ホルムアルデヒド溶液で固定した。固定後、試料を洗浄し、1次抗体あるいは2次抗体と共に振盪培養することで、標的タンパク質に蛍光標識を施した。試料は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 を用いて観察した。

《結果・考察》

まず、*TRH* と *Henna* の発現パターンを qRT-PCR によって調べた。先行研究と一致して *TRH* は主に脳神経系で発現しており、*Henna* は脂肪体で多く発現していたが、脳神経系でも少し発現していた。次に、共同研究によって、各変異体のセロトニン量を LC-MSMS 解析によって定量した結果、*TRH* 変異体ではセロ

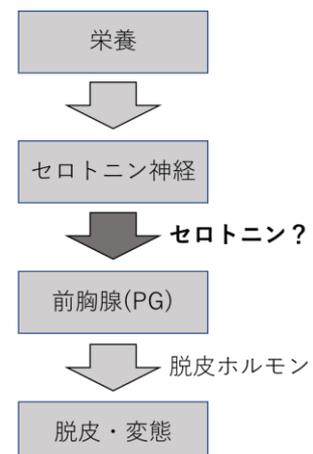
トニン量が劇的に減少するのに対して、*Henna* 変異体ではセロトニン量がほとんど減少せず、代わりにチロシン量が顕著に減少することがわかった。これは、*Henna* がフェニルアラニンからチロシンを生合成する活性を持つことと一致する。さらに予想外なことに、*TRH* と *Henna* のダブル変異体では、セロトニンに加えて、ドーパミンも劇的に減少した。

これらの結果を踏まえた上で、*TRH* と *Henna* の完全機能欠失変異体、およびダブル変異体の蛹化タイミングと蛹サイズを測定した。その結果、セロトニンが欠乏している *TRH* 変異体の蛹化タイミングは、コントロールとほぼ同じであった。それに対して、*Henna* 変異体とダブル変異体の蛹化タイミングは、コントロールと比較して約1~2日遅れた。また、蛹サイズは、*Henna* 変異体とダブル変異体でやや小さくなる傾向があった。以上の結果から、(1)セロトニン欠乏個体でも脱皮ホルモンは合成されること、(2)*Henna* が蛹化タイミングの調節に関与すること、が示唆された。

そこで、*Henna* が SEO_{PG} 神経でセロトニン生合成を担う可能性を検討するために、*Henna* 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、*GALA* 遺伝子上流に挿入したトランスジェニック系統を作製した。*Henna* プロモーターの支配下で GFP を発現させたところ、脳の少数の細胞群でシグナルが検出されたものの、 SEO_{PG} 神経を含む領域にシグナルは見られなかった。このことから、*Henna* は、 SEO_{PG} 以外の神経細胞あるいは末梢組織で働くことにより、個体発育に関与する可能性が支持された。

現在は、*Henna* 変異体の表現型がセロトニン欠乏の結果ではなく、チロシン欠乏や脱皮ホルモン生合成不全の結果である可能性を検証するために、セロトニン前駆体 5-HTP、チロシン、および脱皮ホルモンを摂食させる事により、表現型が回復するかどうかを検討中である。また、*Henna* 変異体のバックグラウンドで、*Henna* あるいは *TRH* を組織特異的に強制発現させる事で、蛹化タイミングの遅れが回復されるか調べることも予定している。

本研究により、シヨウジョウバエの個体発育において、*TRH* の働きによって合成されるセロトニンではなく、*Henna* によって合成されるセロトニン、あるいはアミノ酸代謝産物が関与するという新しい可能性が見出された。



イモリの再生を解析するための新たな条件付き遺伝子発現系の開発

越後谷 知樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 親文 (筑波大学 生命環境系)

【導入】

四肢動物は一般に、水生期 (胚や幼生、胎児として水中で生活する時期) には高い再生能力をもつが、陸生期 (変態後や孵化後、出生後に陸地環境で生活する時期) になるとその能力は著しく減退する。一方、有尾両生類のイモリ (newt) は例外的に、陸生期においても、年齢に関わらず (すなわち歳をとっても) 何度でも繰り返し再生が可能である。こうしたイモリの再生メカニズムを理解するにあたって、外傷後の細胞の挙動を蛍光によって追跡し、その遺伝子機能を制御できるトランスジェニック (TG)イモリは有用である。私が所属する研究室は、I-scelメガヌクレアーゼ法により、アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) のゲノムにタモキシフェン誘導型 Cre-loxP システムを導入することで、変態後の成体において、網膜色素上皮(RPE)細胞や筋繊維 (筋細胞) などを追跡し制御する TG イモリを作製してきた実績がある。しかし、この技術は TG 個体の作製効率の点でまだまだ改良する余地がある。そこで本研究では、TG イモリの作製効率の向上を目指し、新規ベクターの開発に取り組んだ。今回私が開発したベクターは、アカハライモリのみならず他の様々な動物においても、タモキシフェン誘導型 Cre-loxP システムを導入した遺伝子改変個体の作製効率を大幅に向上させることが期待できる。詳しくは発表会の場で報告する。

C型レクチン受容体に対する新規のモノクローナル抗体の樹立

飯島 綾菜 (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]

C型レクチン受容体とは、カルシウム依存的に糖鎖に結合するタンパク質であり、外来微生物由来の糖鎖を認識することで微生物の食食、炎症性メディエーターの産生、ヘルパーT細胞の分化などを制御し、自然免疫及び獲得免疫応答を制御する[1]。さらに、死細胞やがん細胞などの宿主細胞上の糖鎖を認識して免疫応答を制御し、生体内恒常性の維持に寄与している[2,3]。

本研究ではC型レクチン受容体の一つである受容体Xに着目した。受容体Xは、その細胞内領域に免疫受容体抑制性チロシンモチーフをもつが、受容体Xの詳細な発現局在、及び免疫反応における機能は未だ不明である[4]。

[目的]

マウス受容体Xのタンパク質レベルでの発現局在を解析するため、マウス受容体X特異的モノクローナル抗体を樹立する。

[方法・結果]

(1) 抗受容体X抗体を産生するハイブリドーマの作製

免疫動物である受容体X遺伝子欠損(受容体X^{-/-})マウスに対し、受容体XとヒトIgG-Fc領域のキメラタンパク質(受容体X-Fc)を免疫した。初回免疫の3ヶ月後に脾細胞を採取し、ミエローマ細胞株SP2/0と融合させ、ハイブリドーマの選択培地であるHAT培地(hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium)で培養した。クローン化した2345種類のハイブリドーマの培養上清を用いて親細胞株(RMA)及び受容体X強制発現細胞株を染色し、抗受容体X抗体を産生するクローンを、フローサイトメトリー法によりスクリーニングした。その結果、1クローンが受容体Xへの結合性を示し(図1A)、それ以外の全クローンは示さなかった(図1B)。結合性を示したクローンをTX109と命名した。TX109ハイブリドーマをヌードマウスに腹腔内投与し、得られた腹水から抗体を精製した。

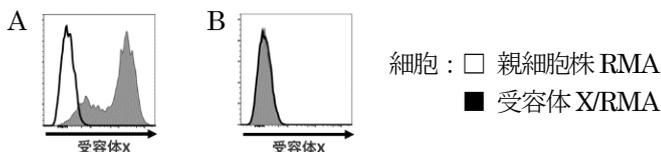


図1 抗受容体Xハイブリドーマのスクリーニング

(2) TX109抗体の特性の検証

①分子量の解析

SDS-PAGE法により、TX109抗体の分子量を非還元条件下及び還元条件下で解析した。その結果、TX109抗体は非還元条件下で約200 kDa、還元条件下で64 kDa及び30 kDaの分子量を示した(図2)。



図2 TX109抗体の分子量解析

② IgGアイソタイプの決定

受容体X強制発現細胞株をTX109抗体で一次染色し、各マウスIgGアイソタイプ(IgG1, 2a, 2b, 3, Igκ, Igλ)に結合する抗体で二次染色したのち、フローサイトメトリー法により二次抗体のTX109抗体への結合を解析した。IgG1(図3A)及びIgκ(図3B)に対する抗体のみがTX109抗体に結合したため、TX109抗体はIgG1抗体であり、κ鎖の軽鎖を持つことが示された。

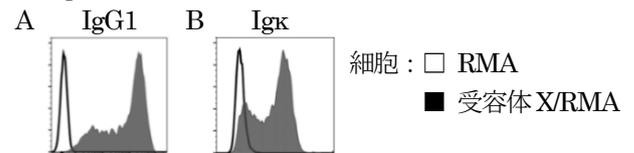


図3 TX109抗体のアイソタイプの決定

③ 受容体Xへの結合特異性の評価

受容体X、及び受容体Xとアミノ酸配列の相同性が高いC型レクチン受容体(受容体X, y, a, b)のヒトIgG-Fcキメラタンパク質を作製し、TX109抗体との結合をELISA法により解析したところ、TX109抗体は受容体Xにのみ用量依存的に結合した(図4)。

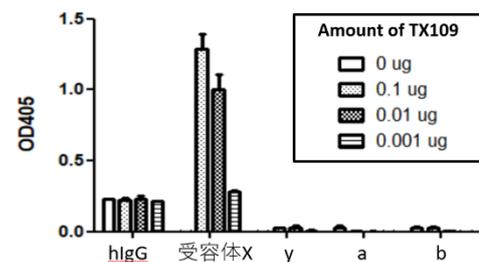


図4 ELISA法によるTX109抗体の結合特異性の評価

[考察]

本研究で得られた受容体Xに対する抗体を産生するクローンは一つだった。その他は抗体産生能を持たない、あるいは、Fc部分に対する抗体を産生するクローンであると考えられる。

TX109抗体が、還元条件下でのSDS-PAGEで64 kDaと30 kDaの分子量を示したのは、還元剤により重鎖と軽鎖間のジスルフィド結合が切断され、検出されたためと考えられる。

TX109抗体は受容体Xに特異的に結合したことから、TX109抗体によって認識されるエピトープは、受容体Xにのみ存在する構造であることが推測される。

[今後の予定]

TX109抗体を用いてマウスの様々な細胞での受容体Xの発現を解析し、受容体X発現細胞における受容体Xの機能を解析する。

[参考文献]

- [1] Nature Immunology Rev 13 (9), 817-22. (2012).
- [2] Immunity 52, 1-13. (2019).
- [3] Cancer Immuno Res 7 (2), 321-334. (2019).
- [4] J. Biol. Chem. 282, 22370-5. (2007).

MiR-126 and GAG are involved in HUVEC vascular network formation

佐々木 寛明 (筑波大学 生物学類)

指導教員：大井 雄一 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

心血管疾患は心臓や血管などの循環器の疾患を指し、高血圧、不整脈、心筋梗塞、脳卒中、動脈硬化症などが含まれる。世界保健機関の2017年の報告によると、2016年の世界の死亡者のうち、31%、数にして1790万人はこの心血管疾患が原因である。動脈硬化症にはいくつかの種類があるが、その1つにアテローム動脈硬化がある。肥満や過度な喫煙、アルコールが原因で、コレステロールなどからなる粥腫(アテローム)が血管内皮で隆起し、血管が狭窄した状況である。場合によっては血栓もでき、栄養や酸素の供給量を下げ、虚血性心疾患を引き起こすことがある。

このように動脈硬化によって虚血状態に陥った場合、血管近くの細胞がVEGF (Vascular endothelial growth factor = 血管内皮細胞増殖因子)を産生する。VEGFは血管新生を司る因子であり、受容した血管内皮細胞は移動、増殖、血管形成、成熟といった過程を経て血管新生を行う。その他の成長因子やケモカイン、miRNA (microRNA)なども血管新生を調節していることが知られている。血管新生に関わるケモカインの一種であるSDF-1 (Stromal cell-derived factor 1)は、CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12)としても知られ、CXCR4 (CXC chemokine receptor 4)やCXCR7が受容体である。CXCR4やCXCR7はシグナルカスケードによって血管新生を促進する。

先行研究により、細胞表面上に存在する直鎖状の多糖類である、GAG (Glycosaminoglycans)はCXCR4を補助していることが知られており、BDX (b-D-xyloside)という化学物質が、このGAGの伸長を阻害することも知られている。また、miRNAの1種、miR-126はPI3K/AKT/mTORシグナル伝達経路及び、MAPK/ERKシグナル伝達経路を負に調節することにより、虚血状態の血管内皮細胞内で血管新生の促進に関わっていることが知られている。

本研究ではGAGやmiR-126が血管新生とどのように関わっているかを調べる実験を行った。

【材料と方法】

HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell = ヒト臍帯静脈内皮細胞)を培養し、miR-126をトランスフェクションした。miR-126によるMAPK/ERKシグナル伝達経路への影響を調べるため、シグナル因子のSPRED1を対象にウェスタンブロットを行った。

また、BDXによりGAG伸長を阻害した場合の血管新生への影響を見るため、細胞培養の際にBDXで処理したHUVECと未処理のもので細胞遊走アッセイを行った。

同様に2種類のHUVECを用意し、平面における血管新生のイメージング解析を行った。

【結果・考察】

ウェスタンブロットでは、miR-126はSPRED1の量に変化を与えなかった。先行結果からは、miR-126はMAPK/ERKシグナル

伝達経路を調節するはずなので、今一度やり直す必要があると思われる。

細胞遊走アッセイでは、BDXによるGAGの伸長阻害が細胞遊走を促進した。細胞遊走アッセイでは、プラスチックの微細な穴を通り抜けるかどうかを調べる。細胞膜に存在する鎖状のGAGは、移動する上で摩擦を引き起こすため、BDX処理により摩擦が減った方が移動しやすかったと考えられる。

イメージング解析の結果(図1)、GAGが、平面における血管新生に必要なことが分かった。しかし、この実験はあくまでも平面上の話である。実際の血管新生は立体構造をとるので、立体構造を作れるような環境で実験することが必要である。

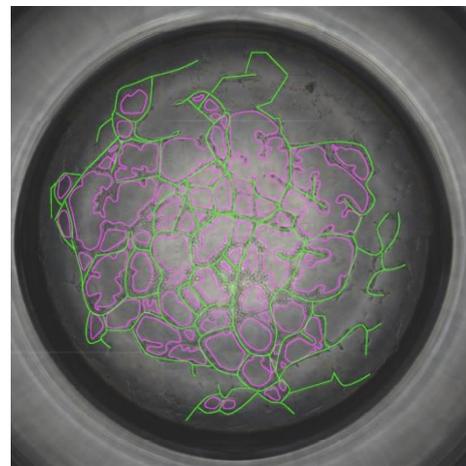


図1. イメージング解析の結果。ノードの数、細胞ネットワークの長さ、メッシュの数を測定した。BDXによる阻害がなければ、ネットワークが形成された。

バキュロウイルスを用いたインフルエンザウイルス抗原の発現

福島 誠生 (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】

インフルエンザウイルスは呼吸器疾患を引き起こす病原体で、国立感染症研究所によると日本国内だけでも毎年推定 1,000 万人が感染している。この感染の拡大や症状の重症化を抑えるために、現在まで多くのワクチンや抗ウイルス剤の開発が進められてきた。現行のワクチンは、インフルエンザウイルスのワクチン株を発育鶏卵に接種してウイルスを増殖させ、主要抗原であるヘマグルチニンタンパク質 (HA) を精製して生産されている。しかし、毎年、大量の発育鶏卵を準備することが必要であり、しかもワクチンは皮下注射により投与されるので感染防御に有効な IgA が誘導されにくいなどの問題もある。そこで、より簡便で有効なワクチンの開発が望まれている。そのためにはまず、大量の HA を生産し精製することが必要である。一方、インフルエンザウイルスのある亜型のウイルスでは、ワクチン株が発育鶏卵で増殖する過程でウイルスに変異が起こり、抗原性が変化し、ワクチンの有効性が低下することが報告されている。この抗原性変化を正しく評価するためには、ワクチンによって誘導される抗体が HA のどのエピトープを認識するかを解析することが重要であり、そのためには抗原抗体反応に用いる正しい構造を持った HA が大量に必要である。

本研究では、上記2つの課題にアプローチするためバキュロウイルスを用いて、インフルエンザウイルスの HA を大量に発現し、精製することを試みた。

【方法】

1. 組換えバキュロウイルスベクターの作製

新規ワクチンの候補となる抗原の作製には、インフルエンザウイルスの標準実験室株である A/PR/8/34 (H1N1) 株の HA 遺伝子を用いた。H1N1 株の HA の抗原性の強い頭部領域 (HA1) を選び C 末端に精製用 6×His タグを付与し、昆虫細胞に至適化した DNA を人工合成 (Eurofins) した。抗原性変化解析用抗原の作製には、近年流行株であるインフルエンザウイルス A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) 株を用いた。ウイルス粒子からウイルス RNA を精製し RT-PCR 法で cDNA を合成した。HA を分泌型にするため、C 末端側の膜貫通ドメインと細胞内ドメインを除去し、HA の 3 量体構造を保持するための T4 trimerization domain と精製用 6×His タグを挿入した。これらの配列をバキュロウイルスベクター pFastBac の *Bam*HI と *Not*I サイトの間に挿入し、大腸菌 (XL-1 blue) でクローニングし、Bac-to-Bac システム (Invitrogen) を用いて組換え Bacmid DNA を作製した。この Bacmid DNA を Miniprep Kit (QIAGEN) で精製し、Sf9 細胞にトランスフェクションして組換えバキュロウイルスを作製した。

2. Western blotting

組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞の培養上清と細胞溶解物を SDS-PAGE で展開し、メンブレンに転写した。転写後に Blocking One (nacalai) でブロッキングを行い、PBST で洗浄後、

ヒツジ抗 A/H1N1 標準血清または、ヒツジ抗 A/H3N2 標準血清を加えてそれぞれインキュベートした。PBST で洗浄後、Alexa680 標識ロバ抗ヒツジ IgG 血清を加えてインキュベートし、近赤外線イメージングシステム (ODYSSEY CLx, LI-COR) で蛍光を検出した。

3. 組換えタンパク質の大量調製

Sf9 細胞で増やした組換えバキュロウイルスを 100 ml の High Five 細胞に感染させ 28°C で旋回培養した。3 日後に培養上清を回収しアフィニティー担体 (Ni-NTA agarose, QIAGEN) で組換えタンパク質の精製を行い、限外濾過器 (Amicon ultra centrifugal filter unit, Millipore) で濃縮した。

【結果】

組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞の細胞溶解物と培養上清を Western blotting で検出したところ、細胞溶解物と上清の両方で H1N1 HA1 では約 50 kD のバンドが、H3N2 HA では約 80 kD のバンドが確認できた。

組換えバキュロウイルス感染 High Five 細胞と培養上清、His タグ精製後の濃縮したタンパク質を SDS-PAGE で展開したところ、同様のサイズの組換えタンパク質を検出できた。精製後の組換えタンパク質を CBB 法で定量したところ、H1N1 HA1 は 4.98 mg/ml、H3N2 HA は 2.53 mg/ml であった。従って、本研究で行った 100 ml での旋回培養から H1N1 HA1 が約 0.7 mg、H3N2 HA が約 0.5 mg 得られた。

【考察・今後の展望】

バキュロウイルスを用いて効率良く、H1N1 HA1 と H3N2 HA を生産することができた。SDS-PAGE におけるバンドの移動度から H1N1 HA1 と H3N2 HA が糖鎖修飾を受けていることも確認できた。本研究で生産した H1N1 HA1 と H3N2 HA は、それぞれの標準血清を用いた Western blotting で検出されたため、大まかな抗原性は保持されていることが確認できた。詳細な抗原性については、今後、モノクローナル抗体を用いて確認する予定である。

H1N1 HA1 については、免疫誘導を増強するためキャリアとなるタンパク質との結合を行う予定である。その後、H1N1 HA1 の免疫原性を確認するためマウスへの投与を行い、血清や気管支洗浄液での IgG と IgA の抗体価の測定を検討している。さらに、H1N1 HA1 を投与したマウスにおける感染防御能を確認するために H1N1 株による攻撃試験を行う予定である。

H3N2 HA については、抗原性変化の解析に用いるため、発育鶏卵で増殖した株と同様の変異を持つ HA の発現を行い、抗原性の確認を行うと共に、H3N2 ワクチン接種ヒト血清との反応性を調べる予定である。

コラーゲン分泌阻害剤ケミカルスクリーニング法の樹立

飯塚 美桜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

線維化とは組織にコラーゲンが過剰に蓄積する現象を指す。コラーゲンの蓄積は組織の構造を破壊し、臓器の機能を障害する。線維化を伴う疾患として間質性肺炎や肝硬変、慢性腎臓病などが知られているが、線維化の詳細な発症メカニズムは未だ解明されていない。それ以前にコラーゲンの分泌機構についても詳細は不明なままである。日本では現在、ピルフェニドンとニンテダニブが抗線維化薬として認可されている。しかしこれらは線維化の進行を遅らせるのみで組織を正常に戻すことはできず、臓器の機能を回復する方法は現時点では臓器移植しかない。線維化のメカニズムが未解明であることや効果的な抗線維化薬が見つかっていない理由として、コラーゲンの観察が困難であることが挙げられる。従来の方法では組織や培養細胞を固定し染色する必要があり、生細胞での経時的な観察はできなかった。

そこで当研究室では、コラーゲン分泌および線維形成を経時的に観察するためにV型コラーゲンにGFPを付加した新規コラーゲンプローブ(以下、CoIVG)を開発した。またプローブ遺伝子をマウスMC3T3-E1細胞およびBalb3T3細胞に導入し安定発現株を樹立している。これら細胞株は、通常培養ではV型コラーゲンが細胞内に蓄積し、線維は形成されなかったが、我々は特殊な培養方法である“分泌誘導培養”へ切り替えることでコラーゲンの分泌を誘導できることを見出した。現在ではこの培養方法によるコラーゲンの分泌から線維形成までの可視化に成功している。

本研究では、MC3T3-E1細胞CoIVG株およびBalb3T3細胞CoIVG株を用いて、効率よくコラーゲンの分泌阻害剤をスクリーニングする評価系の樹立を目的とし、既存の抗線維化薬の添加実験よりコラーゲンの分泌阻害現象のイメージングを試みた。

【材料・方法】

細胞

本研究ではあらかじめCoIVGを安定発現している2種類の細胞株を用いた。

A) MC3T3-E1細胞CoIVG株(MCCoIVG)

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞にCoIVGを導入した細胞株。

B) Balb3T3細胞CoIVG株(BalbCoIVG)

マウス胎仔由来線維芽細胞にCoIVGを導入した細胞株。

通常培養

MCCoIVGは、10%牛胎仔血清を含む α MEM培地、BalbCoIVGは、10%牛胎仔血清を含むMEM培地で、いずれも37°C、5%CO₂条件下で培養した。

分泌誘導培養

馴化培地は、MCCoIVGを25mL組織培養用ベントキャップタイプフラスコ(Falcon®)に播種して α MEM培地を満たし、37°C、5%CO₂の条件下で3週間培養したものを回収した。

MCCoIVGおよびBalbCoIVGがconfluentになった24-well plateから培地を除去し、各wellに α MEMまたはMEM培地を1.5mL、馴化培地を1.5mL加えて合計が3mLになるようにし

た。そして、37°C、12%O₂、5%CO₂条件下で培養した。分泌誘導培養へ切り替えた日をDay 0とした。

抗線維化薬

抗線維化作用をもつことが確認されている以下の3種類の薬剤を用いた。分泌誘導培養に切り替える際に培地に添加した。

・ピルフェニドン (Pirfenidone)

特発性肺線維症の治療薬である。TGF- β 産生阻害効果をもつ抗線維化薬である。

・ベルテポルフィン (Verteporfin)

Hippoシグナル経路におけるYAP阻害剤である。YAPはTGF- β シグナル伝達を制御することが知られている。

・ミノキシジル (Minoxidil)

コラーゲンの架橋に必要なリシルヒドロキシラーゼ1、2および3の阻害剤である。

細胞の撮影

撮影は両細胞株ともDay 0から約1か月間行った。蛍光顕微鏡撮影には、OLYMPUS IX73を用いた。緑色蛍光フィルターは、U-FGFP (OLYMPUS)、Ex: 470/20、Em: 518/45を使用した。

【結果】

コラーゲン分泌阻害効果

1. ピルフェニドン (Pirfenidone) 添加実験

100 μ g/mL、300 μ g/mLの2種類の濃度で実験した。MCCoIVGでは、300 μ g/mLにおいてのみ最終撮影日 (Day 28) までコラーゲン線維は観察されなかった。BalbCoIVG株では、無添加と同日にすべてのwellで線維形成の開始が観察されたが、薬剤を添加したwellでは線維の成長はあまり見られなかった。

2. ベルテポルフィン (Verteporfin) 添加実験

0.3 μ Mから10 μ Mまでの4段階の濃度で実験した。MCCoIVGでは、無添加ではDay 15にコラーゲン線維が観察され線維形成の開始および成長も観察されたが、薬剤を添加したwellでは最終撮影日 (Day 28) までコラーゲン線維は観察されなかった。BalbCoIVGでは、無添加と比較して7日遅れて線維形成の開始が観察されたが、線維の成長はあまり見られなかった。

3. ミノキシジル (Minoxidil) 添加実験

0.1 μ Mから10 μ Mまでは両細胞株において添加の効果が見られなかったが、MCCoIVGでは100 μ Mにおいてのみ最終撮影日 (Day 21) までコラーゲン線維は観察されなかった。BalbCoIVGでは、無添加と比較して3日遅れてコラーゲン線維が観察された。線維の成長は無添加と比較するとやや少なかった。

【考察・今後の展望】

結果より、コラーゲン分泌の有無またはその遅延、線維の成長の程度を観察することで薬剤のコラーゲン分泌阻害効果の評価が可能であることがわかった。今後は、ケミカルライブラリーから抗線維化薬を探索する実験を行う予定である。

目で見える悪性度—iRFP を用いた腫瘍随伴マクロファージの追跡—

鈴木 希愛 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

【背景】

がんの増殖には、がん細胞自身だけではなくそれらを取り巻く腫瘍微小環境が大きく関与している。特に、腫瘍微小環境の正常細胞の大部分を占めているマクロファージは、腫瘍随伴マクロファージ (Tumor Associated Macrophage, TAM) と呼ばれる。マクロファージは炎症促進型の M1 マクロファージと炎症抑制型の M2 マクロファージに大別されるが、TAM は M2 分極に傾いていることが知られている。M2 マクロファージは炎症の制御、炎症後の組織修復、寄生虫感染などに関与し、特に腫瘍組織に浸潤する TAM は血管新生の促進、抗腫瘍免疫の抑制によって腫瘍の進行を促進する。また、放射線治療や抗がん剤治療による効果を減少させることが知られ、TAM の浸潤密度が高いほど悪性度が高く、患者の予後が悪くなることが報告されている。近年の研究ではマクロファージの腫瘍への浸潤の阻止、または M2 分極への偏りを抑制することにより、治療効果を改善できる場合があることも報告されており、がん治療のターゲットとして注目されている。

near infrared fluorescent protein (iRFP) は励起波長を 690 nm、蛍光波長を 720 nm に持つ無毒の蛍光タンパク質である。生体で、水にもヘモグロビンにも吸収されにくい 650 nm から 900 nm の波長は光学的窓 (biological optical window) と呼ばれ、iRFP はこの範囲の中に波長特性を有する。

本研究では骨髄由来の細胞で iRFP を発現するキメラマウスを用いて、TAM の腫瘍への浸潤を経時的に観察することを目的に実験を行った。

【方法】

C57BL/6J マウスの、全身で発現する Cag プロモーターの下流に iRFP が組み込まれた iRFP Tg マウスを用いて実験を行った。このマウスの骨髄細胞を、X 線照射によって骨髄を破壊した野生型マウスに 5×10^6 細胞移植し、iRFP キメラマウスを得た。骨髄の定着を待ち、約 2 か月後にキメリズムチェック、5 か月後に肺がん細胞株 Lewis lung carcinoma (LLC) を 1×10^5 細胞皮下投与した。その後、12 日間 *in vivo* imaging system (IVIS) を用いてキメラマウスを撮影した。投与 14 日目に IVIS で撮影したマウスの腫瘍を取り出し、CD11b 抗体 (骨髄系マーカー)、CD204 抗体 (M2 マクロファージマーカー) を用いて FACS 解析を行った。この実験では、WT マウスに LLC 細胞を投与した個体をコントロールとして用いた (Fig. 1)。

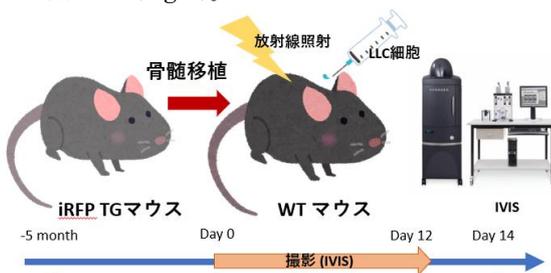


Fig.1 本研究の概要

【結果と考察】

IVIS での撮影で、腫瘍を投与した部位において iRFP の蛍光が経時的に強くなるのが観察された (Fig. 2)。また、FACS 解析の結果、iRFP キメラマウスでは CD11b⁺iRFP⁺細胞は 45.5 %であった。また、CD204⁺iRFP⁺の細胞は iRFP キメラマウスで 20.4 %であった (Fig. 3)。これらのことから iRFP キメラマウスでは、ドナー由来の M2 マクロファージを含む骨髄由来細胞が腫瘍に浸潤していることが示された。

これらの結果から、IVIS での観察で見られたキメラマウスにおける蛍光はドナー由来骨髄系細胞の腫瘍への浸潤によるものであると言える。この手法は将来的に、マウスを殺さず、経時的に腫瘍の悪性度を外部から確認する手法として有用であると考えられる。

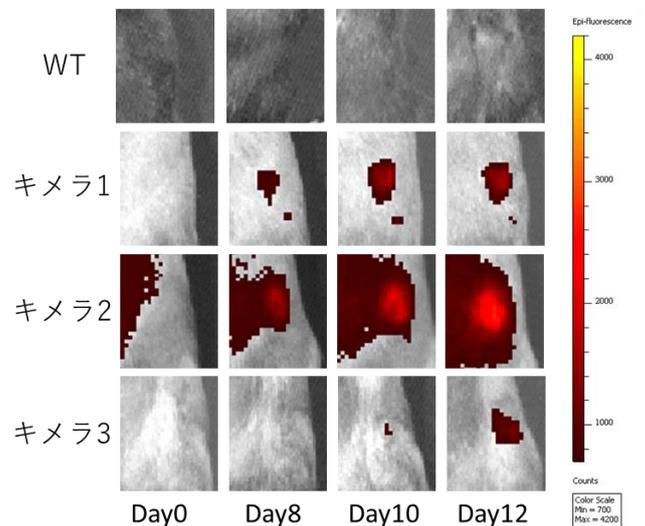


Fig.2 LLCを移植した部位の iRFP 蛍光
iRFP の蛍光は赤～黄色で示す。黄色に近づくほど蛍光が強い。

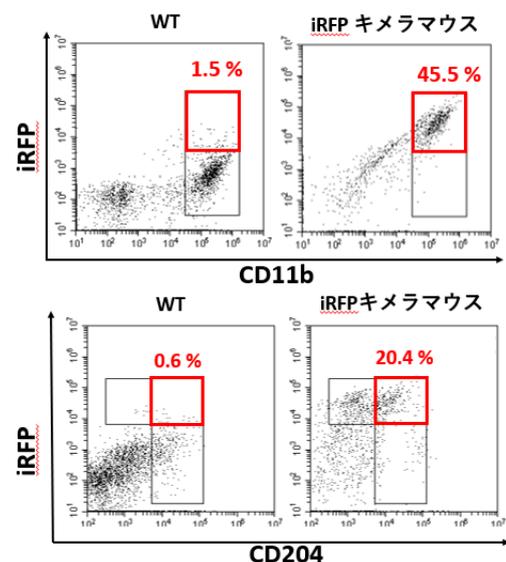


Fig.3 LLC 移植 14 日目の腫瘍の FACS 解析
左: WT 右: iRFP キメラマウス

レム睡眠の意義の解明に向けた生涯にわたってレム睡眠量の多いマウスの確立

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

【背景と目的】

睡眠は全ての動物に共通してみられる生存に必要不可欠な生理的行動である。しかし、睡眠のメカニズムや必要性の根拠に関しては、未だに十分な説明がなされていない。睡眠はレム (Rapid Eye Movement: REM) 睡眠とノンレム (non-REM) 睡眠という 2 つの睡眠段階にわけられる。レム睡眠は、覚醒に似た脳波状態、急速眼球運動や筋弛緩などの身体的変化を伴う特徴をもち、またこれは一部の脊椎動物のみにもみられる現象である。レム睡眠の機能については不明な点が多いが、その割合は幼児期に最も多く、加齢にしたがって減少するため、脳機能発達や加齢に伴う神経疾患との関連が示唆されている。

私の所属する研究室では、レム睡眠の生理的役割や進化的起源の解明を目的として、マウスを用いてレム睡眠を生み出す脳部位の同定・解析・操作を行っている。これまでに、当研究室の柏木らによって、脳幹に位置する SLD-Cre (+) ニューロンがレム睡眠を阻害するはたらきをもつことが明らかになった (柏木ら、投稿中)。さらにこのニューロン特異的にジフテリア毒素 (DTA) を発現させて細胞死を誘導することで、生涯にわたってレム睡眠を増加させることができると示唆された。

私はこの SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスがレム睡眠の機能的意義の研究に有用であると考えた。このマウスを研究へ活用するにあたり、検討すべき事項は 2 つある。第一に、マウスのサンプル数が不十分であるため、引き続き解析を行う必要がある。第二に、このマウスは与えるエサ種によって睡眠表現型の変化や体重の低下がみられるため、原因を特定する必要がある。SLD-Cre (+) 細胞は腸にも存在しており、原因のひとつとして、それらが細胞死を起こすことにより睡眠へ二次的な影響が生じている可能性が考えられる。

そこで、本研究では、SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスのサンプル数を十分に増やして睡眠解析を進めるとともに、脳での SLD-Cre (+) ニューロンに加えて腸でも SLD-Cre (+) 細胞が破壊されている可能性を検討することを目的とした。このマウスが確立されれば、レム睡眠の増加に関連した神経機能の若返り効果 (加齢に伴う成人病や認知症などの疾患の減少、若い時の高い学習能力の維持) の検討などへの活用も期待される。

【方法】

(1) SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスの作製

SLD-Cre (+) ニューロンを特異的に除去するため Cre/loxP システムを用いた。SLD-Cre マウスと Cre 依存的に神経においてジフテリア毒素 (DTA) 遺伝子を発現するマウス (NSE-loxp-stop-loxp-DTA) とを交配した。マウスは離乳後、ゲルタイプのエサを与えて飼育した。生後 10 週目にマウスの頭部には脳波測定及び筋電図測定用の電極を外科的手術により取り付けた。10 日間以上の回復期間の後に睡眠測定を行った。生後 12 週目から固形細断エサを与え、12 日間の馴化の後に再度睡

眠測定を行った。対象群として DTA 遺伝子のみをもつ Cre (-) のマウスを用いた。

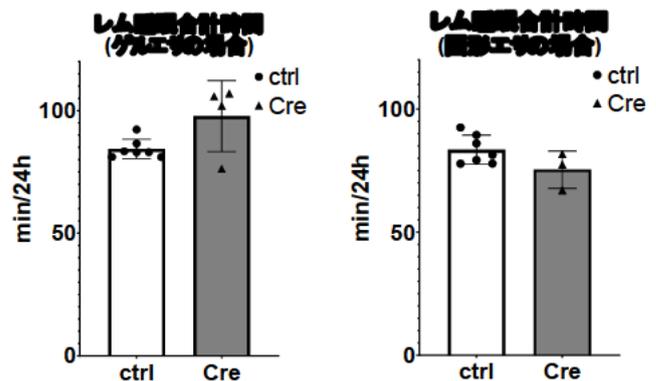
(2) SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスの睡眠の解析
マウスは 12 h ごとの明暗サイクルのもと、睡眠チャンバー内で飼育した。マウスは自由に飲水・摂餌が可能であった。睡眠測定は 48 h 実施した。記録された脳波と筋電図は 4 秒ごとのエポックで区切り、覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の 3 つの状態に振り分けた。また解析は遺伝子型のわからないよう、ブラインドで行った。

(3) 腸の mRNA の定量的逆転写 PCR

腸での SLD-Cre (+) 細胞が破壊されているかを確認するため、定量的逆転写 PCR (quantitative Reverse Transcription-PCR) を行った。今回、SLD-Cre (+) 細胞が多く存在するとされる小腸 (回腸) を対象とした。サンプルを採取し、液体窒素による急速凍結後、RNA 分離試薬を用いて RNA 抽出の後、イソプロパノール沈殿による精製を行った。RNA は電気泳動と吸光度測定によってクオリティチェックを行った。その後、逆転写によって cDNA を合成し、リアルタイム PCR を行った。

【結果】

(1) SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスの睡眠解析
睡眠解析の結果、SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスでは特に暗期での睡眠量の増加がみられた。またその変化はゲルタイプのエサを用いたときに著しく、固形細断エサではみられない。



(2) 腸の mRNA の定量的逆転写 PCR

qRT-PCR の結果、腸においても SLD-Cre (+) 細胞が一部のマウスで破壊されている可能性が示唆された。

【考察・展望】

今回の条件で飼育した SLD-Cre (+) ニューロンを破壊したマウスはエサ条件依存的にレム睡眠量の増加が示唆された。今後、さらに睡眠解析および qRT-PCR のサンプル数を増やして腸での影響をみると共に脳部位や発現時期などを限定することで詳細なメカニズムとレム増加の神経生理的影響を検討していきたい。

概日リズム制御タンパク質 BMAL1 の *in vivo* インタラクトーム解析

三村 明日香 (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】

多くの生物は環境の変化に適応するため、概日リズムという約 24 時間周期で生理現象を変動させる仕組みを持つ。概日リズムは各細胞に存在する時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループにより形成され、光刺激を受容する視交叉上核の働きにより全身のリズムが調律されている。このループでは転写因子 BMAL1 が核内で CLOCK と複合体を形成し、自らの活性を抑制する因子 (PER, CRY) の転写を促進することで概日リズムの波を生み出す。この BMAL1/CLOCK 複合体は様々な時計制御下遺伝子 (clock controlled gene; CCG) の転写も促進するため、CCG もリズムカルな遺伝子発現を示す。BMAL1/CLOCK を中心としたループが各細胞に存在する一方で、一部の CCG は組織特異的に発現する。この組織特異的な CCG の発現制御には BMAL1 以外の転写調節因子の関与が必要と考えられるが、各組織における BMAL1 の相互作用因子の違いは不明である。そこで本研究では、*in vivo* において BMAL1 相互作用タンパク質の網羅的解析を行い、組織特異的な BMAL1 相互作用因子の同定を目指す。

相互作用タンパク質の網羅的解析には、近位依存性ビオチン標識 (BioID) を利用する。本研究では BMAL1 に大腸菌由来ビオチンリガーゼ BirA* を融合させ、BMAL1 の近位に存在するタンパク質を不可逆的にビオチン標識する。ビオチン化タンパク質はアビジンを用いた精製の後に、質量分析によるタンパク質同定が可能である。BioID は弱いタンパク質間相互作用や、一時的な結合因子も検出できるため、新規の相互作用因子の発見が期待される。本研究では BMAL1-BirA*-HA tag (BMAL1-BioID) を発現するノックイン (KI) マウスを用い、BMAL1-BioID のビオチン化能の評価を行った。

【材料・方法】

○ 使用したマウス

CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス ROSA26 遺伝子座に、[CAG promoter-loxP-EGFP-polyA-loxP-BMAL1-BioID-polyA] の配列を相同組換えにより KI した (コントロールマウス)。このマウスの受精卵に Cre mRNA をエレクトロポレーションすることで EGFP-polyA を除き、BMAL1-BioID を全身で発現する BMAL1-BioID KI マウスを作製した。(図 1)

○ *in vivo* における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

2 ヶ月齢の BMAL1-BioID KI マウス に 1 日 1 回、ビオチン (19.2 mg/kg) を 7 日間皮下投与した後、脳、心臓、腎臓、肝臓からタンパク質を抽出し、Streptavidin-HRP (SA-HRP) を用いたウェスタンブロット解析により、ビオチン化タンパク質を検出した。

○ MEFs における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

胎生 14.5 日目の BMAL1-BioID KI マウスから線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblasts; MEFs) を作製し、ビオチン非添加、または添加 (終濃度 50 μM) の条件下で 24 時間培養後、タンパク質を抽出し SA-HRP、Anti-BMAL1 抗体、Anti-GAPDH 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

【結果】

○ *in vivo* における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

ウェスタンブロット解析の結果、BMAL1-BioID KI マウスの検査した組織の全てで、BMAL1-BioID タンパク質の発現を確認した。しかしビオチン投与後のそれら組織において、コントロールマウスと比較して、BMAL1-BioID KI マウスにおけるビオチン化タンパク質の蓄積は認められなかった。(data not shown)

○ MEFs における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

マウス個体においてビオチン化が認められなかったことから、初代培養系を用いて、BMAL1-BioID のビオチン化能の評価を行った。野生型 MEFs では、ビオチン添加によるビオチン化タンパク質の変化は認められなかった。一方で、BMAL1-BioID KI MEFs は BMAL1-BioID を発現しており、ビオチン添加によりビオチン化タンパク質の蓄積が認められた。(図 2)

【考察・展望】

BMAL1-BioID KI MEFs において、ビオチン添加によるビオチン化タンパク質の増加が認められたことから、KI した BMAL1-BioID はビオチン化能を有すると考えられる。しかし、24 時間のビオチン処理にも関わらず、ビオチン化の程度が弱いことから (図 2)、*in vivo* BioID assay では BMAL1-BioID のビオチン化能が不十分であると予想される。

in vivo における ID assay を可能とするには、ビオチン化効率の優れたビオチン化酵素の使用や、ビオチン投与における手法の改善が必要であると考えられる。

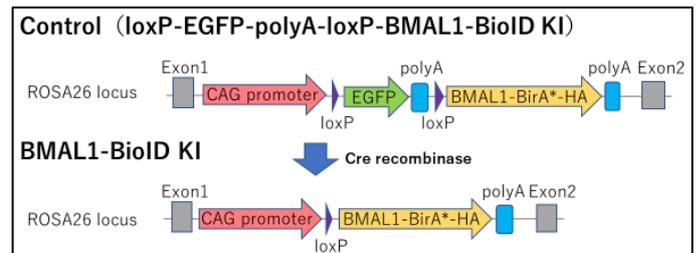


図 1. KI マウスの概略

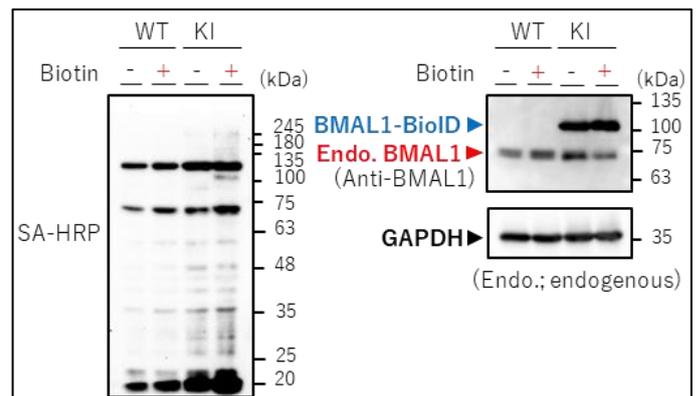


図 2. BMAL1-BioID KI MEFs のウェスタンブロット解析

香辛料由来の各種成分がもつ抗酸化能についてのゼブラフィッシュを用いた検討

渡邊 朝美 (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】

「酸化ストレス」とは、生体内で酸化・還元バランスが崩れて酸化に傾いた状態のことをいう。この状態ではタンパク質や脂質、DNAなどの分子が損傷を受けるため、がんや神経変性疾患、または炎症性疾患などの様々な生活習慣病に繋がる可能性がある¹⁾。少子高齢化時代における保険財政の問題と相まって、上記の疾患発症を未然に防ぐ効果的な予防法開発が求められている。その一つとして、近年、生活習慣病発症・進行の予防に抗酸化力をもつ食品摂取が推奨され、その有効成分についての研究が急速に進んでいる。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、酸化ストレス応答性転写因子の NF- κ B p45-related factor 2 (Nrf2) を介した強力な抗酸化能が認められている²⁾。そのため基礎研究に頻用されるだけでなく、サプリメントとしても実用化されている。香辛料由来成分のクルクミンやケルセチンなどについても、Nrf2 経路を介した抗酸化応答が働いていると報告された例は数多くある³⁾。しかしこうした研究のほとんどは培養細胞を用いたものであり、動物個体における抗酸化力を評価比較したものはあまり多くなく、そのため作用機序を遺伝学的に解析したものは非常に少ない。

この状況を打破するために、私が所属する研究室では、食品有効成分の解析モデル動物としてゼブラフィッシュの活用を試みている⁴⁾⁶⁾。最近、食品有効成分の抗酸化能を評価するアッセイ系をゼブラフィッシュ稚魚と 24 穴プレートを用いて確立し、香辛料由来の有効成分 10 種の動物個体における抗酸化能の比較評価に成功した (遠藤ら、未発表)。この解析では過酸化水素と亜ヒ酸という 2 種の酸化ストレス剤を用いたが、興味深いことにこの両者に対して効果のある有効成分種が異なっていた。

このことは各種食品成分毎に抗酸化能の特異性があることを示唆しており、酸化ストレス剤の種類を増やした解析を行う価値があると考えられた。そこで本研究では、新たな酸化ストレス剤として除草剤として利用されるパラコートと鎮痛剤成分として著名なアセトアミノフェンを活用し、これらに対する香辛料由来成分 10 種の保護的な効果を評価することを目的とした。

【方法】

生存率解析

第 1 段階では、最適な酸化ストレス剤 (パラコート及びアセトアミノフェン) 濃度を効果が既知であるスルフォラファンを活用して検討した。受精後 3.5 日で 40 μ M スルフォラファンを前処理した群と未処理の群を準備し、次に 12 時間後に酸化ストレス剤を 48 時間曝露し生存率を 12 時間毎に測定した。パラコート及びアセトアミノフェンの濃度はそれぞれ 3~7 mM、13~17 mM の範囲で調べた。スルフォラファン処理群と未処理群の生存率を比較することで、スルフォラファンの抗酸化活性が優位に検出できる酸化ストレス剤の最適濃度を決定した。

第 2 段階では香辛料由来の各種有効成分の最適濃度を決定した。有効成分としては、イソオイゲノール、オイゲノール、カプ

サイシン、カルノシン酸、6-ギンゲロール、クルクミン、ケルセチン、ジアリルトリスルフィド、シンナムアルデヒド、6-(メチルスルフィニル)ヘキシルイソチオシアネートの 10 種を用いた。受精後 3.5 日の稚魚に対して各成分を 1~125 μ M の範囲で 5 倍毎に振った濃度で 12 時間曝露させ、その後第 1 段階で決定した濃度の酸化ストレス剤を 48 時間曝露させ、生存率の向上を 12 時間毎に解析した。効果があった成分についてはより詳細に最適濃度を調べた。

第 3 段階では、Nrf2 ホモ変異体を用いて Nrf2 依存性を、第 2 段階において効果があると判断された成分のみで調べた。なお、酸化ストレス剤の濃度は第 1 段階で決定した濃度で、香辛料由来成分の濃度は第 2 段階で最適と判断された濃度を用いた。

ゼブラフィッシュ

第 1、第 2 段階では野生型 AB 系統を交配させて得られた稚魚を用いた。これらの稚魚は受精後 3.5 日の段階で 24 穴プレートの 1 つの穴に 8 匹ずつ移し替えた。薬剤を処理する際には、残った水をできる限り抜いてから薬剤を 400 μ l 入れ、それを抜いてから再度新しい薬剤を 500 μ l 入れることとした。第 3 段階では Nrf2 ホモ変異体成魚⁴⁾を交配させて得られた稚魚を用い、AB 系統と同様の方法で実験をした。

【結果・考察】

発表会当日に紹介予定である。

【参考文献】

- 1) Ruth *et al.* Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease, *Toxicol. Sci.*, 112:4-16, 2009
- 2) Thimmulappa *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray, *Cancer Res.*, 62:5196-5203, 2002
- 3) Qin & Hou. Multiple regulations of Keap1/Nrf2 system by dietary phytochemicals, *Mol. Nutr. Food Res.*, 60:1731-1755, 2016
- 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
- 6) Mukaigasa *et al.* Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115:2758-2763, 2018

Identification and functional analysis of novel proteins involved in retroviral silencing

Seminario Mondejar Gonzalo Alfredo (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)

Introduction

Retroviruses insert their genome into host chromosome during the life cycle and can alter the function of genes located near their insertion site. When retroviruses infect cells at the early stage of embryogenesis, they could cause even more extensive damage by affecting subsequent development of the embryo or by transmitting damages through further generations. To prevent these dire consequences, host cells have developed a defense mechanism, termed retroviral silencing, to suppress transcription of proviruses from both exogenous and endogenous retroviruses (ERVs), especially in cells at early embryogenesis. Retroviral silencing is recapitulated *in vitro* in pluripotent cells including embryonic stem cells (ESCs), embryonal carcinoma cells (ECCs) as well as induced pluripotent stem cells (iPSCs).

Retroviral silencing is believed to be a complex process, which involves DNA methylation and histone modifications. One important regulatory element for retroviral silencing is the primer-binding site (PBS), located near the 5' end of the retrovirus. PBS, a DNA sequence where proline tRNA binds to initiate reverse transcription, also assembles silencing-associated proteins that suppress expression of the provirus. Mutating the murine leukemia virus (MLV) PBS, to PBSQ, which binds glutamine tRNA, in a recombinant virus permits expression of the provirus in ECCs and ESCs.

Reprogramming of somatic cells to iPSCs requires drastic epigenetic changes, including silencing of endogenous and exogenous retroviruses. A recent study using a Sendai virus-based reprogramming system and insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) identified various candidate proteins for retroviral silencing, including two RNA-binding proteins, RBP-X and RBP-Y.

In this research, I will attempt to confirm the role of these novel proteins in retroviral silencing and elucidate their molecular mechanism.

Materials and Methods

Production of retrovirus

Kusabira-orange (hKO) expressing retroviruses were produced by transfection of the plasmid into PLAT-E packaging cells. Two different retroviruses, MLV(YY-PBS-hKO) and MLV(YY-PBSQ-hKO), were produced.

Induction of retroviral silencing by reprogramming

MEFs cells were transduced with the hKO-expressing retrovirus in the presence of 8 µg/mL polybrene and were selected with puromycin for two days.

Candidate genes were knocked down by siRNA transfection in the selected MEFs. Two days after transfection, the cells were infected with a Sendai virus vector encoding EGFP, KLF4, OCT4, SOX2 and c-MYC (SeVdp(GKOSM)) to reprogram

MEFs. One day after SeVdp infection, MEFs were passaged onto feeder cells and maintained at 37°C. FACS was performed at day 7 of reprogramming to measure the silencing index, which is a percentage of hKO-negative cells in the total population of SeVdp-infected cells (EGFP⁺ cells).

Retroviral silencing in ECCs

ECCs (F9 cells) were transfected with siRNA against each gene by lipofection. Two days after siRNA transfection, F9 cells were transduced with retrovirus 12 h after passage, followed by centrifuging at 1,500 x g for 40 min. The degree of silencing was observed by microscopy.

Results and Discussion

Involvement of RBP-X in silencing during reprogramming

MEFs were transfected with either control siRNA (siLuc) or siRNA targeting RBP-X (siRBP-X) before reprogramming. At day 7 of reprogramming, retroviral silencing was observed in over 80 percent of cells transfected with siLuc. By contrast, silencing was observed in only 40 percent of cells transfected with siRBP-X (Figure 1). This confirmed that RBP-X has a role in retroviral silencing.

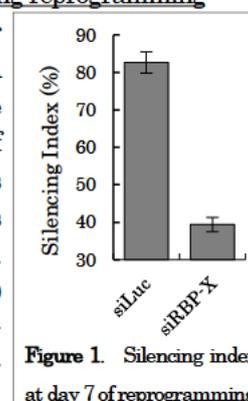


Figure 1. Silencing index at day 7 of reprogramming

Involvement of RBP-X and RBP-Y in silencing in ECCs

To confirm if RBP-X is also required for silencing in ECCs, silencing was assessed in F9 cells. In addition to siRBP-X, an siRNA targeting RBP-Y, which is complexed with RBP-X when binding RNA, was also transfected. Then, F9 cells were transduced with retrovirus harboring either PBS or PBSQ.

The PBS retrovirus was silenced right after infection, with no observable effect from siRNA transfection. However, I observed higher and transient expression from PBSQ retrovirus after siRBP-X or siRBP-Y transfection, as compared to the siLuc control. These results suggest that silencing consists of early and late phases, which are PBS-independent and PBS-dependent, and that RBP-X and RBP-Y have a role in the former one.

Future Plans

The goal of this research is to elucidate a more detailed molecular mechanism by which these two RNA binding proteins are involved in retroviral silencing.

To achieve this, I plan to develop a method to quantitatively assess the silencing induction in F9 cells by FACS for more detailed analyses. Then, I would like to overexpress RBP-X and RBP-Y proteins, as well as their deletion mutants, to investigate their molecular function on the silencing induction. As RBP-Y has two isoforms, I also plan to determine which isoform is involved in retroviral silencing.

NeedlEx-GC(/MS)[®]による薬毒物の一斉分析

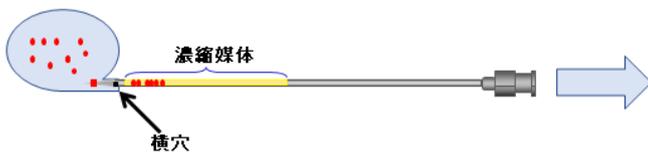
桜井 健祥 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 本田 克也 (筑波大学 医学医療系)

[背景・目的]

中毒原因や死因になり得る薬毒物の分析は法医学や臨床中毒学において重要であり、迅速な薬毒物の検出や定量が求められる。しかし、こうした薬毒物は多種多様かつ微量であることも多く、効率的な分析方法が必要とされている。

NeedlEx[®]とは濃縮媒体を内部に充填した注射針で、揮発性物質を効率よく濃縮できるGC(/MS)の前処理機材である(図1, 2)。SPME法などが静的ヘッドスペース法であるのに対し、NeedlEx[®]による濃縮法は動的ヘッドスペース法であり、ニードル内へと吸引された気相中の化学種が固相(濃縮媒体)に吸着することで抽出・濃縮を行う。

先行研究では、NeedlEx[®]を前処理に用いたGC(/MS)による一斉分析により鉱物油、芳香族化合物、覚せい剤、危険ドラッグ等の薬毒物を同一条件で検出できることが証明され、その有効性が示された。そこで、本研究では新たに医薬品や農薬について先行研究と同様に同一条件での分析を行い NeedlEx[®]の有効性を検討した。

図1 NeedlEx[®]の外観図2 NeedlEx[®]による濃縮の概略

[方法]

NeedlEx[®]による前処理は次のようにして行った。まずバイアルに試料を一定量溶解した水溶液を入れ、そのまま(無添加)、若しくは酸またはアルカリのいずれかを添加して密栓し、バイアル内の気相を NeedlEx[®]と接続したガス採取器によって吸引した。その後、NeedlEx[®]に吸着した揮発成分をGCまたはGC/MSで分析した。定量を行う場合は、2-フェニルエチルアミンやアセトフェノンなどを内部標準液として密栓前にバイアルに添加した。

上記のような手法で、各種医薬品や農薬について検出限界の測定や検量線の作成、他の抽出・濃縮方法(HS法やSPME法)との比較を行った。また、農薬を摂取したと考えられた遺体の剖検試料(尿、胃内容、腸内容)について NeedlEx[®]による分析を行い、農薬の成分の検出が可能であるかを調べた。

GC-MSの条件は以下のように行った。

装置: Shimadzu GC-2010 Plus (GC),

Shimadzu GCMS-QP2010 SE (MS)

カラム: SH-Rxi-1ms (0.32 mm ID×30 m, 膜厚 0.25 μm)

カラム温度: 50°C (4 min) - 20°C/min - 250°C (11 min)

スプリット比: 10 : 1

イオン化法: EI

GCの条件は以下のように行った。

装置: Shimadzu GC-2014

カラム: Rtx-BAC1 (0.32 mm ID×30 m, 膜厚 1.80 μm)

カラム温度: 60°C (4 min) - 30°C/min - 240°C (2 min)

スプリット比: 10 : 1

[結果・考察]

医薬品については、アルカリ添加条件で三環系、フェノチアジン系、ジフェンヒドラミンを NeedlEx[®]で検出することが出来た。また、三環系とジフェンヒドラミンについては高い決定係数の検量線を得ることが出来た。

農薬については、無添加およびアルカリ添加双方の条件でカルバメート系を、無添加条件で有機リン系を検出することが出来た。カルバメート系の検出限界については、アルカリ添加条件でより良い結果が得られた。検量線に関しては、無添加とアルカリ添加条件で大きな違いはなく、どちらの条件でも高い相関が得られた。

他の抽出・濃縮方法との比較では、医薬品と農薬双方において、NeedlEx[®]で得られたピークはSPME法よりは小さかったが、HS法よりは大きかった。

NeedlEx[®]による剖検試料を用いた分析では、胃内容や腸内容といった試料から、ダイアジノンやフェニトロチオンなどの農薬成分を検出することができ、一次的分析としての NeedlEx[®]の有効性が示された。

以上の結果より、NeedlEx[®]は先行研究で検討された薬毒物のみならず、医薬品や農薬の分析にも有効であると考えられた。アルカリの添加といった簡単な条件の変更で種々の成分を検出できる本法は、「有るか無いかをとりあえず調べてみる」といった早急なスクリーニングに適した手法である。また分析に使用したサンプルは必要に応じて別の方法で再度分析することも可能であり、こうした点でも一次的分析に適している。しかし、今回検討した医薬品の中には NeedlEx[®]で検出できなかったものも存在した。それらの検出を可能にするアルカリ添加以外の条件の検討が今後必要だと考えられる。具体的には、気化室温度やスプリット比といったGC(/MS)の条件変更や、塩の添加、誘導体化などを考えている。

タンパク質の長時間ダイナミクスを短時間 MD で作る

山口 孝太 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 原田 隆平 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

近年、計算機の進歩に伴い生体分子の分子動力学 (MD) シミュレーション(MD)を実行することが可能となってきた。例えば MD 汎用計算機である”Anton”はミリ秒オーダーの計算を可能にした。しかし、Anton を利用してミリ秒オーダーのトラジェクトリ (原始座標の時系列データ) が取れたとしても、生体分子が取り得る全ての状態をサンプルできる保証はない。そこで、ディープラーニング(GAN)を利用することで、複数の短時間 MD シミュレーションのデータから長時間MDのシミュレーションデータを予測するようなモデル¹が最近提案されている。現状において予測モデルが適用されているのは高分子だけであり、タンパク質をはじめとする生体分子には適用されていない。適用が難しい理由は、タンパク質は高分子と比較してダイナミクスとして緩和が遅い (レイイベント) であるため、短時間 MD では取り得る状態を全てサンプルしきれないからである。そこで、レイイベントサンプリング法として開発された PaCS-MD²を適用し、状態 A から状態 B までに存在する遷移経路を探索することで、生体分子系への応用を考えた。これまで様々なレイイベントサンプリング法が開発されてきたが、多くは系の状態を無理やり不安定にするように外部バイアスに基づく戦略である。適切なバイアスを指定しない場合、普通では起こりえない構造遷移が誘起されてしまい、長時間ダイナミクスの予想には向いていない。一方 PaCS-MD は、既知の 2 状態間の遷移過程をバイアスなしで誘起可能な強力な手法である。本研究では、タンパク質の短時間 MD で長時間ダイナミクスを予測することを目的とし、PaCS-MD-GAN の開発を行った。

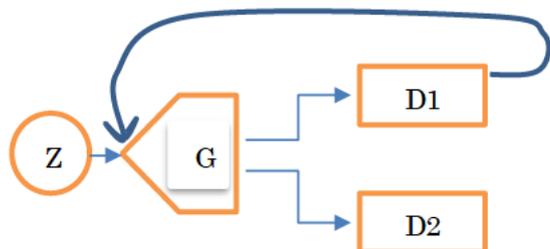
【方法】

PaCS-MD-GAN は 2 つのパートから構成される。

PaCS-MD: タンパク質の状態 A から状態 B までに存在する状態をサンプリングする。

MD-GAN: 深層生成モデルである GAN に基づき、深層生成モデルである GAN に基づき、複数の短時間 MD が生成するトラジェクトリを学習させ、長時間ダイナミクスを予測する。

・MD-GAN のネットワーク

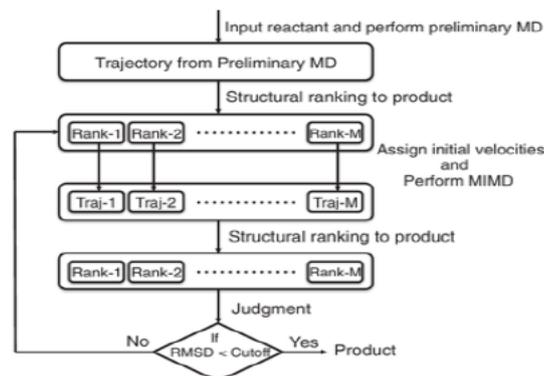


GAN(Generative Adversarial Nets)³ は識別器と生成器の二つからなるネットワークで、生成器は識別器を騙すことができるように、識別器は本物が偽物かを判別できるように学習することで、本物の分布に近いものを生成できる。

MD-GAN は識別器を 2 つ使うことで、生成器がどんな出力を出すかを制御する。D1 で時系列データを学習させる。D2 では時系列データのつながりを学習させる。従来の時系列予想のモデルで

ある LSTM(Long Short Time Memory)と比べると、予測誤差がたまり発散、収束が起こること(exposure bias)が少ない。生成器と識別器は Multilayer Convolutional Network である。更に GAN の学習において問題となっているモード崩壊、勾配消失問題を防ぐために WGAN-gp を使用する。

・PaCS-MD のアルゴリズム



PaCS-MD によりタンパク質の状態 A-B 間の遷移経路を探索する。具体的には短時間 MD を利用し、目的構造 (B 状態) に近い分子構造を新たな初期構造に選択して、選択構造から短時間 MD をリスタートする。常に B 状態に近い分子構造から短時間 MD を繰り返すことで、目的構造へ至る遷移経路を生成する。

・分子動力学計算の実施

MD プログラム (Gromacs2019)を用い、 $T = 300 \text{ K}$ 、 $P = 1 \text{ atom}$ の条件で、T4 リゾチームの $3.4 \mu\text{s}$ の長時間 MD を実行。

【結果】

結果は当日に公開します。

【考察】

従来の MD-GAN ではタンパク質への応用は困難であったが、PaCS-MD で状態間の遷移経路を探索することでそれを可能にした。しかし、PaCS-MD では遷移経路の近傍に存在する局所的な状態探索である場合多く、取り得る全ての状態を探索できている保証はない。しかし、従来のレイイベントサンプリング法の多くは外部バイアスを用いているので、今回の手法には向かない。何故ならば、外部バイアスによりアーティファクトが引き起こされ、異常な長時間ダイナミクスを予測するためである。そこで、より広い状態を合理的に探索可能なノンバイアスレイイベントサンプリング法として OFLOOD⁴が選択肢として考えられ、今後 PaCS-MD との併用することで、更なる予測精度の向上を目指したい。

【参考文献】

1. E. Katsuhiko, K. Tomobe, K. Yasuoka. 2018. In *32nd AAAI Conference on Artificial Intelligence, AAAI 2018*.
2. H. Ryuhei, and A. Kitao. 2013. *Journal of Chemical Physics*.
3. Goodfellow, et. al. 2014. In *Advances in Neural Information Processing Systems*.
4. H. Ryuhei, T. Nakamura, Y. Takano, Y. Shigeta. 2015. *Journal of Computational Chemistry*.

天然変性タンパク質の溶解性に ATP が与える影響の分子メカニズム解析

會田 勇斗 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 原田 隆平 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞内で「ATP がエネルギーの通貨としての役割を担う」ということは、生物学における通説である。ATP のエネルギーを利用する ATP 依存性酵素は μM 単位の濃度で十分に機能するが、実際の細胞内では ATP が 1-10 mM の濃度で保たれている。基質として過剰な量の ATP を高いエネルギーコストで細胞内に維持している理由は長年不明であった。しかし、近年の報告で高濃度の ATP はタンパク質の溶解性を増加させることが明らかになった。先行研究では、試験管内で高濃度の ATP がアミロイド β の凝集体や液-液相分離で形成される液滴を分解することが確認された。このように、タンパク質の溶解性の制御は、細胞内の現象として注目されている「液-液相分離」において重要な役割を担う。

細胞内における液-液相分離は数多く報告されており、酵母のストレス応答や線虫の P 顆粒の形成など、幅広い生命現象で役割を担う。液-液相分離はタンパク質や核酸などの生体分子が膜のない「液滴」という区画を形成する現象である。液滴内には液滴を構成する分子が高濃度で存在するため、酵素反応の効率化や分子の局在化を可能にする。しかしながら、液-液相分離の物理化学的な駆動力は非常に複雑であるため、各分野で活発な議論が行われている。液滴形成に関わる詳細な分子メカニズムを理解することは、液-液相分離の物理化学的な性質を理解する上で重要である。

タンパク質の機能を原子レベルの分解能で解析する際、X 線結晶構造解析などの実験手法が強力であるが、X 線結晶構造解析で得られるタンパク質が静止した構造情報であり、実際の機能に関わる「ダイナミクス」の情報を得ることは困難である。

分子動力学(MD)シミュレーションでは、個々の原子を質点として取り扱い、分子力場に基づき運動方程式をコンピュータで数値的に解くことにより、生体分子のダイナミクスを明らかにする (Fig 1)。液-液相分離は溶液中のタンパク質ダイナミクスにより駆動されるため、MD シミュレーションによる解析が有効である。

タンパク質可溶性における ATP の特徴的な相互作用を原子レベルの分解能で明らかにすることは、液滴をターゲットとした次世代の創薬や生物学的な相分離現象の根本的な理解に有用である。本研究では、MD シミュレーションを用いて液-液相分離を引き起こす天然変性タンパク質の一種である Fused in Sarcoma (FUS)

の相互作用を解析した。更に、FUS 混雑環境に ATP を添加した条件での MD シミュレーションにより、ATP が FUS を水に対して安定化させる特徴的な相互作用を抽出した。

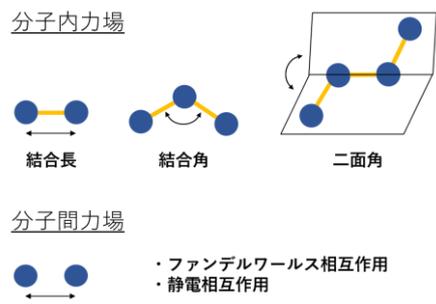


Fig 1. MD シミュレーションで使用される力場

【計算方法】

FUS の Low-Complexity (LC) 領域のコアとなる固体 NMR 構造 (FUS-LC-core, PDB id: 5W3N) の単量体を 1 atm, 300 K の条件で MD シミュレーションを実行し、安定構造を得た。FUS-LC-core の安定構造を 8 分子配置し、ATP-Mg を 0, 6, 12 分子配置させ、上述の計算条件で 2 μs の MD シミュレーションを実行した (Fig 2)。得られた原子座標トラジェクトリから、ATP とタンパク質の相互作用や ATP と水の相互作用を解析した。

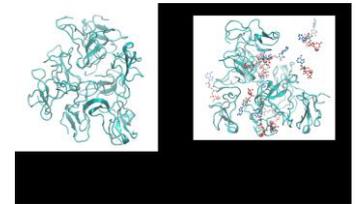


Fig 2. FUS のモデリング構造

【結果・考察】

1. ATP-Mg が FUS-LC-core の分子間相互作用に与える影響

ATP-Mg の量を変えた際の FUS-LC-core の分子間相互作用の変化を Fig 3 にプロットした。Fig. 3 より、ATP-Mg の量が増すことで分子間相互作用が非局在化されていることが分かった。更に、ATP の分布を解析すると FUS-LC-core 同士の分子間相互作用の強い部位に ATP が局在していた。以上の解析結果より、ATP が FUS-LC-core の凝集しやすい部位に分布することで、局所的な凝集性の相互作用をカバーしていると考えられる。

2. ATP 周囲の水の分布

ATP と水の相互作用を明らかにするため、ATP の O 原子、N 原子から見た水の確率分布を解析したところ、リン酸基を主に構成する O 原子は水和されているのに対し、アデニン環を構成する N 原子は水和が弱いことが分かった。解析結果は、アデニン環のタンパク質への配向とリン酸基の水和によって、タンパク質が水に対し安定化されていることを示唆している。

以上の解析結果より、ATP はタンパク質の凝集しやすい部位にアデニン環の配向によって局在し、外側を向いたリン酸基が水和を促進することにより、タンパク質同士の相互作用を非局在化させていると考えられる。結果的に、タンパク質同士の凝集に関わる相互作用が弱まり、ATP がタンパク質の溶解性を向上させる。

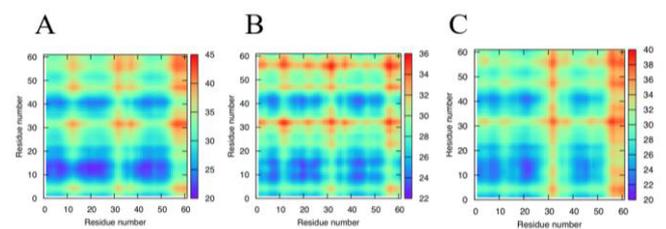


Fig 3. MD シミュレーション初期における FUS-LC-core の分子間コンタクトマップ

A-C) 縦軸と横軸は残基番号を、色は分子間コンタクトの平均距離であり、コンタクトの強さを示す。A) ATP-Mg 0 分子, B) ATP-Mg 6 分子, C) ATP-Mg 12 分子

Investigating the effect of familial Alzheimer's disease mutations on Amyloid- β deposits in 3D cell culture

川原 瞳 (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)

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia but currently there is no critical cure for this progressive disease. Therefore, research into AD is needed to improve fundamental understanding of the disease and to find potential therapies. In the amyloid cascade hypothesis, A β , formed from the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by β -secretase and then γ -secretase, is seen as a key molecule in initiating AD. More than 25 mutations in APP have been identified to cause familial AD or hereditary cerebral angiopathy (CAA). In this project, I examined ① the effect of Swedish, Italian and Iowa mutations on APP proteolytic processing and ② differences in A β deposits between cells containing APP wild-type and APP with mutations using a 3D cell culture model.

Materials and Methods

Site-directed mutations were introduced in human APP695 within pIREShyg vector (Accession, #U89672; Clontech, #6061-1) to obtain APP695 Swedish, APP695 Italian, and APP695 Iowa. Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y cells) were transfected with these vectors by electroporation. Next, cell lysates and culture supernatants obtained from each transfectants were subjected to Western blot to determine the effect of mutations on APP proteolytic processing. In order to determine any difference in A β production in SH-SY5Y cells expressing mutated APP695, A β in conditioned cell medium was quantified using an ELISA based system developed by Meso Scale Discovery (MSD, #K15200E). In addition, SH-SY5Y cells were cultured in Matrigel (Corning, #354277), which contains the extracellular matrix (ECM) to identify differences in A β deposits in cells containing APP wild-type and APP with mutations in 3D cell culture.

Results and Discussion

It was found that proteolytic processing pattern of APP was not identical among mutant proteins (Fig. 1). This difference may contribute to the different pathologies associated with the APP695 Italian and APP695 Iowa mutations. In addition, it was suggested that the double point mutation of APP695 Swedish caused an increase in A β production (Fig. 2). Moreover, I tried to compare extracellular A β deposits stained with 4G8 antibody by using Matrigel and was able to detect an immunostaining signal (not shown). However, more data from repeated experiments are required for concluding that A β deposits in 3D cell culture are affected by APP695 Swedish, Italian and Iowa mutations.

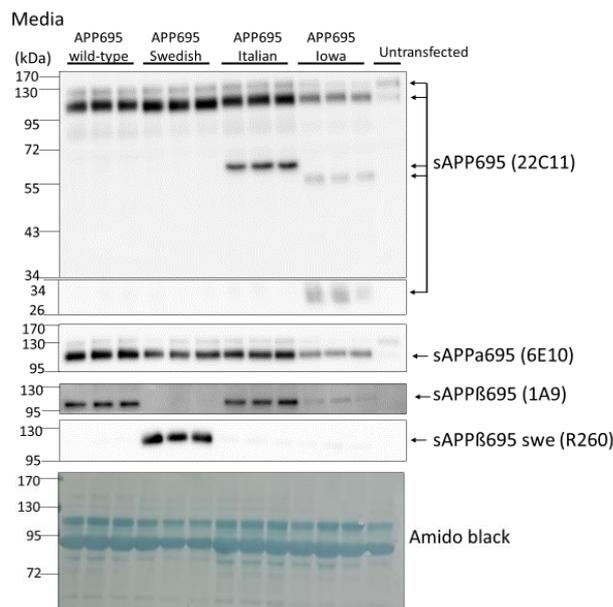


Fig. 1. Proteolysis of APP695 constructs

The concentrated conditioned cell medium was subjected to immunoblot analysis. 22C11, 6E10, 1A9, and R260 antibodies were used to detect APP695, sAPP α 695, sAPP β 695, and sAPP β 695 Swedish, respectively. Protein-transferred membrane was stained with Amido black to confirm equal amount of proteins loaded in each lane.

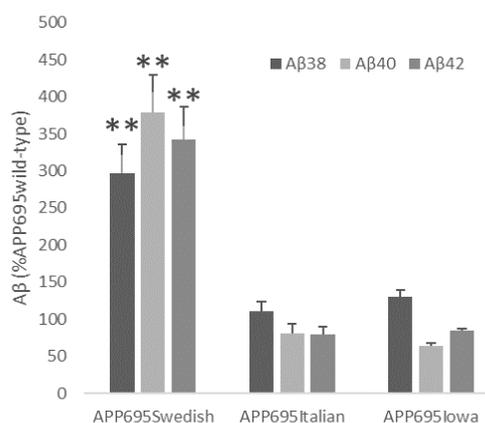


Fig. 2. Quantification of A β 38, A β 40 and A β 42 in conditioned cell medium from SH-SY5Y cells expressing APP695 mutant proteins

ELISA of A β 38, A β 40 and A β 42 in the conditioned cell medium from SH-SY5Y cells expressing APP695 Swedish, APP695 Italian, or APP695 Iowa, as compared to the amount observed in SH-SY5Y cells expressing APP695 wild-type, error bars are \pm S.E.M. ** $p < 0.01$, $n = 3$.

Tetrahymena thermophila の Latrunculin-A に対する耐性能獲得に関わる因子の研究

阿久津 智晃 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

アクチンは小胞輸送やエンドサイトーシス、細胞運動等に重要な役割を担う。繊毛虫テトラヒメナ *T. thermophila* の食胞形成において、主要なアクチンである ACT1 が必須である。アクチン重合阻害剤 Latrunculin-A (LA) を処理すると、直ちに食胞形成が阻害される。しかし、数時間後には食胞形成能が回復する。この LA 耐性能の獲得においては、アクチンアイソフォームの ACT2 が重要な鍵を握る。通常時にはほとんど発現していない ACT2 は、LA 処理後に急激に発現誘導される。ACT2 破壊細胞は、LA 耐性能を示さない (清水祐太修士論文)。一方で、ACT2 の単独の過剰発現では LA 耐性能は賦与され耐ない (赤澤大樹修士論文)。そのため、ACT2 以外の遺伝子の発現誘導も、耐性能獲得に必要なと考えられた。そこで、赤澤らは、LA 処理後 2 時間目に発現量が上がる遺伝子を、次世代シーケンサー解析により調べた。解析結果から、配列上の特徴から転写因子と予測された遺伝子が複数存在あることが判明した。私は、その中で最も発現上昇率が高かった遺伝子 TTHERM_01068050 に着目し、本研究に着手した。

この遺伝子は、LITAF-like zinc ribbon domain protein をコードする。LITAF (Lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α factor) は、細菌の細胞壁成分に反応し、サイトカインの一種である TNF- α の発現を促す転写因子として報告された (Myokai et al., 1999)。一方、LITAF と同じ遺伝子から、カルボキシル末端側の配列が異なる SIMPLE (small integral membrane protein of lysosome /late endosome) という遺伝子産物が発現する (Moriwaki et al., 2001)。SIMPLE は後期エンドソームやリソソームに局在し、メンブレントラフィックに関与することが報告されている (Shirk et al., 2005)。

LITAF と SIMPLE の違いは、当該遺伝子のエキソンジャンクションの差異により生じる。通常のエキシンの切り出しと連結では、SIMPLE をコードする mRNA が作られるらしい。SIMPLE のカルボキシル末端側には、特徴的なジンクフィンガーモチーフ (LITAF ドメイン) が存在する。

TTHERM_01068050 (以下、暫定的に LITAF と記す) が LA 耐性能獲得において転写因子として働く可能性を検証した。

方法

1. LITAF 過剰発現株、及びシャットオフ株の作成株

本研究の伊藤雄平による先行研究により、*T. thermophila* (B2086 株) の大核ゲノムの LITAF の開始コドンの直前に、薬剤耐性遺伝子の Neo4 カセットと銅イオンで発現誘導される MTT2 プロモーターの制御下に赤色蛍光タンパク質 mCherry からなる遺伝子カセットを挿入した細胞株が作成された。私は、この細胞に CuSO₄ (終濃度 1.5 mM) で 3 時間処理して、mCherry-LITAF の局在を観察した。さらに、この細胞の大核ゲノム全体の LITAF 遺伝子を完全にコンストラクトが挿入された遺伝子と置き換え、LITAF シャットオフ株を作製した。

2. LA 耐性能獲得の様子の観測定察

30°C で培養した対数増殖期の細胞に、LA (終濃度 1 μ M; もしくはコントロールとして等量の DMSO を用いた) を処理し、さらに 30°C で一定時間インキュベートした。その後、食胞を可視化するために、墨汁を細胞液に対して 1/100 量加え、10 分間 30°C でインキュベートした。ホルマリンを 1/20 量加えて固定した後、1 細胞あたりが持つ墨汁を取り込んだ食胞数をそれぞれ計測した(20 細胞以上)。

3. 定量 PCR 実験 (RT-PCR)

T. thermophila から、ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (プロメガ) を用いて、total RNA を抽出した。次に PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) により、total RNA 40 ng を逆転写し、これを鋳型として、GoTaq® qPCR Master Mix を用いて RT-PCR を行った。

結果・考察

まず、LITAF 過剰発現により、LA 耐性能が賦与されるか調べた。CuSO₄ 処理を 1 時間行い測定したところ、野生型細胞と比べて、LA 耐性能が発揮されるまでの時間が短縮される傾向が見られた。次に、LITAF のシャットオフによる LA 耐性能獲得への影響について調べた。しかし、特筆すべき現象は見られなかった。これらの結果は、LITAF が LA 耐性能獲得に関係するが、必須な遺伝子ではないことを示唆した。

一方、LA 処理後の LITAF の発現量の変動を、RT-PCR により調べた。その結果、LA 処理 30 分では後では発現量はほとんど増加しないが、1 時間後から発現上昇が認められ、2 時間後には約 60 倍に増加した。一方、ACT2 の発現は LA 処理後 20 分後には明らかに上昇が始まっていた。また、LITAF 過剰発現により、ACT2 の発現が促されるか調べたところ、ACT2 の発現量は 3 倍程度増加していた。しかし、LA 処理のような急激な発現上昇は見られなかった。更に、LITAF をシャットオフし、LA 処理をしても ACT2 の発現の上昇は認められた。以上の結果は、LITAF が ACT2 の発現の誘導において中心的な役割ではなく、補助的に働いている可能性を示唆した。

更に、LITAF 過剰発現株における mCherry-LITAF の細胞内局在を調べた。その結果、mCherry-LITAF は口部装置や食胞膜に局在していた。また、LA 処理をしても核へ移行する様子は認められなかった。以上、LITAF は転写因子として働くのではなく、食胞膜上で LA 耐性能の発現増強に寄与している可能性が伺えた。また、現段階では推察に過ぎないが、例えば LITAF は脂質や他のタンパク質と相互作用して食胞の生理的状態を感知・連絡することで、適切な LA 耐性能の発揮に寄与している可能性がある。また、LA 耐性能が生じる際には、ACT1 が分解され ACT2 から構成される細胞骨格が食胞形成を促すと考えられている。LITAF はこの細胞骨格の入れ替わりの過程に寄与している可能性も考えられる。今後は、転写因子をコードすると推定される他の遺伝子にも手を広げ、LA 耐性能の獲得機構を明らかにしたい。

分裂酵母を用いた Rho の研究

KIM HYOMIN (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境学系)

背景と目的

生きるために細胞は正しい形をとり、方向性を持って動き、そして分裂する。そのために、細胞内のタンパク質が適切な時期に然るべき場所に分布するためのしくみが必要である。細胞極性の形成には、細胞骨格が大きな役割を担う。真核生物の主要な細胞骨格は、アクチン繊維と微小管である。これらの細胞骨格は、細胞極性に関わるタンパク質分子の輸送や足場となる。それでは、細胞骨格の分布や配向性はどのように制御されるのだろうか？

その制御に中心的な役割を担うのは、Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合タンパク質である。Rho ファミリータンパク質は、幅広く真核生物で保存されており、主にアクチン細胞骨格の形成を調節している。Rho は GTP と結合している状態が活性型であり、Rho 標的タンパク質と結合して、アクチンの重合量を増やしたり、ミオシンの脱リン酸化を介してアクチン-ミオシンの相互作用を活性化する。Rho は分子自身が結合している GTP を GDP とリン酸に加水分解する活性をもつ。Rho は、GEF 及び GAP などの別のタンパク質の作用により、その活性を変える。GEF は、Rho と GTP の結合を促す。一方、GAP は Rho に作用して、その GTP 加水分解活性を高める。細胞内では、これらの分子の相互作用により、Rho の活性が適切に制御されている。この制御は、細胞極性を正しく形成して維持するために、時間的かつ空間的に調節されなければならない。Rho の活性制御や標的タンパク質との結合性が異常になると、細胞の形が壊れ、細胞運動がおかしくなり、正しく細胞が分裂できなくなる。

ヒトは十数種類の Rho タンパク質を有する。その中でも、最も初期に細胞機能が研究されたのが RHOA である。最近、悪性の癌患者では、RHOA に点突然変異が生じていることが報告された (Kakiuchi et al., 2014)。点突然変異が発見された位置は、合計で 11 箇所ある (図 1)。これらの変異が生じた位置は、Rho ファミリーで広く保存されていたアミノ酸残基のコドンに変化を及ぼす。しかし、それらの変異が起きたことで、RHOA の活性状態がどのような影響を受けたのかはよく分かっていない。これが分からないと、ガン細胞の悪性化における RHOA の作用の因果関係は理解できない。私は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は用いて、この問題に取り組むことにした。

分裂酵母は単純な細長い円筒形の細胞で、モデル生物として変異の導入などの実験操作がスピーディーで容易である。分裂酵母は、ヒトの RHOA と相同遺伝子である Rho1 をもつ。先行研究により、分裂細胞で Rho1 を欠損させると細胞は死滅し、過剰発現すると細胞の形が異常になり、細胞壁が厚くなるなどの異常が見られた。さらに、機能的にも分裂酵母や出芽酵母の Rho1 とヒト RHOA には機能的保存性があることが確認されている。私は、上述したヒトの RHOA の変異と同じアミノ酸変異が起こす Rho1 変異遺伝子 (R6Q, R6W, G18E, L23R, V39G, Y43C, E55K, W59S, R69P, L70R, Y75D) を作製し、それらを発現した際の細胞に及ぼす影響を調べることにした。

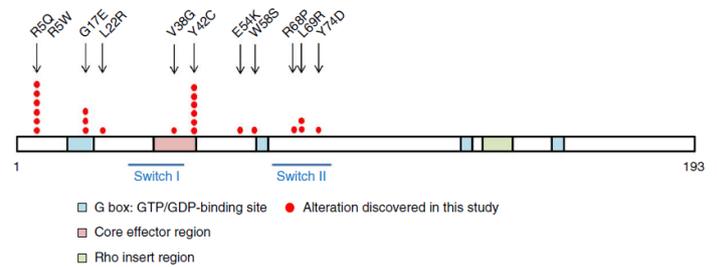


図 1. ヒト RhoA の変異 (Kakiuchi et al., 2014 から転載)

方法

分裂酵母の遺伝子発現プラスミド pREP1rho1 に、inverse PCR 法を用いて、目的の変異を導入した。作製したプラスミドを用いて、*leu1-32* 栄養要求性変異株を形質転換した。
<アルカリ法によるプラスミドの抽出>

1. 37°C で一晩培養した大腸菌を 1.5ml のチューブに移した。
 2. 9,000 rpm で 2 分間遠心し、集菌した。
 3. 培養上清を除き、試薬 solution1 を入れ、懸濁した。
 4. solution2 を加え溶菌し、直ちに solution3 を加え懸濁した。
 5. フェノール/クロロホルム溶液と混合し、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。
 6. 水層を別の 1.5ml のチューブに移し、等量のエタノールと混合し、-20°C で 1 時間以上静置した。
 7. 15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、核酸を沈殿した。
 8. 沈殿を 70% エタノールで洗浄し、風乾した。
 9. TE に懸濁し、RNaseA を加えて RNA を分解した。
- <分裂酵母の形質転換>

1. SD 培地中で培養した細胞を、1,000 rpm で 5 分間遠心した。
2. 集菌した細胞を滅菌水及び酢酸リチウム液で洗浄した。
3. 細胞を酢酸リチウム液に懸濁し、25°C で 30 分間置いた。
4. 目的のプラスミドを加え、さらに 25°C で 1 時間置いた。
5. 50% のポリエチレングリコール液を加え、1 時間置いた。
6. 43°C で 15 分間熱処理し、常温で 10 分間置いた。
7. 3,000 rpm で 1 分間遠心して細胞を集菌した。
8. 滅菌水で洗浄した細胞を、SD 寒天プレートにまいた。
9. 25°C で数日培養し、形成されたコロニーを拾った。

結果と考察

作製したプラスミドについて DNA シーケンスを行い、目的の変異が導入されているか調べた。変異が正しく導入されたプラスミドを用いて分裂酵母を形質転換した。今後、形質転換株の細胞増殖能や細胞形態などの表現型について調べる予定である。

引用文献

Kakiuchi, M. et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nature Genetics* 46, 583-589 (2014).

真核生物における SMC タンパク質ファミリーの多様化及び二次的喪失

吉永 真理 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 計算科学研究センター)

■背景

ATPase スーパーファミリーに属する SMC タンパク質ファミリーは染色体構造の維持に必須で、原核生物から真核生物まで広く保存されると考えられている。原核生物では 1 種類の SMC がホモ二量体を形成するのに対し、真核生物では 6 つの SMC パラログ (SMC1- SMC6) が、3 種類のヘテロ二量体を形成する。SMC 1-3 と SMC 2-4 二量体は、それぞれ染色体分離の際に姉妹染色体を束ねるコヒーシと染色体を凝集させるコンデンシンを構成する。SMC5-6 二量体は DNA 修復に関わる。原核生物では主に DNA 鎖を凝集させる役割を果たす SMC だが、遺伝子重複とその後の機能分化により、染色体の維持という真核生物特有の機構の要となった。

Cobbe & Heck (2004) は SMC1 から 6 の配列に基づく分子系統解析を行ったところ、SMC1 と 4 間、2 と 3 間、5 と 6 間の近縁性が復元された。しかし、当該論文ではオピストコンタに含まれる 5 種とトリパノソーマ原虫からの配列データだけが解析されており、真核生物の多様性を十分に俯瞰しているとはいえない。そこで、本研究では広域な真核生物を対象に SMC1 から 6 を探索し、新たな配列データをもとに系統解析を行うことで、SMC の多様性と進化の再検証を行った。

■方法

i) SMC タンパク質の相同配列探索

NCBI nr (non-redundant protein sequences) データベース中の原核生物 14 種と真核生物 28 種について、ヒトもしくは検索対象の近縁種の SMC タンパク質を問い合わせ配列として BLASTP による同源性検索を行い、SMC 相同配列を得た。NCBI nr データベースに登録されているタンパク質では不十分な真核生物 9 種については、NCBI SRA (Short Read Archive) からトランスクリプトームデータを取得した。sra-toolkit v2.10.0 と fastp v0.20.0 による配列のクオリティコントロール後、Trinity v2.8.5 でアセンブルして mRNA 配列を復元した。復元後の配列に対して、ヒトや検索対象の近縁種の SMC を問い合わせ配列として TBLASTN による同源性検索を行い、SMC 相同配列を得た。最終的に SMC のアミノ酸配列を、原核生物 14 種、系統的に広範な真核生物 37 種から同定し、系統解析に用いた。

ii) SMC に進化的に近縁なタンパク質の相同配列探索

真核生物の Rad50 や原核生物の SbcC、RecN は SMC とアミノ酸配列レベルで同源性が検出できる。また、細菌類では SMC とアミノ酸配列レベルで同源性をもつ MukB をもつことが知られている。4 種類のタンパク質のアミノ酸配列を探索し、SMC と共に系統解析に用いた。データベース内の探索は、SMC と同様に行った。

iii) 系統解析

SMC およびその近縁タンパク質のアミノ酸配列を、MAFFT v7.453 を用いてアラインし、配列間で保存性が低い座位を手動で排除した。最終的に配列の保存性がある 220 アミノ酸座位を系統

解析に用いた。SMC アライメントから、LG + Γ4 モデルを用いた最尤 (ML) 法により ML 系統樹を復元した。系統関係の頑健性は、リサンプリングデータ (100 個) をもちいた ML 法によるブートストラップ解析により検討した。上記系統解析には IQ-TREE v1.6.12 を用いた。

■結果と考察

真核生物 37 種の SMC 配列から復元した ML 系統樹では、SMC1 から 6 の単系統群 (クレード) が形成された。広範な真核生物系統に SMC1-6 が存在することから、真核生物の初期段階ですでに SMC の 6 つのパラログが確立していたことが再確認できた。サブファミリー間の系統関係は、SMC1 と 4 間および 5 と 6 間の近縁性が復元されたが、先行研究とは異なり 2 と 3 は互いに近縁とはならなかった。ただしアライメント中で欠失座位が多い SRA データから取得した配列を系統解析から削除したところ、SMC2 と 3 間の近縁性も復元された。従って、39 種からの SMC 配列に基づく解析で、SMC2 と 3 間の近縁性が復元できなかったのは、欠失座位の多い配列が原因である可能性がある。

SMC1、2、3 および 4 は、解析したほとんど全ての種で検出できたものの、SMC5 と 6 の相同配列が検出できなかった系統が複数存在した。例えば繊毛虫 *Paramecium tetraurelia* および *Tetrahymena thermophila* には高品質なゲノム・トランスクリプトームデータが整備されているにもかかわらず、SMC5 と 6 が検出されなかった。同様にトリパノソーマ原虫 (*Trypanosoma brucei*) でも SMC5 および 6 が検出されなかった。これらの結果は DNA 修復に関わる SMC5 と 6 が二次的に欠失している系統が存在することを示唆する。そこで上記 2 種以外の繊毛虫 11 種について、主にトランスクリプトームデータ中に SMC1-6 配列を探索した。その結果、解析した繊毛虫 11 種中 10 種で SMC 5 と 6 とともに検出できず、繊毛虫の進化における SMC5 と 6 の欠失を支持する結果となった。同様の探索を、トリパノソーマ原虫がふくまれるキネトプラスト綱に含まれる 4 種、キネトプラスト綱の姉妹群であるディプロネマ綱とユーグレナ綱に含まれる 4 種について行った。興味深いことに、キネトプラスト綱とディプロネマ綱に属する 6 種でも SMC5 と 6 は検出されなかった。この結果は、両綱の共通祖先で SMC5 と 6 の欠失が起こった可能性を示唆する。

本研究の結果は、SMC1-6 が真核生物初期進化で確立したが、真核生物多様化の過程で 2 次的欠失が複数回起こっていることを示唆する。今後は SMC の欠失がどのように補完されているのかを実験的に検証する必要がある。

■参考文献

Cobbe N, Heck MM (2004) The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol*. 2004 21:332-47.

緑色鞭毛藻 *Pyramimonas parkeae* の眼点サイズに対する光強度の影響

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

背景・目的

緑藻植物の遊泳細胞は光受容装置として眼点を持ち、光刺激に対して正または負の走光性を示す。眼点の大きさは種によって一定と考えられていたが、2012年に Trippens らが発表した論文で塩性湿地に生息する *Tetraselmis astigmatica* (クロロデンドロン藻綱)と淡水に生息する *Chlamydomonas reinhardtii* (緑藻綱)において眼点サイズ(面積)が光強度に依存して変わることが報告された。2種の間で変化する眼点サイズの範囲にこそ差はあったものの、いずれの種でも強光条件で小さく、弱光条件で大きくなることや、フォトトロピンに関わる 470 nm 前後の青色光が眼点サイズの変化に関与していることは共通の特徴として確認された。

この論文で報告されたのは *T. astigmatica* と *C. reinhardtii* だけであった。そこで緑藻植物の初期に分化したと考えられている潮間帯に生育する *Pyramimonas parkeae* (ピラミモナス目)で検証することで緑藻植物全体に保存されている特徴かどうかを明らかにすることを目的とした。さらにこの現象が緑色藻類全体に共通した特徴であるかどうかを明らかにするためにストレプト植物に属する *Mesostigma viride* (メソスティグマ藻綱)でも検証を行った。

材料・方法

本研究では国立環境研究所から提供していただいた *Pyramimonas parakeae* (NIES254) と *Mesostigma viride* (NIES477)を材料とした。*P. parkeae* は PES 培地・30~40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、*M. viride* は AF-6 培地・30~40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (ともに光源: 白色(昼色)蛍光灯)で培養した。明暗条件は 14h 明期: 10h 暗期で行った。

光強度に対する眼点サイズ変化の検証

細胞増殖とは独立に光強度の影響を調べるために、の培地を糖やトリプトン、酵母抽出液を含んだ培地で暗所・従属栄養条件での培養を試みたが、いずれの条件でも細胞の増殖は起こらなかった。そのため実験は独立栄養条件で培養した細胞を用いて行った。なお、光の強度は ND フィルタ(富士フィルム)を用いて調節し、眼点サイズは培養 10 日目の定常期の細胞で測定した。

波長に対する眼点サイズ変化の検証

波長の違いが眼点サイズに影響を与えるかどうかを検証するための実験は特定の波長のみを透過する富士フィルムの BPN フィルタと SC フィルタを用いて行った。

眼点サイズの測定

眼点サイズは光学顕微鏡で撮影した画像で ImajeJ を用いて測定した。固定液を用いると細胞が収縮してしまうため撮影の際はより正確なサイズを測定するために生きたままの細胞を使った。

結果・考察

P. parkeae においても光強度に依存して眼点サイズが変化するかどうかを調べるために、3つの光強度(弱光 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、通常光 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、強光 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)で 10 日間培養した細胞の眼点サイズを測定した。その結果、眼点のサイズは Trippens et al.(2012)と同様に通常光の $2.41 \mu\text{m}^2 \pm 0.7 \mu\text{m}^2$ (平均値 \pm SD)に比べて弱光条件で大きく($3.08 \mu\text{m}^2 \pm 0.8 \mu\text{m}^2$)なり、強光条件で小さく($2.14 \mu\text{m}^2 \pm 0.6 \mu\text{m}^2$)なった(図 1)。

眼点のサイズが変わることが確認できたため、どのタイミングでサイズの変動が起こるか時間経過を追って測定した。その結果眼点のサイズが 1~2 日目の間に差が生じ始め時間経過とともにその差が拡大することが判明した。

波長に関する実験の結果と *M. virid* の実験の結果は発表会で報告する。

ここまでの実験で *P. parkeae* において眼点のサイズが光強度に依存して変わることが確認できた。目的の部分でも述べた通り *P. parkeae* は潮間帯に生息する藻類であり、緑藻植物の初期に分化した種であることから緑藻植物全体的に保存されている現象であることが示唆される。また Trippens et al.(2012)で調べられた種と合わせると、淡水・海水のどちらの環境に生育する種でも同様の現象が確認できたことになる。発表会では、ストレプト植物に分類されている *M. viride* での結果とも合わせて議論を行う予定である。

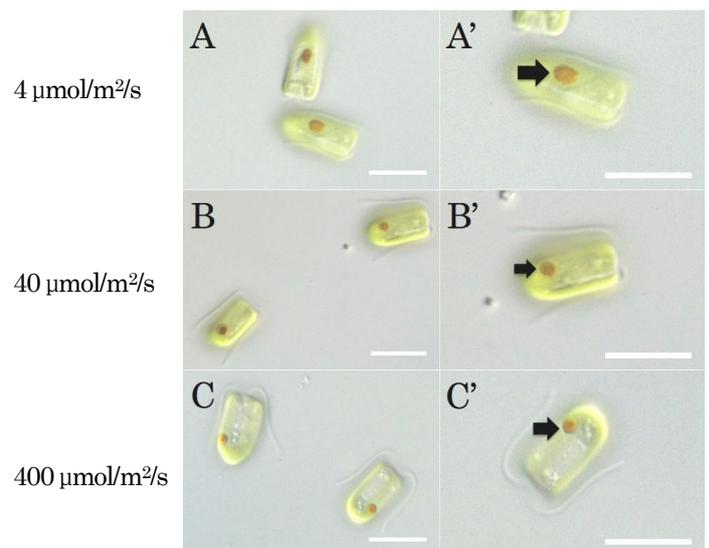


図 1:それぞれの光強度における *P. parkeae* の細胞と眼点。A' B' C' は、それぞれA、B、Cの拡大図。矢印は眼点を示す。Scale bars = 10 μm

発達過程におけるミクログリア cGAS-STING 経路の活性制御

窪谷 ひかり (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

〈背景と目的〉

発生過程の大脳皮質では、脳室帯で神経幹細胞が盛んに分裂を繰り返し、大量の神経細胞が産生され、これら細胞が所定の場所まで移動していく。その際に、神経細胞は様々なメカニカルストレスを受けて、ダメージを蓄積していく。ダメージを受けた神経細胞は、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアによって除去される。当研究室では、発生過程で損傷を受けた神経細胞がミクログリアに微小核を伝播することを見出してきた。微小核とは、主核とは別に存在する直径 1 μm 程度の小型の核であり、DNA 損傷を受けた細胞の分裂や狭小な部位を通過する際の核膜の破裂と融合によって形成される。がん細胞において微小核に含まれる DNA は細胞質 DNA センサーである環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS) に認識され、合成されたセカンドメッセンジャーが Stimulator of Interferon Genes (STING) を活性化し、自然免疫応答を引き起こすことが知られている。しかしながら、ミクログリアにおける微小核の機能は、明らかになっていない。そこで、私は神経細胞から放出された微小核が、ミクログリアの cGAS-STING 経路の活性化の起点となるのではないかと考えた。本研究では、ミクログリアにおいて、微小核を起点に cGAS-STING 経路の活性化が起こるか解明することを目的とした。

〈実験方法〉

(1) 細胞培養

細胞は、マウス初代培養神経細胞、マウスミクログリア細胞株 (BV2)、ヒト胎児腎臓由来 293T 細胞を用いた。初代培養神経細胞は E14 のマウス ICR の胎仔大脳皮質から単離した。

(2) 遺伝子導入

リポフェクション法により、HT-DNA (SigmaAldrich 社)、polyI:C (SigmaAldrich 社)、pCAG-EGFP を BV2 細胞に遺伝子導入した。トランスフェクション試薬は 1.0 mg/ml Polyethylenimine MAX (Polysciences) を用いた。

(3) 微小核の in vitro 誘導法

初代培養神経細胞にリソソーム阻害剤 Bafilomycin A1 (300 nM) を 2 時間処理し、PBS で洗浄した後、新しい培地を添加した。3 時間培養した後、遠心分離を行い、死細胞や細胞断片を除去した上清を条件培地として回収した。ミクログリアを条件培地で 6 時間培養し、微小核形成を誘導した。

(4) 免疫染色

細胞を播種したカバーガラスを 4% PFA/PBS に浸し、固定した。PBS で洗浄した後、5% BSA/ 0.4% Triton X-100/PBS でブロッキングした。一次抗体として抗 p-STING 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) を用いた。核の染色は Hoechst33342 (5 μg/ml, Invitrogen) を用いた。

(5) 微小核・リン酸化 STING のシグナルの定量

蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope (KEYENCE) で観察した。蛍光顕微鏡の 40 倍の対物レンズを用いて、観察を行った。10 視野以上を無作為に選び、核を有す

る細胞、並びにリン酸化 STING のシグナルを有する細胞の定量を行った。

(6) RT-qPCR

total-RNA は Isogen II (Nippongene) を用いて抽出し、Revertra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写した。Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 用いて、Thermal Cycler Dice Real-Time System II (Takara, TP800) にて反応させ、I 型インターフェロン β (IFNβ)、CCL5 の mRNA の発現を定量した。

〈結果・考察〉

初めに、cGAS-STING 経路の活性化を定量した。細胞内に存在する DNA は、cGAS を介して、STING をリン酸化、IFNβ の産生を誘導する。このことから、リン酸化 STING は cGAS-STING 経路活性化の指標として用いることが出来る。そこで、リポフェクション法によって、合成 2 本鎖 DNA、合成 2 本鎖 RNA を細胞外から細胞内へ導入し、リン酸化 STING のシグナルが免疫染色でどのように観察されるかを検証した。リポフェクション効率が高いヒト胎児腎臓由来 293T 細胞で検証したところ、合成 2 本鎖 DNA を細胞内に導入した細胞では核の上、または、近傍にドット状に強い蛍光を発する細胞が多く観察されることを見出した。

次に、ミクログリアにおいて、微小核を起点として cGAS-STING 経路が活性化するか検証するため、微小核の出現と STING のリン酸化のタイムコース実験を行った。その結果、条件培地を処理して 4 時間、6 時間後に微小核陽性細胞が増加することが明らかになった。一方、条件培地処理から 2 時間後と 6 時間後の 2 回のタイミングでリン酸化 STING 陽性細胞が多いことが分かった。また、条件培地処理して 6 時間後のミクログリアでは、cGAS-STING 経路の下流で発現が誘導される IFNβ、CCL5 の mRNA の発現レベルが高かった。

条件培地を処理して 6 時間後のミクログリアでは、微小核の形成と cGAS-STING 経路の活性化がみられたことから、神経細胞で形成された微小核が、cGAS-STING 経路を活性化することが示唆された。また、条件培地を処理して 2 時間後のミクログリアでも cGAS-STING 経路の活性化がみられたことから、神経細胞由来の微小核ではない分泌因子がミクログリアに直接作用し、cGAS-STING 経路を活性化する可能性が示唆された。

今後の予定として、最初の cGAS-STING 経路の活性化が、2 回目の cGAS-STING 経路活性化にどのような影響を与えるのか検証するとともに cGAS の挙動も観察していく予定である。

神経活動を感知するミクログリアのメカニズム解明

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

【背景・目的】

ミクログリアは脳内で免疫を担当する細胞として知られている。主な働きとして脳内の異物や死細胞の食食を行うことが挙げられる。近年では発達段階において、ミクログリアが神経細胞のシナプスと相互作用し、神経回路構築に寄与することが明らかとなってきた。マウスでは出生後、シナプス形成が盛んに行われ、成体脳のシナプス数よりも大幅に多いシナプス結合が作られ、その後ミクログリアによって除去される。例えば、マウス大脳皮質では、生後10日前後(P10)でシナプスが活発に産生され、3-4週目に不必要なシナプスがミクログリアによって刈り込まれる。これらのミクログリア-シナプス相互作用によって、適切な数のシナプスが産生され、より精密で適切な神経回路が形成される。近年、これらミクログリア-シナプス相互作用が神経活動によって調節される可能性が示唆されている。しかし、ミクログリアがどのように神経活動を感知しているのか、またどのような分子がこれら現象を制御しているのか、詳細なメカニズムはほとんど解明されていない。

私は、ミクログリアの制御因子として当研究室で見出したカドヘリンファミリーFAT3が、神経活動依存的なミクログリア-シナプス相互作用に関わるのではないかと考えた。本研究課題では、神経活動がミクログリアに及ぼす影響をライブイメージングで解析し、FAT3がこれら変化に関わるか明らかにすることを目的とした。本研究を介して、FAT3が神経活動依存的なミクログリア-シナプス相互作用に関わる因子になりうるか解明していく。

【方法】

(1) 細胞培養

胎生14日(E14)のマウス大脳皮質から単離した初代培養神経細胞、マウスのミクログリア細胞株(BV2)、ヒト胎児腎細胞(HEK293T)を実験に用いた。初代培養神経細胞はNeurobasal、BV2はDMEM/F12、HEK293TはDMEMを培地として用いた。

(2) プラスミドの作製

ミクログリアマーカー(CD68, CX3CR1)とFAT3のプロモーター領域をマウスゲノムからクローニングして、アデノ随伴ウイルス(AAV)のベクター、ならびにルシフェラーゼレポーターアッセイ用のプラスミド(pGL3)、EGFP並びにmCherryの発現ベクターに組み込んだ。

(3) アデノ随伴ウイルスの作製

HEK293TにDREADD(hM3Dq)ならびにGCaMPが組み込まれたAAV用のベクターをPHPeBならびにヘルパープラスミドpAdΔF6と一緒に導入し、ウイルスを作製した。作製したウイルスは、OptiPrepを用いた密度勾配遠心分離法で精製した。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

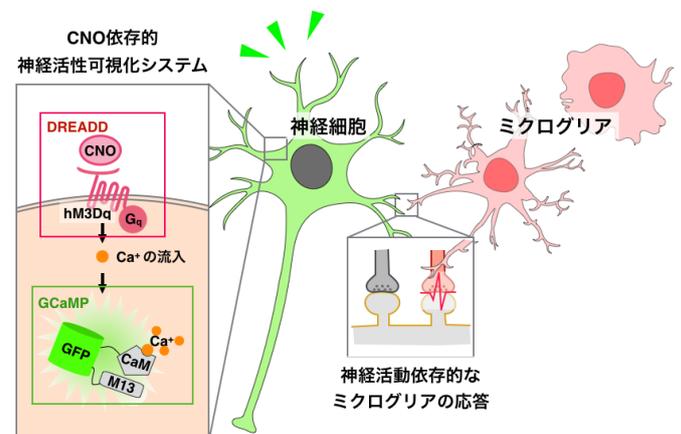
ルシフェラーゼ遺伝子の下流に特定のプロモーター領域を組み込んだベクターと内部コントロールのpRL-TKベクターをBV2とHEK293Tにトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った。

【結果】

まず、化学遺伝学的に神経細胞を活性化させる遺伝子改変型Gタンパク質共役受容体DREADD(hM3Dq)とCa²⁺センサーであるGCaMP6のアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を作製し、このAAVを初代培養神経細胞に導入した。その後、DREADDのアゴニストであるCNOを添加し、hM3Dqが発現した神経細胞を活性化させた。その結果、遺伝子導入された神経細胞で、GCaMP6の蛍光が強くなったことから特定の神経細胞で神経活動を誘発することが可能となった。続いて、ミクログリア形質を解析するため、ミクログリアマーカーであるCD68やCX3CR1、そしてFAT3のプロモーターをクローニングし、これらを分割したのち、ルシフェラーゼのレポータープラスミドに挿入した。その後、これらレポータープラスミドをBV2に導入し、レポーターアッセイによってどの領域にプロモーター活性があるか特定することができた。さらに特定したプロモーターの下流に蛍光タンパク質を挿入し、ミクログリア活性をモニタリングする新しい蛍光プローブを作成した。現在、これらプローブを用いて、詳細な解析を進めているところである。

【展望】

今後はこれまでの研究で獲得したツールを用いて実験系の確立を目指し、*in vivo*と*in vitro*の両方で神経活動依存的なミクログリアの形質変化について観察する予定である。



(図) 実験系の概略図

DREADDとGCaMP6をトランスフェクションした初代培養神経細胞とFAT3蛍光プローブをトランスフェクションしたBV2を共培養する。CNOを投与してDREADDが導入された特定の初代培養神経細胞の神経活動を活性化・抑制させた時にBV2やFAT3の発現が変わるかどうかがプローブを用いて観察する。

自閉症責任遺伝子 USP15 によるシナプス形成の制御

濱田 千晴 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

自閉症とは学習障害や認知障害、社会行動に異常が見られる発達障害の一つである。自閉症関連疾患の患者の脳においては未熟なスパインの密度が上昇し、異常なシナプス構造も認められる。自閉症の発症には遺伝的要因が主原因となるが、近年の研究から、胎児期ならびに幼児期の環境要因も発達障害の発症や重篤度に関与することが示唆されている。先行研究から、これまで数多くの自閉症関連遺伝子が同定されてきた。中でも *Usp15* は Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI) でカテゴリー2の Strong candidate gene に分類される遺伝子である。USP15 は脱ユビキチン化酵素の一つで、細胞内で様々なシグナル伝達や代謝経路を調節している。また、当研究室の先行研究において USP15 が大脳皮質第5層に多く発現していることを見出している。しかしながら、USP15 がどのような分子メカニズムで自閉症のリスク亢進の要因となっているのか、詳細な分子メカニズムは解明されていない。そこで本研究では、中枢神経系における USP15 の機能解析を中心に、USP15 の異常がなぜ発達障害につながるのか、詳細なメカニズム解明を目的とした。

【方法】

(1) 免疫組織染色

野生型 (WT) マウス、USP15 KO マウスを 4%PFA/PBS 溶液で灌流固定後、脳を取り出し、4%PFA/PBS 溶液により 1 日間 4°C で静置した。その後 30%スクロース/PBS 溶液に移し、4°C で静置した。30%スクロース/OCT コンパウンドで包埋し、-80°C で凍結した。その後クライオスタットを用いて 30 μm の凍結切片を作成した。大脳皮質第5層の神経細胞の検出のために抗 CTIP2 抗体 (1:500, abcam)、プレシナプス検出のために抗 VGLUT1 抗体 (1:500, Millipore) と抗 VGLUT2 抗体 (1:500, SYSY)、ポストシナプス検出のために抗 PSD95 抗体 (1:500, NeuroMab) を一次抗体として用いた。核の染色には Hoechst33342 (5.0 μg/ml, Invitrogen) を用いた。染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM710) を用いて観察した。

(2) 細胞免疫染色

カバーガラスに初代マウス神経細胞を播種し、7 日間培養した後、4%PFA/PBS で固定した。一次抗体として抗 USP15 抗体 (1:1000, CST)、神経細胞の核を検出するために抗 NeuN 抗体 (1:1000, Millipore)、神経細胞の樹状突起の検出のために抗 Map2 抗体 (1:1000, Millipore) を用いた。

(3) シナプスの定量

染色画像をもとに、プレシナプスのマーカーとポストシナプスのマーカーが共局在している領域をシナプスとみなし、定量を行った。分析には FIJI Image J の puncta analyzer を用いた。

【結果】

自閉症患者の原因の一つとしてシナプス形成の破綻が挙げられる。まず、USP15 がシナプス形成に関与するか調べるために、生

後 14 日 (以下 P14)、P21、P 28 の WT および USP15 KO マウスの大脳皮質第5層におけるシナプスの定量を行った。USP15 KO マウスの大脳皮質第5層で興奮性シナプスの数が減少、抑制性シナプスの数が増加していることがわかった。このことから、USP15 KO マウスではシナプス形成のバランスが異常となることが示唆された。

次に神経活動依存的な USP15 の発現の制御について検証した。これまでに当研究室では、USP15 は新生仔期の光刺激依存的に局在が変化することを見出している。そこで、細胞に脱分極を引き起こす KCl、または神経伝達物質の一つであるグルタミン酸を添加することにより刺激を与え、USP15 の局在が神経活動依存的に変化するかどうか観察した。細胞の観察は、刺激を添加してから 0~24 時間でタイムコースをとった。その結果、USP15 は通常細胞内で核に多く発現しているが、刺激を与えることにより細胞質や軸索へと周期的に局在が変動することがわかった。これらの結果から、USP15 の局在は神経活動依存的に制御されることが示唆された。

【展望】

本研究では、USP15 KO マウスの大脳皮質第5層においてシナプス形成のバランスが異常になることを見出した。また、USP15 の局在は神経活動依存的に変化することが示唆された。しかしながら、神経活動依存的な USP15 の変化がシナプス形成にどのように影響をもたらすのかは明らかでない。今後 USP15 のイメージングや細胞培養を用いた実験で明らかにしていく予定である。

大脳皮質には神経細胞だけでなくアストロサイトといったグリア細胞も存在する。アストロサイトは脳内でシナプス形成を誘導し、神経細胞の栄養的・機能的補助を行う。それゆえ、USP15 の機能はアストロサイトからの作用により制御される可能性がある。今後 WT および KO のマウスの脳から単離したアストロサイトの培養上清をマウス初代培養神経細胞に添加する実験やアストロサイトとの共培養を行い、神経細胞における USP15 の機能変化が神経細胞自律的、または非自律的に制御されるのかどうかを検証していく予定である。

嫌気・微好気性鞭毛虫の系統メタモナスにおける解糖系関連酵素の進化

小林 祐介 (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)

はじめに

真核生物の中には、嫌気・微好気環境に適応した結果、酸素呼吸を行う典型的なミトコンドリア (Mt) を失っている系統が多数存在する。中でもメタモナスは典型的な Mt を欠く鞭毛虫の大きな系統群であり、いずれの生物も基質レベルのリン酸化により嫌氣的に ATP を合成している。

メタモナスはさらに3つの部分系統群、プレアクソスティラ、パラバサリア (寄生虫 *Trichomonas* 等)、フォルニカータ (寄生虫 *Giardia* 等) に分けられ、名前を挙げた寄生虫においては過去、嫌氣的エネルギー代謝に関する多くの知見が報告されている。

一方で近年、*Trichomonas* や *Giardia* に近縁な自由生活性のメタモナス鞭毛虫が数多く発見され、所属研究室を含む複数の研究室において、それら自由生活性種のゲノム・トランスクリプトームのデータが蓄積されている [1,2]。

これらのデータを用い、自由生活種を含めて嫌氣的エネルギー代謝に関する比較解析を行うことは、嫌気・微好気環境におけるエネルギー代謝の多様性や進化を探るうえで重要である。

そこで本研究では、嫌氣的エネルギー代謝の要となる解糖系に着目し、解糖系を構成する10個の酵素のそれぞれが、メタモナス生物においてどのような進化を遂げたのかを明らかにするために、各酵素のアミノ酸配列データに基づく分子系統解析を行った。

対象・方法

[解析対象とした解糖系酵素]

1) Glucokinase (GCK), 2) Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), 3) phosphofructokinase (PFK), 4) fructose-bisphosphate aldolase (FBA), 5) triose phosphate isomerase (TPI), 6) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 7) phosphoglycerate kinase (PGK), 8) phosphoglycerate mutase (PGAM), 9) enolase (ENO), 10) pyruvate kinase (PK)

・配列データ収集のための検索対象としたアミノ酸配列データベース

・ National Institute for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の nr-aa

・所属研究室および他研究室から報告された、メタモナス生物のタンパク質コード遺伝子のアミノ酸配列データで nr-aa に未登録のもの、所属研究室分については未発表データを含む

[データ収集の方法]

所属研究室にてデータベース化されている、メタモナス生物20種の全タンパク質のアミノ酸配列データを対象に、*Trichomonas* および *Giardia* の各酵素の配列データを問い合わせ配列として blastp 検索を行い、E-値 $< 1 \times 10^{-10}$ をみだす配列を選択した (全く同一の重複データおよび著しく短い配列は除外)。nr-aa から生物界全体を網羅して各酵素のホモログを検索するために、NCBI の Taxonomy データベースを参照して、真核生物を32のサブグループ、アーキアを9のサブグループ、バクテリアを43のサブグループに分割した。検索対象を nr-aa データベース内の 32 + 9 + 43 + その他の配列からなるサブグループのそれぞれに限定し

て、*Trichomonas* の各酵素の配列を問い合わせ配列として、Psi-blastp 検索を行い、E-値 $< 1 \times 10^{-10}$ (一部グループは $< 1 \times 10^{-5}$) をみだす配列を選択した。さらにそれらから E-値が最大値、75%点の値、中央値、25%点の値、最小値を示す配列5つ (5点要約値) を選択し、各サブグループにおける当該酵素ホモログ配列の候補とした。メタモナスデータベースから検索した配列と各サブグループを対象に検索した配列を合わせて、分子系統解析用の候補配列データセットとした。

[アライメントと分子系統解析]

各酵素のデータセットに対し、MAFFT v7.450 を用いてアライメント (-auto オプション) し、trimAl v1.4 を用いてアライメントに曖昧さを伴わない座位を選択 (-gappyout オプション) して、データマトリクスとした。分子系統解析には IQTREE v1.6.5 を用いた [3]。まず、一般的なパソコンにて、最初に modelfinder を用いてモデル選択を行い、BIC 最小の最適モデルを用いて100個のブートストラップデータに対する ultrafast bootstrap オプションでの解析を行い、ブートストラップ合意系統樹を得た。ただし、著しく進化速度の大きい配列や、明らかに誤ってデータに混入したと見られる配列は、アライメントをチェックしたうえで除外した。データマトリクスをもとに、国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータを用いて、最尤系統樹の探索を行い、100個のブートストラップデータに対し通常の non-parametric bootstrap 解析を行ってブートストラップ値 (BP 値) を算出しそれらを最尤系統樹上に示した。さらに、内部枝の信頼度に対する別の尺度として TBE 値 [4] も算出した。

結果

解析配列数は79から423、解析座位数は218から1586に及んだ。10個の酵素のなかで、真核生物の全てのサブグループが1つにまとまる酵素はなかった。メタモナスについては、最尤系統樹で、パラバサリアの単系統性が復元されたのは PGAM を除く9酵素で、同様にプレアクソスティラは GCK を除く9酵素、フォルニカータは PFK, GAPDH, PGK, ENO, PK の5酵素であった。一方、メタモナスの単系統性はどの酵素についても復元されず、パラバサリア、プレアクソスティラ、フォルニカータのうち1つ~2つの組み合わせが、バクテリアの系統の中に含まれる例が多かった。

考察

生物界全体からの網羅的なタクソンサンプリングに留意した解析により、解糖系10酵素それぞれの複雑な進化史の一端が明らかになった。とくに、嫌気・微好気性生物のみからなるメタモナス生物について、バクテリアから水平転移した酵素が用いられていると考えられる例が多く、哺乳類・シロイヌナズナなどの好気性真核モデル生物の解糖系との相違が明確となった。

文献

[1] Leger et al. (2017) Nat Ecol Evol 1:0092; [2] Tanifuji et al. (2018) PLoS One 13: e0194487; [3] Nguyen et al (2015) Mol Biol Evol 32:268-274; [4] Lemoine et al. (2018) Nature 556:452-456

大規模欠失突然変異型 mtDNA を導入したマウス骨格筋の萎縮における炎症性反応の関与の有無

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

【背景・目的】

ミトコンドリアは外膜と内膜の二重の膜からなる細胞小器官であり、内膜は呼吸酵素複合体 I ~ V による酸化リン酸化反応によって生命活動に必要な ATP 産生の大部分を担っている。また、ミトコンドリア内膜の内側のマトリクスには核 DNA とは異なる独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞当たり数百~数千コピー含有されている。哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体の構造遺伝子のほか、これらの翻訳に必要な *tRNA* 遺伝子と *mRNA* 遺伝子がコードされている。

このような mtDNA に病原性突然変異が生じ、変異型 mtDNA が優位に蓄積することで、ミトコンドリア病と呼ばれる全身性の代謝疾患が発症することが知られている。所属研究室では *mito-mice Δ* と呼ばれるミトコンドリア病モデルマウスの樹立に成功している。*mito-mice Δ* の各組織・各細胞には正常な mtDNA (野生型 mtDNA) と大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) が含有されており、各組織・各細胞に含有される Δ mtDNA が 70~80% 以上の割合で蓄積すると、呼吸酵素複合体の形成不全による ATP 産生不全が誘導され、腎不全や低体重といったミトコンドリア病を発症する。 Δ mtDNA を 80% 以上の割合で有している *mito-mice Δ* の骨格筋において呼吸機能不全による筋萎縮が観察されている、しかし、この筋萎縮が誘導される分子機構については詳細に解明されていない。

骨格筋の繊維径はタンパク質合成経路とタンパク質分解経路のバランスによって制御されていることが知られている。骨格筋タンパク質分解経路としては主にユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系が、骨格筋タンパク質合成経路としてはインスリンシグナル伝達経路が、それぞれ関与することが知られている。所属研究室の先行研究において、*mito-mice Δ* の大腿四頭筋ではユビキチンプロテアソーム E3 リガーゼ遺伝子及びオートファジーのマーカータンパク質として知られている LC3II タンパク質の発現量の増加が報告されている。一方、この 2 つの経路を誘導する分解経路のマスターレギュレーターである FoxO3 は不活性化していることから、呼吸機能不全によってひきおこされる筋萎縮は、これまでに知られている骨格筋萎縮とは異なる経路によって誘導されることが示唆されていた。一方、FoxO3 を介さずにタンパク質分解系を促進する経路として、NF- κ B が関わる炎症性反応とステロイド系抗炎症薬の副作用として観察されるグルココルチコイド誘導性の経路も知られている。そこで本研究では、*mito-mice Δ* で観察される筋萎縮において、炎症性反応とグルココルチコイド誘導性の経路が重要な役割を果たしているか、否かを検証した。

【材料】

Δ mtDNA が 80% 以上蓄積した *mito-mice Δ* (10 か月齢) の大腿四頭筋と血清、ならびに、B6 マウス (10 か月齢) の大腿四頭筋と血清を解析材料とした。

【方法】

各マウスの大腿四頭筋から抽出した総タンパク質抽出液を用いて、炎症性反応およびグルココルチコイド誘導性の経路に関与するタンパク質の発現量をウェスタンブロットングにより比較解析した。さらに、免疫蛍光染色を駆使して、大腿四頭筋を構成する各筋繊維における発現変化も比較解析した。また、全身性の炎症性変化、ならびに、グルココルチコイド誘導性の経路の関与を検討するために、血清生化学解析を行った。

【結果】

血清生化学解析において、炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 の量が B6 マウスと比較して *mito-mice Δ* において優位に上昇していた。この結果は、*mito-mice Δ* では全身性の炎症反応が誘導されている可能性を示唆している。

一方、げっ歯類において主要なグルココルチコイドであるコルチコステロンの血清濃度は、B6 マウスと比較して *mito-mice Δ* において優位に減少していた。この結果は、*mito-mice Δ* で観察される筋萎縮においてグルココルチコイド誘導性の経路が関与している可能性は低いことを示唆している。

その他の結果については発表会にて報告する予定である。

点突然変異型 mtDNA が骨格筋タンパク質の分解・合成に及ぼす影響の解析

松浦 佑実子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

<背景・目的>

ミトコンドリアはほとんどの真核生物で見られる細胞小器官の一種であり、外膜と内膜の二重の膜からなっている。特に、内膜には電子伝達系が存在している。この電子伝達系では、呼吸酵素複合体 I～V による酸化的リン酸化によって膜間に H^+ が輸送され、内膜を隔てて生じた濃度勾配により呼吸酵素複合体 V にあたる ATP 合成酵素が駆動し、生命活動に必要な ATP の大部分が産生される。また、ミトコンドリアマトリクス (内膜の内側) には、独自の環状二本鎖 DNA (mtDNA) が、細胞あたり数百から数千コピー含有されている。これらの mtDNA に突然変異が生じ、このような変異型 mtDNA が蓄積すると、「ミトコンドリア病」と総称される多様な疾患が発症することが知られている。さらに近年、糖尿病や個体老化、パーキンソン病やアルツハイマー病といった多様な疾患を発症した患者組織から変異型 mtDNA が見出されたことを受け、変異型 mtDNA と多様な病態との因果関係も示唆されはじめている。

哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体 II を除く複合体サブユニットの一部を構成する 13 種の構造遺伝子とその翻訳に必要な 2 種類の rRNA 及び 22 種類の tRNA の遺伝子がコードされている。呼吸酵素複合体を構成するその他のサブユニットの遺伝子は (前述の 13 種以外) は、核 DNA にコードされている。このように呼吸酵素複合体は核とミトコンドリアの両方を由来として構成されており、核 DNA と mtDNA の二重支配を受けていることから、mtDNA の変異と多様な疾患との因果関係を解析するためには、野生型の核背景をもち、mtDNA にのみ突然変異を有するモデルマウス (mito-mice) を活用ことが有効である。

所属研究室で作製された mito-mice の 1 種である mito-mice ND6^M では、慢性的な酸化ストレスの状態と骨格筋の萎縮 (筋萎縮) が確認されている。mito-mice ND6^M は、呼吸酵素複合体 I のサブユニットをコードする ND6 遺伝子上に G13997A 点突然変異を細胞内の全ての mtDNA に有する、ホモプラスミーの状態で含有している。mito-mice ND6^M の表現型として、呼吸酵素複合体 I の活性低下による軽度な呼吸機能不全、活性酸素種 (ROS) の過剰産生、加齢時の高血糖やリンパ腫の発症頻度の増加などが知られている。

骨格筋を構成する筋繊維は出生後、通常は細胞分裂により新たな筋繊維を分化させることなく、既存の筋繊維のタンパク質の分解と合成を絶えず繰り返すことで、筋繊維のサイズを制御している。このため、筋萎縮はタンパク質分解経路、及び、合成経路のバランスが崩れることで起こることが分かっている。興味深いことに、加齢による筋萎縮 (サルコペニア) や廃用性骨格筋萎縮が認められる症例において、ミトコンドリアの機能異常が観察されることが報告されている。これらのことから、変異型 mtDNA の蓄積によるミトコンドリア機能異常と筋萎縮には何らかの相関があると考えられている。

そこで本研究では、mito-mice ND6^M における骨格筋の組織をモデルとして、点突然変異型 mtDNA が骨格筋タンパク質の分解・合成経路に及ぼす影響の解析を目的とした。

<材料・方法>

1. 使用したマウス

所属研究室において樹立されている mito-mice ND6^M は mtDNA にのみ突然変異を有し、核 DNA は、野生型とされている C57BL/6J (B6) 由来である。そのため、コントロールとして、核 DNA、mtDNA がともに B6 系統であるマウスを用い、各系統 10 カ月齢のマウスから摘出した大腿四頭筋を解析サンプルとした。

2. ウェスタン・ブロッティング

骨格筋タンパク質分解系、及び、合成系のマスターレギュレーターとされるタンパク質を中心にウェスタンブロット法による定量を行った。

WSE-7420 EzRIPA Lysis kit を用いて大腿四頭筋から抽出したタンパク質溶液を出発材料とした。ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜にブロッティングした。室温にて 3 時間ブロッキングを行い、数回 TBS-T にて洗浄した後、1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体を室温にて 1 時間反応させた。TBS-T を用いて数回洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて骨格筋タンパク質分解系、及び、合成系のマスターレギュレータータンパク質を検出した。

<結果>

詳細な結果については発表会にて報告予定である。

レチナル類似体により長波長シフトさせたチャネルロドプシンの電気生理学的解析

田中 海帆 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境学系)

1. 背景

チャネルロドプシンは藻類で発見された7回膜貫通型の光駆動性カチオンチャネルであり、結合する発色団レチナルが光を受けて異性化することによりチャネルが開口し脱分極が引き起こされる。今日では光によって神経細胞の活動を制御する光遺伝学のツールとして広く利用され、生きた状態の生物個体に対して非侵襲的に、チャネルロドプシン遺伝子を発現させた細胞を選択的に興奮させることができることから、特に脳科学や神経科学の分野で注目されている。これまで知られているチャネルロドプシンの多くは青色から緑色光の波長帯の光によって活性化されるが、これらの波長帯は血中に含まれるヘモグロビンによって吸収・散乱されやすく、組織深層への浸透が制限されるという問題点がある。この問題の克服には、より長波長の光の吸収を示す性質を有したチャネルロドプシンの開発が重要である。近年、レチナルの直鎖ポリエンを伸長させた「レチナル類似体」を用いると、チャネルロドプシンの吸収がより長波長シフトを示すことが分光学的に示された。しかし、レチナル類似体を結合したチャネルロドプシンの光電流は不明である。本研究では培養細胞に発現させたチャネルロドプシンについて電気生理学的に光電流の作用スペクトルを解析し、今後のより光遺伝学的に有用性の高いレチナル類似体の開発の一助となることを目的とした。

2. 方法

<培養細胞における発現> ポリ-D-リジンでコーティングした15mm丸型カバーガラスにて培養したHEK293T細胞に対し、プラスミドDNAをリポフェクション法により導入した。プラスミドはマーカーとして蛍光タンパク質 Venus とチャネルロドプシン遺伝子 C1C2 または ReaChR を導入し、1日以上培養後、野生型レチナルまたはレチナル類似体を $1\mu\text{M}$ 添加して2時間から1終夜培養し電気生理実験を行った。レチナル類似体は、オールトランスレチナル2 (ATR2) のポリエン鎖のうちそれぞれ C6-C7, C10-C11, C14-C15 の位置に二重結合を付加したものをを用いた。以降 C6-C7 へ二重結合を加えた ATR2 を導入した C1C2 を ATR2-6ex-C1C2 のように記述する。

<電気生理学実験> 電気生理実験では、蛍光タンパク質 Venus の発現を示した細胞に対して細胞膜を穿孔し、ホールセルパッチクランプ法により、細胞膜電位を固定した状態で 420, 460, 520, 560, 600, 640, 680 nm の各波長の1秒間の定常光によって生じる電流を測定した。なお、還流液の組成は NaCl 140, KCl 1, CaCl₂ 2, CsCl 1, MgCl₂ 2 (mM) を、電極内溶液の組成は NaCl 110, KCl 1, CaCl₂ 2, CsCl 1, MgCl₂ 2 (mM) を用いた。

<解析方法> 多くの細胞では、光刺激を与えた直後に電流は最も大きい値を示し、その後徐々に減少し光が消失する直前にかけて安定的な値を示す(図1)。この異なる時間経過で測定されるの電流量をそれぞれ極大値および定常値として各成分に関して解析をおこなった。定常値解析では一光子数あたりの電流量を各波長における感度とし、極大値解析では一光子数あたりの定常値との差分を感度として算出した。

3. 結果

<チャネルロドプシンの光電流> まず、Venus 陰性の HEK293T に対して光刺激を与えたところいずれの細胞でも光電流は観察されなかったのに対し、Venus 陽性の細胞においては、ほぼ全ての細胞で光電流が観察されたことから、光電流は導入したチャネルロドプシン由来であることを確認した。また、チャネルロドプシンが機能するにはレチナルが不可欠であるが、光電流は、レチナル添加しない条件でも観察された。これは、培養細胞の内在性のレチナルが存在しているためと考えられる。その光電流の最大感度は、C1C2 と ReaChR でそれぞれ 460 nm と 520 nm であり、オールトランスレチナル1 (ATR1) による吸収スペクトルと類似していたことから HEK293 細胞の内在性は ATR1 レチナルと考えられる。これ以降はより長波長シフトが期待できる ReaChR に着目してレチナル類似体を添加し実験を行った。

<レチナル類似体による定常値解析> 次に、培地にレチナル類似体を添加し光電流の測定を行った。異なる3種類のレチナル類似体 ATR2-6ex-ReaChR, ATR2-10ex-ReaChR, ATR2-14ex-ReaChR のすべてに関して、光電流は 520 nm の光に対して最大感度を示し、レチナル添加による最大感度の波長シフトは見られなかった。その一方で、560 nm から 640 nm の波長帯の光に対する感度が上昇し、中でも 560 nm で最も顕著であった。

<レチナル類似体による極大値解析> 極大値に関しても、3種類のレチナル類似体に関して同様の解析を行ったところ、ATR2-14ex-ReaChR でのみスペクトル感度が 560 nm で最も高くなったが、他のレチナル類似体ではいずれの波長の光に対しても顕著な感度の上昇は観察されなかった。

4. 結論

この実験では、まずレチナル類似体が分光学的な吸収を示すだけでなく、生きた細胞内の C1C2 および ReaChR で光電流に寄与することを確認した。特に ATR2-14ex-ReaChR は長波長帯での感度の上昇が顕著であり、さらに極大値のスペクトルピークも長波長へとシフトした。ゆえに ATR2 の C14=C15 への二重結合の導入は、ReaChR において長波長帯の光に対して最も効果的に電流を発生させるといえる。考察の詳細は発表会にて報告する。

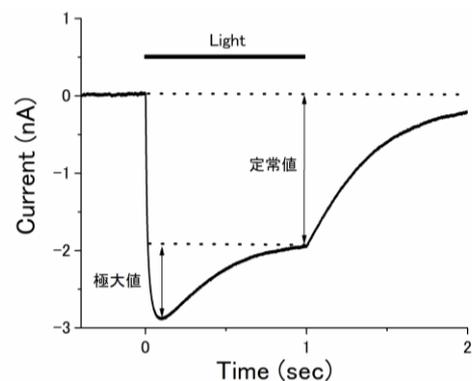


図1: 光パルス照射後から遮断までの光電流例

セサミン代謝微生物に関する研究

西岡 悠輝（筑波大学 生物学類） 指導教員：熊野 匠人（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

リグナンは、フェニルプロパンユニット2つが縮合することで合成される植物由来化合物である。ゴマ種子には重量の半分の油が含まれており、そのうち1%程度がリグナンの一種であるセサミンであるとされている。セサミンは近年サプリメントとしても注目されており、抗酸化、血中コレステロールの低下、脂質低下、抗高血圧、抗炎症などの生理活性が知られている。セサミンの生理活性はセサミンが体内で代謝されることで発揮される場合もあり、例えば、ヒトやマウスでは肝臓において、シトクロームP450酵素により、抗酸化活性の強いセサミンカテコール体へと変換される。生じたセサミンカテコール体は最終的にはグルクロン酸抱合されて体外に排出される。一方で、微生物によるセサミンの代謝については腸内細菌によってリグナンが(哺乳類リグナンと呼ばれる抗酸化活性やエストロゲン様活性を示す)エンテロジオールやエンテロラクトンへ変換されることが報告されているものの、いずれの場合も代謝に関わる酵素とその遺伝子は同定されていなかった。

当研究室では、スクリーニングによって土壌よりセサミン資化性菌を単離し、さらに本菌よりセサミンをセサミンモノカテコール、ジカテコールへと2段階変換するセサミン代謝酵素を発見した。本酵素はテトラヒドロ葉酸 (THF) を補酵素としてメチレン基転移反応を触媒する新規酵素であることが分かった。さらに、セサミンジカテコールがさらに代謝された新規化合物 A も同定されている。

そこで本研究では、化合物Aの代謝反応を明らかにするため、化合物Aの分解に関与する酵素の同定を目的とした。

方法・結果

まず、化合物Aが市販されていなかったため、セサミンから微生物変換により調製した。先行研究で単離されていたセサミン資化性菌の一種を培養し、その無細胞抽出液 (CFE) とセサミンを反応させることで獲得した。次に、同じ細菌のCFEを用いて、AKTAにより化合物A代謝酵素 (酵素X) の精製を試みた。しかし、精製の過程で基質の減少がほとんどみられなくなった。この結果は透析による補酵素の欠乏が原因であると考え、無細胞抽出液を透析したものに様々な補酵素を添加した反応液を作成し検討することで、化合物Aの代謝酵素に必要な補酵素の特定に成功した。しかし、酵素Xによる代謝産物の構造決定には至っていない。

そのため、現在は代謝産物の構造決定を目標とし、様々な反応条件を試して代謝産物の十分な産生と精製を試みている。

今後の予定

引き続き微生物によるセサミン代謝経路の解明を目指す。

まず、高い変換活性を示す反応条件を見出し、代謝産物の構造決定を行う。また、セサミン分解菌を培養し、酵素Xにより生成する代謝産物を加えて、分解されるかどうか検討を行うことで、本研究で得られる代謝産物が、セサミンの代謝中間体であるかどうかを検討する。さらに、酵素Xの諸性質を解明する予定である。

脂溶性ビタミン代謝微生物の探索

常陸 カイル（筑波大学 生物学類） 指導教員：熊野 匠人（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

腸内細菌叢は糞便 1g あたり千億個程度存在しており、彼らは宿主から供給される栄養分の一部を利用して生活している。腸内細菌叢の役割としては免疫機能、腸内環境の維持などがあげられるが、ビタミンの生合成もその役割の一つである。腸内細菌叢によって生合成されるビタミンは多くが報告されているが一方でビタミンの分解についてはその報告例は少ない。

方法・結果

ビタミンの分解に関わる腸内細菌を 2 種の分離源からスクリーニングした。これによりビタミンを分解する 2 種の細菌（A 菌と B 菌）が単離された。遺伝子解析の結果、それぞれからビタミン分解酵素が精製された。

活性測定は 5 mM ビタミンを含む、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に粗酵素液を添加し、37°C で行った。反応後、アセトニトリル添加で反応を停止し、高速液体クロマトグラフィーを用いて確立した測定系で分析することで酵素活性を調べた。A 菌から精製したビタミン分解酵素の N 末端アミノ酸配列を解析し、本菌のゲノム中より一致する ORF を同定した。ORF をアミノ酸配列に翻訳し BLAST データベースで検索すると、グラム陽性菌由来糖変換酵素と相同性を示した。本遺伝子をクローニングし、大腸菌で異種発現させたところ、精製した酵素はビタミンを分解した。

また、B 菌からもビタミン分解酵素遺伝子をクローニングし、組換え酵素を用いてビタミン分解活性の検出を HPLC で試みた。その結果、基質であるビタミンの減少は確認できたものの反応産物のピークは確認することができなかった。これまでに報告されているビタミンの酸化反応後の産物であれば、今回用いた HPLC の分析条件でも検出できる。このことから、今回の反応産物が紫外線吸収を持たない構造を有している新規化合物の可能性が考えられた。ガスクロマトグラフィーやカラムを順相の液体クロマトグラフィーにして検討したもののやはり反応産物を確認することはできなかった。

また、LC/MS の結果から酵素反応後に増加しているピークを見出した。しかしながら再現性良くピークを検出することは難しかった。これはビタミン分解酵素が安定でなく、活性が短時間で失われてしまったためだと考えられる。

今後の予定

反応産物を同定し、大まかな代謝経路の考察などを行った後、酵素の諸性質を解明する予定である。

水溶性ビタミン代謝微生物に関する研究

松室 康平（筑波大学 生物学類） 指導教員：熊野 匠人（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

チアミンはビタミン B1 として広く知られている水溶性ビタミンの一種であり、生体内ではチアミンピロリン酸としてクエン酸回路など主代謝経路の補酵素として必要なため、重要である。チアミン代謝酵素の代表例としてチアミナーゼがあり、チアミナーゼには 2 種類が存在する。一つ目はチアミナーゼ I であり、ピリジンなどの塩基性物質を利用し、塩基性物質複合体とチアゾールに分解する。二つ目のチアミナーゼ II は多くの細菌で見られ、この酵素は加水分解によって C-N 結合を切ることでピリミジンとチアゾールに分解する。

しかし、チアミン代謝におけるチアミナーゼ以外の酵素は未同定であり、本化合物の微生物代謝に関する知見は一部代謝産物が報告されているものの、経路内で働く酵素やその代謝産物の作用機序は未だに明らかにされていない。当研究室ではチアミンの代謝を担う微生物を自然界よりスクリーニングし、チアミン代謝産物や代謝経路の一部を解明するとともに、代謝に関わる酵素（酵素 A、酵素 B）の一部を同定した。

しかし、チアミン代謝酵素において、チアミナーゼ以外はチアミンを酸化するチアミンオキシダーゼについてのみ酵素活性の報告はあるが、遺伝子は同定されておらず、その他の反応に関しては報告されていない。即ち、チアミナーゼ以外の酵素は未同定であり、本化合物の微生物の代謝に関する知見は、一部代謝産物が報告されているものの、その代謝産物の作用機序も未だに明らかにされていない。

そこで、当研究室の先行研究では、チアミン代謝を担う微生物を自然界よりスクリーニングにより単離し、チアミン代謝経路における代謝解明を進めてきた。

方法・結果

私は本研究室で、チアミン代謝経路中の代謝産物である、MaHMP を MbHMP へと変換する酵素である酵素 A の精製を試みた。さらに、酵素 A とは異なる酵素 B についても無細胞抽出液を調製し、クロマトグラフィーを用いて精製を試みた。

今後の予定

さらなるチアミン代謝経路の解明と、それに関与する代謝酵素を同定し、微生物におけるチアミン代謝経路の全貌を明らかにすることを目的とする。

フラボノイド代謝腸内細菌に関する研究

小綿 慧莉 (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

フラボノイド化合物はフラバンを基本骨格として有し、植物の二次代謝産物として産生される化合物である。このフラボノイド化合物には、抗酸化作用や抗炎症効果、抗腫瘍効果などの生理活性があることが知られており、フラボノイド化合物が豊富に含まれる食品類を摂取することは、健康増進につながると考えられている。食品や飲料などを通じて経口摂取されたフラボノイド化合物は、小腸に吸収されるだけでなく、その一部は大腸に移行し、大腸内に生息する腸内細菌によって分解を受ける場合がある。そして、腸内細菌によってフラボノイド化合物が分解されることによって生じた代謝産物の一部には、その化合物そのものにも、フラボノイド化合物が有するような生理活性があるということが認められつつある。フラボノイド化合物の腸内環境における代謝について様々な研究が行われている中で、私は、あるフラボノイド化合物の、腸内環境における代謝過程を明らかにした研究に着目した。この研究では、フラボノイド化合物の代謝産物、およびそのような代謝に関わる菌株の一部のみが同定されているだけで、代謝に関わる菌株が有する代謝酵素や遺伝子については明らかとされていない。この研究で明らかとされた代謝経路の中で産生される化合物の一部には、有用な生理活性が報告されていることから、そのような化合物を産生することに働く代謝酵素やその遺伝子について解明することは、化合物そのものの有用性を向上させることにつながると考えられる。以上の背景から私は、あるフラボノイド化合物の腸内環境における代謝経路のうち、代謝の中間産物を、さらに代謝して生理活性がある別の化合物に変換する反応に着目し、そのような反応に関わる腸内細菌が有する代謝酵素や、その遺伝子を同定することを目標として研究を行った。

方法・結果

以下、フラボノイド化合物を代謝することにより化合物 X を産生する腸内細菌を A 株、A 株が産生した化合物 X をさらに代謝し、生理活性を有する別の化合物 Y に代謝する腸内細菌を B 株と記す。また、物質の変換には関係しないが、A 株の代謝を促進する腸内細菌を C 株と記す。本研究では A 株が産生する化合物 X を化合物 Y へ変換する反応を担う B 株の代謝酵素および遺伝子の同定を目指した。

まず、B 株の休止菌体反応によって化合物 Y が産生されるような反応の条件検討を行った。基質となるフラボノイド化合物を添加した液体培地に、A 株および C 株を植菌し 48 時間共培養した後、培養液に B 株を植菌し、さらに 48 時間共培養を行った。その後、培養液を遠心して A 株、B 株、C 株が混合した休止菌体を回収した。この休止菌体に、A 株の基質であるフラボノイド化合物を添加してインキュベーションを行い、その反応液上清を LC/MS で分析した。その結果、基質として添加したフラボノイド化合物が A 株と B 株に連続的に代謝され、B 株の代謝産物である化合物 Y が反応液上清に産生されたことが確認された。

次に、それぞれ個別に培養した A 株、B 株、C 株から調製した

休止菌体を混合して反応させた場合でも可能なのか、以下の条件検討を行った。まず、B 株の培養条件の検討を行った。B 株を単独で培養する際に、基質を何も添加しない培地、A 株の基質となるフラボノイド化合物を添加した培地、B 株の基質となる化合物 X を添加した培地を用いて、それぞれ B 株を培養し、菌体を回収した。回収した B 株休止菌体に A 株と C 株の休止菌体およびフラボノイド化合物を添加してインキュベーションし、それぞれの菌体が反応液中に産生した化合物 Y の量を比較したところ、化合物 X を添加して培養した B 株菌体は、他の条件で培養した B 株菌体に比べて、化合物 Y 産生量が多いことが分かった。これは B 株の有する代謝酵素が A 株代謝産物 X の存在下で発現が誘導される、誘導酵素である可能性を示唆している。これらのことから、活性の高い B 株を得るためには、基質となる化合物の存在下で培養する必要があるということが明らかとなった。一方、B 株と A 株の菌体を混合して反応させずに、A 株の代謝産物である化合物 X の抽出液を基質として添加し、B 株による反応を検討したが、添加した基質 X の変換は確認できなかった。

これらの休止菌体反応における条件検討の結果から、反応に最適と思われる条件のもと、B 株の無細胞抽出液を用いた反応を検討した。B 株の無細胞抽出液と A 株および C 株の休止菌体を混合し、フラボノイド化合物を添加して反応を試みたが、A 株代謝産物 X の産生までしか反応が進行せず、B 株の産物である化合物 Y の産生は認められなかった。

現在、pH や補酵素など B 株の無細胞抽出液の反応に適切な条件の検討を行っている。

土壌細菌が産生する黒色物質に関する研究

河股 純仁 (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

リグナンは、フェニルプロパンユニットが縮合することで合成される植物由来化合物である。野菜、ナッツ、紅茶など多くの食品に含まれ、我々が摂取するリグナンの供給源となっている。アジア諸国では、リグナンを含むゴマは古くから用いられており、高栄養食材としてだけでなく、文化的にも浸透している。ゴマリグナンに含まれる『セサミン』は、抗酸化作用、コレステロール低下作用、抗炎症作用等の様々な効果を有する生理活性物質として知られており、近年ではサプリメントとして販売されるなど、注目を集めている。セサミンの生理活性はセサミンが体内で代謝されることで発揮される場合もあり、例えば、ヒトやマウスでは肝臓において、シトクローム P450 酵素により、抗酸化活性の強いセサミンカテコール体へと変換される。一方で、微生物によるセサミンの代謝については腸内細菌によってリグナンが哺乳類リグナンと呼ばれる抗酸化活性やエストロゲン様活性を示すエンテロジオールやエンテロラクトンへと変換されることが報告されているものの、いずれの場合も代謝に関わる酵素とその遺伝子は同定されていなかった。

当研究室では、スクリーニングによって土壌よりセサミン資化株を単離し、さらに本菌よりセサミンをセサミンモノカテコール、ジカテコールへと2段階変換するセサミン代謝酵素を発見した。

この資化株は、通常黒くはならないが、セサミンを加えた培地で培養すると培地が黒変する。そのため、セサミンを代謝、またはセサミンに応答することで何らかの化合物が産生されていることが予想される。この時、菌体は黒変していないため、この化合物は、培地中に分泌されていると考えられ、おそらく植物あるいは他の土壌微生物に向けたものである。

そこで本研究では、培養上清から黒色物質を単離し、どのような分子であるかを解明するとともに、この物質が他の生物に与える影響について明らかにすることを目的とした。

方法・結果

初めに、セサミン資化株培養上清から黒色物質を抽出し、精製することを目的として実験を行った。オープンカラムを用い、陽イオン交換樹脂に吸着させ、アンモニア水で溶出後、アセトニトリル、エタノールを用いて洗浄することで部分精製が可能であることが明らかになった。

次に、この物質の分子量や立体構造を解明することを目的として実験を行った。液体クロマトグラフィー/質量分析器(LC/MS)や核磁気共鳴装置(NMR)を用い、部分精製後のサンプルを分析したが、分子量、立体構造の特定には至らなかった。そこで、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分子量を概算したところ、上記の装置の検出限界を超える高分子化合物であることが明らかになった。これらの結果から、生物体有機物が微生物作用を受けることで生じた物質であることから、腐植物質の類であると予想した。現在、代表的な腐植物質であるフミン酸との比較を行っている。

今後の予定

引き続き、黒色物質の分子量、立体構造解明を目指す。まず、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI/TOFMS)を用い、正確な分子量の解明を目指す。その後、部分構造の決定を行う。

続いて、黒色物質が植物や微生物に与える影響について解明していく予定である。

植物由来アルカロイド代謝微生物に関する研究

JIAN PU (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

ピペリンは主にブラックペッパー由来の脂溶性アルカロイドであり、抗がん作用、抗炎症作用、抗菌作用や抗酸化作用を示すことが知られている。

ピペリンは、薬物代謝に関与する肝臓の CYP450 を阻害し、摂取した薬物の生物学的利用能を向上させるなど、生体内における色々な効能の報告はたくさんあるが、自然界での代謝に関する報告は少ない。よって、本研究室における先行研究では、ピペリンの代謝を行う土壌微生物をスクリーニングし、ピペリンの自然代謝経路および代謝産物の解明、代謝経路上で機能する酵素および遺伝子の同定を目的として研究を行った。

先行研究において、沖縄の土壌からピペリンを分解する微生物が単離され、その菌からピペリンを加水分解する酵素が発見され、同定と精製に成功している。また、一部の反応産物としてピペリン酸を同定している。ピペリン酸はさらに何段階かのステップを経て代謝されると推定されるが、その詳細は不明である。

本研究では、植物由来アルカロイド代謝微生物に存在する分解経路の解明と経路上で働く酵素の同定を目的として、酵素の発現条件の検討を試みた。

方法・結果

私は本研究室で、ピペリン分解株である微生物からピペリン誘導性のある酵素の発現条件について検討を行った。さらに、発現した酵素の無細胞抽出液と粗精製酵素を調製し、本酵素の活性について高速液体クロマトグラフィーを用いて検討を行った。

今後の予定

本酵素の活性を更に検討し、ピペリン分解株内のピペリン代謝経路の解明と経路上で働く酵素の同定を目指す。

ゲノム刷り込みに関わる DNA 結合タンパク質の探索

川村 風太 (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】

私たち、ヒトを含む哺乳類の体は、精子と卵子が受精し、受精卵が発生することで形作られる。つまり、二倍体生物である哺乳類の細胞内には父親と母親、それぞれに由来するゲノムが存在する。多くの遺伝子はこれら両方のゲノムから同等に発現するが、刷り込み遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子は片方の親由来ゲノムのみから発現する。この片アレル性の遺伝子発現を制御するのが DNA のメチル化であると考えられている。特に、ICR (Imprinting Control Region) と呼ばれる領域のメチル化は重要である。ICR は父親由来と母親由来とで DNA のメチル化レベルが異なり、この刷り込みメチル化により遺伝子発現の違いを生じる。従って、このメチル化レベルの違いを生み出すメカニズムの解明が極めて重要である。

H19/Igf2 遺伝子座は代表的な刷り込み遺伝子座である (図 1)。*Igf2* は父親由来、*H19* は母親由来アレルのみでそれぞれ発現する。同遺伝子座の ICR (*H19*ICR) は、父親由来では高度にメチル化されており、一方、母親由来では低メチル化となっている。この結果、アレル間で転写制御因子の結合状態に差が生まれ、遺伝子発現の差に繋がると考えられる。当研究室では現在、同領域のアレル特異的なメチル化を生み出すメカニズムの解明を進めている。母親由来アレルの低メチル化維持には、CTCF や Sox/Oct 転写制御因子が関わると考えられている。しかしながら、父親由来のメチル化確立に必要な因子は分かっていない。

【目的】

*H19*ICR における父親由来アレルの刷り込みメチル化は、特定の DNA 領域に特定の因子が結合することで確立されると考えられる。本研究は、このゲノム刷り込みに関わる DNA 結合タンパク質の同定を目的とする。

当研究室では以前、マウスの *H19*ICR (2.9 kb)断片を用いてトランスジェニックマウスを作製した。解析の結果、同トランスジェニックは父親由来アレルのみでメチル化されたことから、刷り込みメチル化の確立に十分な情報を含むと考えられた。さらに、*H19*ICR の 5' 上流領域を欠損させる実験などにより、メチル化確立に必要な十分な 118-bp の配列を同定した。また、同配列に結合するタンパク質が P19 細胞や ES 細胞などの核抽出液中に存在することを、ゲルシフトアッセイにより確認した。以上の結果から、118-bp の配列に同タンパク質が結合することでゲノム刷り込みを制御していることが示唆された。そこで同領域に結合する DNA 結合タンパク質の探索を行うことにした。

【方法】

候補タンパク質の探索は、転写因子データベースを用いておこなった。転写制御因子には、それぞれ固有の DNA 認識配列、つまり、結合コンセンサス配列が存在する。これまでに明らかとなったタンパク質のコンセンサス配列については、データベースにまとめられている。そこでまず、コンセンサス配列と高い相同性

をもつ配列が、118-bp 配列中に存在するタンパク質を検索した。次に、これらタンパク質の機能、細胞内局在、発現時期について文献調査を行うことで、目的因子としての条件を満たす 6 種類に絞り込んだ。

これら因子のクローニングをおこなうために、まず P19 細胞から抽出した RNA を逆転写して合成した cDNA を鋳型とし、PCR により目的の断片を増幅した。次に断片を動物細胞発現用ベクターと大腸菌発現用ベクターにそれぞれライゲーションした。断片が正しく挿入されたプラスミドを調製後、HEK293T 動物細胞、あるいは大腸菌 (BL21 株) に導入した。その後、タンパク質を発現させ、精製をおこなった (図 2)。

発現タンパク質の 118-bp 配列に対する DNA 結合活性は、ゲルシフトアッセイを用いて調べた。同配列を 6 つの部位に分割し、2本鎖オリゴヌクレオチドを合成した。各断片を γ^{32} P により末端標識し、DNA プローブを作製した。プローブと調製したタンパク質を混合し、電気泳動により展開した後、X線フィルムの感光をおこなった。標識 DNA 断片の移動度の変化により、候補因子の DNA 結合活性を判断した。

【結果と考察】

候補因子のうち、1 種類については、PCR による増幅ができなかった。これは、目的のタンパク質をコードする配列が非常に GC リッチであるため、プライマーが鋳型に対して正しく結合できなかったことが原因であると考えられた。3 種類に関しては、大腸菌と動物細胞でタンパク質の調製に成功した。動物細胞サンプルについては、内因性タンパク質によるバックグラウンドが高かったため、その結合活性を判断できなかった。一方、大腸菌サンプルについては、118-bp 配列への結合活性が認められた。現在、残り 2 種類の候補タンパク質の調製を進めており、今後、その DNA 結合活性を調べる予定である。また、刷り込みメチル化に関与する可能性が高いタンパク質については、ロックアウトマウスを作製し、その因子の欠損が体内のメチル化状況にどのような影響を与えるかを解析する予定である。

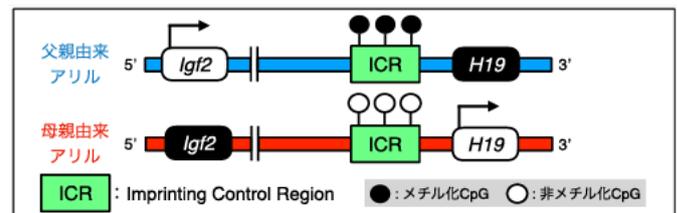


図1: *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み

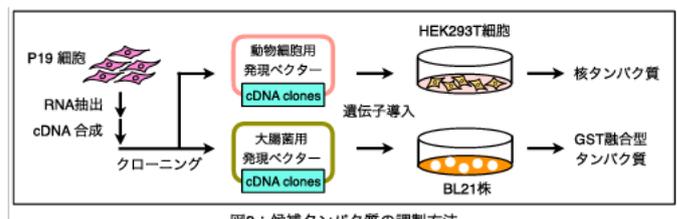


図2: 候補タンパク質の調製方法

ゲノム編集によるアサガオ矮性小型品種の分子育種

山下 遼 (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]

矮性品種とは、一般種と比べて小型のまま成熟する品種のことである。矮性化した品種では、倒伏耐性や耐寒性などの有用な形質を持つものが少なからず存在するが、特に矮性化によって栽培スペースが最小限で抑えられることなどから園芸の分野で親しまれている。また、矮性化による可愛らしさはそれだけで人々の目を引き、市場的な価値を生む。

アサガオ(*Ipomoea nil*)は、古来より園芸植物として栽培されており、小学校1年生が一人一鉢を初めて科学的に栽培・観察するなど、日本人にとって親しみ深い植物である。品種改良が進み、色や形が様々な多くの品種が存在する。これらの自殖による固定品種に対して新たな形質を導入するためには、交配後に数世代の戻し交配が必要であり、多大なコストを必要とする。最近、当研究室の先行研究でアサガオに適用したゲノム編集技術は、このコストを大幅に削減すると共に、より確実な品種改良を行うための手段としての活用が期待できる。

アサガオの変異遺伝子の中で、渦(*contracted, ct*)、木立(*dwarf, dw*)は、それぞれ異なる矮性形質を示す。渦は、ブラシノステロイドの生合成経路の欠損により葉が縮まり、小さく分厚くなるという形質を示す。一方、木立はジベレリンの生合成経路の欠損により蔓が伸びず、縦方向への伸長が起きなくなるという形質を示す。最近、これらの原因としてブラシノステロイドの生合成酵素 CYP90C1 とジベレリンの生合成酵素 GA3ox1 をコードする遺伝子にそれぞれトランスポゾンによる機能喪失変異(ノックアウト)が生じていることが明らかになった。特に GA3ox1 に関しては、昨年当研究室の先行研究において 8 kbp ものトランスポゾンが挿入されていることが判明し、これが変異の原因であることを証明しつつある。

本研究では、これら二つの遺伝子について、ゲノム編集技術を用いてノックアウトし、渦及び木立変異のアサガオを再現することで遺伝学的な観点から原因遺伝子を確認する。さらに、これら二つの遺伝子をアサガオ園芸品種において同様にノックアウトすることで、多種多様なアサガオの矮性品種を作出する。これにより、より奇抜で観賞価値の品種を作出するとともに、ゲノム編集技術を活用した分子育種の有効性を実証する。

[材料]

植物材料は、アサガオ実験系統 Violet に加えて、多種多様な花色を持つ園芸品種 9 種を用いた。園芸品種は、稔性の高いもの、希少価値の高いもの、伝統的なものの観点から選んだ。ゲノム編集には CRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを利用し、標的遺伝子ごとに 2 ヶ所もしくは 3 ヶ所の gRNA を設計した。

[方法]

開花後 2 週間の未熟種子より無菌的に取り出した未熟胚を組織培養して得たアサガオ不定胚に対して、アグロバクテリウム法による目的遺伝子の導入を行った。得られた不定胚はアグロバクテ

リウムと二日間共存培養した後、カナマイシンを含む選抜培地に移植した。その後 2-3 週間後にサイトカニン及びオーキシンを含む培地に移植し、シュートを誘導させた。個体が再生したら、PCR 解析による目的遺伝子の導入を確認した。また、再生した個体は順化させ、表現型を確認した。

[結果]

詳細は発表会にて報告する。

[謝辞]

本研究の一部は、内閣府、戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「スマートバイオ産業・農業基盤技術」(管理法人:農研機構生研支援センター)によって実施されました。CRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを提供して頂いた遠藤真咲先生と土岐精一先生(農研機構)に感謝いたします。アサガオ種子を提供していただいた変化朝顔研究会の石黒和昭氏と NBRP「アサガオ」の仁田坂英二博士(九州大学)に感謝いたします。

2 遺伝子同時ゲノム編集による枝垂れ・花卉老化遅延アサガオの作出

山内 花菜 (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てきた園芸植物である。奈良時代に渡来後しばらくして観賞用の植物として人々に楽しまれるようになり、自然突然変異体の選抜や自然交配を経て、今日に至るまでに多彩な色や形を持つアサガオが生まれてきた。現代でもアサガオは市民の暮らしを彩り、夏の風物詩としてうらわや浴衣の柄などにも広く親しまれる。さらに、多種多様なアサガオの遺伝子の突然変異系統は変化に富み、貴重な遺伝資源として遺伝学や生理学的研究にも用いられている。

アサガオの変異体の中で、*we2 (weeping2)*という自然突然変異体は、近年、新たに発見された(Kitazawa *et al.* 2008)。この変異体は、つるが支柱に巻き付かず、上向きにも伸びず、ただ重力に従って真っ直ぐ枝垂れる。これは、転写因子をコードする *SHORTROOT1 (SHR)* 遺伝子に一塩基置換が生じることにより、茎の重力感知に関わる細胞層が欠落して重力応答能が失われていることによる。通常のアサガオよりも素直なつるは世話が簡単で仕立てやすいとも評される。

一方、最近、長い期間をかけて育種や品種改良を行うことなく、科学技術を用いて新しい形質をもつアサガオをより迅速に作り出すことが可能となってきた。先行研究では、花が開いている時間が通常の約12時間からおよそ倍の24時間程度まで長くなる、二日咲の形質を示すアサガオが作出された(Shibuya *et al.* 2018)。これは CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、プログラム細胞死による花卉老化を促進する転写因子をコードする *EPHEMERAL1 (EPH)* 遺伝子をノックアウトすることで生じたものである。この試みは現在までに実験系統において成功しており、次なる目標として異なる遺伝的背景をもつ園芸品種への応用が期待されている。

以上を踏まえ、本研究では伝統的なアサガオ園芸品種において CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、*EPH1* と *SHR1* の2遺伝子を同時にノックアウトし、花の二日咲と枝垂れという2つの形質を個性豊かなアサガオ品種それぞれの独自の色や形を失うことなく迅速に付与することを目的とする。これにより得られるゲノム編集体は、二日咲形質によって花を觀賞できる時間が長くなり、一日目と二日目で色が異なる花が同時に存在する様子を観ることができるとともに、枝垂れ形質によって藤棚や暖簾のように上から垂れるアサガオを觀賞する新たな展示方法を可能とするなどの、觀賞価値の向上が期待される。また、これらのアサガオの觀賞を楽しむことで、ゲノム編集という先進的な科学技術に対する人々の理解が深まることを期待する。

【材料・方法】

植物材料として、アサガオ(*Ipomoea nil*) 生理実験系統 Violet のほか、園芸品種である東娘、桃三夏、暁の光、万博の霞、浅黄の園、青雅、日本晴、団十郎、黒王を用いた。これらの品種から、種子になる前段階の未熟胚を開花後2週間程度で取り出し、不定胚形成の誘導培地で3~4週間培養した。得られた不定胚に対

し、ゲノム編集に必要な配列である、Cas9 タンパク質をコードする遺伝子、標的遺伝子内の標的配列の相補配列を含む gRNA を発現する遺伝子、これらの目的遺伝子が導入された場合に植物細胞にカナマイシン耐性を付与する遺伝子、のすべてを搭載したオールインワンベクターを導入したアグロバクテリウムを感染させた。アグロバクテリウムには、オールインワンベクターに加えて胚発生を促進する因子も導入した。gRNA 配列は *SHR1*、*EPH1* それぞれを標的として各2箇所、計4箇所に設計し、1つのベクターですべて同時に導入した。感染後のアサガオ不定胚はアグロバクテリウムと2-3日共存培地で培養した後、カナマイシンを含む選択培地に移して選抜を行った。その後、カナマイシン選択培地でも生育する二次不定胚をシュート誘導培地に移した。遺伝子導入の有無は、カナマイシン耐性遺伝子を標的とするプライマーによる PCR 解析によって確認した。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【展望】

得られたゲノム編集体の表現型の解析を行い、期待通り茎の枝垂れと花の二日咲の形質が付与されているかを確認する。そのうえで、既存の自然突然変異体 *we2* の表現型とゲノム編集体の表現型の比較を行い、ゲノム編集により自然突然変異による形質の変化が再現されているかどうかを調べる。また、ゲノム編集体の標的遺伝子の塩基配列を解析し、変異箇所の特異性とノックアウトの原因を明らかにする。同時に、アサガオの実験系統と園芸品種における *EPH1* 遺伝子のノックアウト効率の差異に関する知見を得る。さらに、ゲノム編集した花卉として日本で初めて実験室外での栽培の承認を得るため、ゲノム編集体の後代からヌルセグリガント個体を選び、全ゲノムシーケンシングにより遺伝子導入した核酸(オールインワンベクターの配列)が残存しないことを証明する。

伝統的な色や形を保持しながら新しい形質をもつようになったアサガオ品種を、科学、文化の両面で親しまれ、役立てられる存在とすることを目指す。

【謝辞】

本研究の一部は、内閣府、戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「スマートバイオ産業・農業基盤技術」(管理法人:農研機構生研支援センター)によって実施されました。形質転換用ベクターをご提供いただいた土岐精一博士・遠藤真咲博士(農研機構)、*eph1* ノックアウト系統の種子をご提供いただいた渋谷健市博士(農研機構)、全ゲノムシーケンシングを実施していただいた中嶋信美博士(国立環境研)と小野公代博士に感謝いたします。アサガオ種子を提供していただいた石黒和昭氏(変化朝顔研究会)と NBRP「アサガオ」の仁田坂英二博士(九州大学)に感謝いたします。

光周性花成誘導におけるアサガオ *CONSTANS* 遺伝子の役割

大野 唯 (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】

日長感受性をもつ植物は、日の長さ（正確には、夜＝連続した暗期の長さ）を感知することで季節の変化を読み取る能力を備えている。夜の長さの変化は主に花成誘導を通して、植物の生活環において重要な役割を果たす。夜がある一定の時間より長くなると花成を誘導する植物を短日植物といい、逆に短くなると花成を誘導する植物を長日植物とよぶ。両者は正反対のように見えるが、花成誘導に関わるそれぞれの分子メカニズムには多くの共通点と相違点がある。

本研究は短日植物のモデルであるアサガオ *Ipomoea nil* を用いて、*CONSTANS* (*CO*) 遺伝子の相同遺伝子であるアサガオ *CO* 遺伝子群の機能解析を通し、短日植物の花成誘導機構の解明を目指す。*CO* は長日植物シロイヌナズナで発見された光周性花成誘導を正に制御する転写因子をコードする遺伝子であり、長日条件で発現が増加し、フロリゲン（花成ホルモン）をコードする遺伝子 *FT* を転写することが知られる花成促進因子である。*CO* の相同遺伝子は多くの植物群に広く存在し、花成制御への関与が明らかかなものも多く含まれる。

Ipomoea nil *CONSTANS* (*InCO*) は、アサガオに存在する *CO* 様遺伝子群の中で *CO* と相同性が最も高い花成因子をコードする。先行研究において、*InCO* をゲノム編集によりノックアウト (KO、機能喪失変異) した結果、日本在来の標準系統 Violet では花成時期に変化は生じなかったが、系統 Africa (日本の探検隊が 1956 年にアフリカのギニアで採種した) では花成時期が早まる結果が得られた。アサガオは中南米原産とされており、日本に帰化したアサガオ (系統 Violet など) は、海外の低緯度地域産の野生系統 (系統 Africa など) に比べて早咲き形質になっており、*InCO* がその原因であることを示唆する結果である。そこで本研究では、次の 2 点を目的とした。

1) *InCO* の KO 体の花成時期を特定網室 (屋外の自然日長) および P1P 栽培室 (日長と気温を固定) において調べ、*InCO* が花成抑制因子であることを確認する。

2) *InCO* と同じクレードに属する *CO* 相同遺伝子のノックアウト体の作出を行い、花成への影響を調べる。特に、花成促進因子の候補を探す。

【材料・方法】

Violet、Africa の KO 体 (遺伝子ノックアウト体) と野生型 (非ゲノム編集体) を栽培し、花芽形成するまでの日数 (到花日数) を計測し、比較した。自然日長 (7 月から 10 月) では特定網室にて栽培した。

比較対象として、短日条件の P1P 栽培室にて Africa の KO 体および野生型を同時に栽培し到花日数を計測し、比較した。P1P 栽培室の条件は 13 時間明期/11 時間暗期、常温 25°C とした。

【結果・考察】

自然日長 (7 月から 10 月) では、到花日数は平均して Violet 野生型で約 55 日、Violet KO 体で約 56 日、Africa KO 体で約 63 日、Africa 野生型で約 86 日となった。Africa における *InCO* の KO は到花日数をおよそ 20 日以上早め、Violet に近づいた。これらの結果から Africa 野生型において *InCO* が強い花成誘導抑制因子であることが示された。

一方、Africa KO 体は Violet KO 体より約 7 日遅咲きであり、*InCO* 以外の要因がアサガオの花成時期の決定には残されているとみられる。また一方、Violet KO 体は Violet 野生型と有意差がなかった。そのため、Violet において *InCO* は野生型でも機能していない可能性が示された。

Africa は低緯度地域産であり、比較的高緯度の日本では短日条件が弱い (夜が十分に長くなるのは冬近くになるため) 花成誘導が起こりにくくなっていると考えられている。Violet など日本在来のアサガオは日本の緯度に適応する過程で *InCO* の抑制機構を外すことで開花時期を早めた可能性がある。Violet の *InCO* 遺伝子と Africa の *InCO* 遺伝子では、塩基配列の他、スプライシングパターンにも違いが見られる。これらの違いが原因であるものと推察される。

【展望】

アサガオの Africa の *InCO* 遺伝子の機能は花成抑制因子であることが確認された。一方で、長日植物のシロイヌナズナの *CO* や、短日植物のイネにおける相同遺伝子 *Hdl* では、誘導条件では促進、阻害条件では抑制として機能することが知られている。短日植物アサガオの *InCO* は、誘導条件において花成を抑制する機能を示す点が新奇である。これがどのようなメカニズムによるものか、解明をすすめたい。

一方、アサガオにおいて花成誘導を促進する役割を持つ因子は依然不明である。現在作出中の、*InCO* に相同性が高い配列を持つ 2 種類の *CO* 相同遺伝子のノックアウトの解析により明らかになる可能性がある。今後、これらの機能解析も加え、アサガオの花成誘導のメカニズムをより詳細に解明していきたい。

イネとタイヌビエ由来除草剤代謝酵素遺伝子 CYP81A の大腸菌発現系の構築

松村 康平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

除草剤の多くは作物には影響を与えず、雑草だけを枯死させる選択性を有している。この選択性を発現する要因の1つとしてシトクロム P450 (P450) による解毒代謝がある。P450 は一原子酸素添加酵素であり、活性部位にヘム鉄を有する。還元状態で一酸化炭素 (CO) と結合し、450 nm の吸収極大を示す。植物ゲノムには数百の P450 遺伝子がコードされており、イネは 412 もの P450 遺伝子を有している。これらの多くは 2 次代謝産物や植物ホルモンの生合成に関与することが知られていたが、近年、イネ科植物では CYP81A サブファミリーが除草剤の解毒代謝に関与することが明らかになってきた。イネでは CYP81A6 が作用機序の異なる複数の除草剤の解毒代謝に関与し (1)、例えば、スルホニルウレア系除草剤であるベンスルフロンメチル (BSM) は CYP81A6 によって O-脱メチル体へと急速に解毒代謝されるため (図)、イネは BSM に対する耐性が強い。一方、タイヌビエなどのイネ科感受性雑草では P450 による除草剤代謝活性がイネよりも低いため枯死に至る。

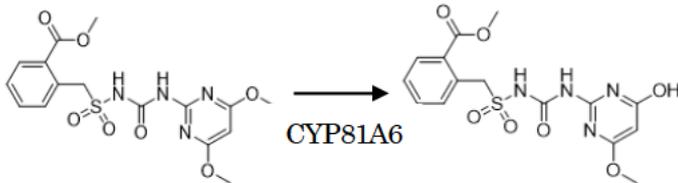


図. CYP81A6 による BSM の代謝 (左: BSM, 右: O-脱メチル体)

しかし除草剤に依存した雑草防除の結果、除草剤抵抗性雑草の出現が世界的に問題になっている。これらの中には、除草剤解毒能を向上し、抵抗性を獲得したものがある。アメリカ・カリフォルニア州において発見されたタイヌビエ個体群は BSM を含む複数の除草剤に対する抵抗性を持つ。この個体群では CYP81A12、CYP81A21 遺伝子が感受性個体群と比較して高発現しており、両 CYP81A が BSM を含む複数の除草剤に対する抵抗性に寄与している (2)。

CYP81A6 と CYP81A12、CYP81A21 の機能及びその相違を明らかにすることが出来ればより選択性の高い除草剤の開発に繋がる可能性がある。しかし、研究室の先行研究で異種発現宿主として出芽酵母を用いたところ CYP81A の生産量は低く、これらの酵素の機能解析は困難であった。そのため、出芽酵母よりも CYP81A 生産量の高い発現系の構築が CYP81A の機能解析を行う上で必要であった。P450 の異種発現宿主として出芽酵母よりも大腸菌の方が高い発現量が期待できることから、本研究では比較機能解析に向けたイネと除草剤抵抗性タイヌビエ由来 CYP81A の大腸菌発現系の構築を目的とした。

方法

CYP81A 変異体の作製と大腸菌における発現の評価

CYP81A の N 末端ベーシックリージョンをインバース PCR によって CYP2C11、CYP5139D7v1、CYP5348N1、CYP94A91 の

N 末端ベーシックリージョンと置換した。作製した N 末端置換体及び以前研究室で作製された CYP2C3 と CYP71A12 置換体の発現プラスミド (3) を用いて大腸菌 C41(DE3)、C43(DE3)、BL21(DE3)、及び KRX を形質転換した。各形質転換体をオートインダクション培地で 26°C、24 時間培養後、L-アラビノース、BSM を添加し、さらに 30°C、24 時間培養した。培地中の BSM 残存量を高速液体クロマトグラフィーによって定量することで CYP81A の N 末端置換体の発現を評価した。

結果と考察

まず、N 末端ベーシックリージョン置換の影響を調査した。発現宿主として C41(DE3) を用いた。その結果、いずれの CYP81A においても、CYP5348N1 置換体以外では BSM の消費量が増加し、CYP2C3 置換体の BSM 消費量が最大であった。次に各 CYP81A の CYP2C3 置換体を複数の大腸菌株で発現し、BSM 代謝能を比較した。その結果、本研究で用いた大腸菌 4 株において、BSM 消費量は同程度であったが、C41(DE3) を発現宿主として用いた時の BSM 消費量が最大であった。また、経時的に BSM 消費量を定量した結果、BSM 添加後 24 時間後に BSM 消費量が最大となり、それ以降は大幅な変化は認められなかった。

以上より、CYP81A6、CYP81A12、CYP81A21 の大腸菌における発現では、CYP2C3 の N 末端ベーシックリージョンに置換し、発現宿主は大腸菌 C41(DE3)、30°C、24 時間の培養が有効だと考えられた。今後、各 CYP81A を発現させた大腸菌から膜画分を回収し、至適温度や至適 pH、カイネティックパラメータ、他の除草剤への基質特異性といった機能解析を行う。また、上記の大腸菌発現系を検討する過程で、BSM 代謝産物として O-脱メチル体に加えて、BSM に水酸基が導入された水酸化体が検出された。今後この新規代謝産物を精製し、NMR を用いて構造決定をする予定である。

参考文献

- (1) Pan G, Zhang XY, Liu KD, Zhang JW, Wu XZ, Zhu J, Tu J. (2006). Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol Biol* 61: 933-943.
- (2) Iwakami S, Endo M, Saika H, Okuno J, Nakamura N, Yokoyama M et al. (2014). Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiology*, 165 (2) 618-629.
- (3) Nina GD, Takuya Y, Kanade F, Tohru T, Iwakami S. (2020). Functional characterization of cytochrome P450 CYP81A subfamily to disclose pattern of cross-resistance in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Mol Biol*. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00954-3>

アイスプラント由来 RBP 遺伝子の導入によるジャガイモの耐塩性強化の試み

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

【背景・目的】

現在、世界人口は増加傾向にあり 2050 年には 90 億人を突破すると予想されている。この増加する人口に伴い、食糧需要の増加が予想されるが、現在、塩害による農業生産量の減少が深刻化している。そこで近年、作物に関して塩ストレス耐性向上を目指す取り組みが求められている。ジャガイモは世界的に広範囲で栽培が可能であり、世界四大作物のひとつとして知られる重要な作物であるが、可食部である塊茎が地下にあるため、塩土壌による農業生産量の低下が他の作物より著しい。したがって、耐塩性ジャガイモ系統の作成は塩害被害の軽減や増加する食糧需要に大きく貢献できると考えられる。ジャガイモはこれまでに交雑育種によって様々な優良品種が確立されているが、同質四倍体という特性から、その特性を変えること無く塩ストレス耐性を付与するには遺伝子組換え技術が有効である。そこで、本研究では遺伝子組換え技術を利用し、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から単離された耐塩性遺伝子である RNA-Binding Protein (*McRBP*) をジャガイモ (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) に導入することで、ジャガイモの耐塩性強化を試みた。

【材料】

1. 導入遺伝子

導入遺伝子として、東京農工大学山田研究室において大腸菌を用いた機能スクリーニングにより耐塩性遺伝子として単離された、*McRBP* を用いた。*McRBP* は、主に葉緑体に存在し、RNA シャペロンの機能を果たしていると考えられている。ストレス条件下で転写中の RNA がヘアピン構造をとり、転写の停止につながる事が知られている。*McRBP* はその高次構造を解き、RNA の転写を正常にすることで、植物の耐塩性を向上させると考えられている。

2. 実験材料

明期 16 時間 / 暗期 8 時間 (明条件) で継代によって試験管培養されたジャガイモを使用した。培養には 0.8% の寒天末を含む Murashige-Skoog 培地を使用し、継代は 2 か月毎に行った。

ジャガイモへの遺伝子導入はアグロバクテリウム LBA4404 株を使用して行った。LBA4404 株は T-DNA の切り出しから移行に関わる遺伝子が存在する、*vir* 領域のみを含むプラスミド pAL4404 を保有しており、ジャガイモをはじめとする様々な植物種の形質転換において使用実績がある。

【実験方法】

1. RBP 遺伝子を含むベクターコンストラクトの作成

島根大学中川強教授より分与を受けた R4L1pGWB432 (下図) に対して、*McRBP* と 35S-pro の導入を試みた。これによって *McRBP* と、レポーターとなる G3GFP、GUS が融合タンパク質として発現するようにコンストラクトを作成した。作成したコン

ストラクトにより *McRBP*、G3GFP、GUS の融合タンパク質を発現させることができ、GFP の蛍光や GUS の染色が *McRBP* の存在を反映する。方法は以下の通りである。

開始コドンから終止コドンの直前までの領域を、レポーターとのフレームを考慮して PCR により増幅させた *McRBP* を、pGEM-Teasy vector に導入した。また、5' 側に *Pst* I、3' 側に *Spe* I サイトを持つよう設計したプライマーを用い、35S-pro を増幅させた。当該制限酵素処理後、*McRBP* を保有する pGEM-Teasy vector に、35S-pro を挿入し、35S-pro を *McRBP* の 5' 側に繋げた。これを用い、35S-pro から *McRBP* までの領域を PCR によって再び増幅させ、pENTR™5'-TOPO の attL4、attR1 に挟まれたクローニングサイトに導入することでエントリークローンを作成した。このエントリークローンと R4L1pGWB432 間で LR 反応を行うことにより、下図の Gateway と示した領域に 35S-pro と *McRBP* を導入した。

2. アグロバクテリウムの形質転換

作成したベクターを Freezing 法によりアグロバクテリウム LBA4404 株に導入し、スペクチノマイシン (SpC : 50 mg/L) を含む Yeast Extract and Beef 寒天培地上で維持した。

3. ジャガイモへの感染

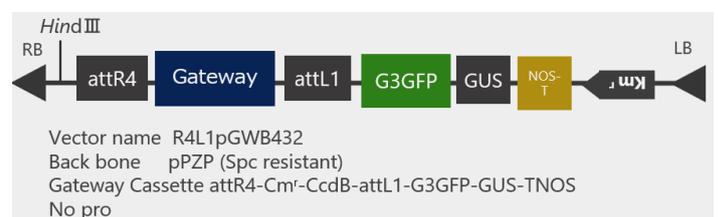
メスにより傷をつけたジャガイモの葉片及び茎片をアグロバクテリウムの懸濁液に 10 分間浸し、濾紙で水気を切った後、共存培地に暗条件で 3 日間静置した。その後、暗条件で 10 日間除菌培地、7 日間再分化培地にて培養した。以後はカナマイシン (Km : 12.5 mg/L) を含む再分化培地上で培養を行い、*McRBP* を発現するジャガイモの再分体を得た。Km を含む再分化培地は 7 日間ごとに交換した。

【結果・考察】

35S-pro、また *McRBP* を pGWB432 ベクターに導入し、アグロバクテリウムを形質転換することができた。ジャガイモへの遺伝子導入、組換え体の取得を目指している。

組換え体は *McRBP*、G3GFP と GUS の融合タンパク質が発現するため、GFP 蛍光や GUS 染色による発色が観察できると考えられ、遺伝子導入の確認が容易に行える。また、簡易 DNA 抽出ゲノミック PCR による遺伝子導入の確認もあわせて行う。

確認できた組換え体に関しては、耐塩性評価試験を行い、優良系統を選抜していく必要があると考える。



木質バイオマス改変に向けた *Lac-CBD* 融合遺伝子導入ポプラの作出

吉川 樹 (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】

今日の人類の発展は、化石資源の利用によるところが大きい、環境意識の高まりからクリーンで持続可能な資源利用への転換への期待が高まっている。リグノセルロースバイオマスはイネ科植物の葉や樹木の幹など存在量が多いこと、加えてそれらは食料と競合しないことから、新たな化石資源の代替資源として注目される。しかし、リグノセルロースは既に利用が進められている他のバイオマスと比べて前処理や糖化処理等の利用に関するコストが高く、実用への障壁になっている。リグノセルロースバイオマスを利用するためには、リグニンを除去する必要があるがリグニンの除去にはコストや環境負荷がかかる。そこで、本研究ではリグニンの除去を必要としない、リグノセルロースを改変した植物の開発を目指した。

Lac-CBD 融合遺伝子は、*Trametes versicolor* 由来のリグニン分解酵素であるラッカーゼ (*Lac*) と *Clostridium cellulovorans* 由来のセルロース結合ドメイン (*CBD*) を連結した融合遺伝子である。*Lac-CBD* 融合酵素はリグノセルロース中のセルロース近辺のリグニンのみを分解することが期待され、その結果として、脱リグニン処理なくとも酵素による糖化が可能なリグノセルロースを与えると仮説した。先行研究において、*Lac-CBD* 融合遺伝子の導入は、イネ (*Oryza sativa*) やシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、生育や形態の変化を与えることなく、非脱リグニン処理条件における酵素糖化効率の改善が報告されている。

本研究では、リグノセルロースの酵素糖化性改良における *Lac-CBD* 融合遺伝子の樹木での有効性の検証を目的とし、樹木のモデル植物であるポプラを宿主として *Lac-CBD* 融合遺伝子導入形質転換体の作成を試みた。

【材料】

● 植物

ポプラ T89 系統 (*Populus sieboldii* × *P. tremuloides*) を利用した。底面の直径 9 cm 高さ 14 cm のポットに 1/2 MS + 1% sucrose + 0.1% PPM + 2.7 g/L Gellan Gum の培地を加え、挿し木を行い、25°C, 16h Light/8h Dark で制御された培養室で培養し、2 か月おきに継代した。形質転換には高さが 14 cm に達した植物体の葉と腋芽を含まない茎を利用した。

● 導入コンストラクト

先行研究 (R, Iiyoshi *et al.*, 2017) で用いられた pTF012 プラスミドベクターを使用した (図)。



図 pTF012 ベクターの T-DNA 領域の模式図

【方法】

◆ 形質転換体の作成

形質転換は、Nilsson の方法を参考とした (Nilsson, O. *et al.*, 1992)。アグロバクテリウムの感染は、外植片を 25 μM カナマイシン (Km) 及び 25 μM ストレプトマイシンを含む YEB 液体培地で 2 夜培養したアグロバクテリウムを懸濁した MS 液体培地中で 0.5-2h 振盪することで行った。シュート誘導培地 (MS + 2% sucrose + 0.2 mg/ml BAP + 0.2 mg/ml IBA + 0.01 mg/ml TDZ) にて暗所で 2 日間共存培養後、オーグメンチンを含む滅菌水で洗浄し、新たなシュート誘導培地に静置した。2-3 週間後、シュートが誘導された外植片はシュート伸長培地 (MS + 2% sucrose + 0.2 mg/ml BAP + 0.2 mg/ml IBA) に移植した。さらに 1 ヶ月ほど培養し、3 cm 程度に達したシュートは外植片から切り離し、発根培地 (MS + 2% sucrose) に移植した。なお、滅菌後の培地には Km25 mg/L とオーグメンチン 250s 1 錠/L を加えた。

◆ 導入遺伝子の有無の確認

再分化シュートよりゲノム DNA を抽出し、PCR により導入遺伝子断片 (35S プロモーター領域等) を増幅することで遺伝子が導入されているか確認を行った。対照として、ポプラ内在性遺伝子である *eIF4A* 遺伝子の部分断片に対する増幅を対象とした。

【結果】

➤ 再分化効率の確認

ポプラ形質転換系を導入するにあたり、初めに細分化効率の測定を行った。アグロバクテリウムに感染させずに再分化を誘導した場合、全ての外植片でシュートが誘導された (n=58)。また、発根培地に移植したすべてのシュートで発根が確認できた (n=17)。

➤ 形質転換

pTF012 ベクターを持つアグロバクテリウムの感染により、22 のカナマイシン耐性系統を得た (約 47%)。最終的に発根が確認できた系統 9 系統を得た。

➤ 遺伝子導入の有無の確認

現在、発根系統 9 系統について、PCR による導入遺伝子の確認を進めている。

【考察・展望】

カナマイシンが添加された選抜培地で発根した個体は形質転換体であると考えられ、この個体を 9 系統得ることが出来た。これらの系統が形質転換体であることを支持するため、PCR により導入遺伝子を確認することが現在の課題である。

導入遺伝子が確認できた後は、系統の維持と形質転換体の評価を行う必要がある。評価は導入遺伝子が植物体の生育や形態に悪影響を与えないかという点と非脱リグニン条件において酵素糖化効率の改善がみられるかという点に関して行うことを計画している。

バクテリアとの混合培養による好熱性シアノバクテリアの細胞凝集に関する研究

石塚 結希乃 (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】

増殖の至適温度が 50°C の好熱性シアノバクテリア (*Thermosynechococcus* sp. BP-1) は、低温条件下 (30°C) で細胞凝集を引き起こすことが報告されている。当研究室で、大分県 の天ヶ瀬温泉から取得した好熱性シアノバクテリア strain2 は、環境中のバクテリアが共存する条件 (共存株) では高温条件でも細胞凝集するが、無菌培養株では凝集しないことを見出した。本研究では好熱性シアノバクテリアがどのようなバクテリアと共存することで細胞凝集するのか、その機構について解明する。

【材料・方法】

▶ セルラーゼ添加処理

BP-1 株の低温条件で誘導される細胞凝集は、細胞外にセルロースが合成されるためであると報告されている。本研究で扱う好熱性シアノバクテリアの細胞凝集におけるセルロースの関与を調べるため、セルラーゼを添加し共存株について凝集解消の有無を確認した。2 µg Chl/mL の共存株に 13 U/mL のセルラーゼ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) を添加し混合した。50°C にて各時間インキュベートし、400 g×1 min 遠心した。遠心後、上清のクロロフィル濃度を測定した。

▶ 共存株に含まれるバクテリアの同定

共存株を BG-11 プレートにて培養し、プレート上に現れたバクテリアコロニーを LB プレートに播種した。生じたバクテリアのコロニーを分離し、バクテリアの DNA を抽出した。バクテリアの rRNA 遺伝子領域を増幅するプライマー [1] で PCR を行い、塩基配列を決定した。

また、バクテリアが共存する好熱性シアノバクテリア培養液から全 DNA を抽出し、同様に PCR を行い、産物をクローニングした。得られたプラスミドの塩基配列を決定し、共存するバクテリアを同定した。

▶ 好熱性シアノバクテリアとバクテリアの混合培養

共存株から、BG-11 プレート培養及び LB プレート培養を経由しバクテリアコロニーを得た。シングルコロニーになるまで植え継いだ後、LB 液体培地に起こし、バクテリアの液体サンプルを作成した。作成したバクテリアの液体サンプルを好熱性シアノバクテリア無菌株に混合した。

3 種類のサンプル (混合培養中のサンプル、無菌株、共存株) 1 mL を 400 g×1 min 遠心した後、沈殿を 100 µL 取り除いた上清のクロロフィル濃度を測定した。

【結果】

▶ セルラーゼ添加処理

共存株に対しては、セルラーゼ処理後のクロロフィル濃度が 2 µg Chl/mL まで回復しなかったものの、細胞凝集の解消が見られ、凝集にセルロースが関与することがわかった (図 1)。

▶ 共存株に含まれるバクテリアの同定

共存株を LB プレートに播種すると黄色と赤色の 2 種類のコ

ロニーが生じ、rRNA 遺伝子の配列からも、少なくとも 2 種類の耐熱性バクテリアの存在が示唆された。黄色のコロニーを形成するバクテリアは *Caldimonas manganoxidans* で、好気性のグラム陰性細菌であり、形態は桿状である [2]。温泉から採取され、至適温度は 45°C~50°C である [2]。一方赤色のコロニーを形成するバクテリアは *Meiothermus* sp. で、好気性のグラム陰性細菌であり、短い糸状の形態が観察される [3]。至適温度は 50°C~65°C である [3]。共存株に含まれる全 DNA のシーケンス結果からも新たにバクテリアは検出されなかった。黄色の培養液に含まれるバクテリアの顕微鏡写真を図 2 の左、赤色の培養液に含まれるバクテリアを右に示す。

▶ 好熱性シアノバクテリアとバクテリアの混合培養 現在、混合培養を行っている。

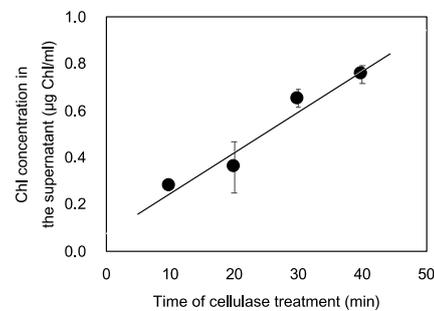


図 1 共存株の細胞凝集に対するセルラーゼの影響

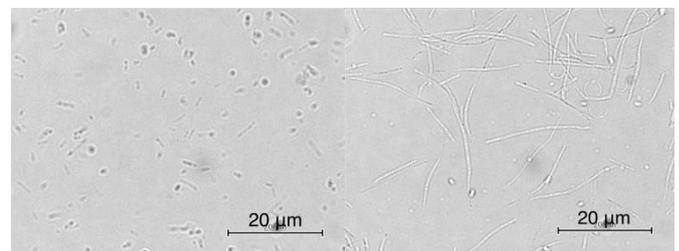


図 2 共存株に含まれる耐熱性バクテリアの顕微鏡写真 *Caldimonas manganoxidans* (左)、及び *Meiothermus* sp. (右)

【考察・展望】

本研究において、好熱性シアノバクテリアの共存培養株には 2 種類のバクテリアが存在していることが明らかになった。今後、好熱性シアノバクテリアとバクテリアの相互作用により、セルロース合成を介した細胞凝集を引き起こすメカニズムについて明らかにしたい。また好熱性シアノバクテリアとバクテリアにはどのような物質のやり取りがあるのか、解明していきたい。

【参考文献】

- [1]. 日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」
- [2]. Takeda, M. et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, (2002), **52**, 895-900
- [3]. Nobre, F.M. et al., *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, (1996), **46**, 604-606

緑藻 *Monoraphidium neglectum* の細胞形態と Ca^{2+} の関係についての研究

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

[背景・目的]

近年、再生可能エネルギーへの関心の高まりにより、微細藻類を用いた持続的なオイル生産方法が注目されている。原料として利用される藻類は、バイオマス生産性、脂質生産性、生産する脂肪酸の種類による経済的妥当性によって決定される(Dhup and Dhawan, 2014)。

緑藻 *Monoraphidium neglectum* は、生育速度が速く、中性脂質を蓄積するオイル産生藻類として同定された種であり、広い pH 範囲及び 1.0 % NaCl の塩濃度まで増殖できる(Bogen et al. 2013)。これらの特徴から、*M. neglectum* は微細藻類を用いた油脂生産の観点で注目されている。

M. neglectum は、所属研究室において微細藻類の培養を維持するのに使われている BG-11 培地、またはハイポネックスジャパン社のハイポネックス原液という液体肥料を水道水 (筑波大学・生物農林学系 D 棟) で希釈して調整した培地 (以下、HYP(T)培地) で維持されている。しかし、HYP(T)培地の水道水を実験室グレードの超純水 (Milli-Q, Merck) に変更したところ、*M. neglectum* の生育が著しく阻害されることを見出した。また、異なる培地条件において細胞形態の変化も見られた。*M. neglectum* は、培地中の NaCl の濃度により細胞形態が変化することが報告されている (Bogen et al. 2013)。また、所属研究室ではこれまでに CO_2 過剰条件下において培養した際、細胞の肥大化が生じるという知見も得られている。これらのことから、本種は何らかの要因により形態を変化させる特徴があると考えられる。これを受けて、どのような要因が細胞の形態に影響を与えるのか、水道水と超純水を比較して実験を行った。

[方法]

M. neglectum A11 株を HYP (T)培地の水道水を実験室グレードの超純水 (Milli-Q, Merck) に変更した HYP (M)培地において 3 日間前培養した後、6 日間それぞれの培地で本培養しサンプルを回収した。通気培養は、空気通気 (25 ml/min)、25°C、60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続光照射で行った。

・透過型電子顕微鏡 (TEM) による細胞の観察

本培養 6 日目の細胞を、グルタルアルデヒドと OsO_4 によって二重固定し、酢酸ウランとクエン酸鉛染色液で染色し、細胞内構造を観察した。

[結果と考察]

各地の水道水を用いて細胞を培養したところ、水道水の採水場所による細胞の生育に差は認められなかった。イオン分析・イオン添加実験の結果、すべての水道水に Mg^{2+} 、 SO_4^{2-} 、および Ca^{2+} が含まれ、BG-11 培地と比較して生育に十分含まれていることが明らかとなった。 Mg^{2+} 、 SO_4^{2-} の添加は、細胞のクロロフィル量と QY 値を改善したが、細胞の増殖には影響を与えなかった。一方 Ca^{2+} の添加は、細胞増殖、クロロフィル量、QY 値を回復させ、また、細胞形態に大きく影響することが明らかとなった (図 1)。

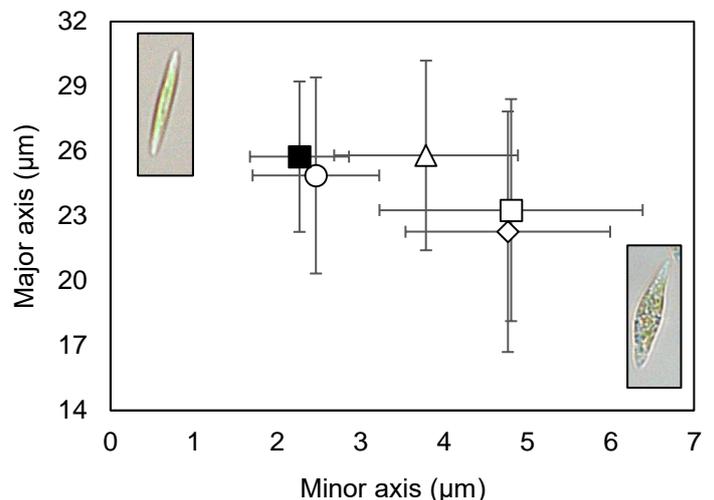


図 1. 培地と細胞形態の関係

□: HYP(M)培地、◇: HYP(M)+ $MgSO_4$ 培地、△: HYP(M)+ $CaCl_2$ 培地、○: HYPO(M)+ $MgSO_4$ + $CaCl_2$ 培地、■: HYP(T)培地で生育した細胞の長径・短径 (エラーバー: 標準偏差)。写真左: HYP(T)培地で生育した細胞、写真右: HYP(M)培地で生育した細胞。

Ca^{2+} を含まない培地で生育した細胞は、細胞の横幅が増加した。また、光学顕微鏡による観察から、細胞内に複数の顆粒が認められ、TEM 解析により液胞内に多数の電子密度の高い構造が認められた。これらのことから、 Ca^{2+} の欠乏条件下で細胞内に新たに顆粒が形成され、同時に細胞形態が変化したことが考えられる。今後はその顆粒がなんであるかを明らかにし、その形成と形態変化の機構について解明を試みたい。

[参考文献]

Bogen, C. et al. (2013) *BMC Genomics* 14: 926

Dhup, S., Dhawan, V. (2014) *Biores. Technol.* 152: 572–575

ブナ老齢林におけるササ群落の GPP 推定：林床のササの役割とは？

蔡 一涵（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】

Gross Primary Production（以下、GPP）は光合成による総生産量であり、生態系の全ての生物を支えるエネルギーの総量である。GPP の高精度推定は未だに難しく、特に複雑な構造を持つ森林生態系ではその推定に曖昧さが残る。そこで私は、森林生態系における GPP の正確な推定を目的として研究を進めている。最初のステップとして、私は直接計測されることが少ない下層植生の GPP 推定を目的とした。というのも、森林において林冠と林床では、光合成特性や生産可能期間が異なる可能性が高く、林冠と林床の GPP を別々に測定することで森林生態系全体の GPP をより正確に推定できると考えられるからだ。さらに得られた林床 GPP を森林全体の GPP と比較することで、林床植物が生産にどれほど貢献しているのかを評価できる。

【方法】

調査は 2019 年 4 月から 11 月にかけて、長野県木島平村カヤノ平のブナ老齢林（樹齢約 300~500 年）に設置されている固定調査区（100 m × 100 m）で行った。カヤノ平ブナ林の林冠ではブナのような落葉広葉樹が、林床ではササが優占している。そこで、今回は林床植生の大部分を占めるササ群落の GPP に絞って調査を行った。カヤノ平ブナ林では、林冠が空いた区（以下、ギャップ区）と林冠閉鎖区が存在している。本研究では、両区の物理環境および、ササ群落バイオマスと GPP を測定し、固定調査区全体のササ群落 GPP 推定を行った。

まず、固定調査区においてササ群落の分布を調べた。次に、物理的な環境が異なるギャップ区と林冠閉鎖区に分け、環境要因として土壌温度、土壌水分、温湿度、光強度を 4 月下旬から 10 月下旬にかけ連続して測定した。ササ群落のバイオマスは、毎月アロメトリー式を作成し、非破壊的に単位土地面積あたりのササバイオマス量を計算によって求めた。

ササ群落の GPP は、透明な巨大チャンパーを用いて明条件下と暗幕を用いた暗条件下で CO₂ 交換速度を測定した。GPP は光合成による総生産のため、明条件下から暗条件下で計測される呼吸の分を差し引いて求めた。同時に光強度を測定し、最終的に季節ごと（春、夏、秋）に光-GPP 曲線を描いた。継続的に測定した光強度のデータをもとに月ごとの GPP を林冠閉鎖区とギャップ区でそれぞれ求めた後、年間 GPP を算出した。固定調査区全体の林冠部の GPP は樹木の幹成長データとリターフォールのデータをもとに算出した。これをもとに林床植生の占める GPP の割合を算出した。

【結果】

土壌温度、温湿度は林冠閉鎖区とギャップ区で大きな違いは見られなかった。土壌水分に関してはギャップ区が林冠閉鎖区の 2 倍ほど大きかった。光強度もギャップ区の方が大きかったが、その差は夏に最大となり、3 倍ぐらいギャップの方が光強度が強かった。

単位土地面積あたりの光-GPP 曲線を見ると、年間を通して林冠閉鎖区の方が GPP の初期勾配は大きく、特に夏に差が顕著で

あった。一方最大 GPP は年間通してギャップ区の方が大きかった。ササの葉バイオマスあたりの光-GPP 曲線も同様に、GPP の初期勾配は林冠閉鎖区で大きい一方、最大 GPP はギャップ区の方が大きかった。

林冠閉鎖区とギャップ区ともに夏に月間 GPP が最大となり、ギャップ区の月間 GPP は林冠閉鎖区の約 3~7 倍であった。

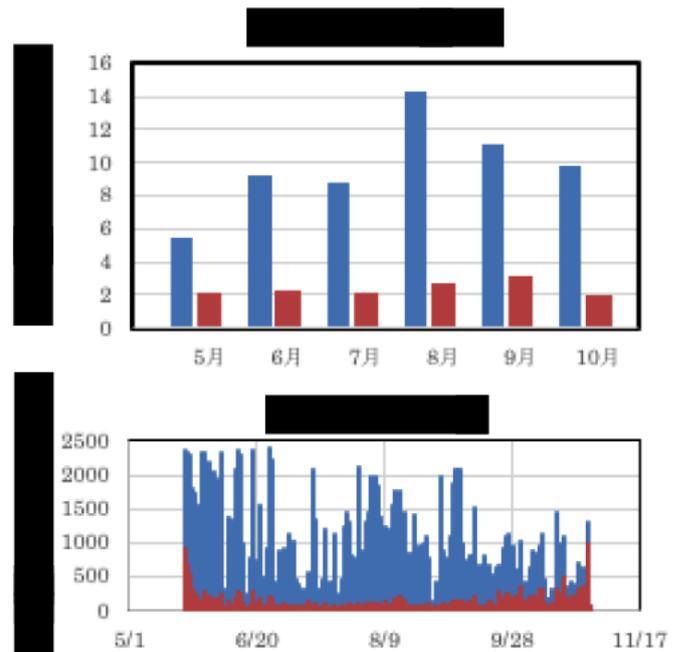
林床植生の年間 GPP と森林全体の年間 GPP はそれぞれ 2.43 t C ha⁻¹ yr⁻¹ と 17.54 t C ha⁻¹ yr⁻¹ であり、森林が林床の約 7 倍であった。しかしバイオマスあたりの GPP で見ると林床植物と森林全体でそれぞれ 0.29 C dw⁻¹ yr⁻¹ と 0.07 C dw⁻¹ yr⁻¹ であった。

【考察】

ササ群落 GPP は、最大 GPP および光強度に対する応答と共に、環境、特に光環境の異なる林冠閉鎖区とギャップ区で大きく異なっていた。弱光下では林冠閉鎖区の方がササ群落 GPP は大きく、強光下ではギャップ区の方が大きかったことから、両区間ともに光に応じて最適な GPP となっている可能性が示唆された。

両区域のササ群落 GPP が最大になったのは展葉前の月でもなく、落葉後の月でもなく、葉が茂っている夏の期間であったことから林床植物のササにとって夏も大切な生産期間であることが分かった。

ブナ林全体の GPP に対してササ群落 GPP は、およそ 1/7 を占めていた。しかし、バイオマス量の違いを考慮し、バイオマスあたりの GPP でみるとササ GPP は森林全体 GPP の 4 倍にも達した。バイオマスあたりの GPP は生産能力を示すことから、老齢林ではササの生産力は樹木よりも高いことが示され、老齢林ではササが森林の生産に大きく貢献していることが示唆された。



小笠原諸島西之島における未発達土壌の微生物活性および理化学性

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

【背景と目的】

遷移の初期過程を解明するうえで、その過程にある生態系は貴重な研究の場である。一般に、遷移初期には窒素が制限されることや、土壌発達に伴い炭素が蓄積していくことが知られている。海洋島では海鳥が海から陸への主要な栄養塩供給経路であることや営巣地を中心に物質供給を行うことが知られており、遷移初期において海鳥は窒素や炭素の供給に重要な役割を果たすと考えられる。

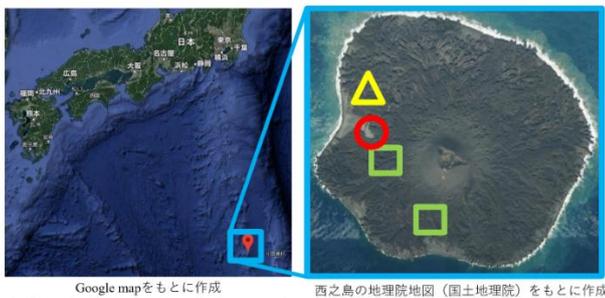
小笠原諸島西之島は1973年に初めて噴火して以降度々噴火し、新たに溶岩台地が形成され、かつ各種生物の移入・定着が始まりつつあり、今まさに遷移の初期過程にある。これまでの調査で1973年の噴火以前より存在していた旧島台地を中心に、海鳥の営巣や繁殖、および植生や節足動物の定着が確認されつつある(川上ほか, 2005; Abe, 2006)。しかし、西之島表面を覆う未発達土壌の微生物群集や理化学性についての知見はほとんどない。

以上の背景を踏まえ、本研究では主に炭素と窒素に着目し、①2019年時点における未発達土壌の微生物活性および理化学性を把握すること、②新たに成立した溶岩台地(下表参照)の成立年代の違いによる①の差異を考察すること、を目的とした。

【調査地と方法】

調査地概要

調査地は、小笠原諸島西之島(概位: 27°15'N, 140°53'E)である。伊豆・小笠原・マリアナ島弧上の成層火山で、島全体が安山岩質である。気候は亜熱帯気候に属する。



Google mapをもとに作成

西之島の地理院地図(国土地理院)をもとに作成

未発達土壌の採取

未発達土壌は「令和元年度西之島総合学術調査」の際に採取された、成立年代の異なる3つの台地のものを対象とした。

	旧島台地 (○)	2015年溶岩台地 (△)	2017年溶岩台地 (□)
略称	旧島	2015	2017
採取地点	10地点	5地点	5地点
成立からの経過年数	40年以上?	約4年	約2年
植生	あり(疎)	なし	なし
海鳥営巣地	あり(密)	あり(疎)	なし

初めに2 mmのふるいにかけて、通過したものを以下の分析に用いた。未発達土壌は4°Cに設定した冷蔵庫にて保管した。

微生物活性

未発達土壌の微生物活性として、硝化能、脱窒能、全微生物活

性、β-グルコシダーゼ活性を測定した。硝化能・脱窒能は硝化・脱窒を行う微生物が最適条件下でどれだけ硝化・脱窒を行えるかというポテンシャルを表す指標である。全微生物活性は生きている全微生物バイオマス量の指標である。β-グルコシダーゼ活性は微生物が栄養獲得のために行うエネルギー投資の指標である。

土壌理化学性

未発達土壌の理化学性として、重量含水率、pH(H₂O)、電気伝導度、全窒素含有率、全炭素含有率、C/N比、硝酸態窒素含有量、亜硝酸態窒素含有量を測定した。

【結果と考察】

本要旨では新台地である2015と2017の差異について、窒素と炭素に関連する結果・考察の一部を記す。発表会当日には他の結果も併せて発表する予定である。

微生物活性

脱窒能およびβ-グルコシダーゼ活性は下表のようになった。

Site	20°C DeP (ng N g ⁻¹ ds h ⁻¹)			βGA (μmol g ⁻¹ ds h ⁻¹)		
	n	Mean	SD	n	Mean	SD
旧島	10	342.0	244.1	10	0.09	0.05
2015	5	363.2	450.2	5	0.05	0.04
2017	4	0.4	0.1	4	0.01	0.00

DePは脱窒能、βGAはβ-グルコシダーゼ活性、dsはdry soil、SDは標準偏差を表す。

2015は2017と比較してDePの値が非常に高かった。2015は海鳥が定着していることから、海鳥によって脱窒に関わる微生物の侵入・定着が促進されていると推測される。

βGAはどの台地においても先行研究と比較して極めて小さい値となった。2015は2017と比較して僅かに活性が高かった。

土壌理化学性

土壌発達の指標となるC/N比は下表のようになった。

Site	C/N ratio		
	n	Mean	SD
旧島	10	3.16	1.65
2015	5	1.38	0.76
2017	5	0.07	0.14

SDは標準偏差を表す。

これらは日本の畑地土壌C/N比の平均値11と比較して極めて小さい値であり、西之島の土壌は未発達だといえる。2015は2017と比較してC/N比が非常に高かった。これは全窒素含有率は2015で0.07±0.03%, 2017で0.04±0.01%とあまり変化しないものの、全炭素含有率は2015で0.12±0.09%, 2017で0.00±0.01% (Mean±SD, n=5)と炭素量が増加していることによる。この炭素量増加は海鳥による供給である可能性が示唆される。

2000年に噴火した三宅島における約20年後の土壌呼吸：7年間でどう変化したのか？

米田 陸（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】

火山の噴火は生態系を大きく破壊する自然撓乱の一つであり、動植物や土壌などの生態系の基盤の破壊をもたらす。現在約550の陸上活火山が世界中に存在しており、噴火後に回復するかについて多くの研究が行われてきた。三宅島ではここ100年で4回もの噴火活動が起きており、特に2000年噴火では、山頂での強大な噴火による大量の火山灰と噴火後何年も続いた火山ガスの放出によって、山頂付近を中心に、島内の生態系は強い撓乱を受けた。しかし2019年現在は、火山ガスの放出も殆どなく、2000年噴火で裸地状態となった山頂付近も植生は回復して緑に覆われつつある。

土壌呼吸とは土壌表面から放出されるCO₂のことで、土壌微生物の有機物分解による呼吸量と根の呼吸量を合わせたものである。土壌呼吸は、生態系の炭素循環機能を特徴づけるCO₂の流れであり、土壌圏生態系の活発さの指標と言える。本研究では2019年時点の三宅島において噴火被害が異なる様々な地点における土壌呼吸量を評価し、生態系の回復程度を推定することを目的とした。また2012年から2014年に同一の場所・方法で評価した土壌呼吸とその他環境要因のデータと2019年に得たデータを比較して生態系の回復過程を考察することを目的とした。

【調査地と調査項目】

本調査は東京都三宅村三宅島で行った。三宅島の年平均気温17.7℃、年平均降水量2953.6mmであり、温暖な黒潮の影響を受ける海洋性気候である。2000年に山頂噴火した三宅島では、山頂付近を中心にその噴火による撓乱強度が大きかった一方、海岸周辺ではその噴火による撓乱強度が殆どなかった。その為、島内には撓乱強度が異なる様々な地点がみられる。本研究では、撓乱強度が異なる10地点を調査区として選定した（図1）。

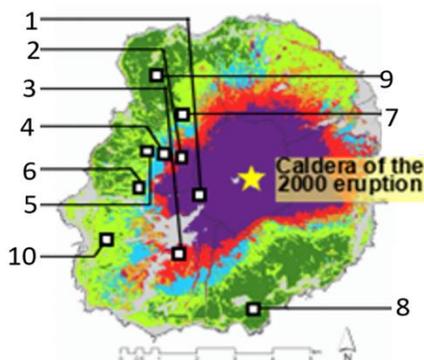


図1 調査区の位置関係

調査項目1：土壌呼吸

ソーダライムを用いたアルカリ吸収法 (Keith & Wong 2006) 直径約30cm、高さ20cm程の蓋のついたプラスチック容器の底を切断し、深さ5cm程度で埋設し、十分に乾燥させ、あらかじめ重量を測定しておいたソーダライムを霧吹きを用いて湿らせてからチャンバー内に入れ、チャンバーを密閉し24時間ほど静

置。持ち帰り、また十分に乾燥させ、重量を測定する。持ち帰った後の重量から持って行く前の重量を引いた値がソーダライムが吸収したCO₂の量となる。

2019年6月～2020年1月までに約1か月間隔で合計7回測定した。

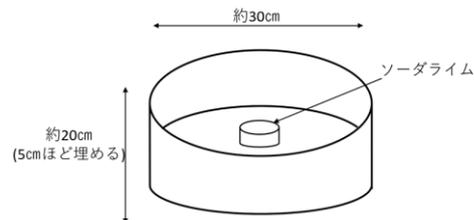


図2 アルカリ吸収法の概略図

調査項目2：各種環境要因

・土壌温度

土壌温度計を10サイトすべての地中5cm程の深さに設置。5月から12月まで連続して温度を測り続けた。

・土壌水分量

土壌水分計を代表的な6サイトに設置。6月から12月まで連続して測り続けた。

・土壌pH

10サイト全てで土壌を採取し、採取後すぐ測定を行った。

・土壌組成

採土缶を用いて土壌を採取。土壌三相分布を土壌三相計で、土壌有機物量を強熱減量法を用いて測定した。

・EC(電気伝導度)

土壌中のイオン濃度を示し、高いほど栄養分が多いといえる。

10サイト全てで土壌を採取し、採取後すぐ測定を行った。

【結果と考察】

今回の調査で計測した土壌呼吸速度は、前回行われた2012年から2014年の調査時の土壌呼吸速度より総じて低い可能性が示唆された。本発表では、2019年の土壌呼吸速度の大きさ、環境要因との関係、さらには前回の調査時との土壌呼吸速度との違いなどを中心に報告する予定である。

【引用文献】

H. Keith, S.C. Wong, 2006. Soil Biology & Biochemistry 38: 1121-1131

菅生沼におけるオオブタクサとオギの群落構造と物質生産の比較

桜井 貴仁 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 安立 美奈子 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

同所的に存在する植物は、限られた資源をめぐる競争関係にあり、かつそれらの植物は競争による不利益を回避するような形態・機能を有することが知られている。菅生沼では、オオブタクサ (*Ambrosia trifida*) はオギ (*Miscanthus sacchariflorus*) と同所的に存在し、共に優占した群落を形成する。オオブタクサは一年草であるが、オギは多年草である。そのため、オオブタクサが発芽、成長を開始する時期には、オギの草丈は既に高く、オオブタクサは光獲得において不利となる。そこで、本研究ではオオブタクサにどのような光獲得戦略があるかに着目し、この2種の群落構造と物質生産を調査した。

【方法】

調査地

菅生沼 (茨城県常総市) 周辺の湿地植物群落で調査を行った。ここでは、毎年1月末に火入れ管理が行われ、オギ-オオブタクサ群落は主に火入れ管理区に形成される。他地域においても、火入れ管理区への侵入が多く報告されていることから、本調査地はオオブタクサの侵入の典型例と言える。

調査内容

(1) 群落構造によるオオブタクサとオギの光利用の調査

2018年5月および同年8月に群落構造行を比較するために、層別刈取り調査を行った。オギ-オオブタクサ群落にプロット (50cm×50cm) を設置し、群落上部から15cm間隔で光量子束密度の測定と、植物体の刈取りをし、オギとオオブタクサ、その他の植物ごとに、それぞれ葉、茎、枯死物に分けて回収した。この時、オギとの共存の影響を考慮して、オギの密度を基準にオギの優占度を3段階 (オギの少ない区、中程度区、多い区) に変えてプロットを設置した (5月は各区 n=3, 8月は各区 n=1)。回収した植物体を70°Cで2日間以上乾燥させた後、重量を計量した。一連の作業からオオブタクサとオギの生産構造図を作成し、葉量が最大となる層の光量子束密度を基準に光利用を比較した。

(2) オオブタクサとオギの葉内窒素 (N) 含有率の計測

5月、8月の調査で採取したオオブタクサとオギのそれぞれ上層3層、下層3層分の葉を保存した。上層、下層でよく混合する様に葉を粉碎した後、CNアナライザーにかけN含有量を測定した。N含有量を測定した試料の乾燥重量で割り、N含有率を計算した。

(3) オオブタクサとオギが群落全体に占める割合

プロット毎に、オオブタクサ、オギ、その他の植物の乾燥重量を総和して、群落全体の合計を求めた。そして、群落全体に対する、オオブタクサ、オギ、その他の植物の割合を計算した。

【結果】

(1) 群落構造によるオオブタクサとオギの光利用の調査

葉量が最大となった高さ、そしてその高さで葉が利用していた相対光量子束密度は、5月のオギは118~124cm、60~70%となったが、オオブタクサは70cm未満、30%以下となり、いずれも、オオブタクサの方が有意に低くなった ($p < 0.05$)。一方、8月のオ

ギは、152~180cm、50~60%となったが、オオブタクサは、132~160cm、40~60%となり、5月に比べて8月では有意な差は認められなかった (図1)。

(2) オオブタクサとオギの葉内N含有率の計測

5月のオギの葉内N含有率は、上層で2.5%、下層で1.7%となったが、8月には、上層で1.7%、下層で1.4%と5月よりも、葉内N含有率は低下した。一方、5月のオオブタクサの葉内N含有率は上層で2.7%、下層で2.1%となったが、8月には、上層で3.4%、下層で3.6%となり、有意ではなかったものの5月に比べて葉内N含有率は増加した (図2)。

(3) オオブタクサとオギが群落全体に占める割合

5月には、オオブタクサはオギ少ない区~オギ多い区の全てに見られ、群落全体の現存量の13~29%を占めていた。また、8月も同様に群落全体の現存量の15~28%と5月とほぼ変わらない値であった。

【考察】

5月のオオブタクサはオギよりも弱い光を利用していた。しかし、8月にはオオブタクサの草丈は5月より成長し、オギと同等の強い光を利用することが可能となっていた。オオブタクサは8月の方が葉内N含有率は高くなったことから、オオブタクサがオギと同所的に存在可能な理由として、オオブタクサがより強い光を利用可能な8月に、光合成能力を高める戦略を行うことが考えられた。

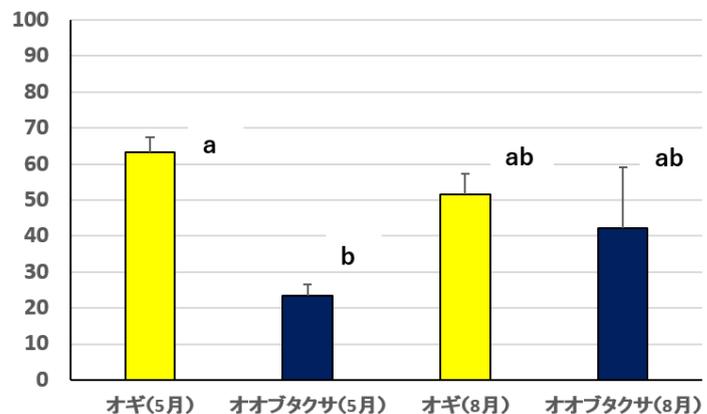


図1 葉量が最大となる層の相対光量子束密度 (異なるアルファベット間で有意差あり, $p < 0.05$)

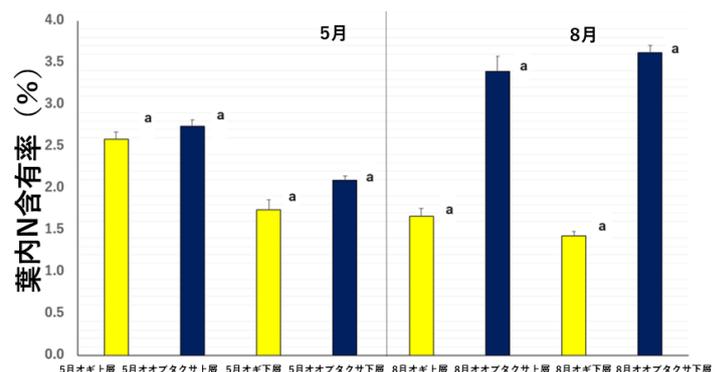


図2 オオブタクサとオギの葉内N含有率

ホソミオツネトンボの可逆的体色変化 - 青色と褐色の異なる役割 -

長谷部 有紀 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 横井 智之 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

動物の体温は、筋収縮や代謝などの内的要因や、温度や光などの外的要因によって変化する。動物は活動に適した温度が決まっており、変温動物である昆虫類は種によって様々な体温調節機構が備わっている。その調節に関わる形質として体色が挙げられる。体色は同種間認識や捕食者回避などに関わるが、太陽光の吸収および反射量を変化させる役割をもち、体温調節も果たしている。昆虫の中でも、トンボ類は体色の色彩に富み、種内で多型が生じる場合や、体色変化が起こる種も多くみられる。体色変化は成熟に伴って一方向的に起こる場合が多いが、可逆的に起こる種も存在する。ホソミオツネトンボ、*Indolestes peregrinus*, は温度に伴う可逆的体色変化が起こることが知られている。夏に羽化した成虫の体色は褐色であり、春になると青色に変化する。ただし繁殖期においては、1日の中で外気温が低くなると褐色に、高くなると再び青色になる。本種の体色がもつ役割として、褐色には光吸収量増加による体温上昇の促進や、捕食者回避のための夜間擬態の役割が、青色には光反射量増加による日中のオーバーヒート抑制の役割があると推測されているが、検証はなされていない。

本研究では、1) 温度に伴う体色変化の所要時間および、2) 体色間での体表温度の違いについて調査を行なうことで、可逆的体色変化の生態的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1) 体色変化にかかる時間と温度の関係

2019年4月から5月に、茨城県つくば市神郡の水田で本種の採集を行なった。採集個体は10°Cのインキュベーターに一定時間入れ、褐色に変化した個体をそれぞれ15°Cおよび20°C、25°C、30°C下にさらし、体色変化を毎分記録した。次に、4つの異なる温度条件からそれぞれ10°Cまで下げたときの体色を毎時間記録した。記録は雌雄別に行なった。体色は胸部の色を判断基準とし、褐色から青色までの変化を4つの段階に分けた。

2) 体色と体表温度の関係

褐色(体色I)および青色(体色IV)の個体をそれぞれ冷凍し、標本を作製した。2019年9月に、作成した標本を用いて野外実験を行なった。標本を太陽光に当て、開始から5分後までの体表温度を30秒ごとにサーモグラフィで撮影した。併せて外気温および照度、風速も測定した。次に画像解析ソフトを用いて、青色または褐色部分から3ヶ所の温度を抽出し、その平均を各色の胸部温度とした。体色が変わらない部分(胸部背面の光沢部)から2ヶ所の温度を抽出し、その平均を対照温度とした。

【結果】

1) 体色変化にかかる時間と温度の関係

本種の体色は、外気温が上がると青色へ、下がると褐色へと変化した(図1)。雌雄とも、青色化は20°C以上のときに約8~20分で完了することが多く、10°Cからの温度差が大きいほど速く起こった。一方、褐色化は時間がかかり、温度差が小さいと約

6時間、大きいと約12時間で完了した。

2) 体色と体表温度の関係

青色および褐色個体の体表温度の変動には差がみられなかった。胸部温度は、青色と褐色どちらの個体においても、対照温度として測定した背面温度より有意に高かった(図2)。

【考察】

褐色化は時間がかかり、野外では明け方に完了する可能性が高く、夜間擬態の役割があるとは考えにくい。一方、青色化は迅速に起こり、活動開始直後には完了していると考えられる。体表温度は体色間で差がみられず、オーバーヒート抑制には青色ではなく胸部背面の光沢部が関係していることが示唆された。そのため青色は、同種の認識などの別の行動に関係していると考えられる。また、20°C以上のときに青色化が完了したが、野外ではより低い気温下でも青色個体がみられる。低温下での体温上昇の要因の一つとして、褐色であることで光の吸収量が多くなり、迅速な青色化を可能にしていると考えられる。本実験より、ホソミオツネトンボの褐色は体温上昇の促進に、青色は体温調節ではなく同種間認識などに関与していることが示唆された。

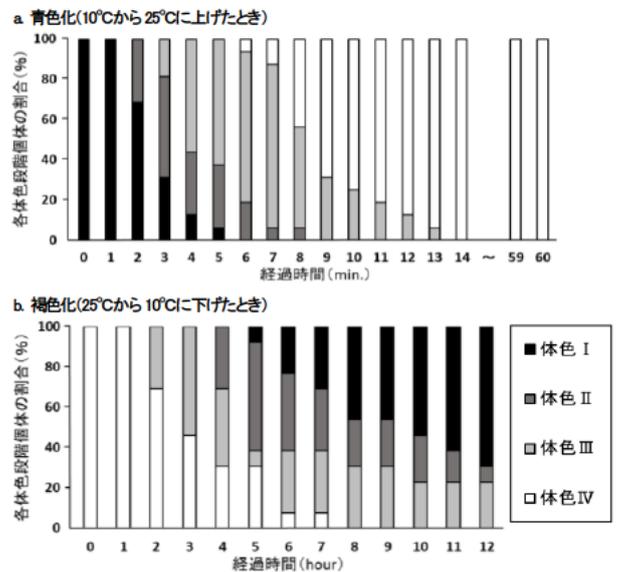


図1. 10 - 25°C間でのオスの体色変化

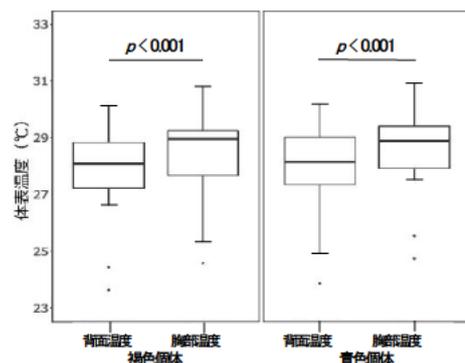


図2. 体色と体表温度の関係 (GLMMsで解析後、尤度比検定)

一過的タンパク質発現システムを用いたスギ花粉アレルゲンの収量向上に関する研究

三谷 郁佳（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】

スギ花粉症は現在日本の人口全体の約 4 分の 1 が罹患するアレルギー疾患である。花粉症の治療には症状を一時的に抑制する「対症療法」、アレルゲンに対する過敏な反応を減らす「免疫療法」の 2 つのアプローチがあるが、後者では、アレルゲンエキスを舌下から投与する舌下免疫療法が、患者への負担も少なく、根治治療が期待できる治療法として注目されている。ただ、舌下免疫療法の治療で用いるアレルゲンエキスを調製するためには莫大な量の花粉が必要になるため、治療の普及のためには、より効率的な方法によって花粉アレルゲンを大量調製することが求められる。先行研究ですでに様々な微生物や植物を利用したアレルゲンの生産が行われてきたが、収量が上がらない、コストがかかる、発現したアレルゲンが患者の抗体に対し有効性を持たないなどとさまざまな理由であまり望ましい結果が得られていない。

そこで、今回研究に利用するのは、ベンサミアナタバコを用いた一過的タンパク質発現系「つくばシステム」である。まず、植物を宿主としてタンパク質を生産する利点として、植物由来の糖鎖がつくことでより天然に近いアレルゲンを作製できる点である。また、ベンサミアナタバコは、元来、病原菌の少ない乾燥地域由来の植物で、エネルギーの大半を成長、生殖に集中させ、植物免疫システムを喪失させた植物であり、栽培が簡単である。そのため、アグロバクテリウムなどの病原菌が感染しやすいという特徴がある。また、アグロインフィルトレーションとよばれる方法を用いることで、アグロバクテリウムに感染してから 3～7 日でタンパク質を生産できる。「つくばシステム」は、低コストの反面十分な収量が得られないとされてきた植物を用いたタンパク質生産系において、ベンサミアナタバコ新鮮重量 1 g あたり約 4 mg と、大腸菌などの異種タンパク質発現系に匹敵するレベルまで収量を上げることが可能なタンパク質高生産システムである。このシステムでは、ベクターにジェミニウイルス由来のローリングサークル型複製システムとダブルターミネーターを導入することで、タンパク質を一過的に大量発現することが可能となっている。

本研究では「つくばシステム」を用いて、花粉症治療に向けたスギ花粉アレルゲンの大量発現系におけるさらなる収量向上を試みる。

【方法】

1. アグロバクテリウムの準備

大腸菌プラスミドの制限酵素処理により、目的タンパク質をコードする遺伝子を導入し、ベクターを作製した。このベクターを用いてアグロバクテリウムに形質転換を行った。

2. タバコへのインフィルトレーション

ベンサミアナタバコに、バキュームを用いてアグロバクテリウムを浸漬させた。

【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する。

イネを用いた細胞壁への蓄積によるアルミニウム毒性作用機序機構の解明

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

【背景と目的】

アルミニウム(Al)は土壌のおよそ7%を占める元素であり、pHがおよそ5を下回る酸性土壌下ではAl³⁺という水溶性の状態になり植物体内に取り込まれ、根の伸長を阻害することが分かっている。世界の農耕地の30~40%は酸性土壌と言われ、Alによる成長阻害は世界の農作物の収量低下の大きな要因と考えられている。こういった毒性を持つAlへの耐性を持つために根から有機酸を分泌し、土壌中のAlが有機酸と化合物を形成することで根に吸収されにくくするというものが代表的なものとして知られている。しかしながら、イネは有機酸の分泌とAl耐性の相関が確認されないにも関わらず、高いアルミニウム耐性を持つことが知られている。当研究室の結果により、Al濃度が高くなるほど根の分泌性ペクチン(メチル化ペクチン)が多くなることでAlに対して障壁として働き、根本体へのAl吸着を防いでいることが高いAl耐性の鍵であることが見出されている。一方、Al耐性が弱く、Al存在下で根の伸長が抑えられる*star1*変異体では、Al濃度が高い条件でも分泌性ペクチンは増加せず、根へのAlの吸着が多く領域で観察された。

根に吸着したAlは細胞壁領域で存在することから、根の細胞壁成分とAlが結合することで細胞壁特性が変化し、根の伸長が阻害されたと考えられている。しかし、どの細胞壁成分と結合したことで細胞の伸長が阻害されたかについての実験的な検証が現在まで明らかになっていない。そこで本研究では、アルミニウムの結合及び吸着が、どの細胞壁成分で起きているのかを明らかにし、Al毒性に関与する伸長阻害現象に関わる細胞壁成分が何かを明らかにすることを目的としている。

【方法】

WT(品種:コシヒカリ)、Al感受性変異体*star1*について、Al処理を施し、根細胞壁を抽出、ペクチン性画分、ヘミセルロース画分、セルロース画分に分け、Al及びCa量をICP-AESを用いて定量した。

WT、*star1*の種子を三日間吸水させた後、1.0 mMのCaCl₂(pH4.5)水耕液で三日間生育、その後異なる濃度(0/100 μM)のAlCl₃を含んだ1.0 mMのCaCl₂水耕液で一日処理した。根の先端1 cmをサンプリングし、凍結乾燥にかけた。

サンプリングした根を破碎し、80%エタノール、1:1クロロホルム:メタノールで処理を行い、AIR(細胞壁)を抽出した。AIR抽出過程において、根から分泌されたペクチンは除去される。AIRに対し、EPG(エンドポリガラクトナーゼ)による処理を行い、ペクチン性画分を抽出した。その後、2 MのTFA(トリフルオロ酢酸)による処理を行い、ヘミセルロース性画分を抽出、残りをセルロース性画分とした。抽出した細胞壁成分に硝酸分解を施したのち、ICP-AESにて各細胞壁成分に含まれるAl及びCa量の定量を行った。

【結果】

・Al量

WT(Al耐性)、*star1*(Al感受性)ともにヘミセルロース性画分において、Alが検出された。

WTでは、-Alでも+Al条件でも、Al量に違いはなかった。一方、*star1*では、+Al条件において-Al条件と比較して、12.3%(乾燥細胞壁1mg中5.0 μg)多いAlが検出された。

・Ca量

WT(Al耐性)、*star1*(Al感受性)ともにヘミセルロース性ペクチン成分において、Alが検出された。

WTでは、-Al条件のヘミセルロース性画分において、最も高いレベルのCa量が検出されたが、+Al条件において-Al条件と比較して、83.3%少ないCaが検出された。

一方、*star1*では、-Alでも+Al条件でも、Ca量に違いはなく、WTと比較して約85%少ない量であった。

【考察と今後の展望】

*star1*の細胞壁に含まれるAl量がWTに比べ多かったことは、*star1*の根がAlを吸着しやすいという結果と一致していた。イネはAlに応答して根端周囲の分泌性ペクチン量を増加させ、これらが根内部へのAlの吸着を防ぎ、Alに抵抗していると考えられているが本結果はそれを支持するものである。

*star1*変異体では、Al濃度が高い条件でも分泌性ペクチンは増加せず、根へ多くのAlが吸着し、根の伸長阻害が観察された。本研究結果により、吸着していた細胞壁成分は、ヘミセルロースであることが明らかとなった。ヘミセルロースは、細胞壁の緩みを促進するXTHやエクспанシンのターゲットとなる成分である。Alはヘミセルロースと結合することにより、こういった酵素の働きにくくすることで細胞伸長を阻害しているのではないかと考えられる。

Alは分泌性ペクチンとも結合できるが、Caは細胞壁において分泌性ではないペクチン(脱メチル化ペクチン)のみと結合する。本研究において用いた細胞壁は、分泌性ペクチンを洗浄している。そのため、検出された細胞壁中のCaは、脱メチル化ペクチンと結合しているCaを示している。WTの-Al条件においてCaが多く、Al感受性の*star1*では極めて少なかった。このことは、*star1*ではペクチン合成が盛んではなく、通常状態である-AlでもCaを多く含んでいないことを示している。また、WTでは、+Al条件でCaが著しく減少した。Al量が+Al条件でも増加しなかったことから、Alが直接細胞壁に作用した可能性は低い。そのため、+Al条件ではCa結合し得るペクチンは、Alにより誘導された分解酵素により分解されたと考えられる。Al応答で合成されたペクチンも含めて全て分泌性ペクチンとして、Alの毒性緩和に貢献したのではないかと考えている。

今後はペクチン分解酵素発現株PG2-FOXとその野性型として日本晴を用い、同様の実験を行うことで各細胞壁成分におけるAl量及びCa量の変化を調べる予定である。

海洋酸性化がカサガイ群集に与える影響

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

【背景・目的】

海洋酸性化とは、大気中の二酸化炭素が海洋に溶け込み、海水の pH が長期的に低下する現象である。炭酸カルシウムの飽和度も低下するため、石灰質から成る貝殻・骨格の形成が阻害され、石灰化生物の成長率や生存率が著しく減じられる。また、生理的機構を攪乱することで代謝速度や行動様式の改変も引き起こし、海洋生物に対する広範な影響が懸念されている。

カサガイ類は軟体動物門・腹足綱に属する、笠形の殻を持つ貝類の総称である。岩礁潮間帯に広く分布し、岩盤表面に固着する生物を剥ぎ取りながら移動することで、強力な排除効果 (ブルドーザー効果) を示す。キーストーン種として生態系内で極めて重要な地位を占めるが、石灰化生物であるが故に、酸性化条件に対して一様に脆弱な生物群と見做されている。しかし、始祖腹足亜綱・カサガイ目 (ウノアシなど) や、肺囊を有する直腹足亜綱・有肺目 (カラマツガイなど) などを含む、極めて多様な分類群で構成されるため、呼吸・代謝・知覚機構も種間で大きく違っている。それ故、海洋酸性化への応答様式も多様であることが予見され、カサガイ類に対する海洋酸性化の適切な影響評価には、種ごとの詳細な理解が不可欠である。

本研究は、カサガイ群集に対する海洋酸性化の影響を、分類群の違いに応じて詳細に検証することを目的とした。

【材料・方法】

調査地の概要

東京都新島村に属する式根島を調査地とした。ここには火山活動によって海底から CO₂ が噴出し、天然状況下で pH が低い海域が複数存在する。それらを酸性化海域として定め、岩礁潮間帯から 3 定点 (酸性化区: 釜ノ下、足附、および泊)、通常海域から 3 定点 (対照区: 石白川、大浦、および中ノ浦) を選出し、以下の調査を実施した。

環境要因とカサガイ群集構造

各定点において、2019 年 5–11 月 (9 月を除く) の期間、月 1 回の頻度で環境要因およびカサガイの個体数を計測した。得られたデータを区域間で比較し、酸性化によって変じる環境要因と、カサガイ各種の増減を把握した。また、環境要因とカサガイ種組成の相関を求め、種組成の改変をもたらす環境要因を推定した。

直接効果の評価

酸性化が石灰化生物へ及ぼす直接的な影響を検討するため、両区域においてカサガイの貝殻の性状を評価した。酸性化区のみで優占していたウノアシと、両区域で優占していたカラマツガイを対象に、Micro-focus X-ray computed tomography (MXCT) を用いて殻層の厚さと殻密度を計測し、区域間で比較した。

間接効果の評価

野外調査によってカサガイ種組成と捕食者密度に相関が認め

られたため、前述のカサガイ 2 種について、それぞれ捕食者に対する応答の変化を評価した。I 字型水槽の片側から酸性化海水または通常海水を一方方向に流し、上流部に捕食者を固定して、中央にカサガイを静置した。その後、カサガイの初動に要する時間、方向転換数、および 1 時間後の捕食者からの距離を測定し、酸性化海水下と通常海水下で比較した。

【結果】

カサガイ群集の種組成は、酸性化区と対照区で明瞭に異なっていた。ウノアシ個体数は酸性化区で有意に減少する一方で、カラマツガイには有意差が認められず、両区域で高密度に保たれていた。また、そうした種組成は、炭酸カルシウム飽和度と捕食者密度に有意な相関を示していた。

貝殻の性状に関して、殻層の厚さおよび殻密度は、カラマツガイとウノアシともに、区域間で大きな相違は認められなかった。

また、捕食者からの逃避行動については、カラマツガイでは、海水条件の違いでいずれのパラメータにも有意差は認められなかった。一方、ウノアシについては酸性化海水下で、逃避の初動に要する時間が遅延し、また、捕食者からの逃避距離も有意に短縮されることが判明した。

【考察】

酸性化区では、ウノアシ個体数が著しく減じられ、その説明要因として炭酸カルシウム飽和度と捕食者密度が推定された。炭酸カルシウム飽和度の影響を貝殻性状から見積もったところ、両種ともに区域間で相違が認められず、その影響は限定的であると考えられた。一般に、炭酸カルシウム濃度の低下は、貝殻形成を妨げることが知られている。しかし、それらはいずれも冠水条件下での報告であり、冠水時間が限られる潮間帯では、海中への炭酸カルシウムの溶出が緩和されるのかもしれない。

一方、捕食者からの逃避は、ウノアシでのみ行動の鈍化が認められた。高 CO₂ 環境は、神経伝達に関わる GABA 受容体に影響を及ぼし、腹足綱の嗅覚能を低下させることが知られている。したがって、ウノアシの逃避行動の鈍化は、捕食者を認識する機能の低下に起因すると推察された。他方、有肺目に属するカラマツガイでは、そうした変化が認められなかった。有肺目は、嗅覚以外にも発達した視覚器官を有しており、潜在的に、捕食者の視覚認識が可能である。こうした知覚機構の相違が、捕食者に対する応答の違いをもたらす、延いては、ウノアシの被食死亡率を高めた可能性がある。

以上より、海洋酸性化は、カサガイ類の知覚機能に対して種間で異なる阻害作用をもたらす、種組成を改変することが示唆された。

日本におけるツキノワグマ (*Ursus thibetanus*) の遺伝構造および集団動態の歴史～野生動物管理に向けて～ Genetic structure and demographic history of Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan: Implications for wildlife management

小井土 凜々子 (筑波大学 生物学類)

指導教員 : Faulks Leanne Kay (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

国内最大級の野生大型哺乳類であるツキノワグマ (*Ursus thibetanus*) は森林生態系の重要な構成者である一方、本種によって引き起こされる農林業被害や人との遭遇事故の増加が昨今、大きな社会問題となっている。人間の森林や里山の管理、土地利用形態の変化もあり、現在、本種の分布域は多くの地域で拡大しており、個体数も増加傾向の地域が存在する。一方で、他の大型哺乳類に比べて生息密度や繁殖力は低い (環境省 2009)、人間による強い捕獲圧によって個体数が減少すると個体数回復には時間がかかると考えられる。実際にこれまでの人間活動の影響により、現在のツキノワグマの分布は本州と四国のみに限られ、九州ではすでに絶滅が報告されている。そのため本種と人間社会との衝突の緩和、そして共存を目指していくためには、各地域で地域集団の状況に応じた適切な保護管理策を考えることが重要となる。しかし、2000年に提案されたツキノワグマの保護管理ユニット (環境省 2000) は、1991年以前の分布と地形のみから地域集団を評価しており、再考の余地がある。特に、野生動物の適切な保護管理および健全な地域集団維持のためにはその分布や生態だけでなく、遺伝構造や集団の歴史を理解・考慮することも重要である (Tsuda et al. 2015)。そこで本研究では、保護管理ユニットを再考し、管理策の基盤を構築することを目的として、日本のツキノワグマの大規模な集団遺伝学的解析を行い、本種の遺伝構造を詳細に評価し、また集団動態の歴史も推定した。

【材料および方法】

本研究では、1991-2017年の26年間に、青森県から京都府にかけて狩猟または害獣駆除された1290個体のツキノワグマについて、両性遺伝する核DNAマイクロサテライト16遺伝子座 (Ohnishi et al. 2019) の遺伝子型データを用いた。まず地域集団の分布を評価するために、個体ベースで遺伝構造を評価できるSTRUCTURE解析 (Pritchard et al. 2000) を行い、その結果をQGIS3.8.3 (QGIS Development team 2019) を用いて地図化した。STRUCTURE解析ではクラスター数 (K) を1~20まで設定し、各 K につき25回のランを行った。さらにSTRUCTURE解析の結果をもとに、各クラスターの遺伝的多様性を Allelic richness (El Mousadik and Petit 1996)、ヘテロ接合度期待値 (H_e)、固定指数 (F_s) を用いて評価した。また各クラスター間の遺伝的分化程度の評価には F_{st} (Meirmans et al. 2011) を用いた。さらに供試全個体・雄807個体・雌430個体に分けて、空間自己相関解析を行い、データセット間の空間遺伝構造の異質性 (Smouse et al. 2008) についても評価した。

【結果および考察】

STRUCTURE解析の結果、各ランの事後確率は $K15\sim16$ あたりで最も高くなり、実際に15あるいは16のクラスターに分けるまでは生物学的に意味のある明確な遺伝構造が検出された。例えば $K2$ ではクラスター1は中部山脈以西および東北地方中北部に

みられ、中部山脈以東から東北地方南部まではクラスター2が優占していた。但し、 $K3$ では東北地方中北部集団は固有のクラスターを示し、 $K4\sim5$ と進むにつれて、これら集団はさらに太平洋側の北上山地、日本海側の秋田県周辺、それ以外の東北地方中北部の集団としてクラスタリングされた。さらにクラスター数を増やすと京都府周辺、南アルプス、関東山地などの地域集団が検出され、また群馬県周辺や白神山地などクラスターの混合個体が多い地域なども検出された。また各クラスター間の遺伝的関係を詳細にみると、大きくは本州中央の中部山脈を境にその北東、南西で集団が遺伝的に分化しているパターンがみられ、核DNAでは中部山脈がツキノワグマの分布変遷において地理的障壁だったことが示唆された。またこのような明確な遺伝構造を反映し、全クラスター間の F_{st} の値も0.412と比較的高い値を示し、地域集団間における遺伝子流動の制限が示唆された。特に北上山地と南アルプス集団では F_{st} が最大の0.604で高い遺伝的分化が検出された。さらに岩手県の北上山地、白神山地など複数の東北地方の地域集団や京都付近で検出された地域集団では、共通祖先から分化してから受けた遺伝的浮動の大きさを表す F_{st} の値が大きく、またこれらの地域集団の遺伝的多様性は他地域よりも低かった。これより、これら地域集団は過去の分布過程あるいは最終氷期最盛期などの過去の氷期に生残した逃避集団が強い浮動の影響を受けたことがわかった。一方で北陸地方の集団は遺伝的多様性が高く比較的安定した集団であることもわかった。空間遺伝構造解析ではいずれのデータセットでも最初の0-100kmの距離階級では有意な正の空間自己相関が検出された。また、0-100kmの距離階級では雌集団の空間自己相関係数が他データセットに比べて有意に高く ($P > 0.05$)、300-400km、400-500kmの距離階級になると、逆に有意に低かった ($P > 0.05$)。これはツキノワグマの雄と雌の行動パターンから、雌の方が出生地に定住するという先行研究 (Ohnishi et al. 2014) の知見と一致した。

このように本研究からツキノワグマの核DNAの遺伝構造を詳細に評価でき、本種の保護管理ユニットを再考するうえで重要な新たな知見を得ることができた。一方、母性遺伝するミトコンドリアDNAを用いた遺伝構造研究 (Ohnishi et al. 2009) では、琵琶湖の北部で遺伝的に大きく東西に分かれるなど、本研究の核DNAで検出された遺伝構造と複数の相違点が明確となり、ツキノワグマは過去に複数回の分布移動を経験し、地域分化および混合、戻し交雑などの複雑な集団動態の歴史を持つことも明らかとなった。今後はこれら集団動態パターンについてより詳細に評価するとともに、地域レベルでの遺伝構造形成要因についても評価を行う。

【謝辞】

本研究は津田吉晃准教授 (筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所)、大西尚樹博士 (森林総合研究所東北支所) らとの共同研究として行った。共同研究者の皆様のご指導、ご協力、心より感謝申し上げます。

福島県帰還困難地域におけるイワナの遺伝的多様性：その保全と管理の意味について

Genetic diversity of white-spotted char in the Difficult-to-Return zones, Fukushima, Japan: Implications for conservation and population management

赤池 真樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：Faulks Leanne Kay (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

2011年3月11日に発生した東日本大震災の影響で福島県第一原子力発電所は水蒸気爆発を起こした。また、3月15日には原発を中心として半径20~30km圏内に屋内退避指示が出された。そして4月22日には警戒区域、計画的避難区域、緊急時避難準備区域の3つの避難区域に分けられた。翌年には復旧計画が決まり、区域の中への立ち入りが認められるようになった場所も増えてきたが、年間積算量が50 mSvを超えて、5年間経っても年間積算量が20 mSvを下回らないおそれがある区域は、「帰還困難区域」として現在に至るまで立ち入りが制限されている。現在、これら帰還困難区域および周辺水域では、放射性セシウム濃度が食品衛生法(厚生労働省、2012)の基準値(100 Bq/Kg)を超える魚類が多数生息し、遊漁は行われていない。加えて淡水魚は海水魚に比べて放射性セシウム濃度が高く、放射性セシウムを保持しやすいとされているため(Wada et al. 2019)、これら帰還困難区域および周辺の河川では今後も長期に渡り、遊漁は行えないと考えられる。一方、遊漁や河川管理を含めた人間活動が減少した帰還困難区域およびその周辺で、現在どのように魚類が集団遺伝学的動態を維持しているのかを評価することは、原発事故が周辺地域の種の分布動態、生物多様性に与えた影響を把握する上でも重要である。特にイワナ(*Salvelinus leucomaenis*)はかつて日本の山岳地域あるいは冷温帯地域における重要なタンパク源として重宝され、人々との結び付きの強い生物である。実際に福島県を含めた日本各地にはイワナを題材とした伝承、昔話、物語なども多く、帰還困難区域および周辺の河川に生育する主要魚種でもある。そこで本研究では帰還困難区域および周辺地域のイワナ集団を対象に、その遺伝的多様性を明らかにし、原発事故に伴う帰還困難区域設定がイワナの分布および遺伝的多様性にどのように影響を与えるのかを評価することを本研究の目的とした。

【材料および方法】

福島県浪江町および南相馬市に位置する太田川およびそこに繋がる横川ダムなどで2018年3月から2019年12月までに定期的に採取したイワナを供試した。ここで浪江町に位置する太田川上流は帰還困難区域内である。また福島県耶麻郡北塩原村の檜原湖のイワナも供試した。これら採取したイワナの鱗から QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (株式会社キアゲン) を用いて DNA 抽出を行った。本研究では日本全国(Yamamoto et al. 2004)および各地域(Kubota et al. 2007, Kikko et al. 2008, 縄田ら 2010, 樋口ら 2011)のイワナの遺伝的多様性の先行研究を参考に、これら研究でも使われている母性遺伝するミトコンドリア DNA(以下、mtDNA)のシトクロム *b* 遺伝子領域を対象に、その塩基配列を解読した。また GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) から、上述のイワナの先行研究等で検出され、登録されている42のハプロタイプの各塩基配列情報を取得し、本研究で検出されたハプロタイプとの比較を行った。これら塩基配列情報の編集、整

理等は MEGA X (Kumar et al. 2018) を用いた。また先行研究および本研究で得られた全ハプロタイプの日本における地理的分布を QGIS3.8.3 (QGIS Development team 2019) を用いて地図化した。さらに塩基配列情報から SplitsTree4 (Huson & Bryant, 2006) を用いて Neighbor-Net (Bryant & Moulton, 2004) を構築し、イワナで検出された各ハプロタイプの系統関係および遺伝構造を評価した。

【結果および考察】

これまでに太田川および横川ダムからは、Yamamoto et al. (2004) で報告されているハプロタイプ 8 および 11 の 2 つ、および本研究で新たに検出されたハプロタイプの計 3 つのハプロタイプが検出された。ここでハプロタイプ 8 は山形県に主に分布し (Yamamoto et al. 2004)、ハプロタイプ 11 は宮城県および栃木県に分布することが報告されている (Yamamoto et al. 2004、Kubota et al. 2007)。これら先行研究でもまだサンプル供試されていない地域も多くあることを考慮すると、放流の影響など今後より詳細な評価が必要であるが、これら 2 つのハプロタイプが帰還困難区域周辺で検出されたのは概ねリーズナブルな結果でもあり、イワナの過去の分布変遷でも説明できると考えられる。また、本研究で新たに検出されたハプロタイプは、既報のイワナ mtDNA の 42 ハプロタイプのうち、利根川水系渡良瀬川支流旗川の放流域および茨城県、栃木県、岩手県などの養殖場 (Kubota et al. 2007) および宮城県 (縄田ら 2010) で報告されているハプロタイプ 31 と最も近縁であった。ハプロタイプ 31 およびこの新しいハプロタイプの分布を今後詳細に調べる必要があるが、これまでの複数の先行研究でもこのハプロタイプは未検出だったことから、おそらくこの新しいハプロタイプは帰還困難区域含めて福島県周辺に分布する地域固有なハプロタイプと思われる。

このように本研究では帰還困難区域周辺のイワナから地域固有の新しい mtDNA ハプロタイプ が確認された。このような生物種が長い進化的歴史の中で獲得した地域固有の遺伝的変異変異は一度消滅すると回復できないため (Moritz et al. 2002)、生物多様性および地域の遺伝資源の保全のためには人間活動が著しく低下した帰還困難区域でも、管理放棄などによりこれら地域系統が消滅しないような生態系管理および保全が重要であることがわかった。今後はさらにこれら地域でイワナのサンプル数を増やし、核 DNA も用いて、経時的な遺伝的多様性の変化や詳細な集団動態について解析を進める。

【謝辞】

本研究は 2019 年度放射能環境動態・影響評価ネットワーク共同研究拠点共同研究 (F-19-23、代表・津田吉晃) の一環として実施された。本研究を行うにあたり、ご指導、ご協力頂いた共同研究者の筑波大学山岳科学センター菅平原実験所・津田吉晃准教授、福島大学環境放射能研究所・和田敏裕准教授、同大学共生システム理工学類・兼子伸吾准教授らに心より感謝申し上げます。

ニホンカモシカとニホンジカの糞・食痕 DNA を用いた識別法についての再検討： カモシカは畑を荒らす犯人なのか？

Faecal and feeding scar DNA based identification of Japanese serow and sika deer: Is Japanese serow the culprit of crop damage?

平野 莉帆（筑波大学 生物学類）

指導教員： Faulks Leanne Kay（筑波大学 生命環境系）

【背景および目的】

多様な野生動物が生息する日本では、近年、野生動物による農林業被害が大きな社会問題となっている。特にニホンカモシカ (*Capricornis crispus*, 以下、カモシカ) は本州・四国・九州に分布する日本固有種であり、過去には狩猟の影響で“幻の獣”と呼ばれ、1955 年以降特別天然記念物として保護されている。しかし近年では狩猟圧からの解放によって中部地方、東北地方の一部の地域では個体数が著しく増加し、自然植生や農林業への被害が顕在化している(環境省 2010)。ニホンジカ(*Cervus nippon*, 以下、シカ)もまた、個体数が著しく増加し、日本の植生や農林業に大きな影響を与えている。しかし、これら 2 種は生息地が重複し、足跡や糞の形状、食痕などが類似していることから、農林業被害地などで残された痕跡から種を特定することが困難なケースもある。例えば、日中も農地に滞在することの多いカモシカは、主に夜間に侵入するシカに比べ、農林業被害に“犯人”として疑われやすい。このようなカモシカの“濡れ衣疑惑”により過剰に捕殺申請されている可能性もある。類似する 2 種の痕跡から種を特定する手法を確立することができれば、これら農林業被害の原因を明確にし、より有効な被害対策を構築することができる。またカモシカおよびシカの分布動態の把握も可能となり、これら種の適切な個体数管理および保全を提案することもできる。

近年、分子生物学の発展により、糞や食痕などの非侵襲性のサンプルから抽出した微量 DNA からでも哺乳類種を特定する技術が確立されつつある。例えばカモシカおよびシカでは、Aikawa et al. (2015)が母性遺伝するミトコンドリア DNA(以下、mtDNA)を対象に、LAMP 法(Loop-Mediated Isothermal Amplification, Notomi et al. 2000)を用いて糞と食痕からの種識別方法を開発している。LAMP 法では、4~6 個のプライマーを用いることで、等温条件下で DNA を増幅させ、また蛍光色素を実験試薬に添加することで、DNA 増幅を蛍光色変化によって目視で確認することができる。そのため、LAMP 法は特別な技術や高価な実験装置、施設を必要としない。またこれにより、PCR 法にくらべ、専門的技術がなくてもより簡易的に、また短時間で行うことができ、研究機関だけでなく行政機関など野生動物管理の現場サイドにおいても有効的なツールになる(Aikawa et al. 2015)。本研究では、より高精度なシカ・カモシカ識別法の確立により、野生動物管理の現場サイドでより活用され、農林業被害の対策に応用されることを目的とし、1)糞と食痕の経過時間と検出精度の関係をさぐり、2)LAMP 法プライマーの追加開発およびその検出能力の評価を行い、3)食害の起きた農地での現場検証を行う。

【材料および方法】

長野市茶臼山動物園で飼育されているニホンカモシカとニホンジカを対象に、新鮮な糞を採取し、採取した糞は容器内のリタース上に放置し定期的にサンプリングし、糞 DNA から種識別の経時的変化評価に用いた。またダイズとキャベツは長野県内で食害

被害のある作物であるため、ダイズおよびキャベツの苗を、これらカモシカおよびシカに与え、食痕サンプルを得た。これら鉢植えの作物は食痕の付いたまま室内で栽培し、糞同様に定期的にサンプリングした。また長野県上田市菅平高原周辺でシカにより食害を受けたササも供試した。糞と食痕サンプルは冷凍保管し、Aikawa et al. (2015)の LAMP 法にもとづいて設計されたニホンジカ・カモシカ識別キット(株式会社ニッポンジーン)を用いて識別した。また LAMP 法プライマー再設計のために GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)に登録されているカモシカおよびシカの mtDNA の D-loop 領域およびシトクロム *b* 遺伝子領域の 17~34 個体の塩基配列情報を取得し、これら取得配列のアライメント等を BioEdit (Hall 1999)で行った。これら配列について SplitsTree4 (Huson and Bryant 2006)で Neighbor-Net (Bryant and Moulton 2004)を構築し、全ての配列の Consensus に最も近縁な配列を参照に PrimerExplorer V5(栄研化学株式会社)を用いてカモシカおよびシカの種内および種間変異も考慮して LAMP 法プライマーを設計した。設計したプライマーのカモシカおよびシカの識別能力については、両種の新鮮な糞から DNA を QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (株式会社キアゲン)により抽出し、濃度調整をした DNA 溶液を用いて評価した。

【結果および考察】

本研究で用いたカモシカおよびシカの糞および食痕由来の DNA サンプルからでもキットを用いて種識別できることを確認した。これまでに、カモシカではダイズについての食痕で摂食後 39 日目、シカでは 16 日目のサンプルでも識別可能であることを確認した。さらにシカにおいては 1 ヶ月以上経過していると考えられるササの葉の食痕からも識別可能であった。今後さらに長期間の調査も含めて、経時的変化についてより詳細な検証を行う。また識別可能であったサンプルの割合はシカの方が高かったが、これについては作物の摂食部位、状況などにより、食痕に残留する唾液量などが変化するため、より詳細な評価が必要である。現場検証については 2020 年冬~初春に長野県内のリンゴ農園での被害情報をもとに行う予定である。

追加プライマー開発ではカモシカの mtDNA の D-loop 領域およびシトクロム *b* 遺伝子領域の 2 領域からそれぞれ 1 セットずつプライマーを開発することができた。これら 2 つのプライマーセット両方でもカモシカおよびシカを識別することができることを確認できた。今後はこれら新しいプライマーセットも用いて、糞、食痕サンプルの状態、経時的変化、対象動物の mtDNA ハプロタイプ、DNA 濃度や LAMP 法反応時間条件なども考慮し、カモシカとシカの識別法について、詳細に検証する。これら一連の研究により、より明確なカモシカおよびシカの識別方法が確立できれば、“特別天然記念物”かつ“害獣”という 2 つの側面をもつカモシカをより適切に保護管理し、“濡れ衣疑惑”も解き明かすことができると期待できる。

高標高は多年生、低標高は一年生：ミヤマハタザオの生活史の遺伝的な違い

川本 晟司（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）

【導入】

生物には、生涯に何度も繁殖する多回繁殖性と、一度のみ繁殖する一回繁殖性という異なる生活史が存在する。その生活史進化は生物学の中心課題の一つだが、主に理論や種間比較¹によって研究されており、単純な比較が行える種内での実証研究は限られている。植物では一年草が一回繁殖性で、多年草の多くが多回繁殖性である。アブラナ科草本のミヤマハタザオ *Arabidopsis kamchatica* ssp. *kamchatica* は中部地方の0~3000mという広い標高帯に分布し、高標高集団は典型的な多年草なのに対し、低標高集団は一年草に近い生活史を持ち²、生活史進化の意義・機構の観点からも、生物の標高適応の観点からも興味深い。しかし、ミヤマハタザオの標高間では生態形質が遺伝的に分化していることが分かっているものの³、一年草/多年草という標高間で見られる生活史の違いが遺伝的なのかは分かっていない。また、一年草型の集団も、夏場の高温が穏やかな日陰では複数年生存することから、夏場の高温ストレスが一年草型の生活史の引き金となっている可能性がある。そこで本研究では、高温ストレスの程度を変えた室内栽培実験を行い、高い地上部/地下部比などを一年草型の指標とし⁴、標高間で生活史が遺伝的に分化しているかを明らかにした。具体的には、A) 低標高集団ほど、地上部・繁殖部への資源配分が大きい、B) 熱ストレスが強いほど、地上部・繁殖部への資源配分が大きい、C) 熱ストレスが強いときに地上部・繁殖部への資源配分する度合いは低標高集団ほど大きい、という3つの作業仮説を検証した。

【方法】

標高の異なるミヤマハタザオ5集団に由来する育成系統の種子を播き、計87個体を同一室内環境で栽培し、繁殖開始して2週間経た後に、昼の気温が20・28・36°Cと異なる以外は同一条件（昼12時間・夜12時間、夜は17°C）のインキュベーターに移動した。繁殖終了した個体は、器官毎に切り分けて袋に小分けした。その際繁殖器官の数を種類ごと（蕾、花、未成熟果実、成熟果実、裂果実、種子）に計測した。70°Cで48時間乾燥させて乾燥重量を計量した。

【結果・考察】

昼36°C条件では、低標高集団ほど地上部・繁殖部の重量比が大きく、作業仮説Aが支持された（図1）。

低標高1集団では、昼気温が高いほど地上部の重量比が大きく、また、個体重量あたりの繁殖器官数が大きかったことから、作業仮説Bが支持された（図2）。熱ストレスによって資源を優先的に繁殖器官に分配するという資源配分のスイッチングが起こった可能性が考えられる。

その他の集団の昼20・28°C条件の個体についても繁殖終了とともに解析を行い、作業仮説Cの検証を行う。

以上より、低標高集団ほど地上部重を大きくするという一年草型の資源配分が実験室で確認され（作業仮説A）、野外で観察さ

れていた標高による生活史の違いが遺伝的なものであることが確かめられた。また低標高集団では、繁殖器官へ優先的に資源配分するスイッチングが熱ストレスによって誘導されること（作業仮説B）が支持され、一年草型集団を適切に一年草型の生活史に誘導する環境条件が明らかとなった。このようなスイッチングの起こり方にも標高間で遺伝的な違いがあるのかどうか、作業仮説Cの検証を通して明らかにしていく。今後は、今回有用性が確かめられた栽培条件や指標形質を用いて交配家系の遺伝子マッピングを行い、生活史変異を決定する遺伝子を同定したい。

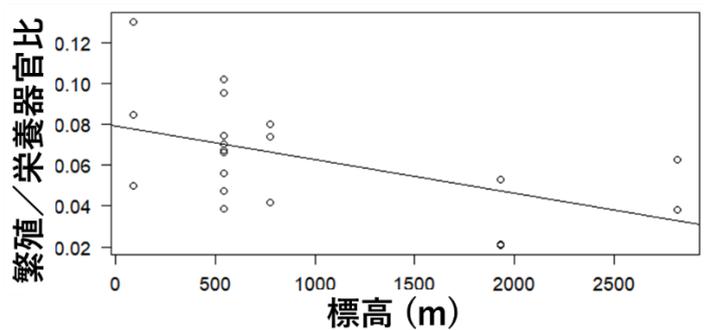


図1：昼36°C条件における、繁殖器官/栄養器官重量比と由来標高との関係（ $p < 0.05$ 、回帰分析）。点1つは1個体を示す。

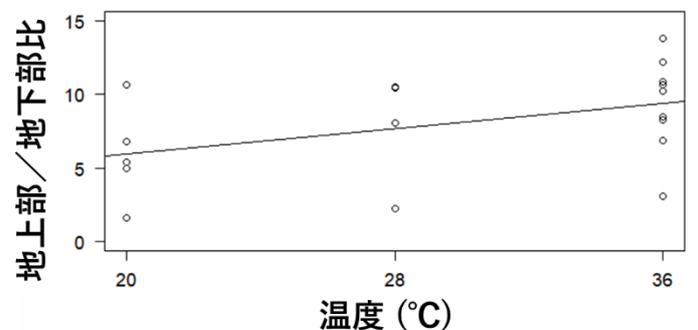


図2：低標高1集団における、地上部/地下部重量比と昼気温との関係（ $p = 0.08$ 、回帰分析）。点1つは1個体を示す。実線

【参考文献】

- ¹Evans et al. 2005. *Evolution* 59(9): 1914-27.
- ²Kenta et al. 2018. ILTER (International Long-Term Ecological Research)-EAP (East Asia and Pacific) scientific conference. Taichung.
- ³Kenta et al. 2011. *Journal of Ecosystem and Ecography* S6: 1-10
- ⁴Vilela et al. 2008. *Acta Oecologica* 33(1): 85-92.

32年間の菅平湿原の植生変化：土砂堆積と河道直線化の影響

坂本 浩輝（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】

湿地は淡水の供給、二酸化炭素の貯蔵、渡り鳥への生息地提供などの重要な役割を担う生態系である。しかし世界の湿地は18世紀初頭から現在にかけて約87%消失し、日本の湿地は1900～1990年に約60%消失した²。その主な要因は、農地転換などの土地開発である。また残された湿地でも、周辺農地からの土砂流入などによって起こる生態系の劣化が問題となっている。しかしながら、土砂堆積等の人為的な影響下にある湿地の植生を長期的に追跡した研究はほとんどない。

長野県・菅平湿原では過去に植生調査³⁴が行われ、初回調査以降に人為的影響が強まり、生態系の劣化が懸念されている。そこで本研究では菅平湿原の植生を2019年に調査し、過去の報告と比較することで、植生の変容を明らかにすることを目的とした。

【調査地】

菅平湿原には、北海道と菅平にしか分布しない氷期遺存種・クロミサンザシなど様々な希少生物が生息している。しかし、1970年代以降に高原野菜農地から耕土が湿地内に流入し、湿地の本来の土壌である泥炭層の上に堆積している。1987年には湿地内の河道を直線化し河床を掘り下げた工事が行われた。

【方法】

湿地の森林化の程度を明らかにするために、高度70mからドローンによる空中写真撮影を行い、目視で植生タイプを判別した。得られた空中写真と過去植生図³の植生タイプごとのピクセル数を画像ソフトGIMP2を用いて計った。

現在の植生を明らかにするために、植物相調査と種組成調査を行った。植物相調査では湿地本流に対して30mごとに垂直に交わるような幅2m×長さ約180～460mの調査区を10設置し（総面積5400m²）、調査区内に出現する維管束植物種を記録した。種組成調査では、湿地表土の様子から3つの表土タイプ（黒土・泥炭土・赤土）を区別し、各表土タイプに1×20mの区画を3つずつ設置した（3タイプ×3区画＝計9区画）。出現維管束植物種、スゲ属の繁殖茎数、植生高を記録した上で、各区画で全天写真を撮影し、全天写真解析ソフトCanopOn2を用いて開空度・光透過時間を求めた。また1×20m区画内の端部に1×1mの区画を設置し、各植物種の株数を記録した。

【結果・考察】

2019年の空中写真と1968年の植生図を比較したところ、51年間で森林が167%に増加し、ヨシ・スゲ群落が42%に減少していた（図1）。湿地の急速な森林化が明らかとなった。

植物相調査より、2019年で171種の維管束植物が確認された。1968年の調査では107種の植物種が確認され、そのうち両年で確認された種は73種、消失してしまった種は34種であった。2019年までに侵入した種は98種であり、現在の種の半数以上が侵入種だった（図2）。各植物種の生態的特徴に注目すると、

湿潤な環境でのみ生息する湿地性植物の割合は1968年と比べ2019年で減少していたが（ $p < 0.05$, χ^2 検定）、乾燥条件でも生息可能な準湿地性種に変化は見られなかった。また木本種の割合は増加傾向で、外来種は有意に増加していた（ $p < 0.01$, Fisherの正確検定）。また消失種と侵入種で比較したところ、侵入種で湿地性種の割合が低く、木本・外来種の割合が高かった（図3, $p < 0.05$ ）。

表土タイプや環境要因が植物の種組成に与える影響については統計的に検出されず（ $p = 0.29$, PERMANOVA）、今後区画数を増やして調査する必要がある。

以上より、菅平湿原では51年間で森林化が急速に進行し、湿地の植物種が入れ替わるほどの種組成変化が進行していることが明らかとなった。これは土砂堆積と河川直線化・河床掘り下げによる湿地の乾燥化が主要な要因として考えられる。

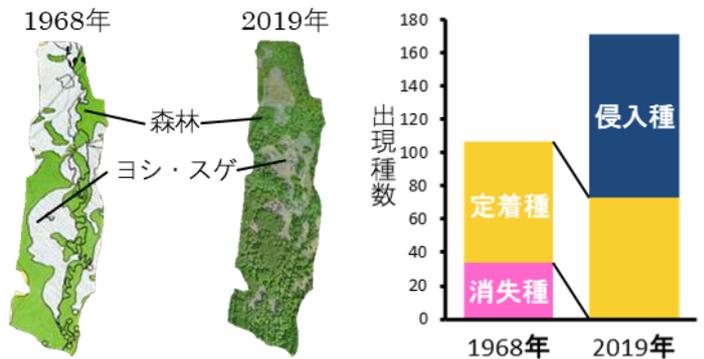


図1. 1968年植生図（左）と2019年空中写真（右）

図2. 1968年と2019年の出現種数

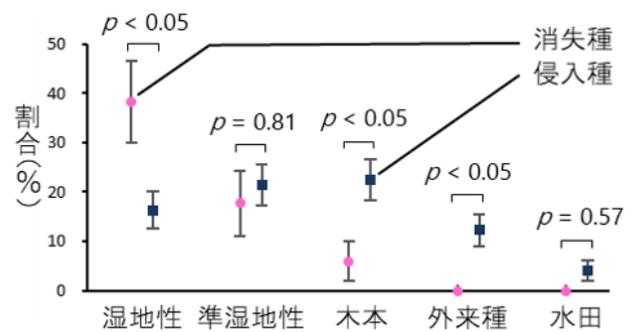


図3. 消失種・侵入種の各生態的特徴をもつ種の占める割合。Fisherの正確検定の結果を示す。エラーバーは二項分布の標準誤差を示す。

【参考文献】

- Davidson (2014) *Mar. Freshwater Res.* 65 (10) :934-941.
- 国土地理院 「日本全国の湿地面積の変化の調査結果」 <https://www.gsi.go.jp/kankyochiri/shicchimenseki2.html> (最終閲覧日：2020年1月13日)
- 浅野ほか (1969) 菅平高原生物実験所研究報告 (3) :11-28.
- 桜井 (1988) 信州大学環境科学論集 (10) :16-28.

異なる昆虫から分離される腸内生キクセラ目菌類の宿主特異性の検討

李 知彦 (筑波生物学類)

指導教員：出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

導入

キクセラ亜門には、土壌や糞上で生育する菌と、節足動物の腸内で生育する菌とが知られてきた。近年、当研究室内でその双方で生育する菌群を把握しつつある。その1つに直翅目昆虫から分離される未記載属のキクセラ目菌類がある。直翅目では食物を咀嚼する前胃が発達しており、これらの菌類は孢子表面の爪状構造により前胃表面の微毛を挟むことで、前胃に留まり増殖する。この属にはカマドウマ科昆虫からのみ得られる sp.1 とコオロギ科昆虫からのみ得られる sp. 2 が含まれる。両菌は宿主腸内に留まって増殖するのに必要な孢子の爪の形態が異なるが、その他は酷似し、近縁な別種と考えられる。宿主の分化は生殖的隔離を生む可能性があり、異なる分離源や両菌の孢子の爪の形状差はその鍵になる。それゆえ、両種は種分化の機構を解明するのに適した材料といえる。更に両種は培養可能で、宿主も入手・飼育が容易であり、実験に好適である。そこで、まず宿主交換実験を行い両菌の宿主特異性を検討した。

材料・方法

1) 両菌の感染頻度の調査・分離・培養

2019年6月～12月の間、長野県、群馬県、栃木県下でカマドウマ科・コオロギ上科昆虫を採集した。種同定は日本直翅類学会(2006)を参照し、形態・鳴き声に基づいて行った。採集個体は湿らせたキムワイプを敷いた容器内で市販の金魚の餌を与えて個別に飼育した。各々から糞を回収し、抗生物質入り素寒天培地に接種した。そして、糞からの菌の出現と前胃への付着孢子数の両方またはいずれかを確認して自然界での両科昆虫への感染頻度を調べた。また、糞から菌が出現した場合、孢子を1/2MA+YEP培地に単離した。両菌の孢子発芽には嫌気条件が必要なため、アネロパウチ・ケンキで約1週間嫌気培養を行い培養株を確立した。

2) 宿主交換実験

本来の宿主と菌のペアと、交換した宿主と菌のペアとで感染実験を行い、宿主特異性を検討した。【材料】宿主としてカマドウマ科のマダラカマドウマ・コノシタウマ(上田市広山寺古墳産)、コオロギ科のフタホシコオロギ(FISH JAPAN店の餌用の市販品)を用いた。また、菌株はコノシタウマ由来の sp. 1 とエンマコオロギ由来の sp. 2 を用いた。各宿主に対して以下3つの実験区を設けた: (i) どちらの菌も与えない(Control) (ii) sp. 1 を与える (iii) sp. 2 を与える。各実験区のサンプルサイズは数字の小さい順にコオロギ科が n=10, 10, 10、カマドウマ科が n=3, 4, 2 だった。【方法】初めに、宿主が両菌を保有していないことを確認するために、糞を3-6回採取し、培地に接種してから二日後に両菌が出現しないことを確認した。続いて、各実験区の菌の孢子を栄養寒天(1/2MA+YEP)に混ぜ実験個体と与え(Controlの場合は孢子なし)、与えた時刻を開始点(Od)とした。孢子量は成熟した孢子柄頂端部に生じる孢子を含む液滴の5滴分とした。実験個体の食餌条件についてはここでは省略する。そして、以下の項目について計測をした。まず、1d・2dに糞を回収し抗生物質入り素寒天培地に接種して、2日後と7日後に菌が出現した糞数をカウ

トした。次に、2dに全個体を解剖し前胃を摘出裂開後、約15秒間ボルテックスミキサーで洗浄して乳酸で封入した。そして、光学顕微鏡を用いて付着孢子数のカウントを行った。このとき、付着孢子の発達を4段階に分け、未発達のStage 0から発達を完了したStage 3へと数字の大きさを発達の進行度合を表し、各段階ごとにカウントした。

結果・考察

1) 両菌の感染頻度調査・分離・培養

カマドウマ科昆虫を計209匹採集し、形態に基づき2属5種に同定した。うち2属4種173匹にsp. 1が感染しており合計の感染率は82.8%であった。同様に、コオロギ上科昆虫を計63匹採集し、形態・鳴き声に基づき3科7属7種に同定した。うちコオロギ科の3属3種5匹にsp. 2が感染しており3種合わせた感染率は11.4%(全44個体中)であった。他2科3属3種18匹にsp. 2の感染は見られなかった。sp. 1の感染頻度が非常に高いのに対してsp. 2の感染頻度は低かった。また、感染個体の4種20匹からsp. 1を21菌株、感染個体の2種2匹からsp. 2を2菌株得た。

2) 宿主交換実験

宿主がコオロギ科の場合の前胃に付着した孢子数の結果を表1に示す。Stage 1を除きsp. 1の付着孢子数がsp. 2より有意に少なかった(Mann-Whitney U test; p<0.05)。一方で、宿主がカマドウマ科の場合の両菌の付着孢子数に有意差はなく(同上)、今回のサンプルサイズでは差の有無は判定できなかった。だが、Stage 0以外の発達段階のsp. 2の付着孢子数はほぼ0で、明白にsp. 1の付着孢子数より少なかった。以上から、付着孢子数は宿主を交換した場合に少なくなることが示唆された。加えて、両菌いずれも宿主を交換した場合に明らかに発達段階が進んだ付着孢子数が少なくなった。次に、宿主を交換した実験区における糞からの菌の出現は宿主がコオロギ科の場合でのみ認められた。したがって、少なくともsp. 1は宿主がコオロギ科の場合でも潜在的に感染可能であり、今回の実験条件ではカマドウマ科への宿主特異性は否定された。

展望

実験結果に反して自然環境下ではコオロギ科から両菌が分離されることはないため、両科昆虫の共在下での感染実験で検証する予定である。また、宿主交換時の孢子付着数の低下の原因は交換した宿主の前胃の構造に対して孢子(の爪)が付着し難いためではないかと考え、現在SEMを用いた観察により調査中である。

表1 コオロギ科宿主における発達段階ごとの付着孢子数

	sp. 2孢子数(個) 中央値 (25%-75%)	sp. 1孢子数(個) 中央値 (25%-75%)	P値
Stage 0	2.5 (1.25-6.5)	0 (0-1)	<0.001
Stage 1	4 (1.25-5.75)	4 (0.25-8.75)	0.5
Stage 2	31.5 (19.5-37.8)	1.5 (0-9.75)	0.001
Stage 3	117 (53.3-148)	0 (0-1.75)	<0.001
合計	160 (83.8-196)	8.5 (1-20.3)	<0.001

Mann-Whitney U test; H_a sp. 1 < sp. 2; p<0.05

ショウジョウバエ侵害受容におけるストレスと下行性抑制機構の関係性

橋本 佳成 (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》

痛みは我々ヒトにとって、危険な刺激から身体を保護するために重要な感覚である。しかし、本来無害な刺激から痛みを感じる状況は、我々の社会生活を脅かす、重大な健康問題となり得る。国際疼痛学会の調査によれば、世界人口のおよそ20%が慢性痛に苦しんでいる¹⁾。つまり、痛みは私達にとって、身近で重要な問題である。

下行性疼痛抑制機構は、脳からの下行性シグナルにより脊髄での侵害受容シグナルを抑制する哺乳類の疼痛制御において重要な役割を果たす経路である。この下行性抑制機構の機能異常は慢性疼痛疾患の原因の一つであると指摘されており、また下行性抑制機構の機能異常にはストレスが関与することが指摘されているものの、その詳しいメカニズムについてはよくわかっていない²⁾。下行性抑制機構は複数の脳領域からの入力により制御される複雑な神経経路であり、哺乳類の複雑な中枢神経系における下行性抑制機構の詳細な解明は、非常に挑戦的な課題と言える。

そこで本研究では、哺乳類よりも単純な神経系を持ち、かつ、遺伝学的手法を用いて組織特異的な遺伝子機能、神経機能の操作が容易なショウジョウバエにおいて、下行性抑制機構とストレスの関係性を検討した。所属研究室において、ショウジョウバエ幼虫における下行性侵害受容抑制機構として機能する可能性が高い神経ペプチド性の神経経路が見出されている。そこで本研究は、この神経ペプチド性の侵害受容抑制系に注目して、その詳細な神経経路の解明とストレスとの関係に関する調査を試みた。

《方法・材料》

1. 下行性制御に係わる神経ペプチドの発現細胞解析

ショウジョウバエの下行性侵害受容制御系とストレスとの関係性を検討するにあたり、まずはじめに GAL4/UAS システムと抗体染色を併用し、この下行性侵害受容制御系に関わる神経ペプチドの詳細な発現部位の特定を実施した。GAL4/UAS システムとは、組織特異的なプロモーターの制御下に挿入した転写因子 GAL4 が、標的配列 UAS に結合することで、UAS 下流にある遺伝子の発現を組織特異的に誘導する遺伝子強制発現システムである(図1)。下行性制御関連神経ペプチドの遺伝子発現プロモーター領域を利用して作製された GAL4 を介して誘導された GFP と、神経ペプチドそれぞれに対する特異的な抗体を用いて二重染色を行い、中枢神経系において共染色される細胞のマッピングを実施した。

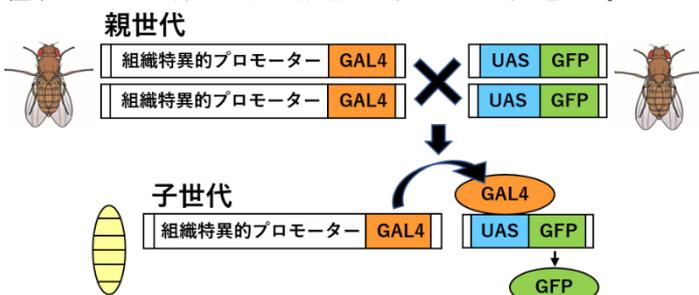


図1 GAL4/UAS システム

2. 1細胞ラベリングによる下行性制御に係わる神経ペプチド発現細胞の解析

FRT カセットフリップアウト法を用いた1細胞クローンの誘導により、上記の実験でマッピングした下行性制御に係わる神経ペプチド発現細胞の軸索投射パターンを詳しく解析した。組み換え酵素 FLP は、標的配列 FRT で挟まれた DNA 領域をゲノム中から除去する働きを持つ。本研究ではヒートショックプロモーター(hs) の制御下に配置した FLP と GAL4/UAS システムの併用により、GAL4 発現細胞の中でヒートショックが起きた細胞においてのみ GFP が発現するシステムを利用した(図2)。少数の細胞のみで GFP が発現するようヒートショック条件を調整し、下行性制御関連神経ペプチド発現細胞において発現した GFP シグナルをトレースすることで軸索投射先の検討を行った。

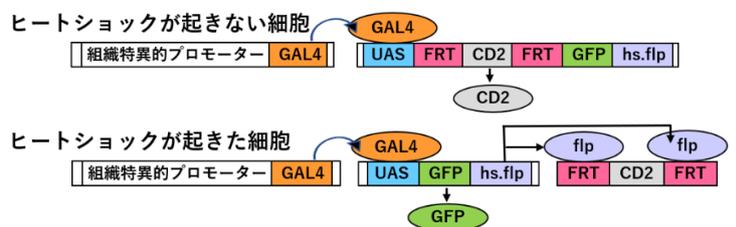


図2 FRT カセットフリップアウト法

3. 栄養ストレスと下行性制御に係わる神経ペプチドの関係解析

下行性制御とストレスの関係を調べることを目的として、栄養ストレスに曝した幼虫の下行性制御関連神経ペプチドの発現部位、発現量などに注目した発現解析を行った。

4. 栄養ストレスの侵害受容への影響の検討

栄養ストレスと下行性抑制機構の関係性を調べる一環として、ショウジョウバエ幼虫の熱侵害受容反応テスト³⁾ を利用し、栄養ストレスに曝した幼虫の侵害受容反応感度に変化が生じるかを調べた。

《結果・考察》

これまでに、下行性制御関連神経ペプチド発現細胞のマッピングおよびその投射パターンの解明に成功した。さらに、栄養ストレスに曝した幼虫において、熱侵害受容応答が大きく変化することを見出した。こうした結果を基に、現在は侵害受容に影響を与える栄養ストレス条件の詳細な検討および、栄養ストレスによる下行性制御関連神経ペプチドの発現変化について検討中である。詳細は卒業研究発表会にて示す。

《参考文献》

- 1) Treede et al. A classification of chronic pain for ICD-11. Pain. 2015;156(6):1003-7
- 2) Crofford LJ. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2015;126:167-183.
- 3) Tracey et al. painless, painless, a Drosophila gene essential for nociception. Cell. 2003;113(2):261-273.

嫌悪記憶を指標としたショウジョウバエの痛み様感覚の検討

桑原 舞衣 (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】

昆虫もヒトと同じく「痛み」を感じるのだろうか?本研究の目的は高度な遺伝学的ツールを持つキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)を用いてその答えを得ることである。

現在もっとも広く受け入れられている国際疼痛学会による痛みの定義によれば痛みは "An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage. (実際にまたは潜在的に存在する組織の損傷やそうした損傷を示す言葉で表現される不快な感覚,あるいは不快な情動体験)"であるとされている(IASP, 1979)。しかし,この定義は主観に依存しており,言葉による意思疎通の困難な乳児やヒト以外の動物において痛みの存在を検証することは難しい。動物モデルを用いた痛覚研究においては「侵害受容」という, "The neural process of encoding noxious stimuli. (有害刺激の情報処理に関わる神経プロセス) (IASP, 1979)"と定義される客観的な概念を用いることでこの問題を回避しているが,ヒト以外の動物に痛みが存在するのことは長らく議論が続いている (Sneddon et al, 2014, Rose et al, 2014)。

先行研究により,脳神経構造がヒトに近い哺乳動物においては痛覚刺激によって活性化される脳領域が共通であることなどから痛みを感じていると既に推定されている(Sneddon et al, 2014)。しかし哺乳動物以外の動物,特に脳神経構造のヒトとの共通性があまり見られない無脊椎動物について痛みの議論はこれほど進んでいない。

Elwood らは無脊椎動物であるヤドカリに電気ショックを与えると,その条件を学習して回避するようになることを示した。彼らはこの嫌悪記憶の形成を,無脊椎動物が侵害性の刺激により不快な感覚を体験する,すなわち痛みが存在する証拠であるとした(Elwood, 2011)。確かに,侵害性の刺激により嫌悪記憶が形成されるならば,それは「侵害性の刺激による不快な情動体験」すなわち痛みとして捉えられる。しかしこの実験のみでは無脊椎動物に痛みがあると断定はできない。電気ショックは侵害受容以外の感覚受容も引き起こしうるため嫌悪記憶が本当に侵害性刺激と結びついたものか,この行動レベルの実験からは判断できないからだ。

そこで本研究では遺伝学的ツールによって上記の問題を解決するため,高度な遺伝学的ツールが利用できるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)を用い,無脊椎動物に「侵害性の刺激による不快な情動体験」というヒトにおける痛みに近い感覚プロセスがあるかどうかの検証を目指す。

一般に動物愛護において無脊椎動物はその対象から除外されている。無脊椎動物に痛みの機構が備わっているか否かを知るとは,動物愛護の観点からも重要な意味をもつだろう。

【方法】

・温度遺伝学による侵害受容ニューロン的人為的刺激

自然な侵害刺激を与えた場合に活性化する感覚系を網羅的に調べることは困難である。そのため本研究では温度遺伝学的手法に

よって特定のニューロンを人為的に興奮させることで侵害受容を発生させることにした。

GAL4/UAS システムは酵母転写因子とその標的配列に由来する組織特異的な遺伝子強制発現システムである(図1)。これを用いて幼虫の侵害受容器と同定されている class IVニューロンに,30°C前後の熱に応答して開くチャネル dTRPA1 を発現し,30°Cの条件下において人為的に侵害受容ニューロンに刺激が加わるシステムを作成した。

・侵害受容ニューロン的人為的刺激と匂いの連合学習

本実験の目的は「侵害受容による不快な情動体験」が生じるか検証することである。そこで,先行研究(Honda et al, 2014)に基づいて上記の手法で引き起こした侵害受容と匂いと連合学習を行い,その後匂いに対する走化性がどう変化するかを調べた。

シャーレのフタにろ紙を貼り付け,におい刺激となる Ethyl Acetate(EA)をろ紙に滴下した。dTRPA1 が応答する温度である30°Cに温めたゲル上にショウジョウバエ3齢後期幼虫を置き,即座にフタを閉めて1分放置した。これにより侵害刺激とにおい刺激が同時に与えられることになり,連合学習が生じると考えられる。

次に試験用紙(図2参照)の上にシャーレを置き,その両端にマイクロチューブのフタを台としてろ紙を置いた。シャーレの中央に学習処理を終えたショウジョウバエ幼虫を置き,ろ紙の片方のみEAを滴下して3分間自由運動をさせた。各領域に含まれる幼虫の数を数え,以下の式に当てはめ,匂いに対する反応を数値化した。

$$Response\ Index(RI) = \frac{N_{odor} - N_{ctrl}}{N_{odor} + N_{ctrl}}$$

N_{odor} : 匂い刺激のある領域にいた幼虫の数

N_{ctrl} : 匂い刺激のない(コントロール)領域にいた幼虫の数

RIの数値は,1に近づくほど匂い刺激に対して正の走化性が,-1に近づくほど負の走化性があることを示す。

もしも温度遺伝学的な侵害受容の発生と匂いの連合学習によって嫌悪記憶が形成されるならば,連合学習後の幼虫のRIはコントロールに比べて有意に減少すると考えられる。

【結果と考察】

これまでに学習に関して学習時間や温度の条件検討を行っている。詳細は発表会にて示す。



図1 UAS/GAL4 システム

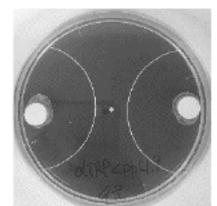


図2 行動試験用紙

JOKER
上下 ～本当の点は写真の中にある～

岡本 遼太郎 (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)

1. 背景と目的

高山帯は気候変動に対して最も脆弱な生態系の一つであるが直接の調査が難しく、リモートセンシングが生態系の物理・生物環境の変化を観測する手法として重要である。地形的な不均質性が高く、狭い領域に多様な環境が混在する高山帯では、衛星画像は生態系の定量的解析に用いるうえで解像度が不十分である場合が多い。このため地上に設置された定点撮影カメラの高解像度な画像を用いて生態系を定量的に観察する試みがなされているが、得られるデータは時間・空間的に限られたものになってしまう。

一方、手持ちカメラによる山岳風景写真は空間解像度や撮影頻度も高く、過去記録も豊富であるが、多くの場合撮影条件が不明であるため被写体の画像情報とその現実世界での地理情報とを結び付けることが難しく、定量的解析に用いられてこなかった。画像中の被写体を地理情報と対応づけ、同じ場所のほかの記録と比較可能な形にすることをオルソ化という。オルソ化を行うことで、山を下から見上げた写真(図 1a)を上から見下ろした写真のように変形させることができる(図 2a, b)。本研究の目的は、山の風景を写したインターネット上の写真や、過去のフィルム写真を高山帯でのリモートセンシングに利用するために、写真の撮影パラメータ(撮影点、撮影角、画角、レンズ歪み)を自動で推定し、オルソ化する手法を開発することである。これにより、過去に遡ることのできる、高山生態系の定量的解析に利用可能な大規模なデータベースを作成することが可能になると期待される。

2. 方法

R 言語を用いて山岳風景写真の撮影パラメータを自動推定するプログラムを開発した。予め撮影条件のわかっている北アルプス立山の室堂山荘に設置された定点撮影カメラ写真(図 1)を例に、撮影パラメータを全て推定して作成したオルソ画像と、撮影位置と画角を固定し、他を推定して作成したオルソ画像との間で、元画像の画素毎に推定された地理座標のずれを評価した。

オルソ化アルゴリズムの概要

オルソ化は以下の流れで行った。

- ① 地形データを用いた、登山道から見える地形の輪郭データベースの作成
- ② 地形の輪郭の形状マッチングによる登山道上でのおおまかな撮影位置・撮影角・画角の推定
- ③ ②で推定されたパラメータと、航空写真、地形データを用いたシミュレーション画像の作成
- ④ シミュレーション写真と風景写真のマッチングによる、風景写真の GCP (Ground Control Points) 付け
- ⑤ GCP をもとにした、遺伝的アルゴリズムによる撮影パラメータの詳細な推定
- ⑥ ⑤で推定された撮影パラメータによる風景写真のオルソ化

3. 結果

撮影条件が全く分からない写真においても、その撮影パラメータを推定しオルソ化することに成功した。全撮影パラメータを推定して作成したオルソ画像(図 2a)、撮影位置と画角を与えて作成したオルソ画像(図 2b)、当該領域のオルソ航空写真(不可視域は図 2b のものを使用、図 2c)を示す。全撮影パラメータを自動推定して作成したシミュレーション画像では、撮影位置のずれによって、画面下部に本来写るはずの斜面がその手前の斜面に隠されてしまった。撮影位置と画角を与えて元画像の画素毎に推定したオルソ化後の地理座標のずれは、この部分において特に大きくなった。(図 3) 作成したオルソ画像においても特にこの部分で、不可視域の形状が大きく異なった(図 2)。



図 1 1a オルソ化に用いた定点カメラ写真、1b 撮影条件の概要



図 2 2a 全撮影パラメータを推定して作成したオルソ画像、2b 撮影位置と画角を与えて作成したオルソ画像、2c オルソ航空写真

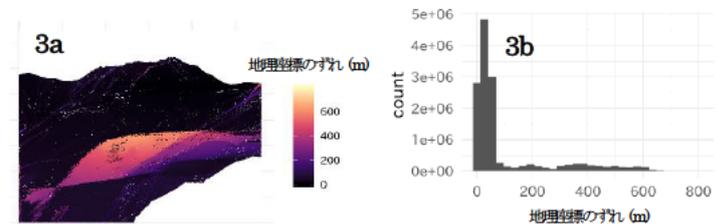


図 3 元画像の画素毎の、全撮影パラメータを推定して作成した地理座標と、撮影位置と画角を与えて作成した地理座標とのずれ 3a 元写真の画像内における分布、3b ヒストグラム

4. 課題と展望

不可視域を考慮した撮影パラメータ推定アルゴリズムの導入による精度改善、及び GPU を用いた計算の高速化が今後の課題である。また、機械学習による画像からの植生情報抽出との組み合わせによって、生態系の定量的な解析に用いることのできるデータを作成することを予定している。

Project Y ～空飛ぶメダカを追え～

八尾 晃史（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>水生生物は水鳥によって受動分散する

分散は生物の時空間的な分布を決定する現象である。これは生物が能動的に行うだけでなく、タンポポやオナモミの種子のように、風や他の生物を運び手として受動的にも生じる。

淡水性水生生物にとって、乾いた陸上を超えて自力で分散するのは困難である。ダーウィンは「種の起原」の中で、水生生物の分散に水鳥が寄与する可能性を初めて提唱した。実際に、外肛動物、節足動物、軟体動物などの幅広い分類群で、水鳥によって分散することが示唆されている。また、水鳥が外来水生生物種の分布拡大を促進することを示唆する研究例もあり、水鳥による受動分散の解明は外来種管理などの応用面でも重要である。

様々な分類群の水生生物で受動分散が報告されている一方で、魚類については未だ詳細な研究例が無い。世界の湖沼の90%以上は、面積1ha未満と小さく、他の水系との接続に乏しいとされるが、魚類はそのような湖沼にも生息している。これらのことから、何らかの運び手によって受動的に分散したことが予想される。加えて、漁業・治水関係者の一部やいくつかのブログが、魚類が卵の状態の水鳥によって受動分散すると主張している。そこで本研究では、ミナミメダカ *Oryzias latipes* を対象として、水鳥による魚類の卵の受動分散が起こるのかを検証した。

<方法と結果>

1. メダカが卵を産む水草は水鳥によって分散した

ミナミメダカは水草等に産卵するため、受動分散する際には水草ごと移動すると予想される。そこで、メダカの産卵基質である植物体の状態の水草が水鳥によって受動分散するのか、野外実験で検証した。2019年7-12月の間、茨城県つくば市北条に1m×2m程度の実験池を、1mまたは3m間隔で2つ設置した。池には餌となる魚を入れ、サギ類を誘引した。人工水草を一方の池に入れ、水鳥がもう一方の池までそれを分散させるか観察した。

アオサギが11回、チュウサギが1回、ゴイサギが1回、池に飛来した。またアオサギが1回、チュウサギが7回、アマサギが1回、池の周囲に飛来した。うち1個体のアオサギが、人工水草を隣の実験池まで分散させた。更に、アオサギによって池の周囲5箇所に人工水草が運ばれた (Fig. 1)。この結果は、水草が水鳥によって受動分散することを示しており、水草にメダカの卵が付いていれば同時に分散することが示唆された。



Fig. 1 アオサギの脚に付いて人工水草が分散した

2. 卵は水草に付いた状態で空中での乾燥に耐えて生存した

卵が、受動分散中の空中での乾燥に耐えられるか検証した。ミナミメダカの卵を水草片に付けた状態、または卵のみの状態で空气中に0-48時間晒す処理を行った。本実験および3.の実験は、ミナミメダカの産卵期である8月の気温・湿度（茨城県つくば市）に近い25°C・湿度75-80%程度の条件で行なった。処理後、卵の生死を判断して生存率とした。また、孵化率も測定した。

卵のみの場合は空气中に12時間晒すと全て死亡したが、水草に付けた場合は最大12時間生存した。ロジスティック回帰により、水草に付けた場合の卵の半数致死時間は11.9時間、90%致死時間は12.6時間と推定された (Fig. 2A)。この結果から、卵は水草に付着した状態であれば12時間程度は空中での乾燥に耐えられること、および水草によって空中で生存可能な時間が伸びることが示唆された。

3. 卵は一度に74.5 km 分散可能と推定された

2.に加えて、飛行中の環境を再現した時にサギ類の脚に付いた水草が脱落する確率、および水草に付着した卵の生存率を測定し、一度に分散可能な距離を推定した。チュウサギの脚の標本に卵を付けた水草を絡め、サギの飛行速度である時速40 kmの風を0-150分間当て、卵の生存率・孵化率を測定した。処理が終了した時点で水草が脱落していた場合は、卵は死亡したとみなした。

卵は最大120分間生存した。ロジスティック回帰によって推定された半数致死時間は82.4分、90%致死時間は111.8分であった (Fig. 2B)。90%致死時間である111.8分とサギの飛行速度40 km/hを掛けて、水草に付いた状態の卵は一度に74.5 km分散可能であることが示唆された。

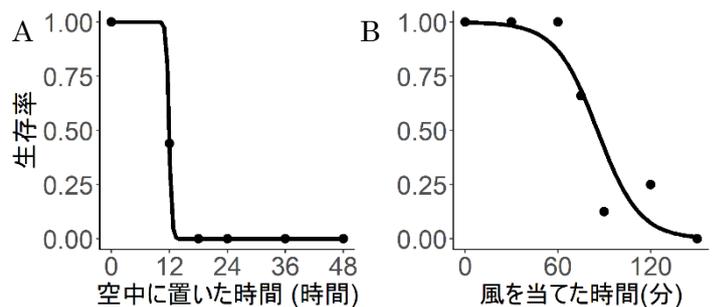


Fig. 2 水草に付けて空中に晒した卵の生存曲線

A. 空中に置いた場合、B. サギの飛行条件を再現した場合 (黒丸は生存率の平均値)

<考察>淡水魚が水鳥によって受動分散することが示唆された

本研究により、これまで明らかにされていなかった水鳥による淡水魚の卵の受動分散が起こりうることを示唆された。魚類の生態学的、生物地理学的、集団遺伝学的な研究を行う上で、水鳥が作る"隠れた空中の道"を考慮することが必要と言えるだろう。

卒業研究発表会では、追加の実験・解析を行った結果を併せて報告する予定である。

「浮気」するのはどんな虫？：イボタノキの訪花昆虫間における体表異種花粉率の比較

寺田 昂平（筑波大学 生物学類）

指導教員：大橋 一晴（筑波大学 生命環境系）

【背景】

花を訪れる多くの動物は、特定の植物種だけでなく、しばしば複数種の花の間を行ったり来たりしながら採餌することが知られている。このような訪花者による「浮気」は、異なる植物種間における花粉の移動 (Interspecific Pollen Transfer, 以下 IPT) を引き起こす。IPT は、花粉の浪費や結実率の低下など、植物の繁殖成功に好ましくない影響をおよぼすだろう。各訪花者がもたらす IPT の程度は、生活史や飛行能力に由来する行動のちがいによって、大きく異なる可能性がある。しかし、花を訪れるさまざまな動物のうち、どのタイプがより多くの IPT をもたらしやすいのか、といったことについては、よくわかっていない。IPT への影響という点から見たポリネーターの「質」のちがいを議論するには、異なる訪花者間で、体表に付着した異種花粉の数や割合、種組成などを比較するのが有効だろう。しかし従来の研究は、1種の花を訪れる 2~3 タイプの訪花者間の比較、あるいは異なる種の花上で得られたデータの比較が大半で、広範な訪花者タイプ間で、IPT への影響のちがいを定量的に議論することはむずかしい。

そこで本研究では、訪花昆虫のタイプ間で、体表に付着した異種花粉の割合、花粉の種組成、および全花粉数を定量的に比較するため、多様な分類群の昆虫が訪れるイボタノキ *Ligustrum obtusifolium* の花に着目した野外調査をおこなった。

【方法】

茨城県つくば市神郡（筑波山麓）において、イボタノキの開花期間中（5月末~6月初め）に、4株を訪れた訪花昆虫を見つけ採りして研究室に持ちかえり、冷凍保存した。イボタノキには、日中にマルハナバチや単独性ハナバチ、ハナムグリ、ハナアブ、チョウといった昆虫が訪花し、日没後にはガが訪花するため、すべての時間帯において訪花昆虫をもれなく採集するよう気をつけた。保存した昆虫は、後に 0.4mol/L のショ糖溶液と共にチューブに入れ、手動、ボルトテックスおよび超音波洗浄器を用いて体表の花粉を洗い落とした。この洗い液を生物顕微鏡下で観察し、液中に含まれるイボタノキおよび他種の花粉を計数した。訪花昆虫および花粉は、可能な限り低次の分類群まで同定した。なおハナバチ類では、後脚に花粉団子をつけていない個体のみを用いた。

集めたデータは、コマルハナバチ雌、コマルハナバチ雄、ヒメハナバチ属、他のハナバチ類、カリバチ類、コアオハナムグリ、他の甲虫類、ハナアブ科、チョウ類、夜行性ガ類の 10 のグループに分けて解析した。近縁なグループ間の体表異種花粉率の差異は、一般化線型モデル (GLM) を用いて解析した。

【結果と考察】

1. 各グループの体表異種花粉率、種組成および全花粉数の特徴

体表異種花粉率は、ヒメハナバチ属、ハナアブ科、コアオハナムグリなどで高い傾向がみられた (図 1)。また、マルハナバチは雌雄ともに解析に用いたいずれの個体においても、体表花粉の

中ではイボタノキが最も多かった。全花粉数は、ヒメハナバチ属 (n=5, 平均: 1.5×10^5 粒)、コアオハナムグリ (n=10, 平均: 1.0×10^5 粒)、コマルハナバチ雌 (n=10, 平均: 7.5×10^4 粒) の順で多く、最も少なかったのは夜行性ガ類 (n=10, 平均: 9.0×10^2 粒) であった。異種花粉の種組成は、チョウ類 (n=10, 平均: 4.2 種) がもっとも多く種類の花粉を付着させており、他のハナバチ類 (n=8, 平均: 2.4 種)、他の甲虫類 (n=10, 平均: 2.4 種)、夜行性ガ類 (n=10, 平均: 2.0 種) では特に少ない傾向がみられた。

2. 近縁なグループ間における体表異種花粉率のちがい

体表異種花粉率には、目などの大まかな分類群間だけでなく、比較的近縁なグループ間や同種の雌雄間でも、以下の注目すべき差異がみられた。

(1) コマルハナバチ雌とコマルハナバチ雄のちがい

コマルハナバチでは、雌よりも雄の方が体表異種花粉率が有意に低かった (図 1; $P < 0.05$)。このちがいは、雌はコロニーのために花粉を多く集めなければならないため、多くの花を訪れる必要がある、といった雌雄間の採餌における要求のちがいを反映しているのかもしれない。

(2) ヒメハナバチ属と他のハナバチ類のちがい

体表異種花粉率は、他のハナバチ類の方がヒメハナバチ属よりも有意に低かった (図 1; $P < 0.001$)。ヒメハナバチ属では、イボタノキ以外の他の 1 種の花粉を多く付ける傾向にあった。このことから、ヒメハナバチ属は、イボタノキ以外の植物種においては、異種花粉率の低い優秀なポリネーターとして機能している可能性がある。

これらの結果は、一般に同じ機能群として扱われるポリネーターの中にも、行動習性や形態によって、植物の繁殖成功に対する影響が大きく異なるグループが複数含まれている可能性を示唆する。

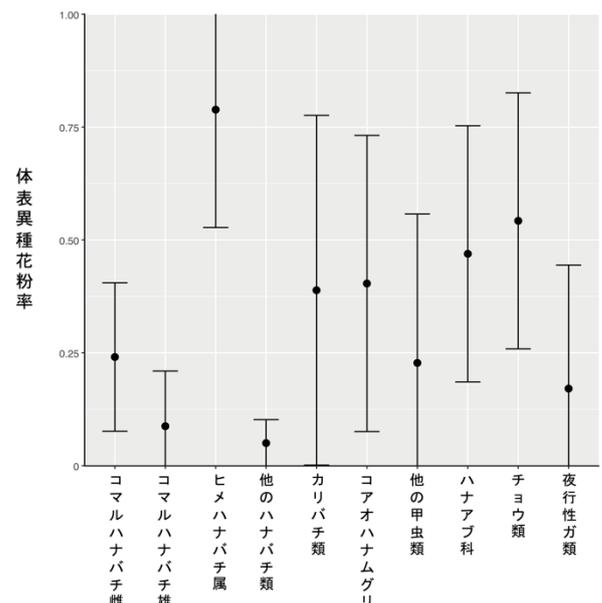


図 1. 各グループにおける体表異種花粉率。黒丸は平均値、エラーバーは±1SDを示す。

茨城県から得られたババヤスデの分類学的検討（倍脚綱：オビヤスデ目）

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

【導入】

ヤスデ類（倍脚類）は土壌生息性の節足動物であり、飛翔能力はなく、水中で長く生存することもできない。その低い移動能力から、狭い地域の中でも種分化の起こる例があり、地理的種分化を調べるのに適した生物群としてしばしば研究対象として用いられている。一方で、狭い範囲でも種分化の起きやすい特性のためにもあって、日本産のヤスデ相は未だ十分に解明されたとは言いがたい状況にある。

ババヤスデ属 (*Parafontaria* 属) は節足動物門多足亜門倍脚綱オビヤスデ目ババヤスデ科に属する大型のヤスデで、これまでに日本列島を中心に 13 種と 1 種複合体が知られているが、未だ未記載の種も残っていると考えられる。本研究では、日本産ババヤスデ類の多様性を明らかにすることを目的として、ババヤスデ相が十分に解明されていない北関東から東北地方にかけて探索を行った。

【材料・方法】

ババヤスデ科のヤスデ類は紫外線を当てると体表が蛍光を発することが知られており、夜間に紫外線ライトを使用することで効率的に発見することができる。本研究では、波長 395 nm にピークのある紫外線ライトを用い、主に夜間に採集調査を行った。採集した個体を 70–80% エタノールで固定して標本とした。標本は実体顕微鏡下で解剖し、ヤスデ類の種レベルの分類形質として特に重要となる生殖肢（雄の交接器）を取り出した。生殖肢は、デジタルカメラと微動装置 WeMacro Rail を使用して少しずつ焦点面の異なる画像を数 10 枚を撮影した後、深度合成ソフトウェア *Zerene Stacer* を利用して全体に焦点の合った深度合成画像を作成した。深度合成画像をトレースしてスケッチを描き、*Parafontaria* 属の既記載種との形質の比較を行った。

【結果・考察】

茨城県および福島県の 4 地点から未記載種である可能性の高い 2 タイプの *Parafontaria* 属の標本群（ここでは仮に *Parafontaria* 属の標本群 A と B とする）を得た。標本群 A と B はともに分布と生息環境に限られており、また成体の出現時期も春から夏に限られているため、これまでは十分な数の標本が得られにくく、分類学的検討が遅れていたものと思われる。

標本群 A の分布は標高 500 メートル以上の山地に限られ、春から夏にかけて成体が出現することを明らかにした。標本群 A は、生殖肢の形態はアカババヤスデ *Parafontaria erythrosona* (Takakuwa, 1942) によく似るが、体型や体色はアカババヤスデとは異なっていた。これまでのところアカババヤスデと同所的に生息する場所は見つかっていない。

標本群 B も分布は標高 500 メートル以上の山地に限られ、春から夏にかけて成体が出現することを明らかにした。標本群 B の生殖肢の形態は、脛附節の構造の類似からトラフババヤスデ *Parafontaria ishii* (Shinohara, 1986) に最も近いと判断される

が、生殖肢全体の形状はトラフババヤスデに比べて弯曲が弱く単純な構造をしていた。また体型には、触角や歩脚が体に対して非常に長い点、歩脚が非常に脆い点、背板に隆起列がある点、雌雄で大きく体型の異なる点など特異な特徴が多数認められ、トラフババヤスデと大きく異なっているだけでなく、*Parafontaria* 属の典型的な形態からもかけ離れていた。調査地の一部では標本群 B はトラフババヤスデと同所的に生息する場所があった。標本群 B とトラフババヤスデの生息環境はどちらもアズマネザサ群落の乾燥した土壌に限られており、アズマネザサの落葉を食べている可能性が高いと考えられる。両者の同所生息の状況から考えると、標本群 B の特異な形態の特徴はトラフババヤスデとの繁殖干渉を避けた結果としてもたらされた可能性もあるかもしれない。

今後、本研究で得られた 2 つの標本群について分類学的検討をさらに進め、未記載種であることを確定できれば新種として命名・記載することを目指すとともに、両者の生態および近縁種との関係の解明を進めたい。

フサヤスデの頭部器官に関する新知見

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

【導入】

節足動物の神経系は、頭部の前方背側に存在する脳と、頭部の後方腹側に位置する食道下神経節、胴部には左右対をなして体節的に並ぶ神経節、そしてこれらの神経節を前後、左右に連絡する縦連合と横連合から形作られるはしご形神経系である。脳は前大脳、中大脳、後大脳から成り、後大脳から後方に1対の神経束(縦連合)が伸びて食道下神経節に接続することで食道神経環を形成している。食道神経環はその中ほどの後大脳横連合によって前部と後部に区別される(図)。脳より後方の頭部腹面に開く口から始まる消化管は、食道神経環を通過して食道下神経節の背側後方へと伸びていく。この神経-食道交差は、昆虫類や甲殻類では後大脳横連合の前方に位置していることが知られており(図)、ヤスデ綱などの多足類でも同様の構造をとっているとされている。

本研究では、いまだ頭部内部形態の研究例の少ないフサヤスデ類を対象に、頭部の内部構造を観察した。フサヤスデ類は節足動物門多足亜門ヤスデ綱フサヤスデ目に属する生物で、ヤスデ綱の中で最も初期に分岐した分類群、最原始系統群であると考えられている。体長数 mm ほどの小型のヤスデで、他のヤスデと異なり強固な外骨格を持たず、全身にふさ状の剛毛を持つ。観察の過程で、フサヤスデ類では頭部中枢神経系と消化管の交差位置が通説と異なっている可能性を見出したため、これをフサヤスデ類の頭部器官に関する新知見として報告する。

【材料・方法】

・材料

本研究では筑波大学一の矢学生宿舎周辺のケヤキの樹皮下から採取した節足動物門多足亜門ヤスデ綱フサヤスデ目フサヤスデ科ハイロチビフサヤスデ *Eudigraphis takakuwai kinutensis* (Haga, 1950)を材料として使用した。

・準薄切片の作成・観察

エポキシ系樹脂(LV)を用いた連続準薄切片法により観察試料を作成した。採取したハイロチビフサヤスデをKarnovsky氏液により固定したのち、頭部が下向きになるように寒天に包埋した。後固定として1% OsO₄水溶液で処理したのち、エタノールによる脱水処理を行った。アセトンを伸介剤としてLV樹脂(重量比; LV Resin : 60, VH1 Hardener : 20, VH2 Hardener : 45, LV Accelerator : 3)を浸透させ、ビームカプセルに包埋した。包埋の完了した標本をウルトラミクロトームにより厚さ2 μmの連続横断面準薄切片とした。作成した準薄切片は、核酸を青く、多糖類を紫色に染色するトルイジンブルーによって染色した。0.1% トルイジンブルー溶液(重量比; 10% 炭酸ナトリウム10水和物水溶液 : 1000, トルイジンブルー : 1)で1時間染色した後、流水で30分間洗浄した。その後色素をアルコール不溶性にするために4% モリブデン酸アンモニウム水溶液で5分間処理し、流水で5分間洗浄した。作成した連続準薄切片はカナダバルサムで封入し、光学顕微鏡で観察した。

【結果・考察】

ハイロチビフサヤスデの頭部には、前方から、脳(前大脳、中大脳、後大脳)、食道神経環を成す左右の縦連合、後大脳横連合とみられる横連合、神経系と交差する消化管(食道部分)、食道下神経節の順に器官が並んでいることが観察できた。特に、後大脳横連合とみられる横連合が神経-食道交差よりも前方に観察できたことは注目に値する。消化管と後大脳横連合の位置関係が昆虫類や甲殻類などの通説の通りであれば、後大脳横連合より前方で神経系と交差する消化管が観察できるはずである。しかしながら本研究では、後大脳横連合とみられる横連合が、神経-食道交差より前方に確認された。これはフサヤスデ類における神経-食道交差の位置が、通説とは異なることを示唆している。

本研究により得られた新知見については、今後、矢状面や冠状面切片での観察などを加え、さらに精緻な検証を必要とするものであるが、同時に、他のヤスデ類、多足類などの神経-食道交差の位置について再検討を促す契機となる発見であると思われる。

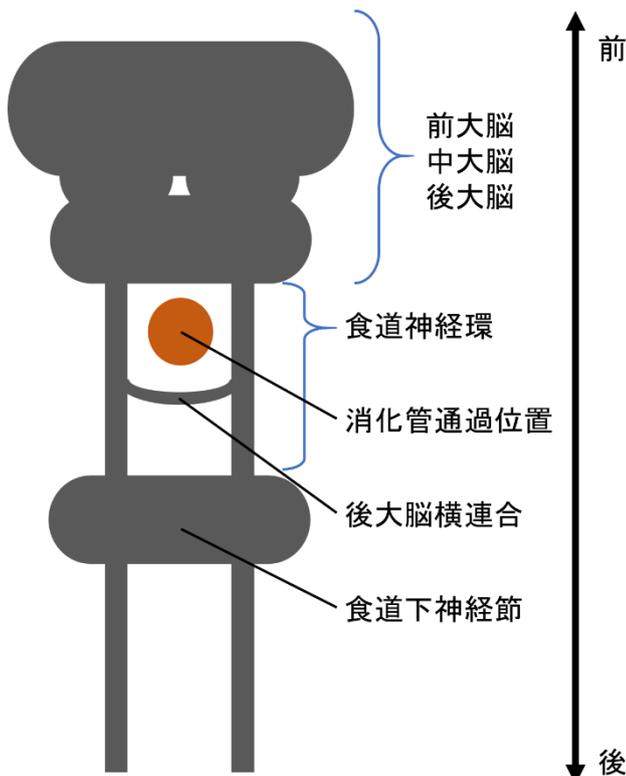


図. 一般的な節足動物の頭部中枢神経系模式図。
Sombke & Rosenberg (2015)を改変。

生物多様性教材としてのスライドガラス沈水法の検討

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

【背景・目的】

平成 29 年度に新しい学習指導要領が告示された。そこでは理科の新たな目標として、理科の「見方・考え方」を働かせながら『自然の事物・現象に進んで関わり、科学的に探究しようとする態度を養う』ことや、そのために必要な『観察、実験などに関する基本的な技能を身に付けるようにする』ことが明記された。その実現のために、理科教育のさらなる工夫や改善が求められている。顕微鏡による観察法は生物分野における観察・実験の基本的な技能のひとつである。近年、スライドガラスを基層として水中に沈め、そこに付着した生物をそのまま顕微鏡で観察する手法 (以下「スライドガラス沈水法」と呼ぶ) が、理科教育の教材として有効だと示唆された。この方法の最大の特徴は、スライドガラスに付着した生物を剥がしとることなくそのまま生物群集ごと観察することのできる点にある。このことは顕微鏡観察を通して生態系や生物多様性の視点を学ばせられる点で非常に優れていると考えられる。そこで、本研究では簡便に多様な生物を見ることのできる方法を明らかにするために、スライドガラス沈水法の持つ特性の検討を行った。

【方法】

筑波大学構内の池などで、スライドガラス沈水法により生物を観察した。スライドガラスを水中に設置するための装置は 100 円ショップなどで手軽に入手できるものを用いて自作した。観察に際しては、水中から引き上げたスライドガラスの片面を拭き取り、もう一方の面に 18 mm×18 mm のカバーガラスを 2 枚置き、10 倍の対物レンズで観察を行った。それぞれのカバーガラスの範囲内の任意の 5 点を観察対象とし、デジタルカメラで撮影して観察状況を記録した。生物群の分け方は、一般的な図鑑で容易に見分けられるレベルとした。1 個体でも観察できたグループを「1」、観察されなかったものを「0」とコード化して記録した。

1. 水中深度の検討

観察に適したスライドガラスの沈水深度を明らかにするため、筑波大学構内の松美池の水深 3 cm、6 cm、9 cm、12 cm の位置にスライドガラスを設置し、観察できる生物群数の違いを検討した。1 週間ごとにスライドガラスを取り出し 4 週間後までの状態を観察した。

2. 水底の易浮遊堆積物中への設置の検討

水中とは異なる生物群集を得られることを期待して、スライドガラスを水底近くの易浮遊堆積物中に設置した。筑波大学の第二エリアと第三エリアの間を流れる水路 (以下「天の川」と称する) を調査地とした。5 週間設置し、1 週間ごとにスライドガラスを取り出して観察した。

3. 水槽の利用の検討

理科教育教材として利用する際の簡便性の向上のため、水槽の中にスライドガラスを設置し、自然水中のように多様な生物群の観察が可能か検討を行った。最も手軽な手段として水道水をいれた水槽 (以下「水槽 A」と表記する)、天の川の水を入れた水槽 (以

下「水槽 B」と表記する)、さらに自然の状態に近づけるために天の川の水および易浮遊堆積物を入れた水槽 (以下「水槽 C」と表記する) を用意し、筑波大学構内の屋外に 10 週間設置して 1 週間ごとにスライドガラスを取り出し観察を行った。

【結果と考察】

1. 水中深度の検討の結果

全ての水中深度で沈水してから 2 週間経過後に最も多くの生物群が観察できた。水深 6 cm のスライドガラスでは 17 群が観察され、他の深度のものよりも有意に多かった (Wilcoxon test, $p < 0.05$) が、3 週間経過後は生物群数が著しく減少した。水深 9 cm のスライドガラスでは、2 週間経過後以降は安定して 10~13 群が観察された。このことより、水深によって生物群数の安定性や最適な沈水期間に違いがあることが示された。また、水深 9 cm、12 cm のスライドガラスでのみタイヨウチュウ類が多く観察できたことから、水深によって異なる生物群が観察できることが示唆された。生物群の違いにも注目しながらより深い場所でも検討を行いたい。

2. 水底易浮遊堆積物中の検討の結果

観察できた生物群数が最も多かったのは沈水してから 3 週間経過後で、水中に設置したものでは 15 群、易浮遊堆積物中のものでは 7 群を観察できた。全ての週において、易浮遊堆積物中に設置したスライドガラスで観察できる生物群数は水中のものよりも有意に少なかった (Wilcoxon test, $p < 0.05$)。また、易浮遊堆積物中のスライドガラスで観察できた生物のほとんどは水中のスライドガラスでも観察することができた。このことから、スライドガラス沈水法では、水中と易浮遊堆積物中の生物相の差は明瞭には検出できないことが示唆された。

3. 水槽の利用の検討の結果

水槽 A、B、C の全ての水槽のスライドガラスから生物が観察された。水槽 A では 5 週間経過後以降安定して 4~5 群を観察できた。水槽 B では 6 週間経過後以降安定し 11~13 群を観察できた。水槽 C は沈水してから 6 週間経過後がピークで、16 群を観察できた。このことから、川の水や泥を用いれば、水槽でも十分に多様な生物群の観察が可能なのことがわかった。水槽では、自然の川や池よりも容易に条件操作を行えるメリットがある。どのような単元でスライドガラス沈水法を利用するかによって、水槽に適切な条件を設定することで、単元ごとの目的に合った教材を提示できる可能性があると考えられる。

今後さらにさまざまな条件下での比較検討を行い、スライドガラス沈水法を理科教育教材として利用する際のより良い使い方を提案できるようにしたい。

系統特異的転写因子 *Lopx* のらせん卵割型発生における役割

新中 健斗 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 守野 孔明 (筑波大学 生命環境系)

【導入】

らせん卵割動物 *Spiralia* は軟体動物や環形動物、触手冠動物によってなる狭義の冠輪動物に、扁形動物と腹毛動物からなる *Rouphozoa*、輪形動物や顎口動物などからなる *Gnathifera* の仲間を加えた動物群である。らせん卵割動物に固有の特徴として、保存的ならせん卵割型発生と呼ばれる発生様式が知られている。らせん卵割型発生では、卵割面が動植物軸に対し斜めになるらせん卵割や、卵割軸に沿って特定の位置と発生運命を持つ割球群(カルテット)が形成されること、3Dと呼ばれる割球またはその娘細胞である4dが背腹軸を誘導し、自身は後方中胚葉に分化することなどの保存的な特徴が知られているが、このような発生様式の分子的な機構については十分な知見が得られていない。

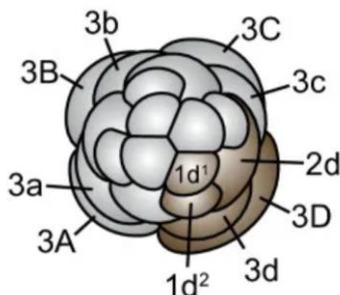


図1: 環形動物の20細胞期における割球の配置 (NP Mayer et al., 2010を改変)

カルテットごとの予定運命の分配は、らせん卵割動物に特異的な転写因子の動植物軸に沿った発現によるものであることが示唆されている(Morino et al., 2017)。そのためらせん卵割型発生の保存された特徴である3D/4d割球から始まる背腹軸誘導経路にも、らせん動物卵割動物に特異的な転写因子が関わっていると仮説を立てた。

本研究で着目した *Lopx* (LOPhotochozoan only homeobox) は、Homeoboxファミリーの転写因子をコードし、軟体、環形、触手冠動物といった冠輪動物でのみ確認されている遺伝子である。*Lopx* を持つ動物の報告はTB Barton-Owen et al., 2018しか存在せず、動物門をまたぐ保存性についての知見は不足しており、その獲得がどの共通祖先の段階で起こったものなのかはわかっていない。またその発現や機能についての知見もマガキ *Crassostrea gigas* における時間的発現の推移しか知られていなく、発現部位などは明らかになっていない。(Paps et al., 2015)

本研究の目的は、系統特異的な発生様式の確立に系統特異的転写因子が関わっているかを確認するために、*Lopx* のらせん卵割型発生における役割を調べることである。そのため、*Lopx* の獲得が起こった共通祖先の推定と、発生過程における *Lopx* の時空間的な発現パターンの検証を行った。

【材料・方法】

Lopx の発現・局在パターンの解析

軟体動物腹足綱クサイロアオガイ *Nipponacmea fuscoviridis* を茨城県平磯海岸で採集し、人工授精によって得た初期胚とトロ

コフォア幼生を固定した。時系列トランスクリプトームデータからクサイロアオガイでの *Lopx* の発現量の推移を調べ、その発現量が上がる桑実胚期以降の胚に対して *in situ* hybridization を行うことでその空間的発現パターンを観察した。

Lopx の系統解析

クサイロアオガイの *Lopx* 遺伝子を同定するため、および *Lopx* を獲得した共有祖先を推定するために *Lopx* 遺伝子の系統解析を行った。データセットは先行研究 (TB Barton-Owen et al., 2018) のものにクサイロアオガイと輪形動物 *Brachionus plicatilis*、紐形動物 *Notospermus geniculatus*、箒虫動物 *Phoronis australis* の *Lopx* 候補遺伝子を加えたものを用いた。

【結果】

Lopx 遺伝子の系統解析の結果、クサイロアオガイ、輪形動物、紐形動物、箒虫動物それぞれから得られた候補遺伝子は、先行研究で知られている *Lopx* 遺伝子と単系統を形成した。

in situ hybridization により、初期の桑実胚期で最も植物極側の割球4つのうちの1つで発色が観察できた(図2)。細胞の配置から、3B(腹側)もしくは3D(背側)割球であると推測される。その後、植物極付近での発現は消失し側方3か所で新しく発現が観察された。トロコフォア幼生期では、頭部と腹部外胚葉の一部で発現が観察された。



図2: 植物極側から見た桑実胚における *Lopx* 遺伝子の発現パターン

【考察】

従来は冠輪動物特異的だとされていた転写因子 *Lopx* は、輪形動物、紐形動物、箒虫動物でも確認され、らせん卵割動物の共通祖先で獲得されたことがわかった。またクサイロアオガイにおける *Lopx* 遺伝子の発現は、3Bもしくは3D割球で始まることも確認された。背腹軸のパターニングが始まるとされる初期桑実胚期で既に背腹に偏った発現パターンを持つことから、*Lopx* はらせん卵割型発生に特有の背腹軸決定カスケードの上流を占める位置で働いている可能性がある。今後、より詳細な発現パターンの観察と機能解析を行い、*Lopx* のらせん卵割型発生における役割を解明する。

【引用文献】

NP Mayer et al., 2010 *EvoDevo*
Morino et al., 2017 *Nature Ecology & Evolution*
Barton-Owen et al., 2018 *Genome Biology and Evolution*,
Paps et al., 2015 *Genome Biology and Evolution*

都市化が筑波山周辺域の中大型哺乳類に与える影響：カメラトラップ調査からみえるもの

岩澤 遥（筑波大学 生物学類） 指導教員：和田 洋（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

近年、世界的に都市化が進行しており、野生生物の分布や行動に様々な影響を与えている^[1,2]。野生生物の中でも特に哺乳類は、体サイズが大きく、食物網の中でも上位に位置するものが多いため、他の生物群に与える影響が大きい。さらに、農林業被害やロードキルといった、人間生活と関わりの深い問題も指摘されている。しかし、都市化と哺乳類に関する研究は北米とヨーロッパに集中しており、アジアにおける研究例は少ない。日本では、多摩や房総半島での研究事例^[3]があるが、土地利用の変化や外来種の分布拡大が進む中、多様な地域景観において定量的なデータを取得していくことが求められる。

つくば市には、筑波山付近にある連続した森林と、筑波大学周辺にみられるような市街地内の孤立林のどちらも存在しており、都市化と哺乳類の関係を調べる上で適したフィールドである。また、ツキノワグマ、ニホンジカ、ニホンザルなどが分布していない独特の哺乳類相をもつことが知られている^[4]。これらのことから、本研究では、筑波山麓から都市化の進む平野部にかけて、カメラトラップ調査を実施し、哺乳類の生息状況にどのような違いがみられるかを明らかにすることを目的とした。

【調査地と方法】

2019年7月~11月に、筑波山麓からつくば市街を含む平野部に向け、24ヶ所に自動撮影カメラ（以下カメラ）を設置した（図1）。設置地点は森林内とし、センサーの検出範囲ができるだけ一定となるよう、下層植生の少ない類似した環境を選定した。カメラは地上から約1.5mの高さになるよう樹木の幹に固定し、樹の根元から3m先の地表を狙って俯角を統一した。撮影は15秒間のビデオモードで行い、同じ個体が連続して撮影されることを防ぐため、撮影後は30秒の休止時間を設けた。撮影された動画は約1ヶ月ごとに回収し、種ごとに撮影回数をまとめた。さらに、各調査地点を森林の連続性（連続林・孤立林）、森林植生タイプ（自然林・混交林・人工林）、近隣の交通量（5段階で評価）で分類し、撮影頻度との関係を分析した。

【結果と考察】

カメラの平均作動日数は81日（最小42日~最大110日）で、合計599回動物が撮影された（図2）。撮影された哺乳類は、撮影頻度が高かった順に、イノシシ、タヌキ、ニホンアナグマ、ニホンノウサギ、ハクビシン、アライグマ、ネコ、ホンドテン、ニホンリス、キツネの10種であった。鳥類も5種撮影され、キジ、ヤマドリ、オオタカ、キジバト、コジュケイが記録された。

森林の連続性による哺乳類の出現状況を比較したところ、イノシシ、ニホンアナグマ、ニホンテン、ニホンリスはほぼ連続林のみで撮影された。一方、タヌキ、ニホンノウサギ、ハクビシンは連続林・孤立林のどちらでも多く撮影され、特定外来生物であるアライグマは孤立林での撮影頻度の方が高かった。哺乳類全種を合わせた撮影頻度は、連続林の方が高い傾向であった。森林植生

タイプについては、自然林での撮影頻度が高く、人工林では低かった。交通量に関しては、幹線道路に近く騒音の大きな地点ほど撮影頻度が低下した。以上の結果から、都市化は全体として哺乳類の生息を制限するが、応答のパターンは種によって異なり、都市域の森林であっても生息できる種と、そうでない種があることが示唆された。

【今後の展望】

本研究は、筑波山周辺では初めてとなる広域カメラトラップ調査であり、哺乳類相の変化をモニタリングしていく上での基礎情報としても活用できる。例えば、茨城県北部ではニホンジカが確認されており、分布拡大が懸念されている。アライグマは孤立林に多く記録されたが、筑波山付近の連続林でも増加していく可能性があり、注意が必要である。

【引用文献】

1. Fischer et al. (2012) *BioScience* 62, 810-818.
2. Gaynor et al. (2018) *Science* 360, 1232-1235.
3. Saito and Koike (2013) *PLoS ONE* 8: e65464.
4. 竹内ほか (2015) 茨城県自然博物館研究報告 (18) : 71-82.

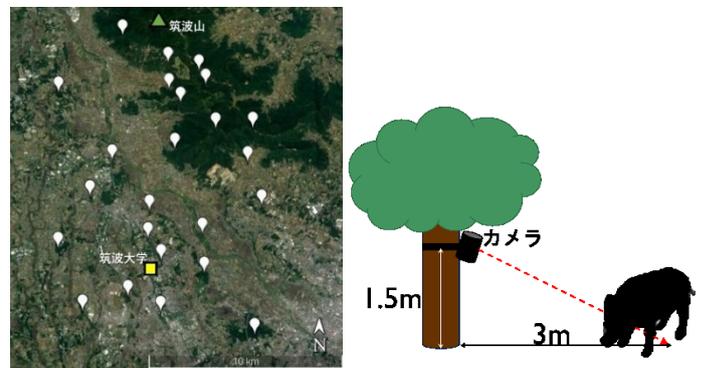


図1. 調査地の位置 (左) とカメラトラップ調査のイメージ (右)



図2. 撮影された哺乳類の例

Evolution of mesoderm specification mechanism in echinoderms with insight from functional change of the *hesC* gene

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

Introduction

Change in developmental processes is the driving force producing phenotypic diversity. However, the evolutionary alterations that cause phenotype change is not well understood. Developmental system drift (DSD) is a phenomenon where evolutionary processes alter genetic background without apparent change in phenotype. It is suggested that the build-up of these genetic changes over evolution can trigger phenotype change, thus allowing us to hypothesize that DSD may act as an intermediate for the rise of novel phenotype. Therefore, studying the mechanism for DSD occurrence with insight from the transition of mesoderm specification in echinoderms is beneficial for understanding fundamental evolutionary processes giving rise to phenotypic diversity.

This research utilizes starfish with an ancestral-like mesoderm regulatory pathway and the euechinoid sea urchin with a derived mesoderm regulatory pathway. The expressions of mesoderm related genes, such as *ets* and *pmar1*/*pmar1*-like gene, in both starfish and euechinoids seem to be fairly conserved, allowing specification of the mesoderm at vegetal pole of embryos during early development. However, the regulation for this specification seems to differ between these two groups. In euechinoids, the *hesC* transcription factor plays a derived regulatory role of repressing mesodermal genes (*ets*, *delta*) throughout the entire embryo except for the vegetal pole, allowing for specification of mesoderm to just the vegetal pole. Starfish *hesC*, located downstream of *delta* seems to function differently, not associated with mesoderm specification. This transition of *hesC* gene function to an essential upstream mesoderm regulator without significantly altering phenotypic outcome exemplifies the occurrence of DSD. Revealing the molecular alteration relevant to the evolution of *hesC* function can allow us to further understand the mechanism for evolutionary modifications leading to phenotype change.

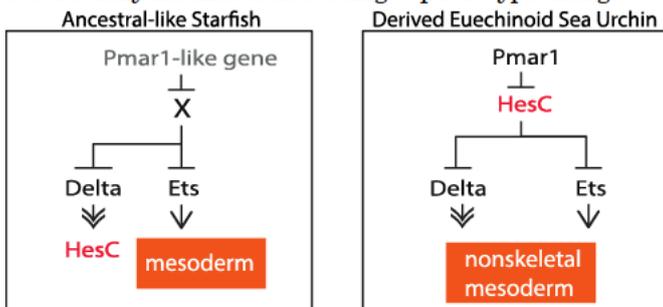


Fig. 1. Mesoderm regulatory pathway in starfish and euechinoids

Methodology

To understand if *hesC* function change is due to the difference in *hesC* protein itself, overexpression of starfish *hesC* mRNA in

sea urchin fertilized eggs was performed by microinjection. At the gastrula stage (28hpf), injected embryos were fixed and skeletogenic mesenchyme cells stained using P4 antibody markers. Observation of these results can indicate if starfish *hesC* is capable of repressing sea urchin mesodermal genes (*delta*, *ets*), similarly as sea urchin *hesC*.

Preliminary results

Overexpression (OE) of starfish *hesC* in sea urchin embryos with concentrations of 50 ng/μl resulted in overall decrease in primary mesenchyme cells (Fig.2b). Concentration of 100 ng/μl resulted in overall decrease of primary mesenchyme cells and restricted archenteron growth (Fig.2c). 500 ng/μl resulted in overall deformation of the embryos (Fig. 2d). Embryos were then stained showing an overall decrease of skeletogenic mesenchyme for starfish *hesC* concentrations of 50 ng/μl (Fig. 2f). For those injected with higher concentrations, all embryos lacked any P4 staining (Fig. 2g,h). These results can suggest that starfish *hesC*, like sea urchin *hesC*, is capable of functioning as a regulatory repressor within the mesoderm regulatory pathway of sea urchins. However, further trials and experimentation must be done to confirm these results.

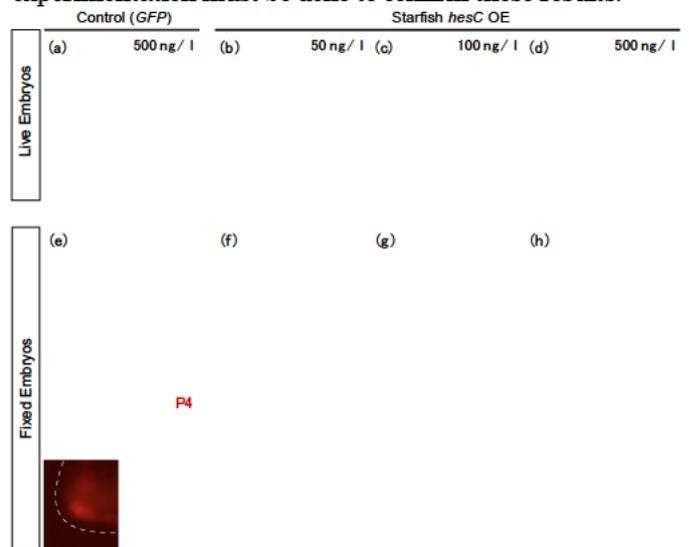


Fig. 2. Observation of sea urchin embryos injected with starfish *hesC*.

Discussion

The initial hypothesis for this research was that the change in *hesC* function was due to the modification of HesC protein itself rather than change in the binding region of multiple downstream cis elements. Ability of starfish *hesC* to act as a mesoderm regulator in sea urchins can suggest the similarity of *hesC* proteins. Thus, to understand the evolution of *hesC* function, analysing changes within downstream cis elements (such as *ets*, *delta*) and revealing possible protein partners of HesC will be some of the future aims.

Investigating Developmental System Drift in germ-layer specification in the lamprey *Lethenteron camtschaticum*.

Maitreyee Pargaien (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Homology, the similarity of form in species of common descent, is a central concern of evolutionary-developmental biology. It is suggested that the developmental pathways conjuring homology are largely static, however a new concept, Developmental System Drift (DSD), states that multiple, varying developmental pathways can give rise to the same phenotype. DSD, then, is the competence of a developmental pathway to undergo modification and manipulation by the environment without changing the phenotype (Fig1).

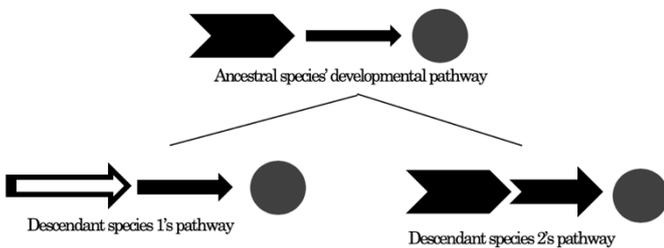


Fig1. DSD of ancestral pathway in descendants. Developmental pathway altered, but trait is conserved. Arrows indicate genes and circle indicates phenotype (homology). Adapted from True and Haag (2001).

Gastrulation is one of the most instrumental and evolutionarily conserved processes in the course of development. The emergence of the germ layers is marked by the deployment of ancestral specifiers such as *ets1*, *hex* and *tgif1* across the deuterostome invertebrate lineages. The jawed vertebrate lineage (gnathostomes), however, breaks this tradition. Ancestral specifiers *ets1*, *hex* and *tgif1* are replaced by homeobox, species-specific genes (orphan genes) such as *dharma* in zebrafish and *siamois* in *Xenopus* (Fig2). This shift in the developmental mechanism of germ-layer formation from that of the invertebrates (ancestral) to that of the gnathostomes (derived) presents itself as an example of DSD.

This research works with the agnathostome lamprey radiated intermediate to the deuterostome invertebrates and the gnathostomes. Possessing homeobox genes (*orphan 1* and *2*) similar to *dharma* and *siamois* in their orphan nature of not having homologues in other species, and expression at gastrulation, lampreys present a possibility of adhering to the gnathostome-like form of derived germ layer specification. Uncovering if, as hypothesised, they exhibit a derived or, alternatively, an ancestral form of germ layer specification is the central aim of this endeavor, where it can help approximate the emergence of the same DSD in the evolutionary history of deuterostomes.

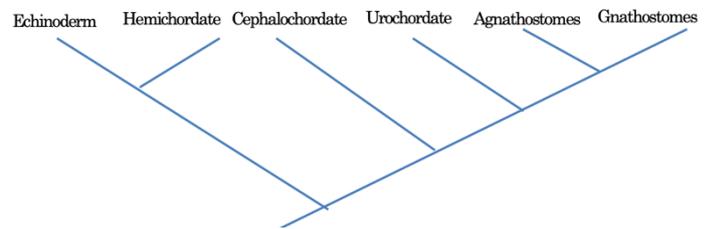


Fig2 Deuterostome Phylogenetic tree. Echinoderms to Urochordates (deuterostome invertebrates) show ancestral (*ets1*, *hex*, *tgif1* inclusive) while Gnathostomes show a derived (*siamois*, *dharma* characterised) germ-layer specification. DSD seen for the same in deuterostome evolution.

Methodology

L.camtschaticum adults, collected from Hokkaido, were artificially fertilised, and their embryos incubated until gastrula stage and later fixed. *In situ hybridisation* using riboprobes done to look for *ets1*, *hex*, *tgif1*, *orphan1* and *orphan2* gene expression. Orphan genes selected on the basis on lack of homologues in other species and homeobox nature.

Expected Results and Implications

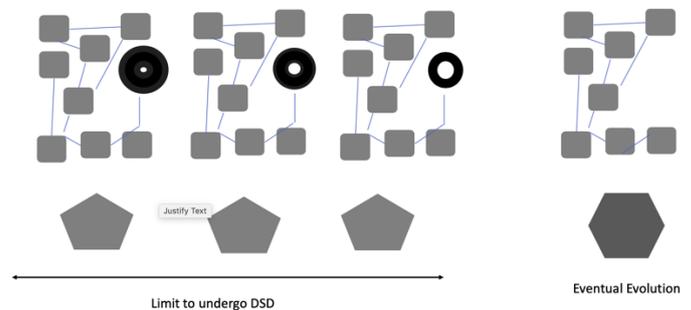


Fig3. Limit of a Developmental Pathway to undergo DSD. Change can be buffered (circle disappearing/ gradual inactivity) up to a limit before it affects the phenotype and leads to evolution and speciation.

Given the presence of orphan genes, expressed exclusively at gastrulation, lampreys are expected to conform to the derived germ-layer specification, as seen in gnathostomes. If so, then this could point to the lineage associated with the origin of this DSD.

As more examples of DSD emerge, they add weight to the new understanding of developmental mechanisms that minuscule changes in developmental pathways pile up over time before the end product is altered. Tracing these changes at molecular and genetic levels can eventually show the extent to which a pathway can undergo DSD before changing the phenotype, i.e. giving rise to a new species and phenotypic and developmental diversity (Fig3).

Functional Analysis of Coenzyme A Disulfide Reductase in the Thermo-Acidophilic Red Alga, *Galdieria sulphuraria*

Chung You Yeon (筑波大学 生物学類)

指導教員：蓑田 歩 (筑波大学 生命環境系)

【Introduction】

Cyanidiophyceae inhabit extreme environmental conditions such as hot, toxic, and acidic environments where other organisms cannot grow efficiently. They even thrive in pure CO₂ conditions [1]. Among Cyanidiophyceae, *Galdieria sulphuraria* shows the highest tolerance to acid, salt, and CO₂ stresses. However, the mechanism to adapt to a wide range of stresses is still not fully understood.

From a previous study done by our laboratory, Gasu_05470, a homolog of Coenzyme A (CoA) disulfide reductase (CoADR), was identified as a highly expressed protein under high CO₂ condition by LC-MS/MS analysis. CoADR is known as a regulator of cellular redox by using CoA. Most organisms use glutathione reductase (GR) to keep the cellular redox homeostasis under stress conditions, while some anaerobic bacteria use CoADR instead of GR [2]. The possession of CoADR in addition to GR suggests that *G. sulphuraria* uses two cellular redox systems (glutathione-GR and CoA-CoADR) to deal with environmental stresses including high CO₂.

In this research, I examined the changes in the expression of *Gasu_05470* and *GR* genes in response to several stresses (high CO₂, low O₂, and low temperature) to elucidate the function of *Gasu_05470* in *G. sulphuraria*. Furthermore, since *Cyanidioschyzon merolae* in Cyanidiophyceae does not have CoADR homolog, I will characterize the CoADR overexpression strain in *C. merolae*, to clarify its function *in vivo*.

【Materials and Methods】

Algal culture and sampling

G. sulphuraria 074W (NIES-3638) cells were grown in modified Allen's Medium (pH 2.5) at 40 °C under ordinary air condition [3]. For the sampling, the cells were grown until the mid-exponential growth phase (OD₇₅₀ = 0.5-0.8), then transferred from the optimum growth condition (air; 40 °C) to the certain stress conditions (100% CO₂, 100% N₂, and 28 °C).

Total RNA extraction and purification

Total RNAs were extracted from the cells that collected at each time point (0, 0.5, 1, 3, and 6 hour) after the transfer to each stress condition and purified using PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen™) including DNase treatment.

Reverse Transcription and PCR amplification

Reverse transcription was performed using ReverTraAce® qPCR RT Master Mix (TOYOBO). After the PCR amplification, PCR products were analyzed by electrophoresis.

【Results and Discussion】

The expression of *Gasu_05470* gene was strongly upregulated within 1 hr after the transfer to 100% CO₂, whereas the expression of *GR* gene was not changed (Figure 1). A similar result was obtained by the transfer from air to low O₂ (100% N₂) condition. On the other hand, by the shift from 40 °C to 28 °C, both expressions of *Gasu_05470* and *GR* genes were upregulated.

From these results, we hypothesize that CoADR-CoA system maintains cellular redox in cooperation with GR-glutathione system under aerobic condition, while under anaerobic condition, CoADR-CoA system is a main redox regulatory system in *G. sulphuraria*.

To test the functional complementation of GR by *Gasu_05470* *in vivo*, we will examine the *Gasu_05470* overexpressed transformants in the wild type and GR knock-out strains of *C. merolae*. This result will be reported in the presentation.

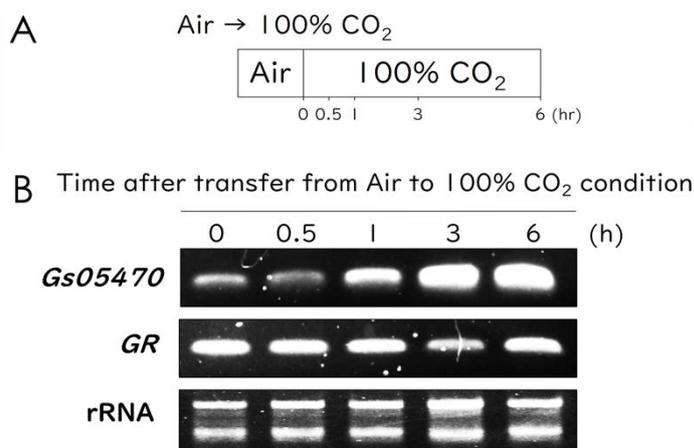


Figure 1. Expression analysis of *Gasu_05470* and *GR* genes in *G. sulphuraria* cells transferred from air to 100% CO₂. Experimental Scheme (A). RT-PCR analysis of *Gasu_05470* and *GR* genes (B)

【Conclusion】

The followings can be drawn from the present research:

- *Gasu_05470* gene was highly expressed under high CO₂ condition.
- Expression of *Gasu_05470* gene was induced by CO₂, N₂, while the expression of *GR* gene was not changed.
- Expressions of both *Gasu_05470* and *GR* genes were upregulated in response to low temperature.
- *Gasu_05470* seems to work as a main redox regulator under anaerobic condition.

【References】

- [1] Seckbach *et al.* (1970). *Nature* 227, 744-745.
- [2] Boylan *et al.* (2006). *Molecular Microbiol.* 59, 475-486.
- [3] Minoda *et al.* (2015). *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 3, 1513-1519.

Taxonomic Study on a New Granofilosean Strain JV1801

Julia Keiko Estes Vaughan (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)

Introduction

Cercozoans are a diverse group of protists that belong to the supergroup Rhizaria. They form a monophyletic group, but their morphological diversity and ambiguity in molecular analyses has clouded the phylogenetic relationships within the group. Cercozoans are all heterotrophic, except for the Chlorarachniophytes and three species of *Paulinella*. Their heterotrophy allows them to survive in various environments such as: soil, seawater, freshwater, and plant leaves. This diversity can also make them hard to culture; it is estimated that only 0.1-1% of bacteria and protists can easily be cultured. This culture bias leaves it unclear whether easily cultured protists play a major role in their environments or if they are simply easy to culture. Discovering new culturing methods and studying newly discovered species in depth can help us better understand the interactions that occur in these environments.

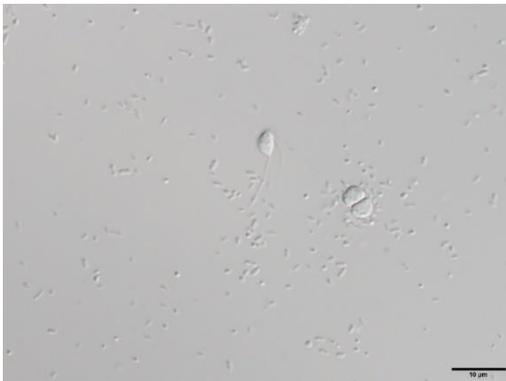


Figure 1: JV1801 in both amoeboid and flagellar stage.

In a course of searching for new protists, a cultured strain that seemed unidentifiable under a light microscope was established, although it was similar to some members of class Granofilosea which belongs to the Cercozoa. The strain was named JV1801.

Aim

My goal is to characterize the strain JV1801 and find its taxonomic home. This will expand our knowledge of cercozoan species that exist in marine environments, which are particularly understudied. To characterize JV1801, both phylogenetic and morphological analysis took place.

Materials and Methods

The strain JV1801 was maintained in ESM medium with contaminant bacteria as a food source and kept at 20°C under dark conditions. For morphological and ultrastructural characterization of the strain JV1801, a light microscope equipped with differential interference contrast (LM), a scanning electron microscope (SEM) and a transmission electron microscope (TEM) were used.

For phylogenetic analysis, genomic DNA of JV1801 was extracted using DNeasy Plant Mini Kit for DNA extraction, the 18S rRNA gene was amplified by PCR with KOD One Master Mix, which was sequenced directly. After acquiring the sequence, a maximum likelihood estimation was used to make a phylogenetic tree.

Results and Discussion

Microscopic observations (Figure 1, 2) revealed a biphasic lifecycle in JV1801, similar to *Massisteria spp.* JV1801 had a swimming flagellar stage, with one longer posterior flagellum of $11.1 \pm 0.25 \mu\text{m}$ and a shorter anterior flagellum of $3.79 \pm 0.21 \mu\text{m}$ ($n=6$). However, this flagellar stage was observed less frequently than its amoeboid stage. In its immotile amoeboid stage, cell bodies were $3.57 \pm 0.09 \mu\text{m}$ ($n=40$) in diameter. These cell bodies had extrusome-bearing pseudopodia radiating from them. The number of pseudopodia ranged from one to seven ($\bar{X}=4 \pm 0.33$) that were $14.03 \pm 1.18 \mu\text{m}$ in length ($n=40$). Unlike the morphologically similar *Massisteria spp.*, JV1801 did not have branching pseudopodia.

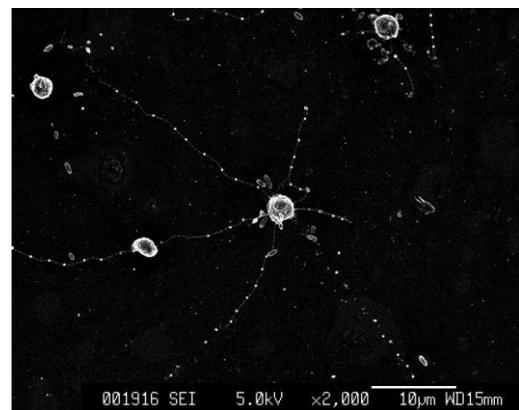


Figure 2: SEM image of JV1801

The phylogenetic tree revealed that JV1801 formed a monophyletic lineage with *Cathrulina elegans* and *Hedriocystis reticulata* in the Granofilosean clade (Fig 3).

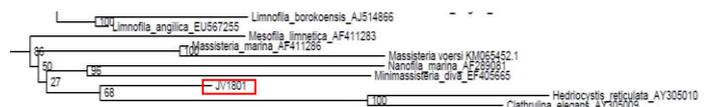


Figure 3: Partial phylogenetic tree containing JV1801 and other granofiloseans.

Conclusion

Considering the results of both phylogenetic analysis and careful characteristic assessment, I concluded that the strain JV1801 should be treated as new genus and species of Granofilosea. More studies should be done to further elucidate the species diversity of phylum Cercozoa.

References

- 1) Del Campo J, Not F, Forn I, Sieracki M, Massana R. 2013. Taming the Smallest Predators of the Oceans. ISME Journal. 7: 351-358.
- 2) Mylnikov A, Weber F, Jurgens K, Wylezich C. 2015. *Massisteria marina* has a sister: *Massisteria voersi* sp. nov., a rare species isolated from coastal waters of the Baltic Sea. EJOP. 51: 299-310.
- 3) Cavalier-Smith T & Chao E. 2003. Phylogeny and Classification of Phylum Cercozoa (Protozoa). Protist. 154: 341-358.

ナカイムチョウウズムシ *Praesagittifera naikaiensis* の共生藻は何か？

竹歳 桃芳 (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】

動物と藻類の共生は様々な動物群で知られている。サンゴやイソギンチャクなどの刺胞動物への渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. (褐虫藻) の細胞内共生や軟体動物のシャコガイへの褐虫藻の細胞外共生などはよく知られている。これらの多くは光合成産物などの物質のやりとりを介した関係を築いている。無腸動物 *Convoluta* 科のメンバーにおいても、藻類との共生が知られており、プラシノ藻の *Tetraselmis convolutae* を共生藻として持つ *Symsagittifera roscoffensis* や未同定の *Tetraselmis* 属藻類を共生藻として持つ *Convolutriloba longifissura*、褐虫藻を共生させている *Waminoa* 属の種などが報告されている(1)。ナカイムチョウウズムシ(*Praesagittifera naikaiensis*)も成長の初期に環境中から *Tetraselmis* 属藻類を取り込み共生させることが知られている(2)。

Tetraselmis 属は伝統的に、ピレノイドの形や鞭毛の毛の構造に基づき形態学的に分類がされてきたが、近年分子系統解析に基づき再分類が行われている。しかし、*S. roscoffensis* を除く *Convoluta* 科の無腸動物の *Tetraselmis* 属共生藻に関しては、培養株の確立がされておらず、系統分類学的位置も未だ決定されていない。すでに研究が進んでいる *S. roscoffensis* の共生藻と同じであるかどうかを含めて、これらの共生藻がどのような *Tetraselmis* 属藻類であるかを明らかにすることが、*Convoluta* 科における *Tetraselmis* 属との共生関係の進化を知るうえで重要である。

そこで本研究では、*Tetraselmis* 属藻類と共生する *Convoluta* 科の一種である *P. naikaiensis* の共生藻について、*S. roscoffensis* の共生藻と同一であるかどうかを確認し、*Convoluta* 科における共生藻獲得の進化に関する知見を得ることを目的として、共生藻の単藻培養株の確立と、それを用いた分子系統解析および鞭毛の毛の微細構造観察を行った。

【材料・方法】

広島県尾道市で採集された *P. naikaiensis* を、10 倍に薄めた ESM 培地を用いて、20°C、明暗周期 12h/12h で維持した。

共生藻の単離培養株を確立するため、*P. naikaiensis* を ESM 中で洗った後に押しつぶし、共生藻をピペット洗浄法で単離して ESM 培地を用いて 20°C、明暗周期 12h/12h で培養、維持した。

P. naikaiensis 及び確立された共生藻培養株から DNA を抽出し、PCR により共生藻の 18s rDNA を増幅し、塩基配列を取得した。mafft 及び trimAL によるアラインメント作製を経て、IQtree (TIME+R3 置換モデル) により分子系統解析を行った。また共生藻同定の決め手として、ホールマウント法により *P. naikaiensis* 共生藻の鞭毛の毛の微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。

【結果・考察】

本研究により、*P. naikaiensis* の共生藻の単藻培養株 2 株 (TKT-1、TKT-2) の確立に成功した。これら 2 株及び *P. naikaiensis* から直接配列取得した共生藻の 18S rDNA 配列を

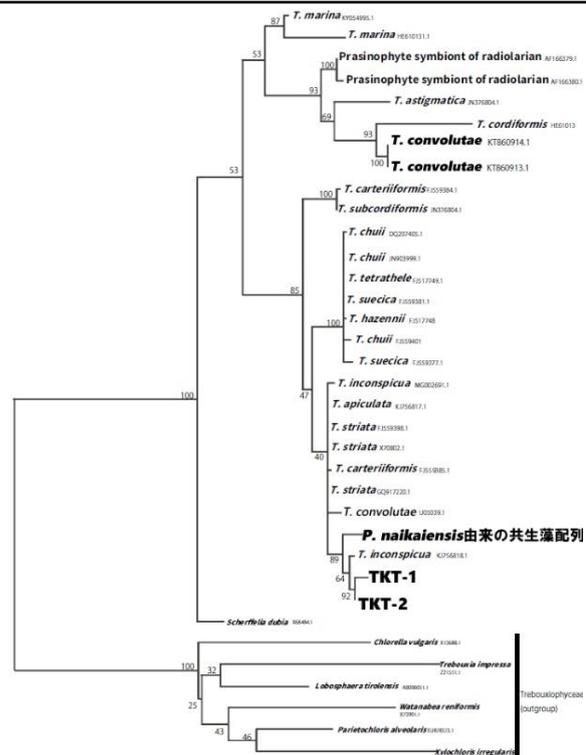


図1 *P. naikaiensis* 共生藻の系統樹

含む分子系統解析の結果、*P. naikaiensis* の共生藻は、*Tetraselmis* 属藻類の系統の中で *T. inconspicua* と共に一つのクレードを形成した(図1)。また、*P. naikaiensis* の共生藻は、*T. convolutae* とは異なるクレードに含まれた(図1)。

電子顕微鏡による観察の結果、TKT-1 および TKT-2 の鞭毛の毛には球形のサブユニットが 26 個あるものが多く観察された(図2、3)。これは、2 個または 30 個のサブユニットを持つ *T. convolutae* とは異なるタイプだと考えられる(3)。

これらのことから、*P. naikaiensis* の共生藻は *S. roscoffensis* の共生藻とは異なる *Tetraselmis* 属の一種であると考えられる。*S. roscoffensis* と *P. naikaiensis* はそれぞれ独立に共生藻との関係を築いたと考えられる。

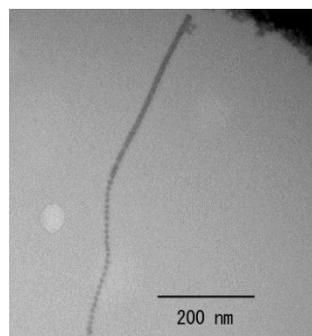


図2 TKT-1の鞭毛の毛

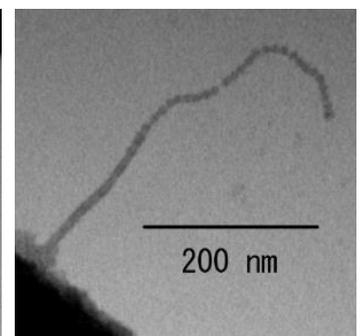


図3 TKT-2の鞭毛の毛

【引用文献】

- (1)Achatz et al., Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 48(1)9-32, 2009
- (2)Arimoto et al., GigaScience, 8-4 giz023, 2019
- (3)Marin et al., Phycologia, 32: 213-222, 1993

赤くなるイカダモの利用可能性を探るための基礎研究

南沢 季実香 (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】

一般的に緑藻イカダモ (*Scenedesmus* spp., *Desmodesmus* spp., *Tetradismus* spp. 等の総称) の色は緑色であることが知られている。これは細胞内の葉緑体に含まれる色素によってもたらされる色であるが、ある生育条件下においては通常状態の緑色から赤色に変化するイカダモが存在する。これはイカダモに限ったことではなく、培地の窒素欠乏、強光状態などのストレス環境において藻類に多く報告されている現象である。赤くなる要因は、葉緑体内で光合成機能に関わる赤い色素であるカロテノイドが、ストレス下においては葉緑体内だけでなく葉緑体外の細胞質に顆粒状に蓄積するためであると考えられている。

カロテノイドは高い抗酸化作用をもつことが知られており、すでに健康食品や化粧品という形で販売され、また発がん予防、抗腫瘍作用が発見されたことから医療分野での利用も期待されている。大量培養が可能かつカロテノイドの原料となり得る赤くなる藻類は産業利用を目的とした研究対象となっている。赤くなる藻類には既に培養コストが低いものや蓄積カロテノイドの抗酸化力の高いものが培養株化されており、産業化に成功しているものも存在する。しかし産業化に求められる要素は様々であり、培養株によって各要素を満たす度合いは異なる。したがって藻類の産業化において、自然界から新たに赤くなる藻類培養株を確立し、継続的に新たな性質やより優れた性質を見出すことが重要である。

本研究では、南波紀昭氏 (筑波大学生命環境科学研究科) により沖縄から採取され研究室での培養中に赤く変化した藻類 (図1) を対象に (1) 単離培養株の確立、(2) 分子系統解析による系統的位置の特定、(3) 培養下での色素・脂肪酸組成の把握、を行い、本藻類に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

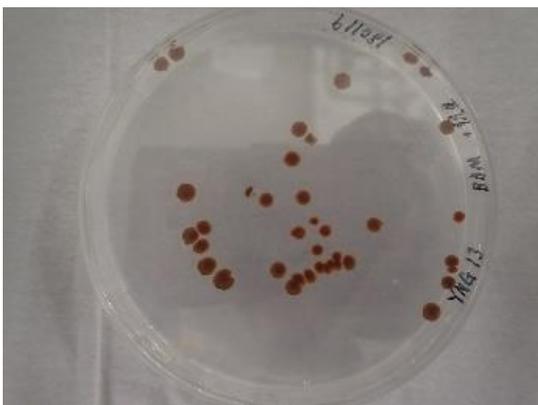


図1. 寒天培地による培養で赤色化した藻類コロニー。

【方法・結果】

(1) 単離培養株の確立

図1の培養サンプルの状態では複数種の藻類が混ざっている可能性があったため、寒天培地上のコロニーを1つずつ液体培地に移し、ピペット洗浄法を用いて細胞を単離した。液体培地に移し

た段階で赤い藻体と緑の藻体が存在した。その中でも赤い藻体由来6株、緑の藻体由来3株、合計9株の培養株確立に成功した。

培養株はAF-6液体培地において無菌状態を保ち継代管理した。図2に単離前の赤色藻体 (左) と継代培養中の緑色藻体 (右) の顕微鏡写真を示す。どちらも細胞の連なりや棘など形態的な特徴から *Desmodesmus* に分類されるイカダモであることが推測された。



図2.

左：単離前の細胞 (赤色)、右：単離後継代中の細胞 (緑色)

(2) 分子系統解析による系統的位置の特定

確立された培養株9株のうち赤い藻体由来かつ増殖が比較的良好な2株 (YNG13-A3、TNG13-C2) のDNAを抽出、18S rDNA汎用プライマーによるPCRの後シーケンス反応を経て18S rDNAの塩基配列を決定した。これを用いて、両株が *Desmodesmus* に近縁であるかどうかを確認するために分子系統解析を行った結果、イカダモの仲間であることが示唆された。しかし属レベルの判別にはITS-2rDNA塩基配列などを用いたより詳細な解析が必要だと思われ、今後ITS領域の配列決定と配列結果に基づく系統樹作成を進める。

(3) 培養下での色素・脂肪酸組成の把握

本藻類によるカロテノイド産生の条件検討を進めるための基礎データとして、まず、通常液体培養下で赤色化していない細胞のカロテノイド色素組成・脂肪酸組成の把握を試みた。カロテノイド色素組成については高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、脂肪酸組成についてはガスクロマトグラフィー (GC) をそれぞれ用いた。結果の詳細は卒業研究発表会にて報告予定である。

【今後の予定・展望】

今後は、本藻類が赤色化する培養条件の検討、赤色化した状態でのカロテノイド色素組成・脂肪酸組成の把握を行い、今回得られた結果と合わせて本藻類の赤色化の要因となる色素を明確にする。その上で本藻類が生産するカロテノイド色素あるいは脂肪酸等の有用性の有無を検討する予定である。有用性が示唆された場合には、細胞の増殖および有用物質生産を最適化する培養条件の検討をすることにより、産業利用の可能性を判断する。

Goniomonas 属の系統分類学的研究

柏木 志乃 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中山 剛 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

Goniomonas は無色単細胞性鞭毛虫であり、海水から淡水にかけて広く普遍的に存在している。この属の特徴は細胞の前方に2本の鞭毛をもつこと、ペリプラストという細胞外被をもつこと、大小のエジェクソームをもつこと、基質上を這うように移動すること、などが知られている。また近縁な生物としては光合成能を持つクリプト藻類が知られている。クリプト藻類の葉緑体は紅藻由来の二次葉緑体であることが示唆されているが、*Goniomonas* のゲノム情報からは葉緑体の痕跡は見つかっておらず、クリプト藻類は *Goniomonas* との分岐後に葉緑体を獲得したと考えられている。このことは、クリプト藻において紅藻の二次共生が起こる前の姿を推定するためには、*Goniomonas* に関する情報が有用であることを示唆している。しかし *Goniomonas* はグループ内の研究があまり進んでいない。これまでの研究でクリプト藻類にはおよそ200種が報告されているが、*Goniomonas* は海水から3種、淡水から1種、計4種のみ記載にとどまっている (Martin-Cereceda 2010; Kim and Archibald 2013)。また分子系統解析から、*Goniomonas* の中には非常に大きな遺伝的多様性が存在し、また淡水産の系統群と海産の系統群に分かれることが示されているが、その情報を基にした分類学的整理行われていない。

本研究ではさまざまな場所から *Goniomonas* の培養株を作成し、その形態的特徴を光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いて明らかにし、また分子系統解析を行うことで、属内の系統と形態の関係を整理し直すこと、及び *Goniomonas* 属内の多様性の解明を目的としている。

方法

日本各地から淡水や海水などのサンプルを収集し、マイクロピペット法を用いて単離、培養株確立を行った。培地は海産サンプルには ESM を、淡水産サンプルには AF-6 を用いた。餌はサンプルに含まれているバクテリアを用いた。

形態観察には光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いた。電子顕微鏡での観察は whole-mount 法を用いた。また培養株から DNA を抽出し、PCR によって 18S rDNA を増幅、塩基配列を決定した。これをもとに最尤法によって系統樹を作成した。

結果

採集したサンプルからの単離や他の方からの譲渡などにより、*Goniomonas* と考えられる5株を集めることができた(4海産株、1淡水産株)。光学顕微鏡観察では、いずれの株も、細胞前端隅から生じるほぼ等長の2本の鞭毛をもち、細胞前端に沿ったエジェクソーム、一方の面を常に下にして基質上を匍匐するように運動することなど確認された。海産株と淡水産株は、細胞の形態と運動、収縮胞の有無などに違いが見られたが、海産4株の間では明瞭な違いは見られなかった。電子顕微鏡観察の結果、海産株においては鞭毛上の小毛であるマストゴネマの存在が確認することができた。また分子系統解析の結果、海産株は海産系統群に、淡水産株は淡水産系統群に含まれ、また海産の株は互いに非常に近縁であることが示された。

考察と今後の展望

本研究で得られた海産の *Goniomonas* 株は形態的に互いに酷似しており、また18SrDNA塩基配列もほぼ同一であることから同種であると考えられる。これらの株は形態的な特徴からは、*G. pacifica* と同定できるが、*G. pacifica* として報告されている配列とはやや異なっており、今後の検討が必要である。また淡水産の株は形態形質からは *G. truncata* と同定できるが、*G. truncata* が含まれる淡水産系統群は非常に大きな遺伝的多様性を示すため、今後分類学的な整理のためにはさまざまな株を用いた形態的・遺伝的多様性の検討が必要である。また現時点では海産系統群と淡水産系統群の違いに対応する形質を発見できていないが、鞭毛小毛にその可能性があると考えている。現時点ではまだ観察が不十分であるが、観察法の改良などによりこの点を確認していきたい。またさらに様々な環境から培養株を作成することにより、*Goniomonas* の多様性を解明していきたい。



左) 海産株 右) 淡水産株

クロララクニオン藻のピレノイドの複製に関する研究

諸見里 怜奈 (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】

ピレノイドは葉緑体内に見られる構造で、炭素固定を触媒する RubisCO タンパク質の集合体である。RubisCO は二酸化炭素との結合特異性が低く、反応速度が遅いため、水圏に生息する多くの藻類はピレノイドに二酸化炭素を集中的に送る炭酸濃縮機構をもつ。ピレノイドは膜に覆われておらず、その形状や位置は生物ごとに異なり、葉緑体内部に埋没するものや葉緑体から突出したものなど様々である。さらにピレノイドへのチラコイド膜の陥入の有無やピレノイドを覆う貯蔵多糖の有無などの多様性が知られている。この形態の多様性に加え、ピレノイドの複製様式にもいくつかのパターンがあることが知られている。例えば、二分裂する様式や葉緑体分裂前後に新生される様式がある (Meyer et al., 2017)。しかし、クロララクニオン藻における報告は無く、ピレノイドの複製様式は解っていない。

クロララクニオン藻は緑藻の細胞内共生により葉緑体を獲得した二次共生藻類である。本藻のピレノイドは二葉性の葉緑体の中央部で突出した形で局在している。ピレノイドへのチラコイド膜の陥入は見られず、葉緑体内膜がスリット状に陥入している。また、貯蔵多糖を含むキャップ小胞が葉緑体の外に局在する。クロララクニオン藻の一種 *Amorphochlora amoebiformis* では、RubisCO 小サブユニット (RbcS) を緑色蛍光タンパク質 GFP で標識した遺伝子導入株が作製されており、ピレノイドの蛍光顕微鏡観察が可能である。本研究では *A. amoebiformis* のピレノイドの複製様式をタイムラプス観察により明らかにすることを目的とした。

【結果①: RubisCO 遺伝子 (*rbcL* と *rbcS*) の転写時期の解析】

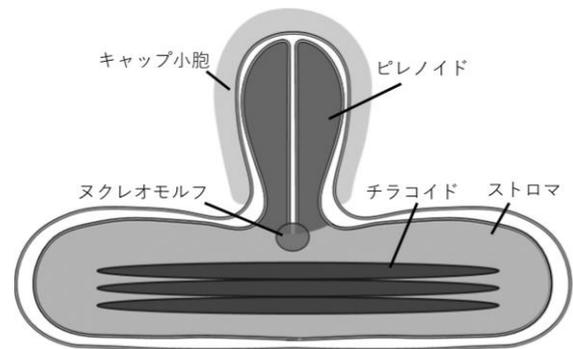
クロララクニオン藻の一種 *Bigelowiella natans* では *rbcS* の発現が概日周期に従って変動することが報告されている (Suzuki et al., 2016)。そこで、ピレノイドの複製時期を推測するために、明暗周期で培養した *A. amoebiformis* における *rbcS* と *rbcL* の転写量を定量的 PCR により 4 時間ごとに測定した。*rbcS* と *rbcL* の転写量は暗期に上昇し、明期開始頃にピークに達した。このことから、クロララクニオン藻の細胞内の RubisCO タンパク質は、暗期から明期前半にかけて増加することが予測された。

【結果②: タイムラプスによるピレノイドの個数の変化の観察】

ピレノイドの複製時期を推測するため、共焦点顕微鏡により明期後半や暗期において 1 時間ごとにタイムラプス観察を行った。各細胞あたりのピレノイドの個数の変化を調べた結果、暗期において連続的なピレノイドの増加が確認された。したがって、暗期においてピレノイドが複製されることが示唆された。暗期には多くの細胞が分裂し、その前後でピレノイドの増加が見られた。また、細胞分裂期のピレノイドは、明期のピレノイドに比べて小さく、平板なものが多く観察された。この形状変化がピレノイドの新生や分裂に伴う現象であるか、今後の詳細な観察が必要である。

【結果③: 細胞周期の同調実験】

タイムラプス観察により暗期にピレノイド増加と細胞分裂が観察されたが、その時期は疎らであった。より安定してピレノイドの複製を観察するため、薬剤添加による分裂同調を試みた。細胞周期阻害剤であるアフィジコリン、デメコルシン、ノコダゾール、ロスコビチンの添加実験を行ったところ、いずれも細胞増殖を抑制した。特に、アフィジコリンとノコダゾールは低濃度で阻害効率が高かった。また、阻害剤を除去することで細胞増殖は再開した。この実験系を用いることで、細胞分裂前後でのピレノイド観察を効率的に行える可能性がある。

図 1 A. *amoebiformis* の葉緑体の模式図

葉緑体からコブ状に突出したピレノイドに内側の葉緑体包膜 2 枚がスリット状に陥入する。

【今後の展望】

ピレノイドの増加・変形が観察された暗期においてより詳細なタイムラプス観察を行い、ピレノイドの複製の観察を試みる。

【参考文献】

Meyer, M. T., Whittaker, C. & Griffiths, H. (2017). The algal pyrenoid: key unanswered questions. *Journal of Experimental Botany*, 68(14), 3739–3749.

Suzuki, S., Ishida, K. I. & Hirakawa, Y. (2016). Diurnal transcriptional regulation of endosymbiotically derived genes in the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*. *Genome Biology and Evolution*, 8(9), 2672–2682.

カルシウム欠乏条件下のトマト果実形態変化における細胞壁構築制御機構の解析

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

【背景と目的】

トマト果実の尻腐れ病は、カルシウム (Ca) 不足により生じた栄養障害であることが知られている。その障害の発生は成長が急速な早期果実発達過程に原因があると考えられている。果実発達過程で起きた果実サイズや形態を決定する細胞増殖と細胞肥大には、細胞壁の合成や分解が大きく関係する。Ca は脱メチル化したペクチンに結合して架橋を形成し、細胞壁構造の保持に働くため Ca は果実形態や細胞壁構造に大きく関与していると考えられる。

しかし、極めて早期ステージでの果実発達への Ca 不足による細胞壁の影響に関する報告はほとんどない。それはこの現象が、非常に小さな組織で行われ多くのサンプルを得るのが困難なため、生化学的な解析が事実上不可能であったためである。そこで当研究室では、免疫組織化学的アプローチによる、各細胞壁成分と細胞壁肥大関連酵素の変化の観察が行われた。その結果、受粉後 5 日間で果実は急激に肥大成長し、いびつな早期果実を形成する。それに伴い果皮で、Ca が直接結合するペクチンのみならず、ヘミセルロースであるキシログルカンも増加することが示された。以上のことから、Ca が直接結合するペクチンだけではなく細胞壁成分全般にわたって構築制御が行われている可能性が考えられた。そこで本研究では、急速に肥大成長する受粉後 5 日間の早期果実発達に着目し、Ca 欠乏条件下における果実形態およびペクチンを含めた細胞壁多糖類およびその関連酵素遺伝子の発現を調査した。これにより、Ca 欠乏条件下での果実形態の変化における細胞壁制御の機構を明らかにすることを目的としている。本研究により尻腐れ果実発生の原因の一端が解明されることも期待している。

【材料および方法】

1. トマトの水耕栽培および Ca 欠乏処理

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

2. サンプルング

開花直前の花を選びピンセットで軽くつまんで人工授粉を行った。-1, 1, 3, 5 DPA (Days post anthesis) のコントロール果実とカルシウム欠乏果実をサンプルングして、各実験を行った。

3. 多糖類合成酵素遺伝子と関連酵素遺伝子の発現解析

コントロール、Ca 欠乏条件のそれぞれのトマトサンプルを用い、細胞壁多糖類合成酵素遺伝子の発現を調査した。用いたのは、ペクチン合成酵素: *GAUT-1-Like*, *GAUT-1-family*, セルロース合成酵素: *SICESA1*, *SICESA2*, *SICESA3*, キシログルカン合成酵素: *XXT-Like*, キシラン合成酵素: *IRX9-Like1*, *IRX9-Like2* について RT-PCR により発現解析を行った。

【結果・考察】

1. ペクチン合成酵素遺伝子の発現解析

本実験では 2 つのペクチン合成酵素遺伝子である *GAUT-1-Family* および *GAUT-1-Like* の発現解析を行った。RT-PCR の結果により、*GAUT-1-Family* において、コントロールでは -1 DPA から 5 DPA にかけて発現量が徐々に上昇しているのが見られた。Ca 欠乏果実において、1 DPA と 5 DPA で発現量の減少が見られた。*GAUT-1-Like* も同様にコントロールにおいて果実の発達に伴い発現量の上昇が見られた。一方、Ca 欠乏果実では 1 DPA と 5 DPA で発現量の減少が見られた。

2. セルロース合成酵素遺伝子の発現解析

一次細胞壁のセルロース合成に関わる *SICESA1*, *SICESA2*, *SICESA3* の発現解析を行った。コントロールにおいて 3 つのセルロース合成酵素遺伝子で果実の発達に伴う発現量の上昇が見られた。Ca 欠乏果実において、*SICESA1* の発現量は -1 DPA が最も高く、果実の発達に連れ徐々に発現量が減少した。*SICESA2*, *SICESA3* では同じ発現パターンが見られ、3 DPA における発現量の減少が見られた。また、*SICESA3* の発現量が最も高いことが見られた。

3. ヘミセルロース合成酵素遺伝子の発現解析

キシログルカンの合成に関わる *XXT-Like* においてコントロールでは -1 DPA から 5 DPA にかけて発現量の変化が見られなかった。Ca 欠乏果実ではペクチン合成酵素遺伝子と同様に 1 DPA と 5 DPA で発現量の減少が見られた。

本実験では二次細胞壁ヘミセルロースの主成分であるグルクロノアラビノキシラン (GAX) の合成に関わる *IRX9-Like1*, *IRX9-Like2* にも着目し、発現解析を行った。コントロールでは *IRX9-Like1* は果実の発達に伴い発現量の上昇が見られた。Ca 欠乏果実では 1 DPA のみ減少が見られた。*IRX9-Like2* ではコントロールは -1 DPA と 1 DPA で高い発現量を示し、3 DPA と 5 DPA で発現量が減少した。Ca 欠乏果実では 3 DPA と 5 DPA で最も高い発現量を示した。

以上の結果から Ca 欠乏果実ではペクチンのみならず、セルロースやヘミセルロースの動態にも影響を与えた。ペクチンが少ないため細胞壁の粘性が低く、また -1 DPA での *SICESA1* の高い発現によってセルロースが早期に蓄積されたため硬度が上昇している可能性が高いと考えられる。キシログルカン合成酵素遺伝子の発現量の減少から細胞壁を繋ぎかえるための成分が低下し、また二次細胞壁ヘミセルロースの合成酵素が早期に高い発現を示した。以上の結果は、Ca 欠乏果実の細胞壁は緩みが生じにくくなっており、果実が膨らみにくくなっていることが、いびつな早期果実の形成につながったのではないかと考えられる。

塩ストレス下のトマト果実サイズ変化における細胞壁構築メカニズムの解析

板野 愛都 (筑波大学 生物学類)

指導教員：岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

植物は動物と異なり移動できないため、様々な環境ストレスに適応しながら生活している。塩ストレスは浸透圧ストレス、イオン毒性を引き起こし、植物の生育や代謝に支障をきたす場合が多い。トマト果実では、塩ストレスによりグルコースやフルクトースなどの糖類や GABA 等のアミノ酸の蓄積が起こり商品価値の高い果実となる一方で、果実硬度の上昇、果実数および果実サイズの減少などのデメリットも報告されている。この果実サイズの変化には、細胞壁構造が大いに関わっている。受粉をきっかけに果実形成過程に入った子房は果実へと変遷し、急激な細胞分裂と細胞肥大が生じた結果、果実のサイズを決定する。サイズが決定した緑色果実は、その後、成熟が進んでも大きさは変化しない。受粉後数日後という極めて早期ステージでの果実発達への塩ストレスによる細胞壁の影響に関する報告はほとんどない。それは、この子房から果実への変遷は、非常に小さな組織で行われているため、生化学的な解析が極めて困難であることが原因である。そこで当研究室では、各細胞壁成分と細胞壁肥大関連酵素に対するモノクローナル抗体をもとに、子房から果実への変遷過程における細胞壁ダイナミクスの顕微観察を行うことで、果実サイズの拡大に必須である細胞壁をやわらかくする酵素である XTH やエクспанシンが増加していないにもかかわらず、細胞壁の硬さの要であるセルロースが早期に蓄積し非常に早期に細胞壁が硬くなっていることが、果実サイズ減少のキーポイントである可能性を見出した。また、一般的に皮が硬くなると果実は大きくなりにくいと言われているが、クチクラ層にも大きな差は見られなかった。果実の外周りの皮が硬くなることが、果実のサイズ決定には重要ではないかと農業現場では考えられているが、実際には、果実内部が硬くなっていることが原因である可能性がある。そのため、果実内部の細胞壁代謝とリモデリングの調節が重要である可能性が高い。そこで本研究では、その細胞壁制御がどのようになっているのかについて明らかとするために、細胞壁合成・修飾酵素の変化について、遺伝子レベルでの解析を行うこととした。これらの実験を通して、塩ストレス条件での早期の果実サイズ減少を引き起こす機構について明らかとすることを目的としている。

方法

1. トマトの水耕栽培・塩ストレス処理

トマト(品種: Micro Tom)を Yin et al. 2010, JXB の方法を用いて、24°Cのインキュベーター内で水耕栽培を行った。水に濡らしたろ紙に滅菌した種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えた。塩ストレス処理は花が咲き始めた時点で開始し、徐々に濃度を上昇させることで馴化させ、最終的にNaCl濃度150 mMで栽培した。NaCl濃度の調節は電気伝導率測定器を用いた。

2. サンプルング

開花前日の子房および、開花前日に人工授粉してから 1, 3, 5, 15 DPA(Days Post Anthesis)の果実をサンプルングした。

3. 遺伝子発現解析

トマト一次細胞壁のセルロース合成酵素遺伝子である *CESA1*, *CESA2*, *CESA3*、ペクチン合成酵素遺伝子である *GAUT1-Like*, *GAUT1-Family*、キシログルカン合成酵素遺伝子である *XXT-Like*、キシラン合成酵素遺伝子である *IRX9-Like1*, *IRX9-Like2* について RT-PCR により発現解析を行った。また、キシログルカン転移酵素加水分解酵素遺伝子である *XTH1* および、エクспанシン遺伝子である *EXP2*, *EXP3*, *EXP4* について qRT-PCR により発現解析を行った。

結果・考察

塩ストレス条件では、-1 DPA の子房におけるセルロース合成酵素遺伝子の発現は、コントロール条件における細胞肥大が活発となる 5 DPA と同レベルの発現を示した。ペクチン合成酵素遺伝子は1~5 DPA において塩ストレス条件でわずかに発現の減少が見られた。キシログルカンの合成酵素遺伝子の発現は1~1 DPA では差は見られないものの、コントロールと比べて塩ストレス条件において開花後 3~5 日でわずかに減少していた。また、キシログルカン転移酵素加水分解酵素やエクспанシンの遺伝子発現に関しては *EXP2*, *EXP3* はコントロールと塩ストレスとの間で差が見られず、*XTH1*, *EXP4* では1 DPA において塩ストレスで有意に減少しており、1~5 DPA においても有意差はないものの塩ストレスで減少傾向が見られた。

これらの結果から、塩ストレス下のトマトでは、子房の段階から細胞壁合成に変化が起こっていることが示された。特にセルロース合成酵素の発現およびセルロースの蓄積は顕著に観察されており、塩ストレス果実の細胞壁がコントロールに比べて硬くなっていることが推測される。また、セルロースが増加した一方で、キシログルカンやペクチンは減少し、細胞壁を緩めることで細胞伸長に関わるキシログルカン転移酵素加水分解酵素やエクспанシンは変化しないまたは減少したために硬く膨らみにくくなり、早期において果実サイズが低下すると考えられる。

セルロース合成酵素は細胞膜上に存在するため、原形質分離を起こしやすい塩条件ではセルロースの供給は困難になると一般的に考えられているが、*CTL1* や *SOS5* など、細胞壁およびセルロース合成関連変異体では、塩ストレス感受性に変化が報告され、セルロースの塩ストレス耐性への関与が示唆されている。本研究においても、地上部の果実でセルロース合成が促進されたことから、早期果実形成においてもまた、塩ストレスに対する応答としてセルロースの蓄積が生じた可能性が考えられる。

根の伸長とオーキシン応答におけるイネ細胞壁タンパク質 THRGP の機能解明

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

【背景と目的】

植物細胞が持つ細胞壁は、セルロースなどの多糖類による複雑な構造を有しているが、その他に細胞壁タンパク質と呼ばれる構造タンパク質もまた、構成成分の一つとして挙げられる。構造タンパク質には不溶化することで構造強化し細胞壁の緩みを止めるものが知られており、その代表例は維管束植物が持つエクステンシンである。そして単子葉植物においては、特有の細胞壁タンパク質である THRGP (Threonine hydroxyproline-rich glycoprotein) が存在する。THRGP はエクステンシンと同様に、不溶化する構造を持つ。そしてイネの THRGP である *OsTHRGP* はゲノム中に1コピーのみ存在し、根や葉、葉鞘の栄養器官で発現することがわかっている。本研究で作出された *OsTHRGP* RNAi 発現抑制体 (*OsTHRGP*KD: 日本型イネ Nipponbare) を観察したところ、*OsTHRGP* 量の低下により、葉鞘と葉身の結合部分であるラミナジョイントの細胞壁の緩みの阻害されなかったことで、その角度が拡大する表現型が見られた。また、ラミナジョイントの角度が非常に広いインド型イネ (Kasalath) では、最も *OsTHRGP* 量が低下しており、ラミナジョイント角度と *OsTHRGP* の偏差蓄積には関係性があることが示されている。一方、根において、*OsTHRGP*KD の根が渦を巻いたように伸長するという回旋転倒運動の異常が見られた。根の回旋転倒運動は、オーキシン応答を必要とする植物の根の成長運動である。以上のことから、この回旋転倒運動の異常は、根における細胞壁タンパク質 THRGP の発現・蓄積とオーキシン応答との関係性が示唆される。そこで本研究では、イネの根における細胞壁タンパク質 THRGP とオーキシン応答機構の関係性について、オーキシン輸送阻害等による根の表現型への影響を調査した。根のオーキシン応答における細胞壁タンパク質の新たな機能を明らかにすることを目的としている。

【材料と方法】

・研究材料

イネ (*Oryza sativa*)

品種は日本型イネ Nipponbare の正常株 (Nipponbare-WT) および *OsTHRGP*-KD#7、#15 (Nipponbare)、そしてインド型イネ Kasalath の正常株 (Kasalath-WT) を用いた。*OsTHRGP*KD#7 は *OsTHRGP* の発現量が正常株に比べて、ラミナジョイント部分において、70%ほどに抑制されて中間的形質を示し、#15 は50%以下に抑制された強い表現型を示す。Kasalath は、*OsTHRGP* の発現量が Nipponbare-WT に比べて約10%以下に抑えられていることが分かっている。

・研究方法

Nipponbare-WT、*OsTHRGP*KD の#7、#15、そして Kasalath-WT を、3日間の吸水を経て2日間の水耕栽培で生育させた後、コントロール、オーキシン (インドール酢酸: IAA) 処理、オーキシン極性移動阻害剤 (N-1-ナフチルフラミン酸: NPA、トリヨード安息香酸: TIBA) 処理でさらに1日間水耕栽培で生育させた。生育後の根の表現型を回旋転倒運動に着目して観察した。

【結果と考察】

水耕栽培後の根を観察し比較すると、コントロール区で根の回旋転倒運動の異常が観察されたのは *OsTHRGP*-KD#15 のみであった。IAA 処理区では#7と#15に根の異常が観察された。そして、オーキシン輸送阻害剤である NPA 処理区では全ての品種において根の回旋転倒運動の異常が観察された。反対に、TIBA 処理区では全ての品種において根の異常が観察されなかった。

Nipponbare-WT と Kasalath-WT では、オーキシン輸送阻害剤である NPA を加えた場合、*OsTHRGP*KD と同様な渦巻きの根の異常が観察され、一方 *OsTHRGP*KD では、オーキシン添加でも阻害でも、根の回旋転倒運動に異常が起こった。そのため根の組織における適切なオーキシン量の制御が、THRGP が正常に働くためには重要ではないかと考えられる。*OsTHRGP*KD では細胞壁タンパク質 THRGP の局在が失われたことで、根の片側における細胞壁伸張性が不安定となり、回旋転倒運動異常を起こした可能性がある。細胞壁タンパク質 THRGP はオーキシン量の適切な制御による細胞壁調節を行うことで、根の伸長の最適化にはたらくのではないかと考えている。根の回旋転倒運動に異常が起こった部位において、縦断面切片を作成し、*OsTHRGP* の局在の免疫組織化学を用いた顕微鏡観察を行う予定である。また、Kasalath-WT はラミナジョイント部分での *OsTHRGP* 発現量が Nipponbare-WT に比べて10%以下に抑えられているにもかかわらず、根においては同じような表現型を示した。したがって、Kasalath-WT における *OsTHRGP* 量の低下と異常は地上部でのみ生じ、根では Nipponbare-WT と同様の機能を有している可能性がある。

そして、NPA 処理区と TIBA 処理区とで観察結果が異なったことは、NPA と TIBA ではターゲットの PIN タンパク質が異なることが原因として考えられる。こちらも、現在進行中である Nipponbare-WT を用いた実験により、NPA および TIBA を投与した個体における *OsTHRGP* の発現部位を明らかにする予定である。

イネ-いもち病病害応答におけるキシロオリゴ糖誘導抵抗性反応機構の解析

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

【導入】

植物は厳しい環境ストレスに対し、その場から避けることができないためそれらに対する優れた応答反応を身に付けてきたと考えられる。中でも病害応答に関する解析が行われてきたが、その多くは細胞内プログラムについての研究であり、細胞外、つまり細胞壁領域についての病害応答反応の知見は乏しいのが現状である。

細胞壁は発生過程に重要であると同時に、その一部であるヘミセルロースは病害応答にも関与している。イネなどの単子葉植物においてヘミセルロースは細胞壁の約60%を占める。ヘミセルロースを分解する酵素が過剰発現したイネ *OsARAF*FOX において、キシロオリゴ糖量の増加、病害抵抗性反応および関連遺伝子の発現誘導が起こることが示されている。

病原体侵入時に病害応答を開始する物質のことをエリターと呼び、PAMPs と DAMPs の2種類が存在している。PAMPs は病原体由来の物質で、DAMPs は植物由来の物質である。本研究室で、ヘミセルロース分解物であるキシロオリゴ糖が DAMPs の一つとして機能し、その受容体として Wall Associated Kinase: WAK21 が関与していると予想された。WAK は、細胞外に糖結合領域(受容領域)、細胞膜貫通領域、細胞内にキナーゼ領域を有する構造をもち、植物特有の監視センサーとして働いている。しかし、WAK21 に関しては、キナーゼ領域のみを有するタンパク質であると報告がある。しかし、ゲノム情報を確認したところ、糖結合領域(受容領域)、細胞膜貫通領域を含む非常に長い5'非翻訳領域が存在していたことから、キナーゼ領域以外の領域もキシロオリゴ糖により発現誘導されているのか、また実際にどのようなタンパク質が作成されているのかについて調査を行なった。

本研究では単子葉植物の植物細胞壁由来のオリゴ糖による病害応答メカニズムの解明を目的に、WAK がキシロオリゴ糖と結合してセンサーとしての役割を果たし細胞壁中における防御応答に寄与しているのか、また *OsWAK21* 欠損変異体の形態形成過程を調査する。

【材料と方法】

① *OsWAK21* の5'非翻訳領域の発現解析

キシロオリゴ糖を与えたイネ培養細胞より RNA を抽出し、5'非翻訳領域を含む領域にプライマーを設計し、発現解析を行った。

② *OsWAK21* の全長配列

報告されていたタンパク質部分の間の塩基配列にプライマーを設計し、間の配列を RT-PCR によって増幅した。その後、シーケンシングにより塩基配列を調べた。

③ *WAK21* 欠損変異体の形態形成観察

WT 及び *OsWAK21* 欠損変異体3系統を特定網室で生育させ、形態形成観察を行った。開花後の雌蕊をサンプリングした。また、背丈を約4週に渡り計測した。

④ キシロオリゴ糖と *OsWAK21* の結合性の実験

OsWAK21 の糖結合領域においてある部分のみのペプチドを作製し、ELISA 法により二つの物質が結合するか確認した。

【結果・考察】

① 発現解析の結果、糖結合領域(受容領域)、細胞膜貫通領域を含む非常に長い5'非翻訳領域もキナーゼ領域と同様に、キシロオリゴ糖により誘導を受け、発現していた。

② シーケンシングの結果、5'非翻訳領域とされていた領域には開始コドンであるメチオニンが存在し、糖結合領域、細胞膜貫通領域塩基配列の後、終始コドンが存在していた。また、データベース上で報告のあるキナーゼ領域でも開始コドンであるメチオニンが存在し、終始コドンが存在していた。つまり、*OsWAK21* は糖結合領域を含む領域がタンパク質として機能している可能性が最も高く、キナーゼ領域のみの二つ目のタンパク質も翻訳する可能性は低いことが示された。そのため、糖結合領域でキシロオリゴ糖を受容し、さらに他の *OsWAK* と協調して病害応答に関与していると予想された。

③ イネの背丈については WT と欠損変異体で差は見られなかった。雌蕊については変異体で黒く変色した穂が欠損変異体で多く見られた。その他においても WT と変異体で見え目にはっきりとした違いがみられなかった。

④ 詳細は卒業研究発表会にて報告する。現在までに、*OsWAK21* は他の *OsWAK* と協調して病害応答に関与することが示唆されていたが *OsWAK21* そのものが受容体ドメインとキナーゼドメイン両方を含む一つのタンパク質ではなく、キナーゼとして働くのでもなく、主にオリゴ糖の結合に関与している可能性が高いことがわかった。今後他の *OsWAK* との関連性を調査することで、キシロオリゴ糖が病害応答反応にどう機能するのか調査していく予定である。