



生物学類

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.22 No.1 January 2023
www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.22 No.1 January 2023

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

令和 4 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

令和 5 年 2 月 17 日

筑波大学

生物学類

第一会場 (2B411)

9:40-	伊藤 香菜子 マウスの生殖系列から変異型ミトコンドリア DNA が消失する機構の検証	2
9:55-	森 優貴 モデルマウスを用いた早期老化と組織特異的な細胞死に関する研究	3
10:10-	稲山 藍花 病原性ミトコンドリア DNA の蓄積による褐色脂肪組織の可塑性とグリコーゲン代謝の関連	4
10:25-	佐藤 麻莉 Investigating the contribution of Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs) in zebrafish fin regeneration	5
10:40-	井上 聡 核内ミトコンドリア DNA 断片に関する基礎研究	6
休憩	(15分)	
11:10-	栗山 貴成 ミトコンドリア病モデルマウスを用いた加齢に伴う病態変遷に関する基礎研究	7
11:25-	根岸 華月 病原性ミトコンドリア DNA の蓄積が褐色脂肪組織の交感神経調節に与える影響	8
11:40-	花田 翔 持久性運動がミトコンドリア病モデルマウスの骨格筋に及ぼす影響	9
11:55-	重松 夏帆 がん細胞の転移・増殖に寄与するミトコンドリアゲノム変異の探索	10
12:10-	池田 秀徳 ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットとしての TLE1 の機能解析	11
昼食	(50分)	
13:15-	金丸 晴香 織毛虫テトラヒメナにおけるアクチン再編成とキネシン-2 メンバー-KIN2 の解析	12
13:30-	森山 直人 分裂酵母の孢子形成に関わる CDK/cyclin の分子構造解析	13
13:45-	植松 雪乃 大脳皮質層形成における USP15 の役割の解明	14
14:00-	平木 智尋 脳の発達過程における cGAS とミクログリア多様性の関連	15
14:15-	前田 ちひろ 神経血管の老化における核構造の異常と微小核伝播の影響	16
休憩	(15分)	
14:45-	山口 泰生 ドーパミンによるキロショウジョウバエ腸内分泌細胞の活性化	17
15:00-	平 清乃 キロショウジョウバエの生殖休眠を制御する神経回路に関する研究	18
15:15-	井上 陸 プラズマローゲンによる線虫の寿命及び健康寿命の延伸作用と作用機序の解析	19
15:30-	池田 瑞輝 線虫 (<i>C. elegans</i>) を用いたコメペプチドの生理活性作用の解析	20
15:45-	大空 由依 コウマクノウキン門 <i>Allomyces</i> の鞭毛をもつ雌雄配偶子と接合子の観察	21
16:00-	AHMED POPLAR HANA Impacts of diagram design on comprehension	22

第二会場 (2B412)

9:40-	佐藤 隆奈 ショウジョウバエ胚前極に異所的に局在させた生殖質中の母性因子の機能解析	23
9:55-	三上 恭平 ショウジョウバエ始原生殖細胞集団の不均一性	24
10:10-	影山 りお ショウジョウバエ生殖系列の発生過程におけるヒストンラクトシル化修飾の観察	25
10:25-	成瀬 梨々香 線維症の治療と再生研究のための新規遺伝子組換えマウスの開発	26
10:40-	勝村 圭裕 細胞培養系を利用した網膜再生因子の研究	27
休憩	(15分)	
11:10-	重川 羽純 イネの側根の形成・発達におけるペクチンメチル基転移酵素遺伝子の機能解析	28
11:25-	向井 彩賀 カルシウム欠乏条件下におけるトマト果実成熟過程での維管束の変化	29
11:40-	渡辺 大智 キシロシダーゼ過剰発現イネの器官別の細胞壁組成と病害応答の変化	30
11:55-	野田 桃菜 根粒形成の鍵転写因子 NIN の機能未知領域に関する研究	31
12:10-	藤戸 冨佳 窒素栄養によって根粒が早期に老化する機構の解析	32
昼食	(50分)	
13:15-	度會 千智 CRISPR/Cas9 を用いたシクラメンの完全八重咲品種の作出	33
13:30-	重政 恒輔 キノコの発光システムを用いた植物の非破壊的な遺伝子発現解析系確立の試み	34
13:45-	上田 修也 高濃度アルミニウム存在下における単細胞性紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> の増殖と細胞サイズの変化	35
14:00-	難波 勇人 単細胞性緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> における CoA ジスルフィドレダクターゼ欠損株の解析	36
14:15-	津留 陽果 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 の硫酸イオン輸送体 SulP family の機能解析	37
休憩	(15分)	
14:45-	居串 謙汰 植物におけるタンパク質高発現系「つくばシステム」を用いたミスマッチ酵素の精製と検証	38
15:00-	山田 佳穂 ジャガイモの環境ストレス耐性向上に関する研究	39
15:15-	高野 俊介 <i>Lac-CBD</i> 導入遺伝子組換えポプラバイオマスの酵素糖化性の評価	40
15:30-	飯島 れいら Effects of ocean acidification under different light availability on the warm temperate coral <i>Acropora solitariaensis</i>	41
15:45-	横屋 稜 マガキガイ体内受精における異型精子の役割に関する研究	42

第三会場 (2C404)

9:40-	大河原 由貴 形態的特徴と環境 DNA 解析を用いた宍塚大池の藻類フロラ	43
9:55-	川島 育海 大陸～日本アルプス・スケールでみる高山蛾 <i>Xestia</i> 属複数種の系統地理学的構造	44
10:10-	高橋 航 筑波大学構内の鞭毛虫	45
10:25-	竹内 涼 環境から分離した糸状仮足アメーバの系統分類学的研究	46
10:40-	下向 雄大 クロララクニオン藻におけるミトコンドリア局在の解糖系酵素の分子進化	47
休憩	(15分)	
11:10-	大井 雄介 ヌタウナギの嗅覚受容	48
11:25-	LI YUANHONG Expression analysis of key genes for germ layer specification in mollusc: insight into the evolution of spiralian development	49
11:40-	富所 怜央 Web3 新しい景色を	50
11:55-	柏俣 青葉 <i>Paracoccus denitrificans</i> Pd1222 を用いた細胞外膜小胞の伝達に関わる因子の探索	51
12:10-	館内 稟太郎 細胞外膜小胞の受け渡しに関わる因子のスクリーニング系の検討	52
昼食	(50分)	
13:15-	岡本 慶乃 分子シミュレーションで解明するホモニ量体チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) のハーフサイト活性	53
13:30-	磯貝 龍邑 大規模分子系統解析による Archaeplastida 内部系統関係の再評価	54
13:45-	番場 浩平 Form I/II型ルビスコに関連する新規タンパク質群の発見	55
14:00-	浅賀 巧匠 <i>Histioneis</i> 属渦鞭毛藻に共生するシアノバクテリアのゲノム解析および系統解析	56
14:15-	宮本 知世 細胞サイズ別環境 DNA を用いた共生性シアノバクテリアの探索	57
休憩	(15分)	
14:45-	秋成 怜美 筑波大学構内と筑波実験植物園に生育する常緑樹数種の植物内生性担子菌類の調査	58
15:00-	清原 広海 日本産ムカデ綱4目における糞生菌相の比較検討	59
15:15-	上辰 俊広 菅平高原における変形菌相調査	60
15:30-	塚越 優喜 菅平高原周辺のみずの遺伝的多様性	61
15:45-	鈴木 暁久 アブラナ科4種における植物炭疽病菌の植物宿主・組織への特異性と季節性	62
16:00-	土井 結渚 筑波大学構内アカマツ林のシラカシ林への急速な遷移：松枯れを含む37年間の変化	63

第四会場（2C410）

9:40-	天野 史子 リンゴの送粉サービスに関わる単独性ハナバチ <i>Osmia</i> 属の基礎生態の解明	64
9:55-	和田 直樹 居住空間サイズがクロマルハナバチ, <i>Bombus ignitus</i> , ワーカーの卵巣発達と育仔行動に及ぼす影響	65
10:10-	沼澤 青葉 ウシガエル, <i>Rana catesbeiana</i> , の侵入初期個体群における餌選好性	66
10:25-	伊藤 響生 熱脱着法と陽子移動反応質量分析計による生物起源揮発性有機化合物の定量法の確立	67
10:40-	鈴木 龍晟 魚食性猛禽類であるミサゴの水銀濃度に影響を及ぼす要因を探る	68
休憩	(15分)	
11:10-	福田 ゆき 国内希少水生植物ナガバエビモの保全を目的とした交配・種子発芽特性の研究	69
11:25-	鈴木 元康 冷温帯二次林におけるつる植物の空間分布～ホスト樹木無しでは生存不可能！？稀有なその生態に迫る～	70
11:40-	柘榴 匡 異なる産地のダケカンバ幼樹の光合成特性に対する窒素負荷の影響	71
11:55-	穴澤 颯太 花を集めれば遠くまで目立つ？：花密度にともなうハチの検出限界の変化	72
12:10-	田中 歩 三花寄れば送受が増える？：ハナウドの花密度が訪花昆虫による送受粉におよぼす影響	73
昼食	(50分)	
13:15-	谷田部 龍 窮鼠、猫を噛む～社会性ハダニにおける反撃能力と雄間闘争との関係～	74
13:30-	古川 顕充 窮鼠に噛まれた猫の戦術 ～ 捕食者タケカブリダニの卵はコロコロされて孵化遅延するのか？ ～	75
13:45-	由本 竜資 体温の概日リズム生成機構の解明	76
14:00-	松本 怜 生後マウス側坐核におけるヘパラン硫酸エンドスルファターゼ <i>Sulf1</i> 遺伝子の発現	77
14:15-	小林 葉奈 黄色ブドウ球菌の核様体凝集	78
休憩	(15分)	
14:45-	中村 勇紀 インフルエンザウイルス感染による二次性細菌性肺炎の発症機序解明に向けた一細胞生体イメージング技術の開発	79
15:00-	新井 悠也 SAGAS: Simulated annealing and greedy algorithm scheduler for laboratory automation	80
15:15-	佐藤 綾香 乳酸菌 H61 株がゼブラフィッシュ体内で発揮する酸化ストレス防御能	81
15:30-	須貝 麻央 徐波発生機構における海馬の役割	82
15:45-	中村 彩希 マウス大脳皮質におけるノンレム睡眠中の徐波を制御する分子機構の探索	83
16:00-	金子 千尋 ヒストン異常による血液がんの発症機序の探索	84

令和4年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

氷見 和裕

上西 慧莉紗

落合 美智

佐久間 陽平

田中 千裕

玉城 孝

照井 一葵

成田 紗由美

船橋 美月

古橋 夢摘

山木 佳奈子

表紙画

天野 史子

表紙画の解説：

テーマは「切手」。モチーフは卒業生を対象に行なったアンケートの結果から選びました。

切手を貼れば日本中、世界中に手紙を届けることができます。筑波大学での学びや研究もまた、私たちが新たな世界へ連れて行ってくれることでしょう。

令和四年度卒業研究発表会要旨の巻頭にあたって

磯貝 龍邑 (筑波大学 生物学類 4年)

遂にこの要旨集を読む立場ではなく、書く立場になってしまいました。いざこの立場になって筆を持つと実感が沸々と込み上げてきます。早速卒業研究発表会の紹介に移りたいところですが、まずは今年の卒業研究生について大学生活をもとに振り返ってみたいと思います。

時間が過ぎるのは年々早くなっていくと言われる通りに、確かに気がついたら大学卒業間際となりました。しかし、思い返せば大学生活というものは一瞬と言い切ってしまうには濃密であったようにも思えます。少し前まで高校生であった私達を最初に迎えたのは基礎生物学実験でした。毎週1回3時限連続に及ぶ実験と不慣れな実験レポート作成は大学生になったことを実感させてくれました。人によっては初めての一人暮らしやサークル活動、アルバイトといった様々なことに日々身を揉まれながら、専門基礎科目、専門科目、実験・実習といったカリキュラムを修めてきました。課題や試験には苦い思い出もあるかもしれませんが、やはり専門的に学ぶ楽しさや喜びを多くの人は感じたのではないのでしょうか。

そして私達の大学生活といえば、あの事項にどうしても触れなければなりません。新型コロナウイルス感染症とそのパンデミックについてです。どの学生にとっても大学が全面閉鎖したことは衝撃的で、実験・実習や課外活動の多くは対面での行動が必須なことから、大学・学生にとって未曾有の危機となりました。そのような中でも以前と同じような体験が出来るようにとオンライン技術等を駆使して大学・学生の双方から対処してきました。

けれど、今やその「以前」を知るのは学生の中だと私達の代のみとなりました。昨今の情勢は、もはや以前にどう戻すのかではなく、これからどうするかに方向性がシフトしたようにすら感じます。問題が発生し、対策を行い、考えが変わっていく。こうした変化がたった数年で実際に起こったという事実には、私は遺伝型どころか表現型の枠組みすらも超えそうな人間の適応力の高さを実感しました。

さて、前置きが長くなりましたが、今年の卒業研究生はこうした時代の変化や人間の適応力を目の当たりにしながら学んできた世代です。全員の卒業研究をまとめて言葉にするのは難しいので多くは語れませんが、先のような大学生活を過ごしてきた人達が約1年という時間を費やして研究してきた成果が次ページ以降にあります。卒業研究発表会を聴いてくださる皆様におかれましては、ひとつひとつの要旨に目を通していただくと幸いです。

また、1~3年生の皆さんにとっても、発表会は大切なものとなっています。1, 2年生においては生物学類でどのような研究が出来るのかを知る重要な機会であり、3年生においては自身の所属する研究室や関連分野でどのような卒業研究がなされているのかを再度確認する機会となるからです。だからこそ、ぜひこの要旨集を発表会当日までの間で閲覧し、発表会でどの研究発表を見ようかと事前に計画を立ててみてください。そうした過程が、皆さんの興味や関心をより深める手伝いをしてくれるはずですよ。

今年の発表会は3年ぶりに対面開催の予定です。昨年度、一昨年度のオンライン開催も素晴らしい発表会でしたが、やはり対面で行うからこそその良さというものもあります。会場の緊張感、その場での質疑応答、複数会場における賑わいといった対面開催ならではの良さを感じていただければ何よりです。

最後になりますが、研究をご指導していただいた先生方や支えてくださった研究室の先輩方、発表会の運営をしてくださる後輩の皆さんや関係する職員の方々のご協力があったからこそ、私達は卒業研究発表を行うことが出来ます。この場をお借りして、皆様に深く感謝申し上げます。

Communicated by Kensuke Yahata, Received January 23, 2023

マウスの生殖系列から変異型ミトコンドリア DNA が消失する機構の検証

伊藤 香菜子 (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】

細胞内小器官の1つであるミトコンドリアは、内部にミトコンドリア DNA (mtDNA) と呼ばれる核 DNA とは異なる独自の DNA を有している。哺乳類では、mtDNA は体細胞では細胞あたり数百から数千コピー、成熟した卵では十万コピーほど存在すると言われている。mtDNA はミトコンドリアの呼吸機能に関する遺伝子をコードしているため、病原性突然変異が生じた mtDNA が蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能の低下が引き起こされ、ミトコンドリア病と総称される病気を発症することが知られている。ミトコンドリア病の原因となる病原性突然変異のひとつに、mtDNA の全長の 1/3 程が抜け落ちた大規模欠失型突然変異があり、欠失によって短くなった変異型 mtDNA を Δ mtDNA と呼んでいる。 Δ mtDNA の蓄積は、ヒトでは CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia) や KSS (Kearns-Sayre syndrome) と呼ばれるミトコンドリア病の原因となることが知られている。所属研究室では、ヒトの Δ mtDNA とほぼ同じ領域を欠失したマウス Δ mtDNA を有するミトコンドリア病モデルマウス、Mito-mice Δ の樹立に成功している。

ヒトやマウスといった哺乳類の mtDNA は母性遺伝様式によって次世代に伝搬されることが知られているが、ヒトで報告されている CPEO や KSS の症例の大部分は孤発性で、家族性ではないことが多い。これは、mtDNA の大規模欠失突然変異が発生の初期段階で体細胞にのみ生じ、生殖系列にはこの Δ mtDNA が存在していないためであると考えられている。しかし、Mito-mice Δ では、 Δ mtDNA が母親から仔へと遺伝するため、系統維持が可能である。雌マウスの Δ mtDNA の割合が高すぎると不妊であり、逆に低すぎると Δ mtDNA がほとんど次世代に受け継がれない。そのため、 Δ mtDNA の割合が 10-30% 程度の雌を交配に用い、野生型の雄と交配させる。この系統維持を通じ、「母マウスが若齢のときには Δ mtDNA を様々な割合で有する産仔が得られるのに対し、母マウスが加齢すると、 Δ mtDNA が仔に伝わらなくなる」ことが明らかとなった。一般的に、卵の質は母親の加齢に伴い低下すると言われているため、「加齢すると Δ mtDNA をもたない正常な仔マウスしか生まれなくなる」というのは通説と逆説的な現象である。そこで、本研究では加齢に伴う Δ mtDNA の消失が、「どのようにして起こるのか」を明らかにすることを目的とする。

その機構として、① Δ mtDNA が卵母細胞ごと除去される② Δ mtDNA が特異的に排除されるという 2 つの仮説が考えられる。本研究では前者の仮説の検証を行うことにした。

【方法】

野生型マウスと 10-30% の割合で Δ mtDNA を持つ Mito-mice Δ の雌から、2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月、8 ヶ月時点で卵巣を採取し、連続切片を作製した。それらの切片についてアポトーシス細胞を特異的に検出する、TACS2 TdT *in situ* Apoptosis Detection Kit を用いて TUNEL 染色をし、TUNEL 陽性である卵母細胞数のカウントを行った。

【結果・考察】

詳細な結果と考察については発表会にて提示する。

モデルマウスを用いた早期老化と組織特異的な細胞死に関する研究

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

【背景】

ミトコンドリアは、ほぼすべての真核生物の細胞に存在する細胞小器官で、酸化的リン酸化 (ミトコンドリア呼吸) によって生体内で必要とされる ATP の大部分を産生している。ミトコンドリアは核 DNA とは異なる独自のゲノムである環状二本鎖構造のミトコンドリア DNA (mtDNA) を 1 細胞当たり数百から数千コピー有し、哺乳類の mtDNA には呼吸酵素複合体のサブユニットの一部の遺伝子やその翻訳に必要な rRNA、tRNA がコードされている。mtDNA はミトコンドリア呼吸の過程で生じる活性酸素種 (ROS) にさらされていることなどにより、核 DNA よりも突然変異が蓄積しやすいとされている。

ミトコンドリアは ATP 産生以外にも多くの生体機能に深くかかわっている。その 1 つとして、アポトーシスへの関与があげられる。

アポトーシスは代表的なプログラム細胞死として知られており、大きく分けて 2 種類の経路が存在している。損傷を受けた細胞などで働く内因性経路と細胞外からデスシグナルを受容した細胞で働く外因性経路である。これら 2 つの経路を通じた細胞死は最終的に実行型カスパーゼの活性化により細胞や DNA の断片化が引き起こされるという共通の結末を迎える。内因性経路ではミトコンドリアが直接はたらいいて、かつ 2 つの経路にはクロストークの関係があり外因性経路にもミトコンドリアが関わっていることから、アポトーシスにおいてミトコンドリアは非常に重要な役割を担っているといえる。

アポトーシスは発生過程における正常な形態形成に不可欠であるほか、品質や機能が低下した細胞を除去するためにも誘導される。加齢に伴う組織の機能不全の原因の 1 つとして、品質が低下した細胞のアポトーシスによる細胞死があげられている。細胞死とは別に、ミトコンドリアの機能低下もまた、老化の一因と考えられており、これを立証するモデルとして mtDNA mutator mice が樹立されている。mtDNA mutator mice は、核 DNA にコードされた polymerase γ (POLG) という mtDNA 唯一の複製酵素の校正機能のみを欠損させたマウスであり、複製のたびに mtDNA にランダムな突然変異が蓄積していくとされている。このマウスでは、加齢に伴う mtDNA への突然変異の蓄積に伴って組織の呼吸機能が低下することや、細胞死の頻度が上昇することが報告されている。このため、mtDNA への突然変異の蓄積がミトコンドリアの機能低下を招き、これが細胞死を引き起こして老化の原因となっていることが示唆されているが、これらの間に実際に因果関係があるのか、あるいは単なる並行現象なのか、詳しいことはよくわかっていない。

そこで、本研究ではミトコンドリアの品質や機能の低下とアポトーシス、そして老化表現型の関連性を考察するため、mtDNA mutator mice におけるアポトーシス細胞数を野生型と比較して、組織間やマウス間の違いを検討し、先行研究で得られているミトコンドリア呼吸活性の低下の程度との相関を明らかにすること目的とした。

【材料】

mtDNA mutator mice は核 DNA にコードされた遺伝子に変異を有するマウスであるため、遺伝子型として野生型ホモ (+/+), ヘテロ (+/mut), 変異型ホモ (mut/mut) の 3 種類が存在する。本研究では、mtDNA mutator mice が早期老化症状を示す 8-10 か月齢時点における POLG +/+マウス、POLG +/mut マウス、POLG mut/mut マウスから摘出した肝臓、腎臓、心臓、脳を用いた。

【方法】

各マウスから摘出した組織をパラフィンに包埋し、そこから厚さ 10 μm の切片をスライドガラス上に作製した。それらの切片を用いて、アポトーシス後期に観察される断片化された DNA を検出できる TUNEL 染色を実施し、アポトーシス細胞核数を計測した。同時にアポトーシスを起こしていない正常な細胞核を 1% Methyl Green によって染色し、単位正常細胞核数あたりのアポトーシス細胞核数を算出することで、各組織間および各遺伝子型間でのアポトーシス頻度の比較を行った。

【結果】

POLG mut/mut マウスにおける POLG +/+マウスと比較したアポトーシス細胞核数の増加の程度は組織ごとに違いが生じていた。POLG +/mut マウスとの比較を含めた詳細な結果は発表会当日に報告する。

【展望】

さらに多くの臓器を採材し、ミトコンドリア呼吸活性の低下との相関の有無をより深く検証したい。また、ミトコンドリアの呼吸機能とアポトーシスの関係をより直接的に研究する目的で、ミトコンドリアの呼吸機能に基づいた活性染色が可能な凍結切片を用いた検証も検討したい。ミトコンドリアの呼吸活性と TUNEL 染色を同一切片上で実施できれば、実際にミトコンドリアの機能低下が起きている細胞で細胞死が誘導されているか否かを直接的に検証できるからである。こうした検証を実施することで、ミトコンドリアの呼吸機能と細胞死、ひいては老化表現型との関係性の理解につなげたいと考えている。

病原性ミトコンドリア DNA の蓄積による褐色脂肪組織の可塑性とグリコーゲン代謝の関連

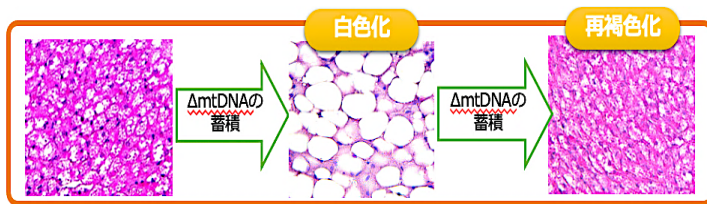
稲山 藍花 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは多くの生体機能に関与する細胞小器官である。ミトコンドリアの代表的な機能としては電子伝達系を介したATP産生が知られている。このミトコンドリアのATP産生にはATP合成酵素が用いられる。一方、ミトコンドリアは熱産生という重要な機能も担っている。このミトコンドリアの熱産生では、電子伝達系の経路を用いるものの、ATP合成酵素の代わりにUCP1というタンパク質が用いられ、結果的に、ATPではなく熱が産生される。この熱産生の機能は、全ての細胞に備わっているわけではなく、褐色脂肪組織 (BAT) のみがもつ特異的な機能であることが知られている。

脂肪組織は褐色脂肪組織 (BAT) と白色脂肪組織 (WAT) に大別される。一般的に脂肪と呼ばれる皮下脂肪や内臓脂肪は WAT であり、脂肪蓄積を主な役割としている。一方、BAT は脂肪分解による熱産生を担っており、ミトコンドリアが豊富であることが特徴である。興味深いことに、両者は生体環境に応じて互いの特徴を呈すること (可塑性) が知られている。例えば、WAT は寒冷刺激により褐色化 (BAT 化) し、逆に BAT は肥満や老化により白色化 (WAT 化) する生体適応現象が報告されている。

さらに所属研究室の先行研究において、ミトコンドリア DNA (mtDNA) への突然変異の蓄積が BAT の可塑性を生み出す可能性を示唆する結果が得られた。この先行研究では、大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) を全身に様々な割合で有するミトコンドリア病モデルマウス (Mito-mice Δ) が用いられている。 Δ mtDNA は野生型 mtDNA よりもゲノムサイズが小さいため複製上の利点を有し、加齢に伴ってその割合 (Δ 率) が上昇するという特徴がある。 Δ 率が上昇するとミトコンドリアの呼吸機能が低下し、全身に様々な悪影響を及ぼす。この先行研究では BAT の Δ 率が 50%前後まで上昇すると白色化し、さらに 70%以上まで蓄積することで「再褐色化」するという現象が報告された。



再褐色化した BAT は、組織学的には野生型の BAT と類似している。しかし、再褐色化した BAT を有する個体では体温が低下して熱産生機能に異常があると想定されることに加え、BAT における質量や呼吸機能の低下、ミトコンドリアのクリステの崩壊など、野生型の BAT と再褐色化した BAT には機能的・生化学的に異なる点が多く観察された。これにより突然変異型 mtDNA の蓄積が BAT の可塑性を生み出す要因の 1 つであることが示唆されたと同時に、野生型 BAT とは質的に異なる再褐色 BAT の存在が示された。しかしこのような可塑性を生み出すメカニズムに関しては未だ解明されていない。

BAT の可塑性について研究を進めるにあたり、私はグリコーゲン代謝に着目した。グリコーゲンは、重要なエネルギー源であるグルコースの貯蔵形態で、主な貯蔵器官として肝臓と筋肉があげられる。BAT はグリコーゲンの貯蔵器官としてはほとんど注目されていないが、プロテオーム解析 (後述) によりグリコーゲン代謝に関連する遺伝子の多くが発現しており、本来、肝臓特異的に発現する肝臓型グリコーゲン遺伝子の異所的発現も確認された。

そこで本研究では変異型ミトコンドリア DNA の蓄積を要因とする BAT の可塑性とグリコーゲン代謝の関連を明らかにすることを目的として研究を行った。

【材料】

5ヶ月齢前後の Mito-mice Δ 、ならびに、5ヶ月齢前後の野生型マウス (C57BL/6J マウス) から抽出した BAT を用いた。

【方法】

①プロテオーム解析

抽出した BAT の Δ 率を定量し、 Δ 率 0% (Δ 0)、 Δ 率 50%前後 (Δ low)、 Δ 率 70%以上 (Δ high) の 3 群に分類し、各群の BAT におけるタンパク質の発現と増減を解析した。

②PAS 染色

抽出した BAT におけるグリコーゲンの蓄積を観察するために、多糖類の染色方法として知られる PAS 染色を行った。PAS 染色に用いる切片は、抽出した BAT をホルマリン固定し、その後、パラフィン包埋し、作製した。顕微鏡観察した結果 (PAS 陽性染色) を ImageJ にて定量化し、比較解析した。

【結果】

プロテオーム解析の結果より、 Δ 率の変化に伴ってグリコーゲン関連遺伝子群の発現量に変動する傾向にあることがわかった。また PAS 染色の結果から、 Δ low 群の BAT ではグリコーゲンの蓄積が減少し、 Δ high 群のそれらにおいてグリコーゲンの蓄積が再び上昇する傾向が観察された。

【考察と展望】

本研究では、変異型 mtDNA の蓄積による BAT の可塑性においてグリコーゲン蓄積の変化を見出すことができた。今後は、BAT の可塑性におけるグリコーゲン代謝関連遺伝子の変化の生物学的な意義 (原因なのか、結果なのか) について探求したい。

Investigating the contribution of Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs) in zebrafish fin regeneration

佐藤 麻莉 (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)

Introduction

Living organisms have a great variety in many aspects, including in their capacity for regeneration. For example, zebrafish and amphibians, including salamanders and frogs, have a high ability to regenerate following injury. Unlike humans these animals are able to fully regenerate their tails and limbs partially de-differentiating cells near the injury site and driving them to re-enter cell cycles and redifferentiate.

Thus, investigating the processes which enable them to recover from injury with high quality, we aim to develop a way to induce higher quality of regeneration in humans.

In order to reach this goal, it is required to understand the mechanisms that permit these animals to have such high ability to regenerate. Recently, it was discovered that elevated reactive oxygen species (ROS) plays an essential role in regeneration. animals with high regenerative capacity^{1,2}. However, how ROS promotes regeneration and what are their downstream targets remain unclear.

The aim of my project was to investigate whether the family of Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs) might be critical downstream targets of ROS during regeneration. PTPs are known to be highly sensitive to changes in ROS levels, where increased ROS levels inhibit their activity, via oxidation of their catalytic cysteines. Since PTPs dephosphorylate the target of protein tyrosine kinases, PTPs act as inhibitors of many cellular processes required for regeneration, such as cell proliferation and signalling. Thus we hypothesise that elevated ROS inhibits the PTPs, so that cell signalling and proliferation can proceed unimpeded during regeneration in these organisms.

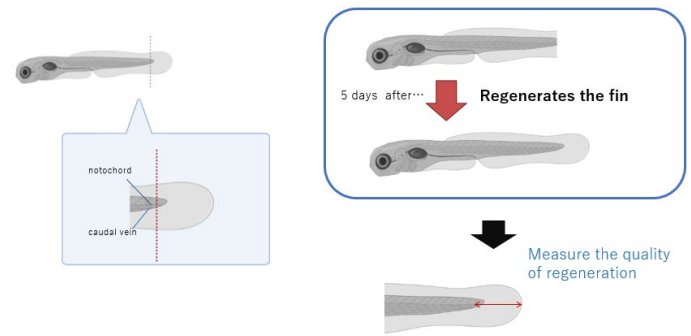
My aim was to test if PTPs are critical downstream targets of ROS during tail and fin regeneration in zebrafish. To address this aim, I investigated whether PTP mutants could rescue regeneration in larval tail regeneration assays.

Materials and Method

Three *ptp* mutants in zebrafish, which others had shown are oxidised during adult caudal fin regeneration³ were used in this study.

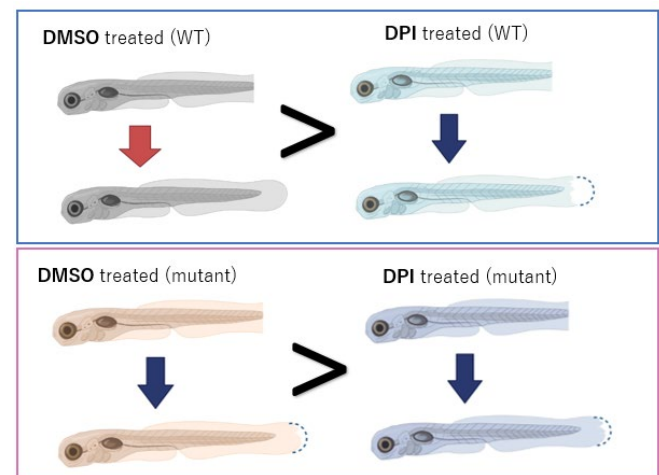
2-day old zebrafish larvae that were either WT, or had mutations in *ptpn1*, *ptpn9a* or *ptprea* had their distal tails amputated. Some of these larvae were treated from 1hr before and after amputation with either DMSO (control) or DPI, which inhibits ROS production.

The larvae were then imaged at 5 days post amputation and regeneration was assessed by measuring the length of the recovering tails.



Result

There was no significant differences in regeneration across the different genotypes, but DPI treated inhibited regeneration. Based on these results, we find that none these PTPs studied is sufficient to rescue regeneration in zebrafish larvae that has attenuated ROS production.



Discussion

My findings suggest that no individual PTP is sufficient to rescue regeneration in zebrafish larvae that has attenuated ROS production. However, it does not exclude the possibility that there are several PTPs that act downstream of ROS during regeneration. This possibility could be addressed in the future by performing similar experiments to the ones described here, but in compound mutant lines (i.e. zebrafish that are double or triple mutant for these *ptp* genes).

References

1. Love et al., (2013) Nat Cell Biol 15, 222–228.
2. Gauron et al., (2013) Sci Rep 3, 2084.
3. Wu et al., (2017) Sci Rep 7, 8460.

This research was conducted under the supervision of Professor Enrique Amaya of the University of Manchester through the exchange student program.

核内ミトコンドリア DNA 断片に関する基礎研究

井上 聡 (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)

詳細は発表会で報告する。

ミトコンドリア病モデルマウスを用いた加齢に伴う病態変遷に関する基礎研究

栗山 貴成 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石川 香 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは、外膜と内膜の二重膜を有する細胞小器官の1つであり、内膜に存在する呼吸酵素複合体による酸化的リン酸化反応によって生体エネルギーである ATP の大部分を産生している。また、ミトコンドリアは核 DNA とは異なるミトコンドリア DNA (mtDNA) と呼ばれる環状二本鎖構造のゲノムを細胞当たり数百から数千コピー有している。哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体を構成するサブユニットのうちの 13 種類の遺伝子と、それらの翻訳に必要な 2 種類の rRNA 遺伝子と 22 種類の tRNA 遺伝子がコードされている。

細胞や組織に含有される mtDNA に特定の病原性突然変異が生じ、このような分子種が優位に蓄積すると、ミトコンドリアにおける ATP 産生の低下や ROS の過剰生産といったミトコンドリアの機能異常が引き起こされ、ミトコンドリア病と呼ばれる代謝疾患が発症する。

mtDNA に生じる病原性突然変異は多数同定されている。興味深いことに、mtDNA 突然変異の種類ごとに一定の型がある、すなわち、変異種特異的な病型形成機構の存在が示唆されている。さらに、最近では、変異型 mtDNA がミトコンドリア病にとどまらず、糖尿病、神経変疾患、がん、不妊症、老化など、多様な病態表現型を誘導する可能性が提案されるに至っている。しかし、mtDNA に生じる突然変異の病原性はミトコンドリア呼吸機能の異常という共通の一次現象を原因とするため、なぜ変異型 mtDNA が変異種特異的な病型を形成できるか、さらには、どのようにして多様な病態を誘導するのか、といった根源的な命題は解決されていない。この命題に答えるためには、病原性突然変異型 mtDNA を導入したモデルマウスを樹立し、それらの病態解析を通して変異型 mtDNA 分子種特異的な病態発症機構を検証する必要がある。

このような状況の中、所属研究室では、mtDNA に突然変異を有するモデルマウスを複数樹立することに成功している。私は最近作製された mtDNA の tRNA 遺伝子領域に点突然変異をもつモデルマウスに注目した。tRNA 遺伝子領域は病原性突然変異のホットスポットとなっており、当該モデルマウスと相同な突然変異を有する患者例ではミオパチーや筋力低下をはじめとする筋障害や、高乳酸血症、および、呼吸酵素複合体 I の活性低下などを発症することが報告されている。

成熟期 (10 カ月齢) の当該モデルマウスにおける病態解析を行った所属研究室の先行研究では、肝機能の低下と共に肝重量の有意な増大や脂肪滴の蓄積が確認されており、脂肪肝を発症していると考えられた。一般に肝臓の病態は、脂肪肝から肝炎となり、肝線維化が重篤化することにより肝硬変へと遷移し、最終的には肝がんに至るとされている。すなわち、当該モデルマウスの加齢に伴って、肝臓の病態は脂肪肝からさらに遷移していく可能性が考えられる。しかし、10 カ月齢を超えたモデルマウスの病態解析は行われていないため、成熟期から老齢期にかけて病態の遷移があるのかということは明らかにされていない。

そこで本研究では、成熟期に病態が確認された肝臓に着目して老齢個体の肝臓の病態解析を行うことにより、tRNA 遺伝子領域の点突然変異を原因とする肝臓の病態が加齢に伴って変遷 (悪化) するか否かを検証した。

【方法】

10 カ月齢時点での当該モデルマウスの病態解析を行った先行研究では、tRNA 遺伝子領域の突然変異含有率が 50%未満の場合は目立った病態を示さず、突然変異率が 50%以上の場合にのみ、脂肪肝などの病態が現れることが示されている。そこで、本研究においても 4 週齢時の尾組織に含まれる変異型 mtDNA の割合に従い、下記の通り実験群を設定した。

	% Low	% High
変異型 mtDNA 含有率	< 50%	≥ 50%

① サンプルング

体重計測後の 20 カ月齢の当該モデルマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、肝臓を採取した。採取した臓器の重量を計測し、組織学的な解析のためのサンプルとした。

② 脂肪肝の有無

摘出した肝臓からパラフィン切片を作製し、HE 染色を行った。また、透過型電子顕微鏡による観察も行い、微小な脂肪滴の有無についても検討した。

③ 肝線維化の検証

摘出した肝臓のパラフィン切片を作製し、膠原繊維を赤染するピクロシリウスレッド染色を実施した。

【結果】

詳細な結果と考察については発表会にて報告予定である。

病原性ミトコンドリア DNA の蓄積が褐色脂肪組織の交感神経調節に与える影響

根岸 華月 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石川 香 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは細胞小器官の1つであり、呼吸酵素複合体 I ~ V を介した酸化的リン酸化反応によって ATP 産生を行っている。ミトコンドリアは独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を有し、細胞あたり数百~数千コピー存在している。哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体の構造遺伝子、これらの翻訳に必要な tRNA 遺伝子と rRNA 遺伝子がコードされている。所属研究室では、このミトコンドリアの機能が低下したモデルマウス Mito-mice Δ の樹立に成功している。Mito-mice Δ のミトコンドリアには野生型 mtDNA のほかに大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) が含まれており、各組織・各細胞で Δ mtDNA が 70~80% 以上蓄積すると 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。

この Mito-mice Δ では褐色脂肪組織 (BAT) にも異常が現れる。BAT はミトコンドリアを豊富に含む組織であり、UCP1 タンパク質を用いて熱産生を行い生物の体温調節に重要な役割を果たす。所属研究室の先行研究から、Mito-mice Δ における BAT では Δ mtDNA の蓄積に伴いダイナミックで可塑的な変化が誘導されていることが明らかとなった。例えば、Mito-mice Δ では Δ mtDNA が 50% 程度蓄積すると、野生型マウスと比較して UCP1 の発現が低下し BAT が白色化するが、さらに 70% 以上蓄積すると、UCP1 の発現が再び上昇し白色化した BAT が再褐色化するのである。このように、 Δ mtDNA が 70% 以上蓄積し再褐色化した BAT は、組織学的には野生型 BAT に似ているが、熱産生能など生化学的な部分で異常が見られ、体温が低下している。このような Mito-mice Δ の Δ mtDNA 蓄積に伴う BAT の変化は非常に興味深い、その機構の解明には至っていない。

BAT の機能制御システムは「内因性制御」と「外因性制御」に大別できる。内因性制御は、熱産生などの BAT 特異的な遺伝子の発現調節を指し、BAT の恒常性維持の根幹を担う。一方、外因性制御は、寒冷刺激や食餌などを指し、これらは BAT をほぼ独占的に神経支配している交感神経によって UCP1 の発現制御や BAT の機能調節が行われている。BAT を外科的あるいは化学的に脱神経すると BAT の過形成や白色化が起こることが分かっており、交感神経系は脂肪細胞の褐色状態の維持に重要な要素であると言える。

本研究では、Mito-mice Δ の BAT のプロテオーム解析結果をもとに、Mito-mice Δ で観察される Δ mtDNA 蓄積に伴う BAT の可塑的な変化に関連する因子を探索し、特に交感神経系の調節との関連について解析した。

【材料】

- 野生型マウスから抽出した BAT ($\Delta 0$)
- Mito-mice Δ BAT; Δ mtDNA 含有率 50% 前後 (Δ low)
- Mito-mice Δ BAT; Δ mtDNA 含有率 70% 以上 (Δ high)

【方法】

- プロテオーム解析

各マウス群から抽出した BAT で発現しているタンパク質の種類や量の変化を調べるために、プロテオーム解析を行った。その後、解析結果から各マウス群の BAT で発現しているタンパク質にどのような特徴があるかを調べた。

- チロシンヒドロキシラーゼの免疫組織化学染色

各マウス群から抽出した BAT からパラフィン切片を作製し、ノルアドレナリン線維を同定するためのマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) を一次抗体として免疫組織化学染色を行った。

【結果・考察】

- プロテオーム解析

BAT 特異的に発現する代表的なタンパク質群について、 $\Delta 0$ 、 Δ low、 Δ high の BAT では発現量に有意差は観察されなかった。この結果から、先行研究で報告された Mito-mice Δ でみられる BAT の白色化・再褐色化といった可塑的な変化には、既知の内因性制御とは別の機構が関与している可能性が示唆された。

- チロシンヒドロキシラーゼの免疫組織化学染色

Mito-mice Δ の BAT は、 Δ mtDNA の蓄積に伴い TH 密度が変化する傾向がみられた。この結果から、先行研究で報告された BAT の可塑的な形態変化や生理的な変動には、交感神経系が関与している可能性が示唆された。

詳細の結果については発表会にて報告する予定である。

【展望】

本研究から、Mito-mice Δ の Δ mtDNA 蓄積に伴う BAT の変化と交感神経系には関連があることが分かった。今後は化学的除神経等で交感神経系を減少させた Mito-mice Δ の体温や BAT の観察を行い、Mito-mice Δ の BAT と交感神経系の因果関係を実験的に立証したいと考えている。また、Mito-mice Δ の Δ mtDNA 蓄積に伴う BAT の変化と交感神経系の関係性を明らかにすることで、ミトコンドリア機能異常による臓器連関と病態制御に関するにもたらす影響について理解を深めていきたい。

持久性運動がミトコンドリア病モデルマウスの骨格筋に及ぼす影響

花田 翔 (筑波大学 生物学類)

指導教員：石川 香 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞小器官の一種であるミトコンドリアは内膜と外膜からなる二重膜構造をしており、内膜上に存在する呼吸酵素複合体による酸化リン酸化反応によって、生命活動において必要不可欠な ATP の大部分を合成している。ミトコンドリアは核 DNA とは異なる環状二本鎖構造の独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) を有しており、ミトコンドリア内膜上の呼吸酵素複合体を構成する構造遺伝子、rRNA、tRNA がコードされている。

通常、mtDNA は 1 細胞あたり数百～数千コピー存在しているが、病原性突然変異が生じた mtDNA が高い割合で蓄積した場合、ミトコンドリア呼吸機能の低下に伴って主として ATP 要求性の高い神経や筋組織において多様な病態が引き起こされる。こうしたミトコンドリアの機能不全によって発症する全身性の代謝疾患を、ミトコンドリア病と呼んでいる。

現在、ミトコンドリア病は指定難病に分類されており、有効な治療法が十分に確立されていない。このような中、ミトコンドリアに異常のない健常者において持久性の運動はミトコンドリア機能を向上し、糖尿病や神経変性疾患といった疾患のリスクを低減するという研究報告がある。こうした報告を根拠として、ミトコンドリア病における運動療法の有効性が提案されている。

mito-mice Δ は大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) を野生型の mtDNA と共に含有するミトコンドリア病モデルマウスであり、ミトコンドリア呼吸機能低下に起因して低体重や骨格筋萎縮、高乳酸血症、腎障害といった全身性の多様な病態が誘導される。そこで本研究では、ミトコンドリア病に対する有効な治療法を探索するため、mito-mice Δ を用いて持久性の運動トレーニングによる影響を調べることにした。

本研究は、令和 4 年度筑波大学動物実験委員会によって承認を得て実施したものである。

【材料・方法】

本研究では、野生型 B6 マウス 6 匹 (WT 群)、変異率 10% 前後の mito-mice Δ 6 匹 (LOW 群)、変異率 60% 前後の mito-mice Δ 6 匹 (HIGH 群) を用いた。mito-mice Δ の群分けの際は、4 週齢時点の尾において定量した Δ mtDNA 含有率を基準とした。これら 3 群において、それぞれ半数の 3 匹に対して水泳による運動トレーニングを実施した。以下、運動トレーニング実施群を「運動群」、運動トレーニング非実施群を「対照群」とする。

運動群に対して、1 時間/日 \times 5 日/週 \times 4 週間の頻度で水泳による運動トレーニングを実施した。mito-mice Δ について、変異率の高い個体は平均して生後 6 ヶ月以降、重篤なミトコンドリア病の症状を発症してしまうため、生後 6 ヶ月より早い時期に実験を終了させる必要がある。そのため、運動トレーニングは 4 ヶ月齢時点から開始した。

運動トレーニング期間終了後、運動群と対照群のマウス全個体に対して、頸椎脱臼により安楽死させたのち、ヒラメ筋、足底筋など複数の下肢の骨格筋を摘出した。採取した骨格筋サンプルに

対し、湿重量の測定、mRNA 発現量の定量、 Δ mtDNA 含有率の定量を実施した。mRNA の発現量に関しては、ミトコンドリア生合成・呼吸機能の主要制御因子とされる PGC-1 α 、mtDNA の転写を促進するミトコンドリア転写因子 A (Tfam)、TCA 回路において律速酵素として機能するクエン酸合成酵素 (Cs) などについて解析を実施した。

【結果】

骨格筋湿重量について、WT-運動群のヒラメ筋において増加傾向が確認された一方で、LOW-運動群のヒラメ筋においては有意な減少が確認された。HIGH-運動群のヒラメ筋においても減少傾向が確認された。

また、PGC-1 α 、Tfam、Cs などミトコンドリア生合成やミトコンドリア呼吸機能に関与する遺伝子の発現については、 Δ mtDNA 含有率に関わらず運動群のヒラメ筋において発現量が増加傾向にあった。

【考察・展望】

一般的に運動トレーニングはミトコンドリア呼吸機能を向上させることが知られている。しかし、大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) を含有する mito-mice Δ では、運動トレーニングによってミトコンドリア生合成に関与する遺伝子の発現に増加傾向が確認された一方で、骨格筋湿重量の減少が確認された。つまり、ミトコンドリア呼吸機能に異常を有するマウスにおいて、ATP 要求量に対して ATP 産生量が十分でないために骨格筋タンパク質の分解が起こった可能性がある。これによって運動トレーニングによるミトコンドリア生合成促進効果が相殺されたうえ、さらにはミトコンドリア病の症状を悪化させてしまった可能性が考えられる。

しかしながら、現段階では mito-mice Δ における運動負荷が骨格筋湿重量を減少させる傾向は確認されているものの、有意差は認められていない。つまり、ミトコンドリア病患者における運動療法の有効性については未だ疑問が残っている状況である。ミトコンドリア病モデルマウスにおいて持久性運動による代謝調節の分子の手がかりを理解することは、代謝性疾患とミトコンドリアの関連性を解明していく上で重要である。そのため、実験個体数を増やして有意性の検証を進めていく必要がある。また、運動強度や期間を見直していくとともに、継続的な血中乳酸値の測定やミトコンドリア生合成に関与する遺伝子のさらに詳細な解析を実施し、分子基盤の解明を進めていきたいと考えている。

がん細胞の転移・増殖に寄与するミトコンドリアゲノム変異の探索

重松 夏帆 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石川 香 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは内膜および外膜からなる二重膜を有する細胞小器官である。内膜には呼吸酵素複合体 I ~ V が存在しており、酸化リン酸化反応によって生命活動に必要な ATP の大部分を産生している。また内膜の内側 (ミトコンドリアマトリクス) には、核 DNA とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞あたり数百から数千コピー存在している。また mtDNA には複合体 II を除く複合体の一部を構成する構造遺伝子と、その翻訳に必要な rRNA および tRNA がコードされている。

mtDNA は核 DNA に比べて突然変異を蓄積しやすく、がん化した細胞では正常細胞と比較して mtDNA の突然変異がより高頻度に見つかることから、mtDNA の突然変異は細胞のがん化やがん化した細胞の性質に影響を及ぼしうると考えられてきた。一方で、mtDNA が母性遺伝するのに対し、母性遺伝するがんの存在は疫学的に証明されておらず、この説に対する反証も多く、長らく議論の対象となってきた。

所属研究室の先行研究では、独自の細胞質移植技術を用い、C57BL/6 (B6) 系統のマウス由来の肺がん細胞で、転移能が異なる 2 種類の細胞の核 DNA と mtDNA の組み合わせを入れ替えることにより、この細胞の転移能が核 DNA ではなく、mtDNA の突然変異に起因することが明らかとなった。転移能の原因になるとされた mtDNA の突然変異は、呼吸酵素複合体 I のサブユニットを構成する構造遺伝子にアミノ酸置換をもたらすものであったが、この突然変異の他にも、がん細胞の転移および増殖に関与し得る mtDNA 突然変異が存在する可能性は十分に考えられる。

哺乳類の mtDNA の唯一のポリメラーゼであるポリメラーゼ γ (PolG) には複製機能と校正機能が備わっている。PolG の校正機能を欠損したマウス (mtDNA mutator mouse) では、mtDNA の複製が起こる際に後天的にランダムな突然変異が生じ、加齢に伴って mtDNA に多様な変異が蓄積していくとされている。この校正機能をホモ (mut/mut) またはヘテロ (+/mut) で欠損した個体では、それぞれ重度および軽度の呼吸機能の低下が認められるが、野生型ホモ (++) の個体では突然変異の蓄積は起こらないため、正常な呼吸機能が維持される。しかし、+/mut 同士の交配から生まれる個体には、母親の体内で蓄積した mtDNA 変異の一部が Germline を通じて伝達されるため、代々+/mut 同士の交配によって維持された系統から得られる++のマウスには、通常野生型マウスと比較して多くの mtDNA 突然変異を蓄積していると考えられる。

そこで本研究では、特に高い転移能を示したクローンの転移巣から回収した細胞を *in vitro* で再培養し、これらの細胞の塩基配列を解析することで、がん細胞の転移・増殖に寄与し得る mtDNA 突然変異の同定を目指すことを目標とする。

【材料】

所属研究室で 10 年以上前に樹立され、代々+/mut 同士の交配で維持されてきた PolG マウスの系統から 3 ヶ月齢の+/+マウスを mtDNA ドナーとして用いた。

【方法】

(1) サイブリッド細胞の作製

mtDNA ドナーの+/+マウスより採取した血小板 (無核で mtDNA を有する) を、mtDNA を完全に欠損した野生型 B6 マウスに由来するがん細胞 (P29 細胞) と融合させることによって、核は P29 細胞に由来し、mtDNA が+/+マウス由来である細胞質雑種 (サイブリッド; P29mt+/+) を複数クローン作製した。また、コントロールとして B6 マウスの mtDNA をもつ細胞 (P29mtB6) を用いた。

(2) 解析による腫瘍形成能・転移能の評価

樹立された複数クローンのサイブリッドをマウスの皮下に移植して腫瘍形成能を、また尾静脈から移植して転移能を、それぞれ評価した。その結果、同一個体の mtDNA を有するにも関わらず、クローン間で造腫瘍性・転移能に大きな違いがあることが明らかになった。そこで、特に造腫瘍性や転移能が高かったクローンについて、移植に用いた親株と共に、形成された腫瘍や転移巣から得た細胞を *in vitro* で再培養した細胞について、mtDNA の塩基配列を次世代シーケンスによって解析し、コントロールである P29mtB6 細胞と比較することで、造腫瘍性や転移能の発現に繋がり得る変異候補を探索した。

【結果】

P29mtB6 細胞と違いが認められた変異のうち、ヒト mtDNA の突然変異のデータベースである MITOMAP に登録されている病原性の突然変異と相同の変異を探索した結果、D-loop 領域に存在する 15930 番目の塩基に、各クローンにおいて 80~99% という高い割合で遺伝子変異が存在していることが明らかとなった。

その他の結果の詳細については、発表会にて報告する。

【考察・今後の展望】

今回発見された、増腫瘍性および転移能を有する細胞群で見られた変異は、がん細胞の転移・増殖に寄与する可能性がある。

しかし腫瘍形成能や転移能が mtDNA ではなく、核 DNA の変異によってもたらされている可能性も現時点では排除できない。そのため、将来的には先行研究で実施されたような mtDNA の交換を行うことで、腫瘍形成能および転移能が mtDNA 変異によるものであることを証明する実験が必要となるだろう。

ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットとしての TLE1 の機能解析

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

【背景・目的】

TLE1 は遺伝子発現のコリプレッサーや NF- κ B シグナル伝達のリプレッサーとして機能することが知られている[1, 2]。その一方で、TLE1 は E3 ユビキチンリガーゼの基質認識に寄与する WD40 ドメインを有し、CUL4-DDB1 複合体と相互作用することも示されている[3]。しかし、CUL4-DDB1-TLE1 複合体が実際にユビキチンリガーゼとしていつ、どの組織で、何を標的とするかに関してはよく分かっていない。

CUL4-DDB1-TLE1 複合体のユビキチンリガーゼとしての機能を調べるにあたって、まずは、TLE1 を過剰発現させただけで CUL4 および DDB1 と複合体を形成するか否か調べることにした。そこで、DDB1 と相互作用することが既に知られている L2DTL を比較対象として、培養細胞内で TLE1 ないしは L2DTL を DDB1 と同時に過剰発現させた場合の相互作用の違いを調べた。

【材料・方法】

HA-DDB1 プラスミド、FLAG-L2DTL プラスミド、および FLAG-TLE1 プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションして過剰発現させた。その後、細胞を回収しタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質溶液のうち一部を lysate のサンプルとして回収した。また、残りの溶液から anti-FLAG mouse 抗体ビーズを用いて FLAG-L2DTL ないしは FLAG-TLE1 と相互作用するタンパク質を免疫沈降した。

回収した lysate および免疫沈降後のサンプルについてウエスタンブロットを行い、HA タグもしくは FLAG タグを抗体標識してシグナルを観察した。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【展望】

TLE1 はリン酸化および過剰リン酸化修飾を受けて、他のタンパク質との相互作用の強さを変えること、さらにはそのような変化が発生時の神経の分化に影響を与えることが示されている[4]。今後はこの性質に着目して、TLE1 のリン酸化状態が CUL4-DDB1 複合体との相互作用の強さにどのような影響をもたらすかを調べる。

そのために全長の TLE1、各ドメインの欠損タンパク質、ならびにアミノ酸置換タンパク質を用意し、それぞれについて DDB1 との相互作用の強さを比較する。DDB1 との相互作用に寄与するようなドメインやリン酸化サイトを絞れたら、そのサイトに作用するキナーゼあるいはホスファターゼの有無により TLE1-DDB1 間の相互作用の強さが変化するか調べる。なお、その際にはウエスタンブロットによる定性的な解析だけでなく、熱力学的な手法を組み合わせて定量的に解析することを目指す。

一方、TLE1 が認識する基質として Tbx6 という転写因子に注

目している。哺乳動物の発生時には Tbx6 の分解が Ripply2 というリプレッサーによって促進される[5, 6]。そして、Ripply2 には TLE1 と相互作用するドメインと Tbx6 と相互作用するドメインがそれぞれある[6]。これらの性質から TLE1 が Ripply2 依存的に Tbx6 を基質として認識する可能性が考えられる。そこで、TLE1 が実際に Ripply2 および Tbx6 と一つの複合体を形成するか否か明らかにするために、Ripply2、Tbx6、および TLE1 の組換えタンパク質を調製してそれらを混合し、複合体形成が起こるか調べる。

【参考文献】

- [1] Barbara H. Jennings & David Ish-Horowicz; *Genome Biology* 9 (1); 205 (2008)
- [2] Elaine R. Nimmo, Craig Stevens, Anne M. Phillips, Amanda Smith, Hazel E. Drummond, Colin L. Noble, Michael Quail, Gail Davies, Marian C. Aldhous, David C. Wilson, & Jack Satsangi; *Gastroenterology* 141 (3); 972-981.e1-2 (2011)
- [3] Leigh Ann Higa, Min Wu, Tao Ye, Ryuji Kobayashi, Hong Sun, & Hui Zhang; *Nature Cell Biology* 8 (11); 1277-1283 (2006)
- [4] Hugh N. Nuthall, Kerline Joachim, & Stefano Stifani; *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 24 (19); 8395-8407 (2004)
- [5] Wei Zhao, Rieko Ajima, Youichirou Ninomiya, Yumiko Saga; *Developmental Biology* 400; 105-117 (2015)
- [6] Wei Zhao, Masayuki Oginuma, Rieko Ajima, Makoto Kiso, Akemi Okubo, Yumiko Saga; *eLife* 7; e33068 (2018)

繊毛虫テトラヒメナにおけるアクチン再編成とキネシン-2 メンバーKIN2 の解析

金丸 晴香 (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

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* は、全ゲノム解析が完了していることや、培養、遺伝子改変の容易さから、モデル生物として細胞生物学の分野においてよく用いられている真核単細胞生物である。アクチン繊維や微小管は、真核生物に普遍的にみられる細胞骨格構造で、細胞内の物質輸送や細胞分裂など重要な生命活動を支えている。キネシンは微小管に沿ってATPを加水分解しながら運動する性質を持ち、物質輸送や細胞分裂に関わることが知られているモータータンパク質である。

T. thermophila は、アクチン繊維の形成を阻害する薬剤であるラトランキュリンA (LA) に対して、処理後短時間のうちに耐性を獲得する。その際、細胞内輸送に関わるキネシン-2 メンバーKIN2 の発現量が増加することが分かっているが、実際にKIN2が細胞のLA耐性能の獲得に必要なか、また細胞のどこに局在してどのような働きをするのかは不明である。そこで本研究は、KIN2 の働きを阻害するとLA耐性能の獲得どのような影響が出るのか、LAで処理をした際にKIN2がどこに局在するのか、調べることを目的として行った。

実験方法

1. 遺伝子導入

本研究では、*T. thermophila* (B2086 株) を用いて3種類の形質転換体を作成した。まず、①KIN2 のC末端側にGFPの遺伝子を連結したプラスミド、②①のプラスミドのKIN2の配列にR213A変異をいれたモーター活性阻害用のプラスミド、③KIN2の翻訳領域をGFPと置換した遺伝子破壊用のプラスミドを作製した。次に、これらの遺伝子導入を導入するため、制限酵素処理を行ってDNA断片を作成した。そして、各DNA断片を金粒子に付着し、遺伝子銃で細胞に打ち込んだ。遺伝子導入が成功した細胞のセレクションは、パロモマイシン耐性を指標に行った。②のプラスミドを使った形質転換体については、ゲノム抽出後、シーケンス解析により、変異が正しく導入されていることを確認した。②、③のプラスミドを使った形質転換体については、単一細胞分離による細胞株の樹立を行った。

2. KIN2の局在観察

先行研究により、細胞内でKIN2は通常時ほとんど発現をしていないが、飢餓誘導、LA処理によって発現が著しく上昇することが分かっている。そのため、飢餓誘導24時間後、またはLA処理2時間後に①と②の形質転換体を蛍光顕微鏡で観察した。

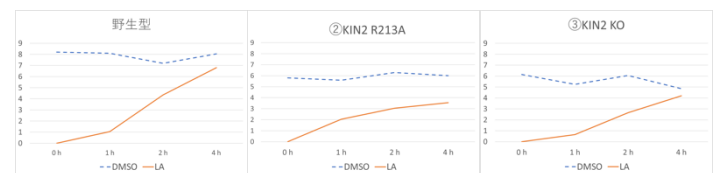
3. 食胞形成の確認実験

対数増殖期の *T. thermophila* の野生株、及び②と③の株を30°Cで培養し、LAで処理をした。一定時間後に墨汁を細胞液に対して1/100量加えて、形成された食胞を可視化した。その後、ホルマリンで細胞を固定し、1細胞あたりに形成された食胞数を計測した。

結果・考察

野生株とKIN2の働きを阻害した細胞でLA処理後の食胞形成数を比較した(下図)。②のKIN2のモーター活性が阻害されている細胞(KIN2 R213A)や、③のKIN2の遺伝子をノックアウトした細胞(KIN2 KO)は、野生型細胞と比べて薬剤処理前から食胞形成能が低い傾向があった。また、②KIN2 R213Aの細胞では、食胞形成能の回復が遅い傾向が見られた。以上より、KIN2は食胞形成やLA耐性能の獲得に関わっている可能性が示唆された。

また、KIN2が属するキネシン-2サブファミリーのメンバーは、他のキネシン-2メンバーとの間でヘテロ二量体を形成する(Scholey, 2013)。テトラヒメナにおける先行研究では、KIN2は、同じキネシン-2のメンバーであるKIN1と協力して働くことが示されているが、実際にKIN1とKIN2がどのような相互作用をしているのかは分かっていない(Brown et al., 1999)。今回、②KIN2 R213Aを導入した細胞では、③KIN2 KOの細胞よりも食胞形成能の回復の遅れがみられた。そのため、KIN2が存在しない時はKIN1などの別のキネシン-2メンバーが協力して食胞形成能の回復に関わる可能性や、モーター活性が阻害されたKIN2は他のキネシン-2メンバーとヘテロ二量体を形成してしまい、その運動性をドミナントに阻害している可能性が推察された。



今後の課題

食胞形成能の回復を調べる実験は、1度しかデータを取得していないため、再現性を確かめるための追試を行う必要がある。また、コントロールとして野生型の細胞だけでなく、遺伝子導入の操作やKIN2の遺伝子のC末端側にGFPを付加した影響などを考慮するために、コントロールとして①の株を使用して実験を行いたい。一方、KIN2の局在については、蛍光顕微鏡で蛍光を観察することができなかった。そのため、抗GFP抗体を用いた抗体染色でシグナルを増強して観察するなどの工夫を考えている。そして、KIN2と協力して働く遺伝子産物は何なのか、KIN2は何を運んでいるのか、ウェスタンブロッティングにより結合蛋白質を分離し、質量分析などの方法で調べたい。さらに、KIN2の普段の働きについては不明な点が多いため、今回作製した遺伝子組換え体を使って明らかにしたいと考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導頂いた中野先生をはじめとする中野研究室の皆様へ心から感謝申し上げます。

分裂酵母の胞子形成に関わる CDK/cyclin の分子構造解析

森山 直人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

真核生物の細胞周期は、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) とサイクリンの複合体による制御が広く保存されている。CDK はサイクリンと結合することで触媒作用を発揮し、サイクリンはそのターゲット特異性を決定する。CDK/cyclin 複合体は細胞周期の制御において中心的な機能を担っていることがよく知られているが、それ以外の生命現象にも関与する事例が多数報告されている。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、多くの細胞分裂の制御因子についての機能が解明されているモデル生物である。この生物には 8 種類の CDK が存在し、そのうちの Cdc2 が細胞周期を制御する主要な CDK として働いている。これ以外の 7 種類の遺伝子は細胞周期制御に必須ではない。

本研究では、分裂酵母の CDK のうち、Pef1 に着目した。Pef1 は、その遺伝子破壊株の表現型から、オートファジー、接合、減数分裂、コヒーシンの制御に関与していることが示唆されている。Pef1 は Cdc2 とアミノ酸配列の相同性が 52% であり、その立体構造は良く似ている。また、Pef1 は 3 つのサイクリン (Pas1, Clg1, Psl1) と結合することが報告されており、少なくともそのうちの 1 つは Cdc2 とも結合する。Pef1 と Cdc2 は、サイクリンをどのように区別し、細胞内で異なる機能を発揮しているのだろうか。この疑問を解決するため、私は Pef1/Cyclin 複合体の構造に注目した。本研究では、まず Pef1/Cyclin 複合体の構造を計算で予測した。そして、Pef1/Psl1 複合体について、その構造から結合に必要なと予想されるタンパク質の部位とそれを構成する重要なアミノ酸残基を予測し、変異型タンパク質を設計した。それらを野生型タンパク質を用いて、サイクリンとの結合性をプルダウン・ウエスタンブロット実験によって評価することで、相互作用に必要な結合部位の決定を試みた。

【方法】

① タンパク質発現プラスミドの作製

分裂酵母の *pef1+* や *psl1+* を発現するプラスミドを作製するため、GST あるいは strep タグを持つ pASG-IBA123 ベクターに、これらの遺伝子のコーディング領域を組み込んだ。そして、GST-Pef1、及び Psl1-strep を発現するようにした。

Psl1 の部位欠損、及び特定のアミノ酸残基の欠失する変異型遺伝子の作製には、inverse PCR 法を用いた。

② プラスミドの形質転換、タンパク質の抽出

作製したプラスミドを大腸菌 BL21 株に形質転換した。得られた形質転換体を培養し、tetracycline で外来タンパク質の発現を誘導した。集菌後、超音波破碎によってタンパク質を抽出した。

③ プルダウン・ウエスタンブロット実験

Psl1-strep のタンパク質抽出液と GST-Pef1 のタンパク質抽出液を混合し、4°C で一晩転倒混和した。この混合液にグルタチオンセファロースを加え、2 時間転倒混和した。これを洗浄バッファ

ーで 4 回ウォッシュし、これを SDS-PAGE、strep 抗体による抗体反応で結合を比較した。

【結果・考察】

詳細な結果については発表会にて報告する。

大脳皮質層形成における USP15 の役割の解明

植松 雪乃 (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】

哺乳動物の大脳皮質は、胎児期に神経細胞が産生され、その後、特定の位置まで移動して大脳皮質の基本構造が形成される。その後、神経回路網の形成やグリア細胞の増殖、細胞外マトリックスの構築によって、大脳皮質は徐々に厚みを増していく。この脳の発達に伴う皮質層変化に関連して、所属研究室では脱ユビキチン化酵素 USP15 のノックアウト (KO) マウスでは、大脳皮質層が薄くなることを見出している。USP15 は標的の脱ユビキチン化を介してストレス応答や細胞増殖など種々の経路を調節することが示唆されている。しかし、なぜ USP15 の異常によって大脳皮質が薄くなるのか、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで本研究では、USP15 がどのようにして正常な大脳皮質の層形成を制御しているのか明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

(1) 免疫組織染色

生後 7 日の野生型 (WT) マウス、USP15 KO マウスを 4% PFA/PBS で灌流固定後、脳を 4%PFA/PBS 中で一晩浸透させた。その後、30%スクロース/PBS に置換し、30%スクロース/OTC (1:1) で包埋後、クライオスタットで 40 μ m の凍結切片を作成した。染色には抗 TBR1 抗体 (1:500, abcam) と Hoechst33342 (1:10000, Invitrogen) を用いた。

(2) His-pull down アッセイ

His-ユビキチン、HA-TBR1、FLAG-USP15 を過剰発現させた培養細胞 (HEK293T) 回収後、細胞液を分割し Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) にて溶解 (①) または Extraction buffer (6M guanidinium-HCl, 50 mM sodium phosphate buffer [pH 8.0], 300 mM NaCl, 5mM imidazole) を添加後に 40 秒間超音波破碎 (②) し、①を Input としてサンプル化した。②に対して His に特異的に結合する Talon metal affinity resin (Clontech) を添加後、室温で 3 時間ローテーションした。洗浄バッファー (50 mM sodium phosphate buffer [pH 8.0], 300 mM NaCl, 5mM imidazole) により 3 回洗浄した後に 250 mM imidazole を加えて溶出させサンプル化した。両者のサンプルをウエスタンブロッティングにより解析した。

(3) ウエスタンブロッティング

生後 3.5 日、および二か月齢の WT、および USP15 KO マウスの脳を Lysis buffer 中でホモジナイズし、14,000 rpm で 5 分間遠心後、上清をサンプルとし、Bradford 法によりタンパク量を定量した。サンプルは 4 \times Sample buffer (125 mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 10% Sucrose, 0.01% Bromophenol blue, 10% 2-Mercaptoethanol) を添加した後、100 $^{\circ}$ C で 3 分間ボイルした。SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Ethanol) を用いて、ポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜へ 100V で 60 分間転写を行った。PVDF 膜は、2.5-5%スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl, 150 mM

NaCl, 0.1%Tween20) によりブロッキング後、5%BSA/TBS-T で希釈した一次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。一次抗体には、抗 TBR1 抗体 (1:1000, abcam)、抗 USP15 (1:1000, CST) 抗体、抗 Tubulin 抗体 (1:100000, SIGMA) を用いた。その後、TBS-T で洗浄し、5%スキムミルク/TBS-T に 1/20000 で希釈した二次抗体を 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄し、PVDF 膜をケミルミワ Super (nacalaitesque) で検出した。

【結果・考察】

USP15 KO では、大脳皮質の第 V・VI 層が特に薄くなっていたことから、これらの層の神経細胞で発現する転写因子 TBR1 に着目した。TBR1 は第 VI 層神経細胞で強く発現し、複数の遺伝子の転写活性化を介して大脳皮質形成に対し重要な役割を担う [1]。また、USP15 KO と同様、TBR1 の KO マウスも皮質層が薄くなる [2]。USP15 も第 V・VI 層近傍で発現量が高いことから、TBR1 が USP15 の標的である可能性が考えられた。そこで、大脳皮質における USP15 の TBR1 への影響を確認するため、免疫組織染色を行った。USP15 KO マウスでは WT と比較し、TBR1 陽性細胞の密度が低下していた。また、USP15 KO マウスでは、第 VI 層と第 V 層の境界領域における TBR1 の発現に異常が観察された。以上の結果から、実際の脳組織において、USP15 によって TBR1 の発現が制御されていることが示唆された。

次に、USP15 がタンパク質レベルで TBR1 の発現量を調節するか、WT および USP15 KO マウスのウエスタンブロッティングを行った。その結果、生後 3.5 日の脳では、USP15 KO マウスにおける TBR1 のタンパク質レベルが減少しており、二か月齢のマウス脳では、USP15 KO におけるユビキチン化様のシグナルがより強く観察された。また His pull down アッセイの結果から、USP15 が TBR1 の脱ユビキチン化を促進することが示唆された。以上の結果から、USP15 は脳組織において TBR1 の翻訳後修飾を制御し、その機能が幼少期と成人期とで変化していることが示唆された。

WT と USP15 KO の大脳皮質層の厚みの差は、生後徐々に顕著となり、生後 1 か月前後で有意な差が認められる。TBR1 は神経細胞で特異的に発現する転写因子であり、USP15 KO では幼少期において TBR1 のタンパク量が減少していた。これらのことから、USP15 が TBR1 のタンパク量を維持することによって下流の標的因子の発現が適切に調節され、その結果、大脳皮質深層における脳内環境が適切に制御され、正常な大脳皮質が形成される可能性が考えられた。今後、大脳皮質層が薄くなる表現型がどのようなメカニズムによってもたらされているのか、大脳皮質深層における細胞種ごとの密度の定量などを行う予定である。

【参考文献】

- [1] F. Bedogni *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (29) 13129-13134, 2010
- [2] S. Nambot *et al.*, *Eur J Hum Genet*, 28 (6) 770, 2020

脳の発達過程における cGAS とミクログリア多様性の関連

平木 智尋 (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

脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、胎仔期から出生後にかけて機能や形態が大きく変化する。出生直後は突起が少なくアメーバ状の形態を示し、死細胞の貪食などを行うのに対し、発生が進むにつれ突起を伸ばし、シナプスの刈り込みなど正常な神経回路形成に必須の機能を担う。これまでに所属研究室では、発生過程の脳における神経細胞が微小核という構造を形成し、この微小核の伝播によって発達期ミクログリアの形質が制御されることを見出している。微小核はDNAを含む微細な核様構造であり、先行研究において cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) を活性化することが報告されている。cGAS は細胞質の外來二重鎖DNAを感知し、自然免疫経路である cGAS-STING経路を活性化することで、I型インターフェロンの発現を誘導する。微小核を受け取ったミクログリアでは、発生が進んだ段階においても、周囲のミクログリアとは異なりアメーバ状の形態を示すとともに、脳実質外に存在する境界関連マクロファージ (BAMs) のマーカーであるCD206 の発現が上昇する。このことから、微小核は cGAS を介したミクログリアの新しい制御因子であると考えられることができる。しかしながら、微小核によって活性化された cGAS がミクログリアの形態を制御するメカニズムは、明らかとなっていない。そこで本研究では、cGAS の活性化によるミクログリアの制御メカニズムの解明を目的とした。

実験方法

(1)パニング法

抗IgG抗体、および抗CD11b抗体でコーティングしたペトリディッシュを前日に作成した。生後 14日の野生型およびcGASノックアウトマウスをPhosphate-Buffered Saline (PBS) で灌流し、脳を摘出した。その後、脳にDulbecco's PBS (DPBS)にカルシウムとマグネシウムを加えた溶液 (DPBS+/+) を加え、ホモジェナイズした。ホモジェナイズ溶液に 90% Percoll/dPBSを加え、1500 rpmで15分遠心した。沈澱をMPEP solution (2% Milk Peptone/PBS)で溶かし、70 μm のセルストレーナーを通した後、抗CD11b抗体でコーティングしたディッシュに添加して常温で 20 分静置した。ディッシュをDPBSで洗浄した後、Isogen II (Nippongene)を加えて細胞を回収した。

(2) RT-qPCR

total-RNA はIsogen II (Nippongene)を用いて抽出し、Reverta Ace (TOYOBO) およびRandom primer (TOYOBO)を用いて逆転写した。Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて、Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 7900HT)にて反応させ、5Sをインターナルコントロールとして $\Delta\Delta Ct$ 値を算出し、IBA1のmRNA の発現を比較定量した。

(3)免疫細胞染色

BV2 細胞を播種したカバーガラスを4%PFA/PBS に置換し、室温で10 分間固定した。PBSで洗浄した後、5%BSA/0.25% Triton X-100/PBS を添加し、室温で 30 分ブロッキングした。一次抗体として抗IBA1抗体 (1:1000, Wako) を用いて、室温で24時間反応させ、その後、蛍光色素が結合した2次抗体で染色した。核の染色にはDAPI (1.0 μg/ml, Dojindo)を用いた。得られたサンプルは蛍光顕微鏡 (Keyence, BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope) を用いて観察した。

結果と考察

初めに、cGASによるミクログリア形質制御への関与の有無を検証するため、反応性ミクログリアで発現が高いIBA1に着目した。IBA1は、細胞骨格の一種であるアクチンと相互作用し、貪食時の細胞膜形態制御に関与することが示唆されている。cGASによってIBA1が制御されるかを調べるために、野生型およびcGASノックアウトマウスのミクログリアにおけるIBA1の発現量を比較した。野生型とcGASノックアウトマウスの脳から、パニング法によってミクログリアを単離し、IBA1についてqPCRを行った。その結果、cGASノックアウトマウスのミクログリアでIBA1のmRNA量が減少していることが明らかとなった。

次に、IBA1がミクログリアの形態にどのような影響を及ぼすのかを調べるために、GFPとIBA1が融合したプラスミドを構築した。このプラスミドをミクログリア培養細胞株BV2に導入し、形態解析を行った。その結果、IBA1を過剰発現させた細胞では、GFPのみのプラスミドを導入した細胞と比較して、突起の伸長した細胞の数が減少した。

以上の結果から、cGAS の下流で IBA1 の発現が制御されると共に、IBA1 の過剰発現によって形態が制御されることが示唆された。当研究室の先行研究において、微小核の形成には領域特異性があることを見出している。これによって、微小核を起点としたcGASの活性化が生じ、一部のミクログリアが領域特異的に形質を変化させる可能性が考えられた。また、IBA1はアクチンの制御を介して、貪食時の細胞の波打ち構造やファゴサイティックカップの形成に寄与することが示唆されている。このことから、IBA1の高い発現は、ミクログリアの反応性に際する形態の維持に重要である可能性が考えられる。しかしながらcGASおよびIBA1がどのようにミクログリアの反応性を誘導するのかは明らかではない。今後は、cGASがミクログリアの多様性にどのように影響するのかを探るとともに、IBA1によるミクログリアの形態制御メカニズムを検証していく予定である。

神経血管の老化における核構造の異常と微小核伝播の影響

前田 ちひろ (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】

老化した脳では、血液脳関門(BBB)の機能不全が引き起こされ、脳血管障害が発症する。脳内免疫担当細胞であるミクログリアは、BBBの維持に関わり、老化に伴い活性化することが報告されている。しかし、老齢期におけるミクログリアの制御メカニズムや、これらがBBBの完全性に対してどのような影響を及ぼすのかについては明らかになっていない。これまでに所属研究室では、神経細胞由来の微小核がミクログリアの多様性を制御していることを見出してきた。微小核は、神経細胞の移動に伴い形成され、ミクログリアに取り込まれて形質を変化させる。これら微小核は、発達期における神経細胞の移動のみならず、老化に伴う核構造の異常によっても形成される可能性がある。そこで、本研究では、老化した神経細胞核のミクログリア制御に対する影響を検証し、最終的にBBBの完全性にどのような影響を与えるのか、その生理的関連性を解析することを目的とした。

【実験方法】

(1) 免疫組織染色

神経細胞の核膜が特異的に標識されたマウス(NexCre; Sun1-GFP)を、4% PFA/PBSで灌流固定し、脳を摘出後、4% PFA/PBSで一晩浸透させた。その後、30%スクロース/PBSに置換し、30%スクロース/OTCコンパウンド(1:1)で包埋後、クライオスタットで50 μ mの凍結切片を作成した。切片の染色には、神経細胞の核膜を標識するために抗GFP抗体(1:1000, Abcam)と、ミクログリアのマーカーであるIba1(1:200, Abcam)、核のマーカーであるDAPI(1.0 μ g/ml, Dojindo)を用いた。染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡(Carl-Zeiss, LSM710)で取得した。

(2) プラスミド作製

50アミノ酸欠損したLaminA/Cの変異体(Δ 50 LaminA/C)は、mCherry-LaminA/Cのプラスミドを鋳型とし、inverse PCRによってDNA産物を得た。その後、セルフライゲーションを行い、BglIIIとBamHIで切り出した。核膜タンパク質であるSun1のsun1ドメインを欠損させたGFP-Sun1 Δ Sと、sun1ドメイン及びcoiled-coilドメインを欠損させたGFP-Sun1 Δ CSは、GFP-Sun1プラスミドを鋳型とし、それぞれPCRによってDNA産物を得た。その後、pCS4-GFPのEcoRI切断箇所に挿入し、さらにBglIIIで切断し、WT LaminA/C及び、 Δ 50 LaminA/Cを挿入し、GFP-WT LaminA/C-Sun1 Δ S、GFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sを作製した。

(3) 免疫細胞染色

神経芽細胞腫Neuro-2aを播種したカバーガラスをPBSで洗浄したのち、4% PFA/PBSに置換し、氷上で10分間固定した。PBSで洗浄した後、5% BSA/0.4% TritonX-100/PBSを添加し、室温で30分間透過処理とブロッキングをした。一次抗体として、抗GFP抗体(1:1000, Abcam)、抗RFP抗体(1:1000, Rockland)を添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。核の染色にはDAPI(1.0 μ g/ml,

Dojindo)を用いた。染色画像は蛍光顕微鏡(Keyence, BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope)で観察した。

(4) 培養細胞における微小核の定量

数値解析ソフトウェアであるMATLAB(MathWorks)の微小核定量プログラムCAMDi (Calculating automatic micronuclei distinction)を用いて、作製したプラスミドを過剰発現させた神経芽細胞腫Neuro-2aにおける微小核数の定量を行った。¹⁾

【結果・考察】

加齢に伴う神経細胞の核構造異常が微小核形成を誘導するか検証するため、NexCre; Sun1-GFPマウス(3ヶ月齢と19ヶ月齢)の脳皮質を染色し、MATLABプログラムCAMDiを用いて微小核数を定量した。その結果、老化に伴い、神経細胞で微小核形成が増加することが示唆された。

次に、老齢期の神経細胞由来の微小核がミクログリアに取り込まれているか検証した。そこで、脳皮質のミクログリアを観察した結果、予備的ながら、神経細胞微小核を取り込んだミクログリアを観察することができた。

また、老化した神経細胞がミクログリアを介してBBBに影響を与えるか解析するために、神経細胞特異的に核膜を老化させる系の立ち上げを試みた。先行研究において、LaminA/Cに部分欠損が生じることで早老症に至ることが報告されている。そこで、早老症を引き起こすLaminA/Cの部分欠損変異体LaminA/C Δ 50を作製した。また、LaminA/C Δ 50を核膜移行に必要なSun1のドメインであるGFP-Sun1 Δ Sと融合し、神経芽細胞腫Neuro-2aへ導入した。その結果、加齢に伴い形成される核膜の構造異常や微小核形成がGFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sの過剰発現によって形成された。

以上の結果から、老齢期では、神経細胞由来の微小核がミクログリアに取り込まれ、ミクログリアを制御する可能性が示唆された。また、GFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sによる老化誘導プラスミドが、人為的な老化誘導に有用なツールであることが示唆された。今後は、神経細胞由来の微小核がどのように形成されるのか、また、微小核がどのようにミクログリアの形態変化を制御しているのかを検証し、ミクログリアの形態制御や周囲の血管に及ぼす影響のメカニズムを明らかにしていく。また、AAVを用いて、神経細胞特異的にGFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sを発現させ、血管周囲の神経細胞がミクログリアやBBBに与える影響を*in vivo*で検証する予定である。

【参考文献】

- 1) Yano S, et al. A MATLAB-based program for three-dimensional quantitative analysis of micronuclei reveals that neuroinflammation induces micronuclei formation in the brain. (2021). *Sci Rep*, 11(1), 18360

ドーパミンによるキイロショウジョウバエ腸内分泌細胞の活性化

山口 泰生 (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】

多くの動物の腸には外部刺激を受けてさまざまなペプチドホルモンを分泌する腸内分泌細胞 (EEC) があり、キイロショウジョウバエも例外ではない。例として、交尾刺激を卵巣で受容したメスは EEC から Neuropeptide F (NPF) の分泌が促進され、生殖幹細胞の増殖を行うことが報告されている¹。しかし、交尾刺激がどのように NPF 分泌を促すかはまだ解明されていない。

所属研究室の先行研究により、NPF 分泌には神経伝達物質であるドーパミンの受容体の 1 つ (以下、DR) が必要であることが示唆されている²。そこで私は、EEC からの NPF 分泌は、DR を介したドーパミン受容が関与すると仮説を立てた。

また、EEC からのペプチドホルモンの分泌は、Ca²⁺レベルにより調節されることを示唆した報告がある³。そこで、NPF 分泌のメカニズムを解明するにあたって NPF+EEC の Ca²⁺レベルの変動に着目した。上記のことを踏まえて私は、ドーパミンが NPF+EEC 上の DR に受容される際の Ca²⁺レベルの変動を解析した。

【方法】

実験 1. システム

NPF+EEC での各種遺伝子の発現にあたっては、GAL4-UAS システムを利用した。

NPF 遺伝子領域に GAL4 配列の挿入されたシステムを使用して、UAS の下流に配置した GCaMP6s および turboRFP を強制的に発現させたシステムを作製した (以下 Control と略)。GCaMP は、Ca²⁺ が結合することによって蛍光強度が上昇するタンパク質であり、細胞内 Ca²⁺ レベルの変動を可視化できる⁴。GCaMP 蛍光強度は turboRFP 蛍光強度によってノーマライズするために使用した。また、さらに UAS-DRRNAi が挿入されて DR がノックダウンされたシステム (以下 DRRNAi) を作製した。

実験 2. Control を使用した live imaging

羽化後 3~5 日の未交尾 Control メスを解剖し、腸を取り出した。ガラスベースディッシュの底に滴下した 20µl の Schneider's Drosophila Medium (SDM; ペニシリン/ストレプトマイシン添加、血清非添加) の中に腸を移し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM900 (カルルツァイス) で live imaging を行った。2 秒ごとに蛍光像を撮影し、115 回撮影した後、ガラスベースディッシュの底にさらに溶液 80µl を加え、さらに 185 回撮影した (合計 300 回の撮影)。この 80µl の溶液としては、ドーパミン 1mM を含むものと含まないものを用いた。そして、それぞれの溶液を加えた後の GCaMP 蛍光強度の変化を解析した。

実験 3. DRRNAi を使用した live imaging

未交尾の DRRNAi システムのメスを用いて、2 と同じプロトコルで実験を行った。

【結果・考察】

まず、Control の腸にドーパミンを含まない SDM を添加しても、添加前と比較して相対的な GCaMP 蛍光強度に有意差はなかった。よって、溶液の添加による物理的衝撃が EEC を活性化することはないことが確認された。次に、ドーパミンを含む SDM を添加した結果、添加前よりも相対的な GCaMP 蛍光強度が有意に上昇することが明らかになった。以上の実験結果は、NPF+EEC はドーパミンに感受性があることを示唆する。

私は次に、ドーパミンによる NPF+EEC 内の Ca²⁺レベルの上昇に DR が関与しているかを検討するため、DR RNAi システムを用いた実験を行った。その結果、Control の腸とは異なり、DRRNAi の腸にドーパミンを含む SDM を添加しても相対的な GCaMP 蛍光強度は上昇しなかった。したがって、NPF+EEC における Ca²⁺レベルの上昇には、DR が必要であることが示された。

以上の結果から、NPF+EEC の Ca²⁺レベルの上昇は、ドーパミンが DR に受容されることで引き起こされることが示唆された。私は、細胞内 Ca²⁺レベルの上昇が細胞からのペプチドホルモン分泌に関与することを考慮し、ドーパミンは NPF+EEC 内の Ca²⁺レベルを上昇させることで NPF 分泌を促すと推測している。

【今後の展望】

本研究で注目したドーパミン受容体アイソフォームは DR のみであるが、ショウジョウバエのゲノムにはこれ以外にも複数のドーパミン受容体アイソフォームが存在する。そのため、ドーパミンによる NPF+EEC の Ca²⁺レベルの上昇に、DR 以外のドーパミン受容体アイソフォームが関与するのかわかる必要がある。そこで、それぞれのアイソフォームをノックダウンするためのシステムの準備を行っている。

さらに、DR はドーパミンを受容する際、Ca²⁺だけでなく cAMP を細胞内の 2 次メッセンジャーとして利用する可能性がある。しかし、今回の実験では cAMP の変動を見ていないので、ドーパミンを添加したときの反応を、PinkFlamindo⁵ や RfInc⁶ といった cAMP レポーターのシステムを利用して検討する。

【参考文献】

- 1) Ameku et al. (2018) *PLOS Biology*, 16, e2005004.
- 2) 金谷彩 (2022) 修士 (理学) 学位論文.
- 3) Malita et al. (2022) *Nature Metabolism*, 4, 1532–1550.
- 4) Nakai et al. (2001) *Nature Biotechnology*, 19, 137–141.
- 5) Harada et al. (2017) *Scientific Reports*, 7, 7351.
- 6) Ohta et al. (2018) *Scientific Reports*, 8, 1866.

キロショウジョウバエの生殖休眠を制御する神経回路に関する研究

平 清乃 (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】

休眠は、生存に不利な環境下で発生や生殖を抑制する生存戦略である。キロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, 以下ショウジョウバエ) を含む一部の昆虫においては、低温短日条件に置くと卵巣などの生殖器官が縮退する生殖休眠が見られる。この生殖休眠の制御には、アラタ体という内分泌器官から放出される幼若ホルモンが重要であることが古くから示されている¹⁾。ショウジョウバエでは、所属研究室の先行研究により、アラタ体に直接投射する CA-LP 神経が生殖休眠を制御していることが明らかになっていた²⁾。

CA-LP 神経の機能をさらに理解するためには、この神経に接続する上流神経の同定と機能解析が不可欠である。所属研究室の先行研究において、ショウジョウバエの脳神経を網羅的に再構築したコネクトームデータベース³⁾を利用して CA-LP 神経上流神経の探索が行われた。その結果、CA-LP 神経と多くのシナプスを形成する複数の神経があることが明らかになった²⁾。しかし現状では、これらの神経が生殖休眠の制御に関わるかは一切検討されていない。そこで私は、これらの CA-LP 神経上流神経の詳細を調べることを目標に、これらの神経を特異的に標識するトランスジェニックシステムの探索とその標識神経の解剖学的観察を実施した。

【方法】

・ GAL4-UAS システム

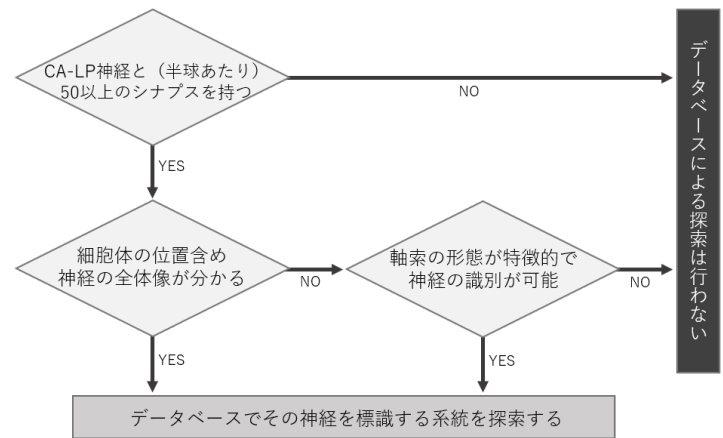
ショウジョウバエでは GAL4-UAS システムを用いて組織特異的な遺伝学的操作が可能である。このシステムでは、酵母由来の転写因子 GAL4 を特定のエンハンサーの制御下で発現させることで、GAL4 結合配列である UAS 配列の下流の任意の遺伝子を発現させることができる。本研究では、ストックセンターより取り寄せた GAL4 システムと、UAS 配列の下流に GFP を配置したシステムを交配させ、取り寄せたシステムが標識する神経を可視化した。

・ 免疫組織化学染色による脳の観察

神経の形態観察を行うため、免疫組織化学染色によって GFP の蛍光強度の増強や、神経分泌因子の可視化を行った。解剖によって取り出した脳を 4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定した後、2%仔牛血清アルブミン/PBT (PBS+Tryton-X100) でブロッキング処理した。その後任意の 1 次抗体を用いて、Alexa 蛍光標識 2 次抗体によって染色した。蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM900) を用いて撮影した。脳を立体的にマウントする場合は、スライドガラスにビニールテープを巻いてカバーガラスを浮かせることで脳が潰れないようにした。

・ CA-LP 神経上流神経を標識する可能性のあるシステムの探索

ハーワードヒューズ医学研究所 Janelia Farm によって公開されているショウジョウバエ脳のイメージングデータベース (<https://neuronbridge.janelia.org/>)⁴⁾ を利用した。次のフローチャートに則り、3 つの神経 (それぞれ Body Id: 296544262、5813055822、481501144) について GAL4 システムの探索を行った。



【結果・考察】

本研究では、CA-LP 神経上流神経の 1 つ (Body Id: 296544262) に集中した解析を実施した。この神経を標識する GAL4 システムを 6 システム選択した。このうち、ストックセンターに存在する 5 システムを取り寄せ、GAL4-UAS システムを用いて標識神経を確認した。その結果、2 システムにおいて CA-LP 神経上流神経に類似した形態の神経が標識された。

次に、上記 2 つの GAL4 システムを用いて、この神経の特徴づけを試みた。先行研究で報告されている neuropeptide F (NPF) 産生神経の形態が CA-LP 神経上流神経に類似していた²⁾ため、抗 NPF 抗体による免疫組織化学染色を利用して、GAL4 で標識される神経が NPF 陽性かを検討した。しかしながら、GAL4 で標識される神経は抗 NPF 抗体で染色されなかった。続いて、CA-LP 神経に発現している受容体の情報から CA-LP 神経上流神経が myoinhibitory peptide (Mip) を放出している可能性が考えられた。しかし、Mip 産生神経の形態を観察した結果、Mip 産生神経は CA-LP 神経上流神経とは異なっていた。よって、この CA-LP 神経上流神経は Mip 産生神経ではないことが示唆された。

なお、ストックセンターから取り寄せられなかった 1 システムはエンハンサー配列が判明しており、現在自分たちの手でこのシステムを作製することを試みている。

【今後の展望】

CA-LP 神経上流神経が産生する神経伝達物質の特定を進めるとともに、入手した GAL4 システムの標識神経が本当に CA-LP 神経上流神経であるかを確認するために CA-LP 神経との接続や生殖休眠への影響を調べる。さらに、split-GAL4 システム⁵⁾を用いてより特異的に神経を標識するシステムを作製することも検討している。

【参考文献】

- 1) Kurogi et al. (2021) *Front. Ecol. Evol.* 9, e715029.
- 2) Kurogi et al. (2022) *bioRxiv* doi:10.1101/2022.05.28.492955
- 3) Scheffer et al. (2020) *eLife* 9, e57443.
- 4) Clements et al. (2022) *bioRxiv* doi:10.1101/2022.07.20.500311
- 5) Deng et al. (2019) *Neuron* 101, 876-893
- 6) Luan et al. (2020) *Front. Neural Circuits* 14, e603397

プラズマローゲンによる線虫の寿命及び健康寿命の延伸作用と作用機序の解析

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

【背景・目的】

プラズマローゲンは sn-1 位にビニルエーテル結合を持つ脂肪アルコールを含み、sn-2 位に多加不飽和脂肪酸が豊富なグリセロン脂質である。哺乳類では、プラズマローゲンの含有量は膜脂質全体の最大 20% を占めており、脳に最も多い。プラズマローゲンは年齢によって量が増減しており、高齢者の血清中のプラズマローゲンの量は若い人と比較して 40% 少なく、ヒトやラットの脳でもプラズマローゲンの量は加齢に伴い減少する。また、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患でプラズマローゲン量の減少が確認されている。

本研究では、プラズマローゲンの寿命や健康寿命に対する影響を調査するために、寿命が短いことから、寿命や老化に関連したアッセイを容易に行うことが出来るモデル生物で線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* を用いて、プラズマローゲンを与えたことによる線虫の寿命、健康寿命、老化、酸化ストレス耐性、産卵数への影響を分析した。また、プラズマローゲンを与えたことによる各影響のメカニズムを解明するために内分泌レベル、細胞内 ROS レベルも解析した。

【材料・方法】

<モデル生物>

本研究で使用された線虫株は *C. elegans* N2 Bristol (wild type) である。線虫は、大腸菌 (OP50) を撒いた NGM (Nematode Growth Medium) プレート上で 20°C で培養した。

<方法 1>

卵を集めるために、線虫の成虫を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破砕し、この過程で線虫の成長レベルを同調させた。その後、約 18 時間培養して孵化した線虫を、OP50、DMSO、Hokkaido Scallop Oil Plasmalogen Powder の混合液を塗布した NGM プレート上または、コントロールとして OP50、DMSO のみの混合液を塗布した NGM プレート上に移した。成虫になるまで約 96 時間培養し、実験に用いた。飼育温度は 20°C である。

(1) 細胞内 ROS レベルの評価

DCFH-DA を用いて染色して、蛍光顕微鏡で撮影し、ImageJ で解析した。

(2) 酸化ストレス耐性の評価

0.05% H₂O₂ に移し、この時点から 0 時間目とした。移してから 2 時間後より 1 時間ごとに生存率を測定した。

(3) 産卵数の評価

線虫を大腸菌 OP50 を撒いた NGM プレートに移して、24 時間後にプレート上の卵と幼虫の数をカウントした。

(4) 内分泌レベルの評価

線虫をホモジナイズし、遠心分離して上清を回収した。ホルモン分泌レベルをキットの製造元の指示に従って分析を実施した。

<方法 2>

卵を集めるために、線虫の成虫を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破砕し、この過程で線虫の成長レベルを同調させた。その後、約 18 時間培養して孵化した線虫を、OP50 を撒いた NGM プレート上に移した。成虫になるまで 96 時間培養し、OP50、DMSO、Hokkaido Scallop Oil Plasmalogen Powder の混合液を塗布した NGM プレート上または、コントロールとして OP50、DMSO のみの混合液を塗布した NGM プレート上に移した。その後、培養を継続して、実験に用いた。飼育温度は 20°C である。また、子孫の発生を防ぐために 0.5 mg/ml FUdR をプレートに添加した。

(5) 線虫の運動性の評価

0、3、6、9 日後に 15 秒間のスラッシング運動の回数を測定した。

(6) 老化様形質の評価

18 日後に線虫を回収して蛍光顕微鏡で撮影し、ImageJ で解析した。

(7) 寿命の評価

2 日毎に生存個体数を計数した。

【結果】

- (1) プラズマローゲンは線虫の細胞内 ROS レベルを増加させた。
- (2) プラズマローゲンは線虫の酸化ストレス耐性を増加させた。
- (3) プラズマローゲンは線虫の産卵数を減少させた。
- (5) プラズマローゲンは線虫の加齢に伴う運動性の低下を抑制した。
- (6) プラズマローゲンは線虫の老化様形質を変化させた。
- (7) プラズマローゲンは線虫の寿命を延伸させた。

【考察・今後の展望】

本研究より、プラズマローゲンが線虫の酸化ストレス耐性の増加、寿命の延伸に寄与することが確認できた。さらに、プラズマローゲンが老化形質、健康寿命の延伸に寄与することが示唆された。内分泌レベルについては、現在解析中である。

今後は、転写因子で老化や寿命を調節することで知られる DAF-16 の欠損変異体などの変異体を用いて実験を行い、本実験で明らかになったプラズマローゲンの作用の作用機序を詳細に明らかにしていく。また、本研究で確認された、細胞内 ROS レベルの増加及び産卵数の減少と寿命延伸及び酸化ストレス耐性の増加の関係を、変異体を用いた実験などで明らかにする。

線虫(*C. elegans*)を用いたコメペプチドの生理活性作用の解析

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

【背景・目的】

近年、レスベラトロールやイソフラボンといった様々な機能性分子の生理活性作用について多くの研究がなされており、アミノ酸が2~100個結合した物質であるペプチドもまた、その研究対象として大きな注目を集めている。ある種のペプチドは抗酸化作用や脂肪蓄積の抑制、寿命延伸といった様々な生理活性作用を示すことが判明しており、現在に至るまで、多くの植物や動物の抽出タンパク質から精製されるペプチドの生理学的効果が明らかとなってきた。しかし、我々日本人が普段よく口にする白米および、玄米を精白する過程で生じる米糠から精製されたペプチドの生理作用については、未だ明らかとなっていない部分が多い。そこで本研究では、モデル生物である線虫を用いて、白米または米糠から作られたペプチド混合物の生理活性作用およびその強度の差について明らかにすることを目的とした。本研究に線虫(*Caenorhabditis elegans*)を用いた理由として、卵から孵化してから成虫へと成長するまで約4日しかかからず、寿命も短いため老化や寿命の解析を容易に行う事が可能であるという点がまず挙げられる。また、多くの遺伝子変異体が存在するため、遺伝子解析を行うことが容易であるという点も理由として挙げられる。線虫はまた、我々ヒトと同様に食物を口から摂取・消化し、腸から吸収するという性質をもつことが知られており、吸収された物質は体液により全身を巡ることでその生理活性作用が発揮されるため、ヒトにおけるコメペプチドの生理活性作用について解析するうえで、線虫は理想的なモデル生物である。本研究では、白米および米糠から調製したペプチドの水溶液を線虫に経口投与し、各種実験を行うことで2種類のコメペプチドの生理活性作用の解析を行った。

【材料】

<コメペプチド>

白米または米糠に含まれるタンパク質成分を抽出し、プロテアーゼで分解することによりペプチド混合物を作成した。実験を行う際は両ペプチドについて50mg/ml水溶液をマザーストックとして作成し、DDWを用いて複数種類の濃度のサンプルを調製した。

<線虫>

線虫(*Caenorhabditis elegans*)の野生型(N₂)個体を用いて全ての実験を実施した。

【実験方法】

(1)脂肪蓄積解析実験

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫体内の脂肪分を「Nile red」と呼ばれる試薬を用いて染色し、蛍光顕微鏡で赤色蛍光を測

定後、「Image J」という解析ソフトを用いて各サンプルの蛍光量の定量化・比較を行った。

(2)老化に伴う運動性の測定

日数経過とともに線虫の運動性が低下していくことを利用し、各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫について3日ごとに首振り運動の回数を測定することにより、各サンプルにおける老化の進行度を測定した。

(3)細胞内ROS測定

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫の細胞内ROSを、50 μ M DCF-DA溶液を用いて染色し、蛍光顕微鏡で緑色蛍光を計測後、「Image J」を用いて蛍光量の定量化・比較を行った。

(4)産卵数測定

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫3匹についてそれぞれの卵の数および幼虫の数を測定した。

(5)産卵率測定

産卵数測定を行った翌日に孵化していない卵の数を数え、産卵数測定の数を用いて産卵率を算出した。

(6)酸化ストレス耐性試験

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫を0.01% H₂O₂で満たしたウェルに入れ、1時間ごとに線虫の身体をピッカーで刺激することにより生存率を測定した。

【結果】

白米ペプチド、米糠ペプチドのいずれにおいても、脂肪蓄積の抑制、細胞内ROSの減少が有意にみられ、その効果はサンプル濃度に依存的事であることが分かった。また、両ペプチドともに線虫の産卵数・孵化率には影響を及ぼさず、生殖機能に対する毒性が無いということも明らかとなった。なお、各実験結果の詳細については報告会で述べるとする。

コウマクノウキン門 *Allomyces* の鞭毛をもつ雌雄配偶子と接合子の観察

大空 由依 (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】

多くの場合、真核生物の有性生殖は2つの性(交配型)の配偶子が融合することによって行われ、その大きさの差や運動性の違いによって同型配偶、異型配偶、卵生殖に分類される。一般に同型配偶では2つの配偶子はその大きさと形が同じだが、異型配偶では雌雄の配偶子はその大きさの違いによって区別できる。しかし緑藻植物では、性(交配型)が異なる配偶子の接合装置(細胞融合装置)が鞭毛と眼点(光受容装置)に対して異なる位置にあり、同型配偶・異型配偶に関わらず2つの配偶子を形態的に区別できる(図1)。この配置の違いによって、接合子では異なる配偶子由来の鞭毛が同じ方向に並び、2つの眼点が隣り合って並ぶ(図1)。このような性質は、緑藻植物に共通の性質であることが示唆されている。そこで、他の真核生物でも同様に配偶子の細胞融合部位に性特異性が認められるかどうかを確かめるため、緑藻植物とは系統的に離れた *Allomyces* (Opisthokonta) で検証した。

Allomyces は1本鞭毛の遊走子と配偶子を形成する菌類である。遊走子と雌配偶子が脂質顆粒や膜系からなる眼点様の構造 Side Body Complex (SBC) をもち、光受容体タンパク質の存在や、*Allomyces* 属内の数種は走光性を持つことが先行研究で示唆されている(図2)。本研究では、*Allomyces* を用いて緑藻植物で見られるような細胞融合部位の配置に規則性があるかを明らかにするため、以下の2つの目的で実験を行った。

1. 雌雄配偶子は細胞の特定の場所で接着し融合するのか?
2. もし特定の場所で融合するなら、接合子において雌雄配偶子由来の2本の鞭毛とSBCの配置に規則性があるのか?

【材料と方法】

・配偶子形成の誘導

Allomyces macrogynus (ATCC38327), *A. arbusculus* (NBRC105421)は、YpSs 寒天培地 23°Cで1ヶ月おきに継代培養した。配偶子形成の誘導は、3ヶ月以上前に植え継いだ古い菌糸を24h, 35°Cで乾燥した後にDS液体培地を加えて放出させた遊走子をYpSs液体培地に懸濁し、3日間100rpm, 30°Cで振盪培養することで行った。次いで、菌糸をDS液体培地に移すことで配偶子を放出させた。

・接合過程の観察

配偶子放出から30分後に懸濁液を26x20x0.05 mmのチャンバーに入れて光学顕微鏡で配偶子、接合子の行動を観察した。

・電界放射型走査電顕(FE-SEM)での観察

放出から2hの配偶子・接合子懸濁液を2%GAと1:1で混合して4°Cで一晩固定、1%OsO4で後固定、0.1%タンニン酸固定、1%OsO4で再度固定した。フィルタに乗せ、10~95%のEtOH、t-ブチルアルコール脱水ののち凍結乾燥し、白金でスパッタリングを行い、JSM6330Fで観察した。

・集束イオンビーム走査電顕(FIB-SEM)での観察

FE-SEM観察で使用した細胞にHelios nanolab 600iを用いて集束イオンビームを照射することにより細胞を削り断面を観察した。

・高速ビデオでの観察

配偶子、接合子の運動を毎秒200コマで撮影し観察した。

・微分干渉顕微鏡での観察

放出後2~4hの配偶子・接合子を4%GAと1:1で固定後、2000rpmで10分遠心分離して集めた細胞を観察した。

【結果と考察】

・光学顕微鏡と高速ビデオによる接合過程の観察

雌雄配偶子が融合する位置を確認するために、接合の様子を高速ビデオで観察した。その結果、接合の際、雌の鞭毛側に複数の雄が集まる様子が観察できた。さらに、接合子は2本鞭毛を同調させて動かし、しばらく遊泳したのち着生した。

・SBCの視覚化と細胞融合部位の観察

FE-SEMで接合子のSBCが観察できれば、鞭毛との相対的な位置関係がわかる。そこで、FE-SEMでSBCが確認できるか検討した。その結果、雌配偶子と接合子の鞭毛基部近くの細胞膜表面に雄配偶子には見られない滑らかな部分が見つかった。これをFIB-SEMで切断して内部構造を観察したところ、雌配偶子も接合子もその滑らかな構造部分に脂質顆粒が並んでおり、SBCであることが確認できた。次に、SBCの位置をマーカーとして細胞融合部位の位置をFE-SEMで詳細に観察したが、まだはっきりとした結果が得られていない。

・接合子の鞭毛とSBCの配置

接合子における雌雄由来の2本の鞭毛とSBCの位置関係をFE-SEMを用いて調べた。その結果、SBCは2本の鞭毛の並びに対して並行または約45°傾いて並んでいる傾向が見られた。

・微分干渉顕微鏡による接合子の観察

雌配偶子の鞭毛側のどこの位置に雄配偶子が接合したか推測するため、接合して間もない核融合前の接合子を用いて雌雄の核とSBCの位置関係を観察した。この結果は発表会にて報告する。

以上の結果について緑藻植物と比較して議論する予定である。

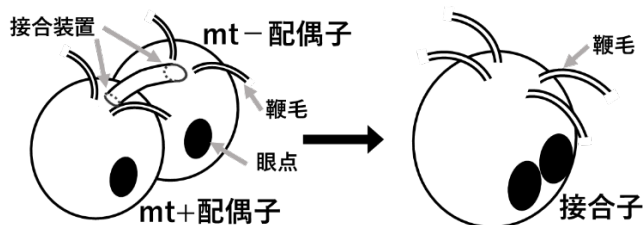


図1. 緑藻植物の配偶子の接合。2つの性で接合装置の配置が違うことで、接合子で2つの眼点が隣り合って並ぶ。

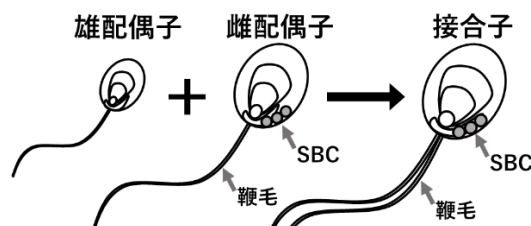


図2. *Allomyces* の配偶子・接合子。雌と接合子はSBCをもつ。

Impacts of diagram design on comprehension

AHMED POPLAR HANA (筑波大学 生物学類)

指導教員: Wood Matthew (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Science graphics are used in textbooks and museum settings to assist understanding. However, graphics could confuse the audience depending on their context.

Clutter is the state in which excess items, or their representation or organization, lead to a degradation of performance at some task (Rosenholtz et al., 2005). When this happens to visuals, it is called visual clutter. According to research on visual clutter, the simpler the figure, the easier it is to understand. In addition, Cognitive Load Theory (CLT) also states that extraneous load must be reduced by good design to create more effective and valuable teaching materials (Reedy, 2015).

On the other hand, studies have shown that information appearing in more familiar contexts is better learned and recalled (Song & Bruning, 2015). This could be explained by the framework of Schema Theory (ST).

This project aims to explore the interplay between these apparently contradicting frameworks, visual clutter and CLT versus ST, within the context of a specific design choice. This study compared participant comprehension from two different morphological figures of chickens. The first figure was a skeletal diagram and the second was a silhouetted figure. Better comprehension from the skeletal figure would provide support for simpler diagram as suggested by the visual clutter literature, and CLT. However, higher levels of comprehension from the silhouetted skeletal figure might suggest that inclusion of context leads to improved comprehension in line with ST.

Material & Methods

Two types of morphological figures of chickens were prepared—a skeletal figure and a silhouetted skeletal figure (See Fig 1). A total of 153 participants were recruited from undergraduate and graduate programs in Japan and the United States, Participants were randomly assigned to one of the figures. After seeing the figure, participants were asked to answer a series of questions to evaluate their comprehension of these figures. To evaluate the impact of diagram design on different levels of comprehension, three types of questions were prepared: Recall questions, asking the name of the bones; Function questions, asking the function of bones, and Homology questions, asking the corresponding bones with humans. The total number of correct answers for each section was compared between groups using the statistical software package JASP.

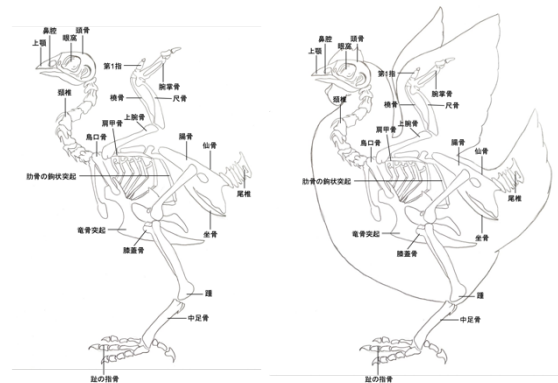


Figure 1. Skeletal (left) and Silhouetted Skeletal (right) morphological figures of chicken

Result

Mean total scores and standard deviations were calculated for each group and section (See Table1). Since comprehension data collected was not normally distributed the non-parametric Mann-Whitney test was used to compare mean totals. The p-value for the Recall section was 0.41, Function section was 0.68, and the Homology section was 0.98. Therefore, the results did not reveal any statistically significant differences between the two groups.

Table 1. Descriptive Statistics

Descriptive Statistics	Recall		Function		Homology	
	Skeletal	Silhouetted	Skeletal	Silhouetted	Skeletal	Silhouetted
Mean	6.403	6.070	6.134	6.058	4.119	4.093
Std. Deviation	2.374	2.580	2.052	2.031	1.737	1.685

Discussion

The Mann-Whitney test has revealed that there is no significant difference between people’s comprehension on the two types of diagrams. However, due to insufficient statistical power (0.2) it was not possible to draw reliable conclusions from this data. To be certain with the results, you need to have more participants. In addition, the survey only asks three types of questions to address people’s comprehension. This limitation of research design might had influenced the results.

References

Reedy, GB. (2015) Clinical Simulation in Nursing, 11: 355-360.
 Rosenholtz R. et al. (2005) Proc. of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems, 761-770.
 Song, M, and Bruning, R. (2015) Educational Psychology, vol. 36, no. 4, 2015, pp. 691-718.

シヨウジョウバエ胚前極に異所的に供給された母性因子群の機能解析

佐藤 隆奈 (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胚の後極には、生殖質と呼ばれる細胞質が局在している。生殖質を取り込んだ細胞は始原生殖細胞 (PGC) となり、卵や精子に分化する。生殖質を胚の前極に移植すると、その生殖質を取り込んだ細胞は PGC となり、生殖細胞に分化する (1)。このことは、生殖質中には生殖細胞の分化に必要な母性因子が含まれていることを強く示唆している。生殖質に含まれる母性因子は、体細胞への分化を抑制することで、生殖細胞への分化を許容すると考えられている。体細胞分化に必要な遺伝子 (体細胞性遺伝子) の発現を抑制する母性因子として、Nanos (Nos)、Polar granule component (Pgc)、Germ cell-less (Gcl) タンパク質が同定されている (2, 3, 4)。しかし、これら3つの母性因子の働きにより、どのような体細胞性遺伝子の発現が抑制されているのかは網羅的に解析されていない。また、これら3つの母性因子を取り込んだ体細胞が、PGC と同様の発生過程をどこまで辿ることができるのかについても明らかではない。そこで、本研究では、これらの点を明らかにすることを大きな目的としている。

tao1 mRNA を胚の前極に局在させると、胚の前極に PGC と同様の形態を示す細胞 (PGC 様細胞) が形成される (5)。この PGC 様細胞は体細胞の性質を持つこと、生殖質に局在する母性因子を欠くことが研究室の先行研究により明らかになっている (6)。本研究では、Nos、Pgc、Gcl タンパク質を PGC 様細胞に供給し、それぞれのタンパク質が機能的であることを明らかにすることを目的とする。将来的には、これら3種類のタンパク質を含む PGC 様細胞において抑制される体細胞性遺伝子を網羅的に明らかにするとともに、その細胞の発生運命も追跡する予定である。

方法

胚前極に mRNA を局在させることができる *bicoid* (*bcd*) 3'UTR を *tao1* mRNA の 3'UTR と置き換え (*tao1-bcd3'UTR*)、この RNA を卵形成過程で Gal4-UAS システムを用いて発現させると、胚 (*tao1* 強制発現胚) の前極に PGC とよく似た形態の細胞 (PGC 様細胞) が形成される (5)。先行研究よりも効率よく PGC 様細胞を形成させるために、Gal4 遺伝子のコピー数を2倍にした (6)。さらに、*tao1* mRNA と同様の方法により、胚前極に Nos、Pgc、Gcl タンパク質をコードする mRNA を局在させ、PGC 様細胞に取り込ませた。この胚をステージ3-5まで発生させ、*in situ hybridization* 法や蛍光免疫染色法により、これらタンパク質が PGC 様細胞中で機能的かを調べた。

結果

Nos、Pgc、Gcl をコードする mRNA を、*tao1* mRNA と同様の方法で前極に局在させた胚 (*nos-tao1* 強制発現胚、*pgc-tao1* 強制発現胚、*gcl-tao1* 強制発現胚) において、それぞれのタンパク質が PGC 様細胞中で機能するのについて調べた。

nos-tao1 強制発現胚

Nos タンパク質は、胚の前極の体細胞の分化に必要な Bicoid (Bcd) タンパク質をコードする *bcd* mRNA の翻訳を阻害することが知られている (7)。PGC 様細胞において、Nos が Bcd タンパク質の発現を抑制するかは現在確認中である。また、*nos-tao1* 強制発現胚では、PGC 様細胞以外の胚の前半部に *nos* mRNA が分布していた。おそらくこれが原因となり、*nos-tao1* 強制発現胚は正常に発生できずに致死となることが明らかとなった。

pgc-tao1 強制発現胚

Pgc タンパク質は、RNA ポリメラーゼ II の活性を低下させる (8)。*pgc-tao1* 強制発現胚において、活性型 RNA ポリメラーゼ II の分布を調べたところ、PGC 様細胞だけでなく、胚の前半部で活性型 RNA ポリメラーゼ II が減少していることがわかった。

gcl-tao1 強制発現胚

Gcl タンパク質は、胚両端の体細胞の分化を進める *huckebein* (*hkb*) 遺伝子の発現を抑制する (9, 10, 11)。*gcl-tao1* 強制発現胚において、Gcl が PGC 様細胞中で *hkb* mRNA の発現を抑制しているかは現在解析中である。

考察・展望

現在、Nos、Pgc、Gcl の3つの母性因子を同時に胚前極に局在させ、それら mRNA を PGC 様細胞に供給する系統 (*nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現系統) を作成中である。*nos-tao1* 強制発現胚は正常に発生することなく致死となるため、*nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現胚も正常に発生しないと考えられる。したがって、*nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現胚の PGC 様細胞の発生運命を解析するためには、その PGC 様細胞を正常胚の後極に移植する必要があると考えられる。今後は *nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現胚の PGC 様細胞において抑制される体細胞性遺伝子を網羅的に調べるとともに、その発生運命を解析する予定である。

参考文献

1. Illmensee and Mahowald. *Science*, 71, 1016-1020 (1974).
2. Nakamura *et al.* *Science*, 274, 2075 (1996).
3. Robertson *et al.* *Developmental Biology*, 215, 288 (1999).
4. Asaoka *et al.* *Nature Cell Biology*, 1, 431 (1999).
5. Pflanz *et al.* *Open biology*, 5, 140161 (2014).
6. 萩久保朝香. 修士論文. (2022).
7. Wreden *et al.* *Development*, 124, 3015 (1997).
8. Hanyu-Nakamura *et al.* *Nature*, 451, 730 (2008).
9. Pignoni *et al.* *Cell*, 62, 151 (1990).
10. Weigel *et al.* *Science*, 248, 495 (1990).
11. Pae *et al.* *Developmental Cell*, 42, 130 (2017).

ショウジョウバエ始原生殖細胞集団の不均一性

三上 恭平 (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】

有性生殖を行う多細胞生物において、生殖細胞は次世代を生み出すための唯一の細胞である。次世代が正常に発生するためには生殖細胞の遺伝情報が次世代に正確に受け継がれる必要がある。しかし、細胞の遺伝情報であるゲノム中には遺伝情報を破壊する脅威となる転移因子 (Transposable Elements; TEs) が存在している。そのため、生殖細胞には TEs の発現を抑制する機構である PIWI-interacting RNA (piRNA) システムが備わっており、piRNA システムは機能的な配偶子の形成に必要であることが知られている¹。しかし、piRNA システムについての研究の多くは成熟した生殖細胞を対象としており、どのように piRNA システムが確立されるかについては明らかになっていない。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, 以下ショウジョウバエ) を含めた多くの動物では、胚発生初期に生殖質と呼ばれる特殊な細胞質を取り込んだ細胞のみが、生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) になる。生殖質には生殖細胞形成に必要な十分な分子が含まれていることが知られているが、PGC が取り込む生殖質の量は一律ではなく、PGC 集団は不均一な集団であることが報告されている²。

所属する研究室において、ショウジョウバエの遺伝子強制発現系として知られる Gal4/UAS システムを用いて緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を生殖細胞特異的に発現させた時、少数の PGC でのみ EGFP の発現量が顕著に高くなるという予備的な結果が得られている。UAS には配列構造の異なる UASp, UAS_t および UAS_z の 3 種類のバリエーションが存在しており、特に UAS_t には piRNA のターゲット領域が含まれていることが知られている³。上記の現象が観察されるのは UAS_t を用いた時のみであった。このことから PGC 集団には piRNA システムの機能に関与する不均一性が存在すると考えた。そこで、本研究では、この予備的な結果を確認した。さらに、piRNA システムを構成する Piwi タンパク質の発現について、PGC 間で差があるかについても解析を行った。

【材料と方法】

• Gal4/UAS システムによる EGFP 発現誘導

生殖細胞特異的に発現する *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*) の処女メスと UAS_t-EGFP を持つ系統および UAS_z-EGFP を持つ系統のオスをそれぞれ交配させた。

• タンパク質の蛍光免疫染色およびその観察

交配後 12h-15h の胚を集め、4% PFA (4% パラホルムアルデヒド / PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, and 3 mM NaH₂PO₄)) で固定し、EGFP, 生殖系列のマーカーである *Vasa* タンパク質, Piwi 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。染色した胚は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

• タンパク質の輝度定量解析

胚表層から 20 μm 以内に生殖巣があるような胚を選び、共焦点レーザー顕微鏡のレーザー強度および検出器のゲイン、拡大率を試料間で一定にし、その生殖巣全体の蛍光画像を撮影した。取得した画像に対して画像解析ソフト Fiji を用いて、各 PGC の直径が最大となる断面におけるタンパク質の単位面積あたりの平均輝度を測定した。

【結果と考察】

UAS_t-EGFP システムを用いた場合、胚発生ステージ 15-16 に PGC 間で EGFP の発現量が不均一になるような胚が観察された。一方、UAS_z-EGFP システムを用いた場合、このような胚は観察されなかった。以上の結果は、PGC 集団に piRNA システムの機能の不均一性が存在していることを示唆している。

また、UAS_t を用いて EGFP 発現を誘導した胚を用いて、胚発生ステージ 15-16 における Piwi タンパク質の発現を観察ところ、EGFP の発現が顕著に高い PGC では、同一胚内に存在する他の PGC より Piwi タンパク質の発現量が低いことが明らかになった。

以上の結果は、ショウジョウバエ胚において、一部の PGC でのみ、Piwi タンパク質の発現量が低下することで、PGC 集団では piRNA システムが不均一に機能していることを強く示唆している。

【展望】

今後、なぜ、一部の PGC において、Piwi タンパク質の発現が低くなるかを明らかにすることで、piRNA システムが正常に機能するために必要な因子を調べる予定である。また、生殖細胞形成では、あらかじめ異常な細胞を排除することで機能的な生殖細胞のみを生成する、品質管理機構の存在が提唱されている。今回確認した現象において、piRNA システムの機能が弱いと考えられるような PGC では TEs 抑制がうまくいかず、配偶子として正常に機能できない、あるいは排除される可能性がある。したがって、これらの細胞が排除される仕組みが存在すれば、それは生殖系列の品質管理機構の解明に迫る手がかりとなりうる。そこで、今後 EGFP 高発現 PGC における TEs 発現レベルおよびその発生運命を調べる予定である。

【参考文献】

1. Yamashiro, H.; Siomi, M. C. *Chem. Rev.* 2018, 118 (8), 4404-4421.
2. Slaidina, M.; Lehmann, R. *Current Biology.* 2017, 27(2), 291-297.
3. DeLuca, S. Z.; Spradling, A. C. *Genetics.* 2018, 209(2), 381-387.

ショウジョウバエ生殖系列の発生過程におけるヒストンラクチル化修飾の観察

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

【背景・目的】

主要なエピジェネティック修飾であるヒストンリジン残基の翻訳後修飾は、クロマチンの構造や転写因子の動態に影響を与えることで広範な遺伝子発現を制御する。これまでに、アセチル化やメチル化といった主要なヒストン修飾の制御機構およびその遺伝子発現制御における役割について解析が進んできた一方、近年、新たなヒストン修飾としてヒストンラクチル化修飾が特定され注目を集めている。

ラクチル化修飾は解糖系の代謝産物の一つである乳酸を基質とする新規翻訳後修飾である。現時点において、遺伝子発現の亢進に寄与するとされているものの、その遺伝子発現制御における働きの詳細や組織発生過程での役割については全く不明である。そこで本研究では、ショウジョウバエの卵形成過程をモデルとし、ヒストンラクチル化修飾の役割を明らかにすることを試みた。

ショウジョウバエの卵形成過程は次の様に進行する。まず卵巣先端部分の形成細胞巢に存在する生殖幹細胞 (GSC) の不等分裂によりシストブラスト (Cb) が生じる。Cb は4回の同調した不完全な細胞分裂を経て16細胞よりなるシストを形成する。シストを構成する細胞のうち1つは卵母細胞へ、残りの15細胞は哺育細胞へと細胞運命が決定する。細胞運命の決定後、シストは卵巣を構成する体細胞に包まれて卵室を形成し、形成細胞巢を出る。その後、哺育細胞は最終的に退縮するのに対し、卵母細胞では減数分裂が進行し、次世代を生み出す成熟卵となる。この様に、卵形成過程には幹細胞の維持および分化、減数分裂やインプリンテイングといった、クロマチン制御の重要性が高いプロセスが含まれる。したがって、ヒストンラクチル化修飾の機能解析をするにあたり、理想的な検証モデルを提供する。

本研究では、卵形成過程におけるヒストンラクチル化修飾の機能解明の第一歩として、特にヒストンラクチル化修飾が卵形成過程のどの細胞でどの様な時期に生じるかを特定することを試みた。

【材料と方法】

本研究では野生型 (Oregon-R 系統) の卵巣を用いて、以下の抗体で免疫組織化学染色を行った。生殖系列の発生過程におけるラクチル化修飾を観察するために、一次抗体として、全てのラクチル化リジンを認識する抗体 (抗 Klac 抗体) (ウサギ)、およびヒストン中のラクチル化リジンを認識する抗体である抗ヒストン H3K18 ラクチル化抗体 (抗 H3K18Lac 抗体) (ウサギ)、抗ヒストン H4K8 ラクチル化抗体 (抗 H4K8Lac 抗体) (ウサギ) を使用した。また乳酸の代謝に関わる酵素の発現を観察するために、乳酸脱水素酵素 (Ldh) およびピルビン酸キナーゼ (PyK) に対する抗体 (抗 Ldh 抗体および抗 PyK 抗体) (ウサギ) を使用した。生殖系列の標識には抗 Vasa 抗体 (ニワトリ) を用いた。これら一次抗体を蛍光標識する二次抗体には、Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa546 標識抗ニワトリ IgY 抗体を用いた。また核は TO-PRO-3 を用いて標識した。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

【結果・考察】

卵形成過程でのラクチル化修飾を観察するため、抗 Klac 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、初期卵室から後期卵室の卵母細胞の核において抗 Klac 抗体のシグナルが強く観察された。その一方で、GSC や哺育細胞等の卵母細胞以外の生殖系列および卵巣を構成する体細胞ではラクチル化シグナルは観察されなかった。本結果は、卵形成過程におけるラクチル化修飾が卵母細胞の核において重要な役割をもつことを示唆している。

そこで次に、卵母細胞の核でのラクチル化修飾がヒストン中のリジンに起きているのか検証した。検証にあたっては、ヌクレオソームを構成するヒストンのうち、翻訳後修飾が重要な働きをもつことが知られるヒストン H3 および H4 のリジンに注目し、これらリジンのラクチル化修飾を認識する抗体 (それぞれ抗 H3K18Lac 抗体、抗 H4K8Lac 抗体) を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、いずれの抗体も初期卵室から後期卵室の卵母細胞の核において強いシグナルを示した。以上の結果は、ヒストンラクチル化修飾が初期卵室から後期卵室の卵母細胞において重要な働きをもつことを強く示唆している。

さらに、卵母細胞においてヒストンラクチル化修飾を誘導する要因についても解析を行った。これまでの研究により、乳酸を基質とするラクチル化修飾は、乳酸産生が活発な状況下で誘導されることが知られている。そこで卵形成過程における乳酸産生状態を明らかにすることを試みた。このため、卵形成過程において、解糖系の最終反応を触媒するピルビン酸キナーゼ (PyK) および PyK により産生されたピルビン酸より乳酸を産生する酵素 (Ldh) の発現を観察した。その結果、PyK は全ての生殖系列で均一に発現していたのに対し、Ldh は初期卵室から中期卵室の卵母細胞の細胞質において他の細胞に比べて特に高く発現していることが明らかとなった。以上の結果は、初期卵室から中期卵室にかけての卵母細胞が高い乳酸産生状態をもつことを強く示唆している。

本研究の結果、初期卵室から中期卵室という限られた発生時期において、卵母細胞特異的に増加する乳酸産生がヒストンラクチル化修飾を亢進することにより、卵母細胞の核特異的に起きる現象を制御することが示唆された。この時期の卵母細胞の核は減数第一分裂の前期にあることから、現在、私は卵形成過程において、ヒストンラクチル化修飾は減数分裂期の染色体制御に寄与すると予想している。

加えて本研究では、ヒストンラクチル化修飾が、転写が不活性であることが知られる減数分裂中の卵母細胞の核において高いことを見出した。この観察結果はこれまでに考えられてきたヒストンラクチル化修飾の働きと相反する。したがって、本研究の成果は、未だ十分に解明されていないヒストンラクチル化修飾の新規機能を特定するための重要な途端となると考える。

今後は、Ldh に対する遺伝学的操作が、卵母細胞のヒストンラクチル化修飾や減数分裂等の卵母細胞特異的な生命現象に影響を与えるかを解析することで、ヒストンラクチル化修飾の役割を解明していく予定である。

線維症の治療と再生研究のための新規遺伝子組換えマウスの開発

成瀬 梨々香（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）

イモリ（有尾両生類）は、眼球から神経性網膜を失っても網膜色素上皮（RPE）細胞から完全に網膜を再生することができる。RPE細胞は、神経性網膜が損傷すると幹細胞（RPE 幹細胞）にリプログラムされ、そこから新たな神経性網膜と RPE 自身を再生する。一方、ヒトを含む哺乳類の場合、RPE 幹細胞は筋線維芽細胞に分化し、最終的には網膜症や失明の原因となる。また、肢においては、イモリの場合、肢が切断されると骨格筋線維（SMF）細胞など実質細胞が脱分化して間葉型の組織前駆細胞様細胞となり、他の組織前駆細胞／幹細胞や間質細胞（線維芽細胞）とともに新たに肢を再生する。一方、哺乳類の場合、こうした間葉細胞が切断端に集まるものの、肢が再生することはなく、多くが筋線維芽細胞に分化し、最終的に線維性の癒痕組織を形成して治癒するのみである。

もし、RPE 細胞や SMF 細胞の外傷後の挙動および遺伝子発現の変化をイモリとマウスの間で比較することができれば、「再生できる・できない」を決定づける因子を明らかにすることが出来ると期待できる。

研究内容の詳細は発表会の場で報告する。

細胞培養系を利用した網膜再生因子の研究

勝村 圭裕 (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)

網膜は眼球の内部を覆う組織で、神経性網膜と網膜色素上皮 (Retinal Pigment Epithelium: RPE) から構成されている。神経性網膜は、最外層に視細胞を含む複雑な神経回路で、視覚の初期過程にはたらく。一方、RPE は、神経性網膜と脈絡膜血管層との間にある扁平な単一細胞層で、メラニン色素をもち、光の散乱防止や視細胞の機能維持など、神経性網膜の生理機能に欠かせないはたらきがある。ヒトなどの哺乳類では、事故等により失われた神経性網膜が再生することはない。一方、イモリ (有尾両生類) は、眼球内に残された RPE 細胞から完全な網膜を再生することができる (Chiba, 2014)。ヒトやイモリでは、眼球から神経性網膜が失われると、RPE 細胞が上皮の性質を失うとともに多能性を獲得する (この細胞を RPE 幹細胞と呼ぶ)。ヒトでは、RPE 幹細胞が筋線維芽細胞に分化して線維症の原因となる。一方イモリでは、RPE 幹細胞は 2 層の細胞層を形成し、内層は神経上皮化して新たな神経性網膜を再生し、外層は RPE を再形成することで、最終的に完全な網膜が再生する。現在、イモリの RPE 細胞を神経性網膜に分化転換させる因子の探索が急がれている。しかし、現状では、RPE 細胞を神経上皮化させる因子は明らかにされていない。

研究内容の詳細は発表会の場で報告します。

イネの側根形成・発達におけるペクチンメチル基転移酵素の機能解析

重川 羽純 (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・目的>

高等植物に特徴的な構造である細胞壁は、細胞形態のみならず発生や器官形成にも大きく関わることが知られている。細胞壁を構成する主成分のうちペクチンは、その性質や存在量が制御されることで、細胞接着、分化や発生の制御に重要な役割を果たしている。ペクチンはゴルジ体内で合成され、まずペクチンの主鎖が合成されると、次にペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) により、メチル基が付与され、流動性の高いメチル化ペクチンの状態となり、最終的に細胞壁へと輸送される。メチル化ペクチンは、細胞壁中にて、ペクチンメチルエステラーゼ(PME)によって脱メチル化され、カルシウム架橋を形成、ゲル化する。また、脱メチル化されたペクチンは、ペクチン分解酵素 (PG) のターゲットとなることから、脱メチル化することで、ペクチン分子の大きさも制御を受けることとなる。これらのことによりペクチンの質的、量的変化が起き、細胞壁の特性全体を調節する機構が存在することで、器官形成などに寄与しているとされているが、未だ報告は少ない。例えば、根はペクチンを多く含むことから、根圏の形成や根の伸長成長に重要であるとされているが、詳しい機構は明らかではない。また、特にペクチン量の少ないイネにおける知見は少ない。そして、根におけるペクチンの調節機構について、PMEに関しては多くの報告があるが、PMTの根における働きについての報告は、非常に少ないのが現状である。そこで本研究では、イネの PMT の中で最も発現量の強い *OsPMT10* に着目し、その変異体の表現型の調査を行うことで、根の発生、発達過程におけるペクチンのメチル化制御機構を明らかとすることを目的に調査を行った。

<材料・方法>

● イネの生育

WT(品種: Dongjin)、*OsPMT10*の機能欠損変異体である *ospmt10*、*pPMT10::GUS*の種子を3日間吸水させた後、1.0 mMのCaCl₂水耕液で4-6日間水耕栽培を行ったイネを用いて以下の実験を行った。

● GUS染色法を用いた *OsPMT10*発現部位の観察

*pOsPMT10::GUS*を90%アセトンで固定した後、GUS staining bufferに浸して15分脱気し、37°Cで一晩染色し観察した。

● 表現型の観察

WTと *ospmt10*の根において、個体ごとに根の総数と、そのうち側根を含む根の数を計測し、側根を含む根の割合を計測した。また、根の先端15 mmの領域における側根の数をWTと *ospmt10*でそれぞれ計測し、平均値を算出した。

● ルテニウムレッド(RR)による根のペクチン染色

4-6日間生育させたWTと *ospmt10*の根を0.01%のRRで5日間染色し、脱メチル化ペクチンの観察を行った。その後、0.1NのNaOHで1分間けん化処理した後、再び0.01%のRRで5日間染色し、メチル化ペクチンも含むペクチン全量の観察を行った。

<結果>

● *OsPMT10*発現部位の観察

種子根と側根の根端、側根の原基の組織でGUSの高い染色性が観察された。一方、根の伸長領域は、種子根、側根ともに発現は確認されなかった。

● 側根の表現型

WTと比べて *ospmt10*の方が側根を含む根の割合が高かった。また、根の先端15 mmにおける側根の数を比べた結果、WTと比べて *ospmt10*で側根の数が多かった。種子根の根端の形態は、WTと *ospmt10*で違いはなかった。

● ペクチンの染色レベルとその分布

NaOH処理前のRR染色(脱メチル化ペクチン染色)では、WTと比べて *ospmt10*の方が側根原基と側根の根端において高い染色性がみられた。NaOH処理後のRR染色(全ペクチン染色)においても、WTと比べて *ospmt10*の方が、側根原基における染色性が高かった。

<考察>

GUS染色による *OsPMT10*発現部位の観察により、*OsPMT10*は種子根と側根の分裂組織、そして、側根の原基で発現することから、根の伸長には働かないが、分裂や組織分化が盛んな組織で働く可能性が示された。これらの結果から、*OsPMT10*の変異体である *ospmt10*は、根の長さよりも、種子根の発達や、側根の分化に影響が出ることが予想されたため、本研究では *ospmt10*で、根の発達や分化に着目した観察を行うこととした。*ospmt10*では、側根が生えている根の割合がWTより高く、WTでは側根が観察されることが少ない根の先端15 mmで側根の数が多かったことから、*OsPMT10*が欠損することで、側根の分化が生じやすくなっていることが示唆された。

そこで、ペクチンのメチル化転移酵素である *OsPMT10*と側根の分化との関係性を調査するため、ペクチン染色を行なった。その結果から、*ospmt10*の側根原基では、ペクチン量がWTよりも増加していた。また、その増加は脱メチル化ペクチン量の増加によるものであった。このことから、*ospmt10*で *OsPMT10*が欠損しペクチンへのメチル化の付与が不全となることにより、まずペクチン合成が促進されたと考えられる。そして、ペクチンがメチル化できないことで、脱メチル化ペクチンの状態で、ゴルジ体から細胞壁へ放出された可能性が考えられる。側根原基で、脱メチル化ペクチンが増加したことで、側根の分化がなぜ促進されたかについては、現在解析を進めている。今後、側根の分化とペクチンのメチル化制御の関係性について明らかとするため、組織化学的方法だけでなく、生化学的な解析を進めるとともに、PMEやPGの活性の測定などのペクチン分解制御の解析を行う予定である。

カルシウム欠乏条件下におけるトマト果実成熟過程での維管束の変化

向井 彩賀 (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】

植物の生育には、窒素 (N)、リン (P)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、硫黄 (S) などの元素が必須である。こういった元素が欠乏すると、植物は生理障害を起こすことが知られている。中でも Ca は、細胞壁の構造と機能の維持、細胞膜の安定化、細胞内のシグナル伝達などに関与し、欠乏した場合は、尻腐れ病と呼ばれるトマトなどの果実の頂端部分が壊死して黒褐色になる生理障害がしばしば問題になる。Ca は運搬されにくい元素として知られており、水とともに蒸散の駆動力で根から吸収され、道管を通過して果実へと運ばれる。果実の中でも、特に果実頂端部では Ca が不足しやすい。また、これまでの研究で、尻腐れ果は果実内の Ca 不足が原因で発生するが、水耕液中の Ca の不足よりも、水分ストレス等によって、Ca の吸収や果実への移行が妨げられることが、障害の主な原因であるとする報告もある。果実への Ca 輸送は、果実や小花柄の維管束の道管から形成される木部の状態によっても制限されている可能性がある。そこで、本研究では、発生する Ca 欠乏条件下の果実成熟過程における果実の維管束の発達の役割を明らかとするために、水を果実に運搬する最終通路である小花柄の維管束と果実内の維管束の様子を調査した。

【材料・方法】

トマトの水耕栽培と Ca 欠乏処理

トマト (*Solanum lycopersicum* cv. "Micro Tom") を 24°C インキュベータ内で水耕栽培した (Yin *et al.*, 2010)。乾燥種子を水で濡らしたろ紙上に滅菌播種し、発芽後ロックウールに植え替えた。花が咲き始めた時点で Ca を含まない水耕液で栽培することで、Ca 欠乏処理を行なった。Ca 欠乏処理後に開花した花から果実を Ca 欠乏条件下の果実としてサンプリングを行なった。

サンプリング

トマト果実は、成熟ステージの Mature green (緑)、Breaker (黄)、Turning (橙)、Redripe (赤) において採取した。小花柄は、Mature green および Red ripe 果実ができた段階で採取した。

実験1 果実内の維管束の本数の計測

4 つの成熟ステージの果実を用いた。果実の果径と果高を記録した後、100 ml ビーカーに水 50 ml と果実 1 個を入れマイクロ波 (100 W) を 4~5 min 照射した。照射後のサンプルの果皮、子室組織、種子を除去し、維管束を取り出した。Mature green 果実、Breaker 果実の一部は、マイクロ波照射後に外果皮を除去し、50 mM Na₂CO₃ 溶液中で室温で処理した後、維管束以外の残りの組織を除去した。

果実の最も広い断面を示す赤道面における維管束数を計測した。果実 1 個につき 5 回計測し、その平均値をその果実の維管束の本数とした。

実験2 小花柄離層の上下部分における輪切り切片の作成と観察

Mature green および Red ripe ステージの小花柄を、離層を境に上下に分けてテクノビット 7100 樹脂に包埋した。包埋サンプルの中間点での輪切り切片を作成し、光学顕微鏡で観察した。

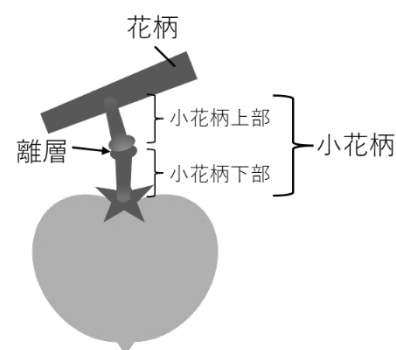
【結果・考察】

実験1において、各条件、4つの成熟ステージでそれぞれ15個以上のサンプルを計測した。維管束の本数/果実サイズ(果径×果高)を算出し、各ステージにおける維管束の本数を、コントロール条件とCa欠乏条件とで比較した。コントロール条件とCa欠乏条件とでは、果実内の維管束の本数に有意な変化がないことが明らかになった。

次に実験2において、各条件における Mature green と Red ripe 果実の小花柄の上下を観察した。すべての条件で離層を境とした小花柄上側、小花柄下側ともに、円環の非常に発達した木部組織が観察できた。コントロール条件では、Mature green でも Red ripe でも、小花柄上部の方が下部と比較して、発達して幅が広い木部組織が観察された。こういった構造を取ることで、小花柄上部から下部にかけての水ポテンシャルが変化することが考えられる。結果的に、小花柄下側の木部での流速が上昇し、果実に水が流れ込みやすくなることが示唆された。一方、Ca欠乏条件のRed ripe ステージの小花柄では、小花柄上部と下部の木部組織の幅が大きく変わらない状態が観察された。Ca欠乏条件下での小花柄上部の木部が発達しにくい現象は、小花柄内の木部を流れる水の流量を減少させている可能性が考えられる。このことは、果実先端へのCaの運搬を阻害するかもしれない。木部維管束細胞の分化には、Caが必要であることが知られており (Iakimova and Woltering, 2017)、Ca欠乏条件によって小花柄の木部組織が正常に発達しなかったことが考えられる。本研究により、尻腐れ果の原因になるCa不足は、小花柄の木部が発達しにくいことによるCaを含む水の流量の減少も関与する可能性が示唆された。

【今後の展望】

Mature green から Red ripe ステージにかけての小花柄全体の木部の状態を観察するために、小花柄の縦切りを実態顕微鏡で観察する。また、小花柄および果実への水の流量を調査するために、水ポテンシャル測定を行う予定である。



キシロシダーゼ過剰発現イネの器官別の細胞壁組成と病害応答の変化

渡辺 大智 (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】

植物細胞は細胞壁という構造を持ち、細胞壁は動物や昆虫による食害ストレスや病原菌による病害ストレス、活性酸素や乾燥による環境ストレスに対して様々な応答を示している。細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチンの3つの主成分から構成されている。キシランはイネの主要なヘミセルロースの主成分であり、 β 1-4 結合したキシロースの主鎖に対し、アラビノースやグルクロン酸などの側鎖が結合したヘテロ糖であり、天然条件ではアラビノキシランやグルクルクロノキシランとして存在している。 β -キシロシダーゼはキシランを加水分解する酵素である。植物体内での細胞壁構成多糖や、糖タンパク質、脂質の代謝に関わっているほか、イネの代表的な病気の原因の病原菌であるいもち病菌が細胞壁を分解し、植物体内に侵入する際にも用いられている。イネがいもち病に感染した際のスコアは5段階あり、低いスコアでは感染部位には褐斑が多く見られるが、スコアが高くなるにつれ感染部位の白斑の数が増加する。第4,5葉期の β -キシロシダーゼを過剰発現するように改変されたイネ(xylosidase-FOX)とWTのイネにおいて、葉と葉鞘でいもち病に対する応答を比較が行われた。その結果、葉ではxylosidase-FOXの方がWTよりも白斑の数が多く、病気のスコアが高かったため病害抵抗性が低下していた。一方、茎を含む葉鞘では、病害抵抗性が向上していた。xylosidase-FOXの葉と葉鞘で病害応答性が異なることから、それぞれの細胞壁の構造にも変化があるのではないかと考えられる。一般的に植物の病原抵抗性に影響を与えるのはセルロースの量だと言われるため、本研究ではWTのイネとキシロシダーゼを過剰発現させたイネの第4,5葉期での葉と葉鞘での細胞壁成分を解析し、セルロース量、またキシランを構成する単糖の量を比較することで、細胞壁組成の変化による病害抵抗性との関係を明らかにすることを目的に実験を行なった。

【材料・方法】

研究材料には、イネ(*Oryza sativa*)のWT、キシロシダーゼ過剰発現体であるxylosidase-FOXを用いた。

1. イネのサンプリング・細胞壁分画

WT(品種:日本晴)、キシロシダーゼ過剰発現イネ Xylosidase-FOXの種子を3日間吸水させた後、土耕栽培によって18日間栽培した。WTとXylosidase-FOXそれぞれ生育の良いものを選び、葉と葉鞘に分けて1cm切片にサンプリングした、サンプリングしたWTとXylosidase-FOXそれぞれの葉と葉鞘から細胞壁を抽出し、結晶性セルロースを多く含むTFA不溶画分(結晶性セルロース画分)と、ヘミセルロースおよびペクチンを多く含むTFA可溶画分(細胞壁マトリックス画分)に分画した。

2. 細胞壁構成糖の分析

ガスクロマトグラフィー、カルバゾール硫酸法、アンスロン硫酸法を用いてWTとXylosidase-FOXの葉と葉鞘におけるTFA可溶画分の構成糖の定量を行った。また、TFA不溶画分の重量を測定することで、細胞壁中のセルロースの量を比較した。

【結果・考察】

xylosidase-FOXとWTでのセルロース量の測定

xylosidase-FOXとWTでのTFA不溶画分の重量について、葉ではWTの方がxylosidase-FOXよりもTFA不溶画分の重量は大きかったが、葉鞘ではxylosidase-FOXの方がWTよりもTFA不溶画分の重量が大きかった。そのため、葉ではセルロースが減少していたが、葉鞘ではセルロースが増加していることが示唆された。

xylosidase-FOXとWTでのヘミセルロース量の測定

現在実験中であるため、詳細な解析結果は発表会にて報告する。

Xylosidase-FOXとWTの葉と葉鞘でのTFA不要画分の重量測定の結果によって、Xylosidase-FOXの葉でのセルロース量の減少および葉鞘でのセルロース量の増加する傾向が観察されたことから、セルロースの存在量が、病害応答性に大きな影響を与える可能性が示唆された。

根粒形成の鍵転写因子 NIN の機能未知領域に関する研究

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

【背景】

根粒とはマメ科植物が窒素固定細菌である根粒菌と共生するために根に形成する器官である。根粒は「根粒菌の感染および増殖・分化」と「細胞分裂などの器官形成」が発達段階に応じて同調しながら形成される。成熟した根粒内部では、根粒菌がニトロゲナーゼと呼ばれる酵素を用いて N_2 を NH_4^+ に還元する窒素固定を行うため、植物は大気中の N_2 に由来する窒素源を利用できる。

NODULE INCEPTION (NIN) は、根粒形成能をもつ植物だけに存在し、根粒菌感染直後に根で発現する転写因子である。NIN 転写因子は根粒形成を開始する際、「根粒菌の感染」と「細胞分裂 (器官形成)」の両方に関してさまざまな遺伝子の発現を制御する鍵転写因子として機能する。さらに、NIN 転写因子は根粒形成過程の初期に限らず、窒素固定を行う成熟した根粒内部でも発現し続けている。しかし、論文等でこれまで報告されているほとんどの *nin* 変異体では根粒が全く形成されないため、根粒の成熟過程や窒素固定といった根粒内部における NIN 転写因子の役割には不明な点が多い。

当研究室ではマメ科のモデル植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* を用いて、根粒を形成する新たな *nin* 変異体 (以後 *partial nin*) を単離した。*partial nin* では、約 900 アミノ酸 (900 aa) からなる NIN 転写因子のうち、既知の機能ドメインに含まれない 104 aa がフレームシフトを起こすことなく欠失している。野生型の成熟した根粒が植物のレグヘモグロビンによってピンク色を呈するのに対し、*partial nin* は窒素固定活性のない白い根粒を形成する。このように、*partial nin* では根粒形成は開始するが、成熟しないことから、*partial nin* で欠失した領域内に根粒内部での NIN 転写因子の機能に重要な部分があると予想される。

NIN 転写因子の新たな機能、特に根粒内部における役割の解明を目指し、まずは *partial nin* の表現型解析を行った。次に、*partial nin* で欠失した 104 aa のうち、根粒の成熟に必要な NIN 転写因子の機能に関わる領域を絞り込むための相補実験を行った。

【材料】

ミヤコグサ *Lotus japonicus* MG-20 (野生型) および *partial nin* 根粒菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF 303099)

【結果・考察】

1. *partial nin* の表現型

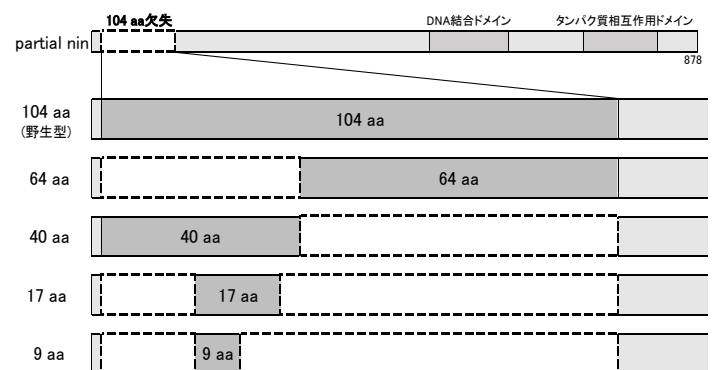
GFP を発現する根粒菌を接種して *partial nin* の根粒菌の感染状態を調べた結果、根粒菌接種 5 日後 (5 dai) では *partial nin* でも野生型と同様に根粒菌が植物内に感染するための通路である感染糸が根毛に形成されていた。しかし、*partial nin* の 14 dai の根粒には根粒菌がほとんど存在しなかった。よって、*partial nin* では感染糸形成以降の感染糸から根粒内部の細胞への根粒菌の放出や感染細胞内での根粒菌の増殖に問題がある可能性が考えられた。

次に、遺伝子発現から *partial nin* の根粒の状態を理解するために 14 dai の根粒の RNA シークエンスを行った。*partial nin* と野生型で発現に差があった遺伝子は 6000 を超えた。このうち約 4 割は根粒菌感染特異的に発現量が変化する遺伝子だった。

NIN について、*partial nin* でも mRNA のスプライシングに異常はなく、発現量は野生型と同様だった。また、根粒形成の初期に発現し、NIN の標的遺伝子である *NF-YB* や *NF-YA* は *partial nin* でも発現が誘導されていた。したがって、*partial nin* において NIN 転写因子の機能は完全には失われていないことがわかった。一方、成熟した根粒で発現することが知られる *Lbs* や *SEN1*、*SST1* などは *partial nin* ではほとんど発現していなかった。さらに、野生型では根粒菌の感染に伴う発現量の変化が起きない老化関連遺伝子 (*CYP1*、*NAC094*) が *partial nin* では顕著に発現していた。ゆえに、*partial nin* では根粒が成熟する前に老化が始まっていると考えられた。

2. 相補実験

partial nin で欠失した 104 aa の全部または一部が野生型のように翻訳される NIN (図 1) が NIN プロモーターによって発現するコンストラクトを 5 種類作成した。これらのコンストラクトを毛状根形質転換法によりアグロバクテリウムを介して *partial nin* に導入した。形質転換根をもつ植物に根粒菌を接種し、形成される根粒を観察した。その結果、欠失領域の後半にあたる 64 aa を補った NIN 以外で成熟した根粒が形成された。したがって、欠失した 104 aa のうち、特に 9 aa に *partial nin* で失われた根粒の成熟に必要な NIN の機能に関わる部分が含まれるとわかった。



(図 1) 相補実験に用いた NIN の模式図

【展望】

partial nin の表現型を踏まえ、感染糸からの根粒菌の放出や根粒菌の増殖に関わる遺伝子の候補を探索し、NIN による制御が行われているか調べる。

また、相補実験より *partial nin* で欠失した 104 aa のうち 9 aa に未知の NIN の機能に関わるアミノ酸が存在すると示唆された。9 aa から更なる絞り込みを行い NIN 転写因子の機能にどのように関わるのか明らかにする。

窒素栄養によって根粒が早期に老化する機構の解析

藤戸 冨佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員：壽崎 拓哉 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)などのマメ科植物は、根に根粒という器官を形成し、根粒を介して根粒菌と共生することにより、大気中の窒素を栄養として得ることができる。マメ科植物と根粒菌は、マメ科植物が光合成産物である炭素栄養を、根粒菌が窒素固定によって得られる窒素栄養を互いに差し出すことによって共生関係を成立させている。しかし、土壌中に硝酸イオンのような植物が直接利用可能な窒素栄養が存在する場合、植物が炭素栄養を差し出すメリットが少ない状況に陥る。この問題の解消のため、植物は硝酸に応答して根粒共生の各過程を多面的に抑制する機構をもつことが知られている。根粒菌の感染や根粒形成の抑制といった、根粒共生の前半過程を硝酸依存的に抑制する仕組みについては、その制御に関わる分子機構の詳細が近年明らかになっている。その一方で、成熟した根粒における硝酸依存的な共生の抑制については未解明な点が多い。本研究は、窒素栄養に応答した根粒共生の後期過程の制御を深く理解することを目的としている。

本研究では、硝酸依存的に機能し、根粒菌の感染や根粒形成を負に制御することが知られている *NIN-LIKE PROTEIN 1 (NLP1)* および *NLP4* に着目した。これらの遺伝子は、硝酸依存的な根粒共生の多面的な抑制に関わる転写因子をコードする。*NLP1* および *NLP4* が成熟した根粒においても共生への負の制御に関与するという仮説を立て、ミヤコグサ *nlp1 nlp4* 二重変異体を用いた解析を行った。

【材料と手法】

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*)根粒菌 (*Mesorhizobium loti*)

ミヤコグサの種子を一晩吸水させた後、寒天培地に植え、2日間育成した。その後、窒素栄養以外の必要最小限の栄養を含むバーミキュライトの入ったポットに根粒菌を接種し、植物体を植え替えた。ポットに植えてから3週間後に KNO_3 (5 mM) を加える、もしくは対照として KNO_3 の含まない水を加え、その後1週間もしくは2週間栽培し、各種実験に用いた。

1. 観察

上記の条件で植物一頭あたり根粒数、根粒の発達段階のそれぞれの個数、最大根粒の直径、根粒の色などについて観察を行った。

2. 樹脂切片の作成、染色

上記の条件でサンプリングした根粒をテクノビット 7100 を用いて包埋し、切片を作成した後、トレイジンプルーによって根粒組織を染色した。

3. qRT-PCR、RNA シーケンス (RNA-seq)

一条件5個の根粒をサンプリングし、通常条件と硝酸処理条件、野生型と変異体での差異についてそれぞれ遺伝子発現解析を行った。

【結果】

nlp1 nlp4 二重変異体と野生型を用いて、3週間生育した植物に高濃度の硝酸を与え、その2週間後に観察を行った。その結果、野生型では通常は桃色をしている根粒が硝酸によって緑色になり、一般的に知られている根粒の老化現象が起こっていた。次に、同条件での根粒切片の観察を行ったところ、野生型では硝酸を与えた条件でのみ根粒内部で根粒菌の量の減少や、根粒菌の状態が変化している様子が観察された。また、DsRed と呼ばれる蛍光タンパク質を発現する根粒菌を感染させて形成された根粒の蛍光強度測定による根粒菌量の定量を行った。その結果、野生型では硝酸を与えた条件でのみ根粒菌量が減少しており、切片の観察と同様の結果が確認された。これらの変化は二重変異体では見られなかった。したがって、硝酸によって *NLP1/4* 依存的な根粒の早期老化が起こることが示された。本研究により、*NLP1/4* は根粒共生の後期においても硝酸依存的に共生を負に制御する因子であることが明らかとなった。

上述した野生型における根粒の老化は、硝酸を与えてから2週間後に見られた。遺伝子発現の変化はそれに先立って起こることが予想される。そこで、硝酸を与えてから1週間後の時点における各条件の根粒を用いて RNA-seq を行った。その結果、根粒において発現する遺伝子の 6.5%程度が *NLP1/4* 依存的に硝酸によって発現量が減少、もしくは増加することが分かった。その中には先行研究において根粒の老化に関与することが示されている遺伝子も多く含まれていた。これらの遺伝子について、より詳しい発現パターンを調べるために、硝酸を与えてからより早いタイミング (1日、3日、5日) の遺伝子発現を qRT-PCR により解析した。

【展望】

今後、根粒共生の後期における *NLP1/4* 下流遺伝子の同定や、欠損変異体の作成および表現型の観察を通じて、より詳しく根粒老化に関連する遺伝子の働きについて調べていきたいと考えている。窒素栄養による根粒共生抑制の仕組みの理解が進めば、窒素肥料と根粒共生を両立した農業の実現への寄与が期待される。

CRISPR/Cas9 を用いたシクラメンの完全八重咲品種の作出

度會 千智 (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】

花の色や形は観賞用花卉にとって重要な特性であり、魅力的な色や形であることはその価値を高めることになる。したがって、新規形質花卉の作出は観賞用花卉の商業的価値を高める方法のひとつになっている。近年、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集が様々な高等植物において行われるようになっており、ゲノムに直接的に変異を起こすことによる分子育種は従来の育種よりも効率的に新規形質を獲得することができる。

花器官の形態形成の制御にはABCモデルが提唱されており、クラスA、クラスB、クラスCの遺伝子の発現によって、萼、花弁、雄蕊、雌蕊の形成が制御される。クラスC遺伝子は雄蕊、雌蕊の形成に関わっており、シロイヌナズナのクラスC遺伝子であるAGAMOS (AG) の変異体は雄蕊と雌蕊を欠損した八重咲の花になる。

本研究の材料であるシクラメン (*Cyclamen persicum*) は地中海沿岸原産のサクラソウ科の多年草で、特徴的な5枚の花弁を持つ。また、花の少ない冬季に開花し、開花期が長いことなどから人気の高い鉢花である。シクラメンは2つのクラスC遺伝子を持っており、CpAG1は雄蕊の、CpAG2は雌蕊の器官分化を決定することが知られている。また、クラスC遺伝子は茎頂分裂組織における増殖を停止する働きが知られている。先行研究ではCRES-T法を用いて、シクラメンの2つのクラスC遺伝子産物(転写因子)の機能を抑制型に変えることにより、50枚以上の花弁を持つ完全八重咲のシクラメンが作出されている(Tanaka *et al.* 2013)。従って、CRISPR/Cas9を用いてシクラメンの2つのクラスC遺伝子を共にノックアウトすることにより50枚を超える花弁を持つ完全八重咲のシクラメンが作出できると期待される。

シクラメンにはCRISPR/Cas9を用いてゲノム編集を行った報告はない。本研究はシクラメンのCRISPR/Cas9を用いた分子育種法を開発すると共に、ゲノム編集による完全八重咲シクラメンを作出することを目的として行う。先行研究では、シクラメンの切片にアグロバクテリウム法によりCRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを導入し、シクラメンのゲノム編集が行われてきたが、標的配列は低頻度での変異にとどまっている。そこで、シクラメンに熱処理を加えることによりゲノム編集頻度の向上も目指す。

【材料・方法】

形質転換体系統の培養

植物材料としてシクラメン「ワインレッド」と「はる香」の2品種を用いた。ワインレッド(WR)は *Cyclamen persicum* 由来の栽培品種であり、はる香(HK)は *Cyclamen persicum* の四倍体性栽培品種と *C. purpurascens* (芳香種) との種間雑種である。これら2品種のシクラメンに、Cas9 タンパク質、標的遺伝子に対するgRNA配列、蛍光タンパク質(ZsGreen)、カナマイシン耐性の各遺伝子を含むCRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを導入することで作出された形質転換体系統を用いた。形質転換体系統は20°Cでカルス増殖を行い、25°Cで不定芽形成、個体再生を行った。熱処

理は、不定芽の誘導・育成中の系統を用いて、37°Cに24時間、48時間、168時間のいずれかの時間で処理を行った。

標的遺伝子配列の解析

シクラメン形質転換体系統の蛍光を放つ不定芽からDNAを抽出し、サンガーシーケンスにより標的遺伝子の塩基配列の解析を行った。

【結果・考察】

これまでに、20°Cで培養中の不定芽からは標的配列への変異は確認されなかった(WR: 0/1 系統, HK: 0/14 系統)。

25°C培養中の不定芽からは、WRのCpAG1は29.4%(5/17 系統)で標的配列への変異が確認され、CpAG2の変異は確認できていない(0/17 系統)。HKのCpAG1は1.7%(1/58 系統)、CpAG2は3.4%(2/58 系統)の標的配列への変異が確認された。また、標的配列への変異が確認された系統すべてに野生型(未編集)の対立遺伝子が存在していることから、完全八重咲の表現型を示す系統はまだ作出できていない可能性が高い。

37°Cで熱処理を行った系統の標的配列への変異については発表会にて報告する。

【展望】

得られたゲノム編集体の培養を続け、表現型の解析を行い、期待通りの完全八重咲の表現型を示すかを確認する。また、野生型配列と変異型配列のヘテロのゲノム編集体を用いて交配を行い、後代から外来のDNAを含まない個体を選抜する。この外来のDNAを含まないゲノム編集シクラメンの栽培・鑑賞を通して、遺伝子組換えやゲノム編集植物を身近にすることで、遺伝子組換えやゲノム編集に対する国民的な親しみや理解が深まることに期待する。また、本研究で得た技術は観賞価値を高めると同時に、遺伝子の拡散を防止することから、花弁の遺伝子組換え育種の定法となる可能性がある。この技術を、新しい色や形、香りを付与した遺伝子組換え植物の不稔化に応用することにも期待する。

【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」によって実施されました。シクラメンの2品種(ワインレッド、はる香)を提供して頂いたインプラントイノベーションズ(株)、CRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを提供して頂いた遠藤真咲博士と土岐精一博士(農研機構)に深く御礼を申し上げます。また、実験手順等ご指導いただきました小野公代博士に深く御礼を申し上げます。

キノコの発光システムを用いた植物の非破壊的な遺伝子発現解析系確立の試み

重政 恒輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員：小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物の動きは動物に比べて静かであるが、その内部では劇的な遺伝子発現の変化があり、それらは概日リズム変動であったり、さまざまな外環境への応答であったりする。これらの遺伝子発現の変化を、植物体をすり潰して RNA を抽出するのではなく、非破壊的に非接触に観察することは理想的であり、これまで多くのシステムが構築されてきた。現状、使われているシステムとしてホタルルシフェラーゼやウミシイタケルシフェラーゼを用いた非破壊的な遺伝子解析システムがある。

しかしながら、そうしたシステムでは均一な基質送達や基質の添加の部分で課題があり改良の余地は大きい。そこで私は発光基質を自身で合成する、自家発光システム系の開発を目指した研究を行った。

先行研究では発光キノコ (*Neonothopanus nambi*) の発光システムを組み込んだ植物が作製されている。この発光システムで用いられる発光基質(3-hydroxy hispidin) は、植物が豊富に含むカフェ酸 (caffeic acid) を初発物質として2段階の酵素反応により合成される。発光酵素 (*luciferase*: *Luz*) はこれを ATP を必要としない反応で酸化して発光し、発光後の代謝物は1段階の酵素反応によりカフェ酸に再生される。そのため外部からの基質投与をせずに光り続けることができる (*Khakhar et al., 2020*)。しかし、現段階ではこの発光システムによる発光量は非常に少なく、目視では確認できなかった。

そこで本研究では、発光酵素(*Luz*)遺伝子を改変し、酵素改良を行うことによってより強い発光量を示すような植物体の作製を試みる。本研究では、酵素改良を行うためにまず、カフェ酸から発光基質を多量に生産する植物体の作製に取り組んだ。そうした植物体に、改良した酵素遺伝子を導入することで発光量の差異が明らかになり、改良がしやすくなると考えた。酵素遺伝子の導入には、植物-大腸菌のシャトルベクターを用いて、一過性発現による発光の観察と、遺伝子の回収を容易に行うことにした。

【材料・方法】

1. 発光基質生産植物の作製

植物材料としては、モデル植物であるベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた。発光基質合成酵素である *hispidin synthase* (*HISPS*) と *hispidin-3-hydroxylase* (*H3H*)、発光基質再生酵素である *caffeylpyruvate hydrolase* (*CPH*)、*HISPS* の働きを助ける酵素である *4'-phosphopantetheinyl transferase* (*NPGA*) の4遺伝子及び、緑色蛍光タンパク質 (*ZsGreen*) と抗生物質カナマイシン耐性 (*neomycin phosphotransferase II*) の遺伝子を T-DNA 上に組み込んだアグロバクテリウム用のバイナリーベクターを作製した。バイナリーベクターは、Golden Gate 法を用いて、各 DNA 断片を一度に繋ぐ方法により作製した。アグロバクテリウムを用いて、リーフディスク法により、ベンサミアナタバ

コを形質転換した。形質転換植物は、カナマイシン耐性及び、*ZsGreen* の蛍光強度を指標として選抜した。

2. 発光酵素の改良

発光酵素の改良を行うために *Luz* の CDS だけを取り出し、CDS の両端に *EcoRI* site、*HindIII* site を導入した。蛍光選抜で発光基質生産が高いことが期待されるベンサミアナタバコ細胞に一過性に導入するために、*Luz* は大腸菌と植物のシャトルベクターである pWI-11 に組み込んだ。この pWI-11-*Luz* をパーティクルガン法などを用いて、発光基質生産をしているベンサミアナタバコに形質転換し、自家発光させる。*Luz* の改良のために、変異 PCR 等を用いた進化分子工学的手法により、より強い発光強度等を示す *Luz* を選抜する。

【結果】

報告会にて詳細を報告する。

【展望】

将来的には、街路樹などの自家発光に適応できれば、事故防止やSDGsの多くの目標を達成できると考えている。

夜になると暗がりになる学園東大通りをエネルギーを使わずに明るくできると良いと考えており、そのことは事故防止につながると考えている。筑波大学に所属する学生は多数が自転車を使って移動しており、暗い道を自転車移動をしていると木々の枝が顔にぶつかるなどして、重大な事故に繋がりがかねないことを経験したとよく耳にする。そういったことを未然に防ぐためにも、この自律的な発光をする植物を利用することができる。

加えて、街に多く存在する街灯の代わりとなるような存在になることで電気を生み出す際の二酸化炭素量を減らすことができる。そのことは、持続的な社会の実現に向けたSDGsの目標達成に貢献できるのではないだろうか。この研究は社会を変えるような研究のはじめの一歩と言っても過言ではないだろう。

【謝辞】

HISPS、*H3H*、*CPH*、*NPGA*、*Luz* を含むベクターを提供いただいたミネソタ大学の Daniel F. Voytas 教授、pWI-11 を提供いただいた東京大学の宇垣正志名誉教授に感謝いたします。また、実験等を教示いただいた小野公代博士、小野研究室の皆様にも感謝いたします。本研究の一部は、令和4年度生命環境系科研究費獲得支援金によって実施されました。

高濃度アルミニウム存在下における単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の増殖と細胞サイズの変化

上田 修也 (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

地球の地殻中に最も豊富に存在するアルミニウムは、中性環境ではケイ酸塩などの形態で土壌などに固定されるが、土壌や水の pH が低下するとアルミニウム(Al)イオンとして溶出し、数 mM の Al は多くの生物の成長を阻害する。

単細胞性紅藻イデユコゴメ綱 *Cyanidium caldarium* は、実験室内において 200 mM Al 存在下でも増殖することが報告されている(Yoshimura et al. 1999)。イデユコゴメ綱は、世界各地の温泉や火山地帯などの高温・強酸性条件 (56°C以下、pH 5 以下) に適応した極限環境生物の一種である。イデユコゴメ綱が生息する高温・強酸性条件では、金属は非常に水に溶けやすいため、高濃度の金属に対する耐性は生存のために重要であると考えられる。Al 耐性については、細胞内でポリリン酸が Al をキレートしていることが知られている (Nagasawa et al. 2002) が、その全容は明らかではない。

そこで、本研究ではイデユコゴメ綱に属する *Galdieria sulphuraria* および *Cyanidioschyzon merolae* を用いて、イデユコゴメ綱における高濃度 Al 耐性のメカニズムを明らかにすることを目的に研究を行った。*G. sulphuraria* と *C. merolae* は全ゲノム配列が決定されており、相同組換えによる形質転換が可能な優れた実験材料である。また、*C. merolae* は細胞壁を持たず、光独立栄養でのみ増殖するのに対して、*G. sulphuraria* は固い細胞壁を持ち、従属栄養で増殖でき、生理学的、形態学的特徴が異なる。

Materials and Methods

培養: 50 ml フラスコに 10 ml の *G. sulphuraria*, *C. merolae* をそれぞれ、初期濁度 $OD_{750} = 0.05$ となるように 2×Allen's medium (pH 2.5) で調整し、40 °C で振動培養した。*G. sulphuraria* は従属栄養 (暗条件, 25mM グルコース添加) もしくは、連続光(70 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)を照射して、光独立栄養で、Al 濃度を 0-700 mM で段階的に変えて培養した。Al は硫酸塩として添加した。同様に *C. merolae* は Al 濃度が 0, 30, 100, 200, 300 mM となるよう Al を添加し、光独立栄養で培養した。光学顕微鏡 (OLYMPUS BX53) により細胞を観察した。

Al 濃度の測定: 培養液および、培養液を遠心分離により上清画分と細胞画分に分けたものを灰化处理し、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)により Al 濃度を決定した。

Results and Discussion

Al の濃度を段階的に変えて *G. sulphuraria* を培養したところ、従属栄養、光独立栄養ともに 700 mM では増殖せず、500 mM では増殖したが、増殖が低下した。全ての Al 濃度で、従属栄養のほうが独立栄養よりも高い Al 耐性を示した。*C. merolae* は、30, 100, 200 mM Al 存在下では、通常培養条件 (0 mM Al 添加) よりも高

い増殖速度を示した。一方、300 mM Al 存在下では増殖しなかった。

ここまでの結果から、*G. sulphuraria* のもつ固い細胞壁が Al 耐性に寄与している可能性はあるが、イデユコゴメ綱における高濃度の Al 耐性には、細胞の代謝が重要であると考えられた。そこで、これ以降、細胞内の元素局在の解析や生化学的解析に優れた *C. merolae* を研究材料として、イデユコゴメ綱における高濃度 Al 耐性機構の詳細なメカニズムを調べることにした。

C. merolae について顕微鏡観察を行ったところ、全ての Al 濃度で、通常培養に比べて細胞サイズの縮小が観察された。Al 添加後 6, 14 日目の *C. merolae* 培養液、及び培養液を遠心分離して得た上清画分と細胞画分の Al 濃度を、ICP-AES により決定した。その結果、両方のサンプリング日で、全ての Al 濃度で、細胞画分の Al 量は通常培養と変わらず、添加した Al は主に培地上清に含まれていた。このことから、*C. merolae* は、Al の取り込みを抑制、あるいは排出を促進する機構を有しており、それが Al 耐性に主に寄与していると考えられる。

本研究では、*C. merolae* と *G. sulphuraria* も *Cyanidium* と同様に高濃度 Al 耐性をもち、*C. merolae* では、高濃度 Al 存在下で細胞サイズが縮小するが、200 mM 以下の Al が存在するときには増殖が促進されることをみいだした。さらに、高濃度 Al 存在下でも細胞画分の Al 濃度が上昇しなかったことから、先行研究とは異なる Al 耐性機構があることが示唆された。今後、本研究成果を手がかりに、イデユコゴメ綱における高濃度 Al 耐性の解明を目指す。

References

- Nagasaka et al. 2002 *Planta*, 215: 399-404.
Yoshimura et al. 1999 *Soil Sci. Plant Nutr.*, 45:721-724.

単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における CoA ジスルフィドレダクターゼ欠損株の解析

難波 勇人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 蓑田 歩 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞内のレドックスバランスは、一次代謝の方向と流量を変えることで、増殖を制御する。この制御には酸化還元酵素などのレドックス制御因子が関与しているが、その重要さゆえに、表現型が致死性であったり、複数の因子が関与する階層性の制御のため観察されないことも多い。そのため、光合成生物のレドックスバランスによる一次代謝の制御についての知見は限られている。

CoA ジスルフィドレダクターゼ (CoADR) は、CoA のチオール基の酸化還元を触媒する酵素である。グルタチオンのチオール基の酸化還元を触媒するグルタチオンレダクターゼ (GR) を持たない一部の嫌気性微生物に主に存在し、多くの生物が GR を介して行っている細胞内レドックスの調節を GR の代わりに行っていると考えられているが、その生理学的解析はない。私達は、ラン藻、緑藻、紅藻やクリプト藻の一部に CoADR が存在することを見出した。これらの藻類では GR と CoADR の両方が存在することから、CoADR は、GR と共に細胞内のレドックス制御に関与していると考えられた。

そこで、本研究では、CoADR をもつ光合成生物のうち、古くから生理学的知見が蓄積されており、全ゲノム配列も決定し、分子生物学的解析にも優れた光合成研究のモデル生物である単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて、光合成生物における CoADR の生理学的役割の解明を目的として研究を行った。

【材料と方法】

培養: クラミドモナスライブラリープロジェクトから、*Chlamydomonas reinhardtii* の CoADR 遺伝子の異なる位置に CIB1 カセットが挿入された CoADR 欠損株 (CoA1, CoA2)、CIB1 カセットの挿入に利用された野生株を取得した。

C. reinhardtii は、光強度 90-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、27°C で、試験管で通気しながら、光混合栄養条件、光独立栄養条件で培養した。

PCR: 光混合栄養条件で培養した *C. reinhardtii* の培養液 (1 mL) を遠心分離して上清を取り除き、DNA を Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (PCI) を用いて抽出した。CIB1 カセットが CoADR 遺伝子領域に挿入されているかを確かめるために、各 DNA 抽出液とコントロール領域とカセットが挿入されていると予想される CoADR 遺伝子の領域をそれぞれ増幅するプライマーセットを用いて KOD FX Neo (TOYOBO) により PCR を行った。また、CoA1、CoA2 にそれぞれ挿入されているカセットの配列と CoADR 遺伝子の配列をプライマーとして用い、同様に PCR を行った。

RT-PCR: 光混合栄養条件で培養した *C. reinhardtii* の培養液 $\text{OD}_{750}=1.0$, 10 mL) を遠心分離し、上清を取り除いた。RNA を PureLink RNA Mini Kit (Life technologies) を用いて抽出し、polyA プライマーと Reveratrac Ace (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行った。作成した cDNA を鋳型として、One Taq (New

England BioLabs) を用いて PCR (40 cycle) を行い、野生株と CoA1 欠損株における CoADR 遺伝子の発現量を比較した。顕微鏡観察: 培養した細胞、および、でんぷん染色をおこなった細胞を、40 倍の対物レンズを用いて光学顕微鏡 (OLYMPUS BX53) により観察した。でんぷん染色は培養 200 μL を遠心分離し、上清を除去した後、90%エタノールを入れ再度遠心分離し、クロロフィルを取り除き、ペレットに $\text{I}_2\text{-KI}$ solution を加えた。

【結果と考察】

最初に、クラミドモナスライブラリープロジェクトから入手した CoADR 欠損株 (CoA1, CoA2) のカセット挿入位置を決定した。クラミドモナスライブラリープロジェクトの情報から CoA1 は第 13 エキソンに、CoA2 は第 3 エキソンに CIB1 カセットが挿入されていると考えられた。それぞれの株において、CIB1 カセットが挿入されていると予想される領域を増幅した時に、野生株では 1500 bp にバンドが観察されたのに対して、CoADR 欠損株では 4000 bp にバンドが観察された。また、CIB1 の配列をプライマーとして用いたとき、欠損株は CoA1、CoA2 ともに 1000 bp 付近にバンドができたのに対し、野生株ではバンドが観察されなかった。これらの結果から、二つの CoADR 欠損株は、それぞれ、CoADR1 は第 13 エキソンに、CoADR2 は第 3 エキソンにカセットが挿入されていることを確認した。RT-PCR を行った結果、野生株では CoADR の mRNA に由来するバンドが検出されたが、CoA1 では検出されず、CoA2 では微量にしか検出されなかったことから、CoA1、CoA2 ともに CIB1 カセットがゲノム上の CoADR 遺伝子に挿入されることにより、CoADR 遺伝子の発現レベルが顕著に低下した CoADR 機能欠損株であることがわかった。

次に顕微鏡観察を行ったところ、光独立栄養条件、光混合栄養条件で、CoADR 欠損株は、0 日目は野生株と同程度の大きさであったが、培養 4、5 日目には野生株に比べて、細胞サイズが増加していた。さらに、培養した細胞にでんぷん染色をおこない観察したところ、CoADR 欠損株は両培養条件において野生株に比べてでんぷんを過剰に蓄積していることがわかった。これらの結果から、CoADR 欠損株では、デンプンが過剰に蓄積することにより細胞の肥大化が起こっていることが示唆された。

さらに、CoADR の欠損が増殖にどう影響するのかを調べるために増殖曲線を作成した。それらの詳細な結果と考察は発表会にて報告予定である。今後、CoADR 欠損株の更なる表現型の探索や、過剰なデンプンの蓄積を引き起こす原因を探ることで、CoADR の生理学的役割の解明を目指す。

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の硫酸イオン輸送体 SulP family の機能解析

津留 陽果 (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】

硫黄は生物に不可欠な元素であり、含硫アミノ酸 (システイン・メチオニン)、様々な補因子 (ビオチン、coenzyme A、鉄・硫黄クラスターなど) に含まれる。一般的に、バクテリアは、硫酸塩 (sulfate) を取り込んで、様々な含硫化合物を生合成している。硫酸塩は、様々な硫酸輸送体 (sulfate permeases; SulT (CysPTWA), SulP, Cysp/(Pit), CysZ family) によって取り込まれる(1)。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は光合成、窒素・炭素同化や植物色素体の進化について長年研究されてきたモデル生物である。シアノバクテリアの硫酸輸送体は、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 で詳しく調べられている。SulT (CysPTWA) をコードする *sbpA* オペロンの破壊で通常濃度の硫酸濃度条件下で生育できなくなる。つまり、7942 株はこの一つの硫酸輸送体をもっている。シアノバクテリアにはこの一種類の硫酸輸送体をもつと考えられていた。しかしながら、私の研究室の先行研究で、*Synechocystis* sp. PCC 6803 は同オペロンを欠失しても通常の硫酸濃度条件下で生育できることがわかり(2)、つまり 6803 株には未知の硫酸輸送体が存在すると考えられた。

バクテリアの硫酸輸送体のうち、SulP は 12 個の膜貫通ドメインをもち、生物全般に幅広く存在する陰イオン輸送体である(3)。シアノバクテリアの SulP family について、以下のことがわかっている。*Synechococcus elongatus* の *sync1147* は SulP 様タンパク質をコードし、低親和性の NO₃⁻ 輸送に関連することのみが示唆されているが、本来の基質は明らかにされていない(4)。*Synechococcus* sp. PCC 7002 では、SulP family に属する BicA タンパク質が HCO₃⁻ 輸送体として機能し、CO₂ 濃縮メカニズムの一端を担っている(5)。*Synechocystis* sp. PCC 6803 にも、BicA のオルソログが存在するが、*sync1147* のそれは見つかっていない。それら以外の 3 種の SulP 様タンパク質 (Slr0096, Slr1229, Slr1776) が硫酸塩の輸送に関わる可能性を検討することにした。そこで、それらの遺伝子破壊株を作成し、その表現型についての解明を目指した。

【材料・方法】

slr0096, *slr1229*, *slr1776* 変異株の作出

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の *slr0096*, *slr1229*, *slr1776* 遺伝子中に、それぞれエリスロマイシン、スペクチノマイシン、カナマイシンに耐性を与える遺伝子を二重相同組換えにより挿入することで変異株を作出した (図)。それぞれの標的遺伝子のコード領域とその上流及び下流各 1 kbp を含む約 3 kbp の DNA 断片を PCR で増幅し、pMD19 vector に Cloning した。得られたプラスミドを鋳型に、標的遺伝子のコード領域の大部分を欠損する様に逆向きに PCR を行い、得られた線状化ベクターと各耐性遺伝子を In-Fusion 反応により結合し、大腸菌で増幅したのち精製することで、耐性遺伝子を目的遺伝子上流及び下流の相同領域によって挟む置列を持つプラスミド DNA を得た。

得られたプラスミド DNA を用いて野生株への形質転換を行い、形質転換株を得た。

【結果・考察】

各株の作出進行状況は以下のとおりである。 Δ *slr0096* 株は、形質転換株ゲノムを耐性遺伝子を増幅するプライマー (Emr_F, Emr_R) 及び遺伝子プライマー (*slr0096_upF*, *slr0096_dnR*) の組み合わせで PCR し、ゲノム情報が目的のものかどうか確認した。その結果、得られた株は目的の Δ *slr0096* 株であると判断した。この株は寒天培地上で生育が抑制されており、遺伝子欠損の影響が見られた。

Δ *slr1229* 株は得られた株の DNA 構造が予測と異なっており、あらためてプラスミド DNA を確認したところ不備が認められたので、infusion クローニングをやり直している。

Δ *slr1776* 株は、得られた変異株の染色体 DNA の構造を確認中である。

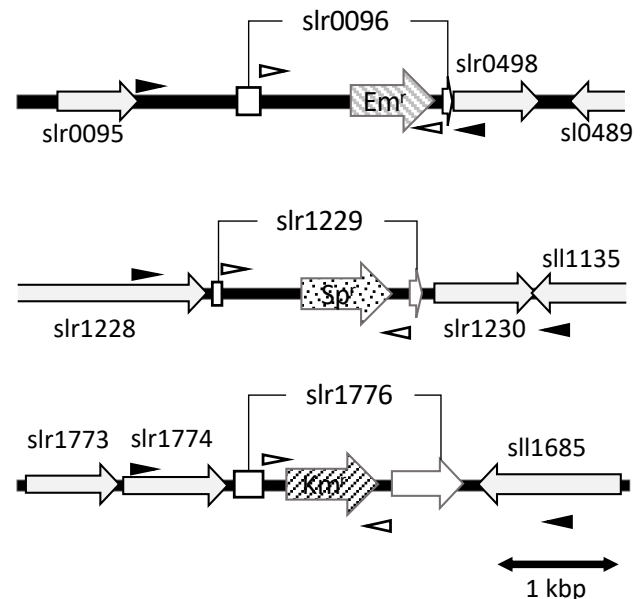


図. *slr0096*, *slr1229*, *slr1776* 遺伝子への薬剤耐性遺伝子挿入の模式図。Emr^r、Sp^r、Km^rは、それぞれエリスロマイシン、スペクチノマイシン、カナマイシン耐性遺伝子を示す。黒三角と白三角は、それぞれの遺伝子領域と薬剤耐性遺伝子を増幅するプライマーの位置を示す。

【参考文献】

1. Aguilar-Barajas et al., *Biomaterials* 24, 687–707 (2011)
2. Lee et al., *Algal Res.* 60, 102530 (2021)
3. Malcom et al., *Physiol. Plant.* 117, 155–163 (2003)
4. Maeda et al., *J. Biol. Chem.* 281, 5869–5876 (2006)
5. Price et al., *PNAS* 101, 18228–18233 (2004)

植物におけるタンパク質高発現系「つくばシステム」を用いたミスマッチ酵素の精製と検証

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

背景・目的

ゲノム編集とは人工切断酵素を用いて DNA に二本鎖切断 (DSB) を起こし、切断された遺伝子が欠失や置換を起こすことによるノックアウトや、修復する際に外来の配列を導入することによって目的の性質を持つ遺伝子を導入するノックインを扱う技術である。

既存の技術として CRISPR/Cas9 が近年主に使用されている。CRISPR/Cas9 はヌクレアーゼである Cas9 とプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の直前に位置する特異的 DNA 標的部位へ結合するための gRNA から構成されており、デザインの簡便さや複数の標的遺伝子を扱えることに優れているゲノム編集方法である。しかし、PAM 配列での標的制限があることや産業利用として特許のライセンスの問題という懸念が挙げられる。

植物における Enzyme X は、そのアミノ酸配列比較から、ほかの生物における DNA ミスマッチ認識酵素と相同性を示す。通常、これらの DNA ミスマッチ認識酵素は、DNA ミスマッチのみを認識し、ほかのタンパク質と結合することで、ミスマッチを修復する。一方で、植物 Enzyme X はほかの DNA ミスマッチ認識酵素にはないドメインを有していることが配列比較から明らかになっているが、このドメインがどのような機能を有するのか明らかになっていない。そのため、本研究では、植物由来 Enzyme X を発現、精製を行うことで、その生化学的機能を明らかにすることを目的とする。もし、この酵素が DNA ミスマッチを認識することができれば、ゲノム編集酵素として利用することの可能性も考えられる。

植物由来 Enzyme X については、これまで大腸菌でのタンパク質発現システムを用いた実験が行われたが、インクルージョンボディに蓄積して、不溶化するため、生化学的な検証は出来ていない。そこで、当研究室で開発された植物における一過的タンパク質発現系である「つくばシステム」を利用して発現させることを行うこととした。つくばシステムは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組み合わせることによって、これまでに報告された植物での一過的タンパク質発現システムである magnICON システムと比較して、短時間で大量のタンパク質を発現できるシステムである。ちなみに、これらの発現は、*Nicotiana benthamiana* において行うが、これは、様々な植物種のなかでも、病原菌に対する免疫応答が弱いいため、ウイルス由来のローリングサークル型複製システムが有効にはたらくためと考えられている。

方法

1. *Nicotiana benthamiana* への感染

前任の研究者が作製したベクターをエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムに導入し、培養過程を行ってから OD₆₀₀ が 0.5 になるように調製して感染溶液を作製した。植物の葉を溶液に浸した状態でバキュームをするアグロインフィルトレ

ーションを行い感染させた。細胞壊死を抑制するためアスコルビン酸ナトリウム水溶液を噴霧し、感染 3 日後に葉を回収し、液体窒素によって葉を凍結させた。

2. タンパク質精製

凍結した葉をミキサーによって破碎し、バッファーを加えて液状にした。その溶液をホモジナイザーで分画し、ミラクロスで濾過、いくつかの遠心の過程を行った。更に不純物を取り除くため、限外濾過とアミロースレジンを利用したカラムクロマトグラフィーを行い、enzyme X を精製した。

結果と考察

詳細は発表会にて報告する。

ジャガイモの環境ストレス耐性向上に関する研究

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

【導入】

植物は環境ストレスにより、その生育に悪影響を受ける。体内の耐性機構により対抗するが、生育が抑制され、高い塩ストレス下では枯死してしまうものが多い。地球温暖化の影響による気候変動などにより、世界的に塩類の蓄積した土壌の割合が増加しているため、現在農作物を生産している地域で将来的に耕作が不可能になることも考えられる。

生産量がトウモロコシ、コムギ、米に次ぐ世界四大作物のジャガイモ(*Solanum tuberosum*)は、可食部が地下に形成されるため塩害に弱く、ストレス耐性の向上に伴うジャガイモの生産可能地域の拡大は食糧問題解決の手段になり得ると考えられる。

ストレス耐性を向上させる手段の一つとして、遺伝子組換えを用いた方法が挙げられる。本研究では、海浜の湿地に生育するアッケシソウから単離された FLA をジャガイモに導入することにより耐塩性が強化されたジャガイモの作出を目指している。

【材料】

・ジャガイモ：オランダ由来の品種で、耐塩性や乾燥耐性が比較的高い Desiree を用いた。世界各地で栽培されており、研究材料としても用いられてきた²⁾。実験に使用する個体は、25°C、16時間明期、8時間暗期の条件下で固形 Murashige and Skoog (MS) 培地を使用して継代培養により維持している。

・導入遺伝子：共同研究先の東京農工大学山田研究室により、耐塩性が知られる植物種から耐性に関わる遺伝子の探索が行われ、cDNA ライブラリーを導入した大腸菌の耐塩性スクリーニングにより幾つかの遺伝子が単離された。本研究では、その中からアッケシソウ (*Salicornia europaea*) 由来の Fascicline-like Arabinogalactan Protein (FLA) を使用した。この遺伝子は植物由来で大腸菌の耐塩性を強化することから、多様な生物種で耐塩性を付与する事が期待される。

【方法】

1. FLA 導入コンストラクトを保有するアグロバクテリウムの作成

Gateway クローニングシステムによりアグロバクテリウムが保有可能なディステーションベクター pGWB602、pGWB605 にそれぞれ導入した。

これらのベクターは、目的遺伝子を植物の全身で高発現させる 35S プロモーターの下流に連結させるものである。また、pGWB605 は目的遺伝子の下流に GFP が連結されるよう設計されている。

作出されたそれぞれのベクターは、凍結法を用いて LBA4404 株に導入した。

2. アグロバクテリウム法による形質転換体の作出

FLA(pGWB602-FLA、pGWB605-FLA)を導入したアグロバク

テリウムを使用し、非組換え体の葉切片に感染させた。感染後の葉切片は適切なタイミングで培地交換を行った。培地は植物ホルモンを加えた固形 MS 培地を使用した。感染後 6 日間は暗条件下で培養し、その後は明条件下でカルスの形成を誘導した。形質転換体の選抜には除草剤の一種であるバスタを使用した。

【結果、考察】

1. FLA 導入コンストラクトを保有するアグロバクテリウムの作成

pGWB602-FLA、pGWB605-FLA の二種類を作成した。シーケンス解析によりベクターへ目的遺伝子が正しく挿入されたことを確認した後、それぞれのコンストラクトを有するアグロバクテリウム(LBA4404 株)を得た。

2. 形質転換体の作出

約 500 枚の葉切片において感染作業を行った。現在まで、形質転換体は得られていないため、カルス形成と再分化形成の二点について考察する。

① カルスが形成されない点

感染を行った後の葉が褐変し、カルスが形成されない外植片が複数見られた。この要因として、継代培養後の経過時間が問題であると推測された。継代作業では、成長した個体の茎頂を約 2~3cm 程度切断し、新しい培地に移植する。移植した茎頂が成長し、葉が感染に使える程度まで大きくなるには 2 週間以上を要する。感染作業上、葉の周囲を切り落とすことから、葉が大きく成長した継代後 4~5 週の葉を用いていた。しかし、継代後時間をおかず 2.5 週が経過した葉を使用すると褐変が起らず、複数のカルスを獲得することが出来た。この結果を基に、今後の感染では継代培養後 2.5~3 週程度の葉を使用することとした。

② 再分化体が形成されない点

カルスの形成後、選抜マーカーであるバスタを添加すると全てのカルスが褐変し、結果として再分化体が得られていない。しかしながら、感染を行わず同じ条件下で培養した葉切片については全ての個体においてカルスの成長が比較的良好なことから、アグロバクテリウムの感染過程、若しくは感染後の培養条件に問題があると考えられる。原因の一つとして、再分化中にアグロバクテリウムと思われる菌が再増殖してくることが培養条件の悪化に関与していることが想定された。

この問題の解決策は現在検討中である。

【参考文献】

*1 Life 11,545 (2021)

*2 ジャガイモ辞典：財団法人いも類振興会 (2012)

Lac-CBD 導入遺伝子組換えポプラバイオマスの酵素糖化性の評価

高野 俊介 (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・目的】

世界的な気候変動への対策として、CO₂排出量削減が急務である。植物バイオマスは化石資源の代替として期待され、その中でも木質バイオマスは賦存量が大きく、かつ食料生産とも競合しないことから魅力的な資源である。しかし、木質バイオマスの主体を成すリグノセルロースバイオマスはリグニンの除去のための前処理、糖化处理等に要するコストがネックとなり、実用化が進んでいない。そこで、リグニンの除去工程を必要としない、リグノセルロースを改変した植物の開発を目的が望まれている。

Lac-CBD 融合遺伝子は、カワラタケ *Trametes versicolor* 由来のリグニン分解酵素であるラッカーゼ (*Lac*) とセルロース分解菌 *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 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部分的に分解し、脱リグニン処理を要しないリグノセルロースバイオマスが得られると仮説に基づき設計された。これまでに、Lac-CBD 融合遺伝子の導入により草本では酵素糖化性が向上することが確認されたが、樹木における事例はない。本研究では、Lac-CBD 融合遺伝子の樹木での有効性の検証を目的とし、Lac-CBD 導入組換えポプラの特性評価を行った。

【材料】

■植物材料

ポプラ T89 系統 (*Populus sieboldii* × *P. tremuloides*) の非組換え体 (NT) と、同 T89 系統に対して TF012 コントラスト (図 1) を導入した 3 つの組換え体系統 L1、L2、L3 を用いた。



図 1 TF-012 の T-DNA 領域の模式図

ポプラは、25°C、16 h 明期/ 8 h 暗期で制御された培養室において、MS 寒天培地 (組換え系統については 50 mg/L Kanamycin を含む) で無菌培養により維持された。

【方法】

○ 栽培評価

各系統ポプラは、約 1 ヶ月間馴化後、40 日間特定網室での生育を評価した (2022. 6. 13 ~ 7. 23)。

評価項目は樹高、基部直径、光合成量子収量 (QY) の 3 つである。各評価項目は 1 週間毎に計測し、基部直径 (地上 3 cm 部分) についてはノギスを使用し、QY 値については午前 6 時において Fluor Pen 100 を使用してそれぞれ計測を行った。

○ 発現量解析

無菌栽培の各系統ポプラから RNA を抽出、cDNA の合成を行い、RT-qPCR により Lac-CBD の発現量をポプラ内である *PteIF4A* の発現量との比として定量、比較した。

○ 酵素糖化性評価

栽培評価に用いたポプラの地上部 3 cm 以上をフードプロセッサー (CRUSH MILLSER IFM-C20G) で粉碎し、ステンレスメッシュで粒径が 75 μm 以下の木粉のみを酵素糖化試験の試料とした。

上記の木粉を 10 mg ずつ量り取り、クエン酸緩衝液 (pH. 5) 950 μl に加えた後、Cellulose, enzyme blend (Sigma-Aldrich Co. LLC) 50 μl を添加しよく攪拌した。その内、10 μl を分取し 1, 990 μl のクエン酸緩衝液に加え、これを 0 h の試料とした。残りの混合液は HYBRIDIZATION INCUBATOR (HB-80) で 50 °C、59 r/min でそれぞれインキュベートし、インキュベート開始から 24 h と 72 h で、0 h と同様にサンプリングし試料を得た。

分取した試料は Glucose Assay Kit-WST (株式会社 同仁化学研究所) 及びそのプロトコルを用い、グルコース含量を定量した。

【結果】

➤ 栽培評価

栽培期間を通じて、組換え系統はいずれも NT と比較して有意に小さかった。葉の健全度の指標とした QY については全ての系統間で有意な差は生じなかった。

➤ 発現量解析

Lac-CBD の発現量は LP3 で最も高く、次いで L1 で高い値を示した。L2 の Lac-CBD の発現量は極めて低かった (n=3)。

➤ 酵素糖化性

脱リグニン処理なしでの酵素糖化处理 72 h の溶出グルコース量は、4 系統間では大きな差はみられなかった。

一方、酵素処理 24 h 時点での溶出グルコース量に着目すると、L3 系統は他の系統と比較して高い値を示すことが確認されたことから、酵素糖化性が高いことが示唆された。

【考察・展望】

脱リグニン処理なしの酵素糖化性試験により L3 における酵素糖化性の向上が示唆された。L3 は、Lac-CBD 発現量が最も高い系統であることから、Lac-CBD 発現と酵素糖化性向上との関係が期待される。一方で、酵素糖化試験に関しては定量値の乱れから再現性の確認が十分ではなく、今後反復実施が必要である。加えて、本研究で使用した試料は特定網室で 5 週程度しか栽培しておらず、二次木部組織が十分に発達していなかった。今後、二次木部組織が十分に成長した成長段階における Lac-CBD 発現と酵素糖化性の関係について評価することで、Lac-CBD のポプラにおけるリグノセルロース改変の有効性を検証したい。

Effects of ocean acidification under different light availability on the warm temperate coral *Acropora solitaryensis*

飯島 れいら (筑波大学 生物学類) 指導教員: Sylvain Agostini (筑波大学 生命環境系)

Introduction – Increase in seawater temperature due to climate change is leading to the poleward shift of hermatypic corals geographic distribution. However, ocean acidification (OA), the decrease in oceanic pH result due to the absorption of CO₂, could limit the expansion to higher latitudes. Additionally, in comparison to lower latitudes, higher latitudes tend to have limited light availability, and it could limit the habitable depth range¹. Thus, ocean acidification increases the energetic cost of calcification², and as corals relies on the energetic input of photosynthesis from their symbiont³, lower light level could further enhance the negative effects of OA. Therefore, we investigated the interaction of future pH conditions with differing light conditions, as these factors could determine the potential of high latitudes as a coral refugia.

Methodology – Colonies of the warm-temperate coral species *Acropora solitaryensis* were sampled at Shikine island (Tokyo Prefecture, Japan, 34° 19' 34" N 139° 12' 36" E), fragmented into microcolonies and acclimatized prior to the experiment for two weeks. Four experimental treatments were chosen by fully-crossing two pH, equivalent to present and end-of-century OA scenario, and light conditions, equivalent to 5 m (high light) and 15 m depth (low light): (1) High light × Present pH (mean ± se, n = 8, 7.86 ± 1.80 mol photon s m⁻² d⁻¹, 8.22 ± 0.08 pH, 353 ± 56 μatm pCO₂), (2) High light × OA pH (n = 5, 8.56 ± 2.46, 7.86 ± 0.16, 923 ± 180), (3) Low light × Present pH (n = 5, 3.19 ± 1.75, 8.17 ± 0.11, 409 ± 75), (4) Low light × OA pH (n = 5, 3.09 ± 1.04, 7.83 ± 0.15, 994 ± 94). Both the coral host and symbiont physiology and metabolism were assessed to gauge their response to differing stressors.

the symbiont maximum photosystem II efficiency (F_vF_m), which increased under OA (Figure 1C, ANOVA OA p = 0.012). Corals reared under OA and low light availability showed an increase, albeit non-significant, in photosynthetic activity, host protein, ETSA and net calcification compared to corals reared under low light and present pCO₂ (ANOVA pH:light p = 0.134, p = 0.087, p = 0.053 and p = 0.083, respectively).

Discussion – As expected, metabolic and growth rates were reduced under low light levels. However, contrary to the hypothesis, OA only minorly affected the coral metabolism and its negative effect was not observed under the lower light level. Although the combined effects of OA and decreased light availability could negatively affect coral energetic homeostasis⁴, on the opposite, acidification had a positive effect on the metabolism of corals reared under low light conditions. Corals reared under acidified conditions showed an increase in maximum photosystem II efficiency. Under low light conditions, this increase in photosystem efficiency led to an increase in photosynthesis rates compared to the corals under present CO₂ level and low light conditions. Recent studies have shown autotrophs like zooxanthellae (coral symbiont)^{5,6} and macroalgae⁷ that have poor carbon concentration mechanisms can benefit from the enrichment in CO₂ under acidified conditions⁸. Moreover, the alga species *Padina pavonica*, showed increased maximum photosystem II efficiency under decreased light availability and OA⁹. The increased energetic input resulting from increase photosynthetic rates could have therefore compensated the increase energetic requirements of coral growth under OA. Our results suggest the combination of OA and low light availability will not have a compounding effect on the coral *A. solitaryensis* and might not limit the suitable depth range of corals in higher latitudes.

References

- Muir, P. R., Wallace, C. C., Done, T. & Aguirre, J. D. Limited scope for latitudinal extension of reef corals. *Science* **348**, 1135–1138 (2015).
- Cohen, A. & Holcomb, M. Why corals care about ocean acidification: uncovering the mechanism. *Oceanography* **22**, 118–127 (2009).
- Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L. & Porter, J. W. Light and the Bioenergetics of a Symbiotic Coral. *BioScience* **34**, 705–709 (1984).
- Wall, C. B., Mason, R. A. B., Ellis, W. R., Cunning, R. & Gates, R. D. Elevated pCO₂ affects tissue biomass composition, but not calcification, in a reef coral under two light regimes. *R. Soc. Open Sci.* **4**, 170683 (2017).
- Brading, P. *et al.* Differential effects of ocean acidification on growth and photosynthesis among phylogenies of *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Limnol. Oceanogr.* **56**, 927–938 (2011).
- Rölfer, L. *et al.* Coral-macroalgal competition under ocean warming and acidification. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **534**, 151477 (2021).
- Connell, S. D. *et al.* The duality of ocean acidification as a resource and a stressor. *Ecology* **99**, 1005–1010 (2018).
- Cornwall, C. E. *et al.* Inorganic carbon physiology underpins macroalgal responses to elevated CO₂. *Sci. Rep.* **7**, 46297 (2017).
- Celis-Plá, P. S. M. *et al.* Macroalgal responses to ocean acidification depend on nutrient and light levels. *Front. Mar. Sci.* **2**, (2015).

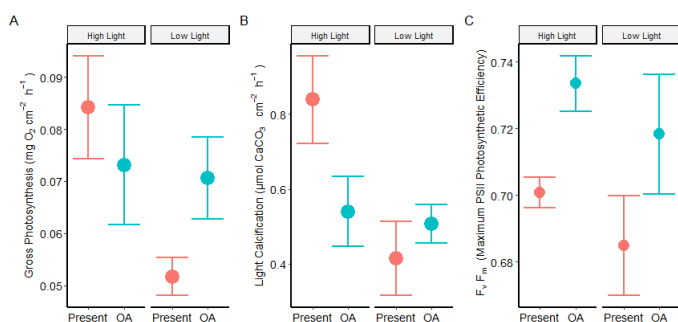


Figure 1: Maximum PSII photosynthetic efficiency (A), gross photosynthesis rates (B) and calcification rates (C).

Results – Under present-day of pCO₂, corals reared under low light conditions showed decreased metabolism (photosynthesis and respiration; Figure 1A) and growth (skeletal growth and calcification; Figure 1B). The only significant difference observed in OA conditions regardless of light condition, was observed for

マガキガイ体内受精における異型精子の役割に関する研究

横屋稜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：稲葉 一男 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

生殖は生物が種を維持するのに必要なプロセスである。有性生殖において、精子は卵と結合し次世代を再生産する重要な役割を果たすが、生物によっては同一個体の精巣から形態が異なる2つの型の精子を作り出す。これを精子二型という。2種類の精子のうち一方は核を持ち、卵と受精する正型精子である。もう一つは核を持たず、卵と受精しない異型精子である¹⁾。精子二型は巻貝などの腹足綱²⁾、ヤリイカ³⁾、硬骨魚類のカジカ⁴⁾、カイコなどの昆虫綱⁵⁾などに見られ、生物の生殖戦略として注目されてきた。しかし、異型精子の機能についてほとんど明らかになっていない。

本研究では浅海の砂地に生息するマガキガイ (*Conomurex luhuanus*) を用いて、異型精子の役割を明らかにすることを目的とした。先行研究により、マガキガイ異型精子に特異的に含まれるタンパク質 *parasperm 1* (PARAS1) が同定され、異型精子の顆粒体と正型精子頭部先端に局在することが明らかになっている⁶⁾。本研究では、異型精子の細胞質に存在する顆粒体構造の詳細、ならびに PARAS1 の局在と生理学的な役割について実験を進め、顆粒体内内容物の放出過程を明らかにした。

【材料】

静岡県下田市恵比寿島、及び沖縄県国頭郡本部町瀬底で採集したマガキガイの成熟雄個体を用いた。採集個体は、海水かけ流し水槽で、海水温 24°C、12/12 時間の明暗周期で飼育した。

【実験方法】

間接蛍光抗体観察

人工海水 (ASW) で希釈した精子を poly-L-Lysin でコートしたカバーガラスに貼り付け、パラホルムアルデヒドで 10 分固定した。PBS で洗浄後、10% goat serum/PBS で室温 1 時間ブロッキングし、1/500 に希釈した 1 次抗体 (抗アセチル化チューブリン抗体及び抗 PARAS1 抗体) で室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1/1000 に希釈した二次抗体 (Alexa488 または Alexa555 で標識) で室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、DAPI で室温で 10 分核染色し、超解像顕微鏡 (ZEISS Elra7 with Lattice SIM) で観察した。

光学顕微鏡観察および運動解析

輸精管から採集した精子を ASW で希釈し、10、20 及び 60 倍の対物レンズを用いて位相差顕微鏡または微分干渉顕微鏡で観察した。運動及び顆粒体の放出は、高速カメラ (HAS220) により観察、撮影を行った。

ウエスタンブロッティング

精子を ASW で希釈し、一定時間後に 15,000 rpm で 4°C、30 秒間遠心後、上清と沈殿を回収した。それぞれ SDS サンプルバッファーと混合し 95°C で 2 分加熱後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、タンパク質を PVDF 膜に転写し、抗 PARAS1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。シグナルは ECL prime の

化学発光システムを用いて、イメージアナライザ LAS4000-mini で検知した。

透過電子顕微鏡 (TEM)

精巣及び輸精管精子を 2.5% グルタルアルデヒドで固定し、Epon 樹脂に包埋後、ウルトラミクロトームを用いて厚さ 70 nm 超薄型切片を作成した。フォルムバール支持膜を貼った銅グリッドの上に載せ、4% 酢酸ウラニルとレイノルズ溶液で電子染色を行った後、透過電子顕微鏡 (JEM1200, JEOL) で観察した。

【結果】

顆粒体の形態と PARAS1 の局在

TEM による観察の結果、異型精子内の顆粒体は膜によって隔てられた小胞であることがわかった。いくつかの像では、エキソサイトーシスにより顆粒体内内容物が放出されている様子が観察された。また、顆粒体の膜付近に PARAS1 の強いシグナルが観察された。

海水への希釈により誘起される顆粒体の自律的崩壊

顆粒体のエキソサイトーシス過程についてさらに詳細に知るために、異型精子を ASW に希釈し、一定時間後の顆粒体の形態を観察した。その結果、異型精子を ASW に希釈したのみでエキソサイトーシスが誘起され、顆粒体が自律的に細胞外に内容物を放出することがわかった。また、希釈直後の異型精子ですら少数の顆粒体がエキソサイトーシスを起こしていることがわかった。

一方、ウエスタンブロッティングから、顆粒体のエキソサイトーシスに伴い、細胞外に PARAS1 が放出、遊離され、遠心後の上清に回収されることが確認された。

【考察】

本研究により、異型精子を ASW に希釈しただけで顆粒体の内容物が自律的に細胞外に放出されることがわかった。輸精管内では顆粒体のエキソサイトーシスが抑制され、海水中のイオンなど何らかのトリガーによって自律的に引き起こされると考えられる。先行研究により、異型精子の内容物が雌の受精嚢内で放出されている像が確認されている⁶⁾。本研究から、この反応は雌由来の何らかの物質によって誘起されるのではなく、雌体内から異型精子が放出されたことが刺激となり、自律的に進行すると考えられる。エキソサイトーシスによって放出された PARAS1 の機能解明は、今後進めるべき重要な課題である。

【参考文献】

- Shibata et al., *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 905748 (2022).
- 手塚 治, *奈良医学雑誌* Vol. 11, No. 5, p. 719-735 (1960).
- Iwata et al., *BMC Evol. Biol.* 11, 236 (2011).
- Hayakawa et al., *J Morphol.* 253, 243-254 (2002).
- Sakai et al., *PNAS.* 116, 10412-10417 (2019).
- 謝 沛然, 筑波大学生命環境科学研究科修士論文 (2017).

形態的特徴と環境 DNA 解析を用いた宍塚大池の藻類フロラ

大河原 由貴 (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】

淡水環境における生物多様性は、経済、文化、教育などの観点からその重要性が認識されている。しかしながら、近年では水質汚染や生息地の破壊などの影響により、世界中で淡水生態系の縮小が危惧されている(Dudgeon et al., 2006)。今後淡水環境を適切に管理していくために、現在の水域にどのような生物が存在しているのか、正確に把握することが求められる。

茨城県土浦市西部に位置する宍塚地域は、開発の進む関東平野において 100 ha の里山環境が広がり、高い生物多様性を維持している。1980 年代より NPO を主体とした保全活動が行われており、2015 年には環境省による「生物多様性保全上重要な里地里山」にも選定された。宍塚地域における生態系の調査は動物、および陸上植物で 1000 種近くが報告されている(及川ひろみ, 1998)。一方で、藻類に着目した生物相の研究は 1978 年の所属研究室の卒業研究による観察記録があるのみで(後藤道美, 1979)、以来調査が全くなされていない。地域の生物多様性をより詳細に理解し今後の保全活動に生かしていくためには、微細藻類を対象とした生物相の基礎的データの更新が望まれる。

本研究では、宍塚大池の藻類、及びそれに近縁な真核生物を対象に、顕微鏡観察から得られる形態的特徴と環境 DNA 解析によって得られる 18S rRNA 遺伝子配列に基づいて、生物相調査を行った。

【方法】

1) 調査地及びサンプリング方法

宍塚地域の中心に位置する宍塚大池を調査地とした。宍塚大池は農業用に 3 つの谷をせき止めて造られたため池である。水域面積は約 3.3 ha で、江戸時代の古地図ではすでにその位置を確認できることから、長い歴史を持ち豊かな生態系が確立されていることが推察される。本研究では、大池北部の灌漑用水口、雑木林が池の縁まで迫った東部、また西側のイナリヤツ湿地の 3 地点において、2022 年 4 月から 12 月にかけて、毎月サンプリングを行った。試料の採集方法として、プランクトンネット法、葉洗い法、直接法、また池の水が干上がっていた場合に限り土壌サンプルを持ち帰り、AF-6 培地を加えたものを観察した。加えて、環境 DNA のフィルター試料作成と粗培養観察に利用するため、環境水も約 1 L 採集した。

2) 形態観察

AXIO ImergerA2 (ZEISS) と CKX31 (OLYMPUS) の顕微鏡を用いてサンプルの観察を行った。AXIO ImergerA2 で観察された細胞はできる限り顕微鏡カメラ DP73 (OLYMPUS) で写真記録を取った。

3) 環境 DNA の抽出

環境水サンプルは採集当日中に GF/F filter (Whatman) で濾過し、-80 °C で保存した。ビーズ式細胞破碎と Dneasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてフィルターから DNA を抽出した。National Center for Biotechnology Information (NCBI) データより多様な真核スーパーグループを含む 51 種の 18S rRNA デー

タベースを作成し、アライメントエディタ上で PR4, PR9 プライマー (Nakayama et al., 1996) の有効性を検討した後、TaKaRa Ex Taq を用いた PCR によって V4 - 5 領域を増幅できることを確認した。その後、PR4, PR9 を用いた PCR によるライブラリー作成と、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いたシーケンシング解析を依頼した。

4) 環境 DNA の解析

メタゲノムデータ解析を行うパイプラインである QIIME2 (Bolyen E et al., 2019) と mothur (v.1.48.0) (Schloss et al., 2013) を用いて、系統解析を行った。ペアエンドのクオリティを確認し、Forward リードを用いたシングルリード解析とした。DADA2 処理を行い、シーケンスエラーの修正と Amplicon Sequence Variant (ASV) へのグルーピングを行った。加えて系統解析では、PR² database (v.4.14.0) (Guillou et al., 2013) を参照し、単純ベイズ分類器を利用して ASV 配列の各分類群への割り当てを行った。

【結果・考察】

1) 形態観察

これまでに 10 門 92 属を観察した。最も多くの属が見られたのは緑藻植物門であり、合計で 45 属を観察することができた。他に観察された生物群は、シアノバクテリア 12 属、渦鞭毛藻 4 属、ストラメノパイル 13 属、ケルコゾア 1 属、ユーグレノゾア 9 属、アマーボゾア 4 属、クリプト藻 3 属、太陽虫 1 属であった。

2) 環境 DNA 解析

合計 193,262 配列 (Forward) から 569 の ASV を得た。系統解析としては、9 門 19 綱 38 目 58 科 75 属 107 種の配列を検出した。これらの中には、形態観察で記録することのできなかつた Apsozoa や Opalozoa に属する原生物の配列も含まれる。また、Perkinsea など、寄生性の生活様式をとる生物群についても環境 DNA の検出によってその存在が示唆される。

卒業研究発表では、形態観察及び環境 DNA 解析から得られたデータを統合し、現在の宍塚大池における藻類相について考察するとともに、40 年前のデータとも比較し、藻類相の変遷についても議論する予定である。

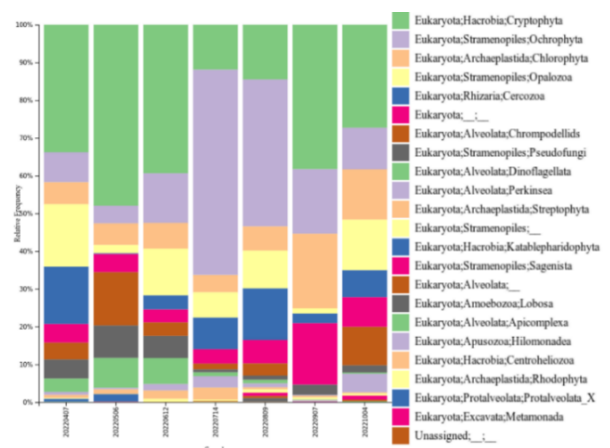


図 1. 4-10 月の環境水における綱レベルでのリード数占有率

大陸～日本アルプス・スケールでみる高山蛾 *Xestia* 属複数種の系統地理学的構造

川島育海 (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)

【背景及び目的】

日本列島の高山帯に分布している生物の多くは、かつて北米大陸あるいはユーラシア大陸に分布していた種が、第四紀の気候変動に伴う分布拡大・縮小の繰り返しの歴史の中で、種分化なども経験しながら、現在の分布域を形成したと考えられている。特に、本州中央部に位置する日本アルプスの高山域はライチョウなどの周北極要素の生物種の世界的な分布の南限である。そのため、日本列島の高山域は世界的に見ても貴重な生物多様性形成の歴史をもち、これら高山域に分布する生物種の生物系統地理学的関係や、移動分散の歴史を推定することは、周北極要素の生物の分布を理解する上でも重要である。しかし、これらの周北極要素をもつ生物の研究の多くは高山植物で行われており (Fujii and Senni, 2006; Ikeda et al., 2020)、チョウなどの一部分類群を除き (Usami et al., 2020; Usami et al., 2021) 未だ十分に研究されていないのが現状である。そこで、本研究では種の多様性と採集効率から鱗翅目ガ類に着目し①本州中部の日本アルプスおよび周辺地域において対象高山蛾 3 種の生物系統地理学的関係を明らかにした上で、②公開データベースを用いて、北半球レベルでの生物系統地理学的構造を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】

対象種として日本列島に分布する高山蛾 6 科 45 種 (神保, 1984; 四方, 2020) のうちヤガ科 *Xestia* 属より、*Xestia speciosa* アルプスヤガ、*Xestia yatsugadakeana* ヤツガタケヤガ、*Xestia albuncula* ダイセツヤガの 3 種を選択した。このうち、アルプスヤガとダイセツヤガは日本列島のほかユーラシア大陸と北アメリカ大陸の寒冷地に分布するが、ヤツガタケヤガは本州中部のみに分布する日本固有種である。また、アルプスヤガは本州中部および北海道に分布するが、ダイセツヤガは本州中部、東北および北海道に分布するなど、これら 3 種は異なる分布様式を示す。サンプル採集では、日本アルプスなど本州中部 5 つの山域より 6 か所で HID ライト (88 W) と紫外線 LED (10 W) を用いた灯火採集を行い、捕獲した対象種はアンモニアを用いて捕殺後、99.9% EtOH 内で保管した。また、飯田市美術館に保管されている高山蛾のコレクションを貸借し、実験試料とした。これらサンプルを対象に QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kits を用いて胸部筋肉または脚より DNA を抽出し、母系遺伝するミトコンドリア DNA Cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) 領域の塩基配列の解読を行った。また、先行研究 (Summerville and Crist, 2002; Mutanen et al., 2012; Mutanen et al., 2016) で公表されている北米およびユーラシア大陸の *Xestia* 属の *COI* 領域の塩基配列情報を公開データベースより収集した。これらデータをもとに、ハプロタイプの決定を行い、QGIS を用いてハプロタイプ分布を地図化した。Neighbor-Net (Bryant and Moulton, 2004) を用いて、種間および種内の遺伝的関係の評価を行なった。また、検出された各地域集団の遺伝的多様性の評価には塩基多様度 π を計算した。さらにアルプスヤガについて、GenGIS (Paekes et al., 2013) を用いて、日本～北半球のサンプルの系統樹を地図に挿入すること

で、アルプスヤガの北半球レベルでの系統地理学的構造を視覚化した。

【結果及び考察】

Neighbor-Net の解析の結果、アルプスヤガ、ヤツガタケヤガ、ダイセツヤガの 3 種より計 33 のハプロタイプが検出された。また、それぞれの種内集団は本州中部の山岳域の東西で 2 系統に分かれることが明らかになった。特に最もサンプル数の多いアルプスヤガでみると、上越から諏訪湖を通過して甲府盆地へつながる線の東側 (大弛峠、八ヶ岳) と西側 (赤石山脈、木曾山脈、飛騨山脈、御嶽山) で 2 系統に分かれていた。また、日本国内のアルプスヤガ、ヤツガタケヤガ、ダイセツヤガについて種レベルの塩基多様度はそれぞれ、0.01225、0.00338、0.00966 であった。ヤツガタケヤガの塩基多様性が 3 種の中で最も低い理由としては、ヤツガタケヤガが日本固有種であり、長期間隔離分布していたことに起因すると考えられた。

日本～北半球の統合データから、アルプスヤガは大きく北米、日本、ウラル・アルタイ、北欧、ヨーロッパアルプスの 5 つの地域系統に分かれた。これら 5 つの地域系統の塩基多様度はそれぞれ、0.00030、0.00391、0.00341、0.00110 および 0.00117 であった。北米の集団の遺伝的多様性が他集団よりも著しく低いのは、供試したデータベースのサンプル採取地域 (ブリティッシュ・コロンビア州西部) が、最終氷期最盛期 (LGM) には氷床で覆われていた地域であり、LGM 以降に小さい母集団から急速に分布拡大したためとも考えられた。しかし、同じく LGM に氷床で覆われていた北欧集団と多くの生物のレフュージア地域であった地中海側のヨーロッパアルプス集団では塩基多様度に大きな違いがみられなかったことから、これについて今後検証が必要である。一方、日本とウラル・アルタイが比較的高い遺伝的多様性を示したことについては、これら地域に更新世の氷期にレフュージアが存在していたためと考えられた。更にユーラシア、北米大陸の系統の地理的距離が離れているのに対し、本州中部は非常に狭い地理的距離にもかかわらず遺伝的多様性が大きいことが分かった。これは、高山蝶に関する先行研究のクモマツマキチョウ、オオイチモンジ、コヒオドシなどに見られるパターンと同様である。

(Usami et al., 2020)

本研究は、北半球レベルでの高山蛾の生物系統地理学的構造を評価した初めての研究である。特に、本州中部という小さいスケールにおいても高山蛾 *Xestia* 属 3 種は複雑な遺伝構造をもつことが明らかとなった。今後は空白地点である本州中部の妙高や白山、東北や北海道のサンプルを追加し、種分化や種内地域集団の分化時期などの推定に取り組むことで、日本列島の特異的な高山域の生物多様性形成の歴史を明らかにしたいと考える。また目下、両性遺伝する核 DNA については、次世代シーケンサーを用いて大量の縮約ゲノム多型 (単純繰り返し配列および 1 塩基多型) を取得中であり、ミトコンドリア DNA と核 DNA の両方から解析を行いたいと考える。

筑波大学構内の鞭毛虫

高橋 航 (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

鞭毛をもって運動する単細胞の真核生物は、「鞭毛虫」と総称される。鞭毛虫は真核生物のほとんどの系統群に存在し、例えば、襟鞭毛虫 (オピストコンダ)、*Bodo* (ディスコーバ)、クラミドモナス (アーケプラスチダ)、*Spumella* (ストラメノパイル)、*Goniomonas* (クリプチスタ) などがある。鞭毛虫は生態的にも多様であり、独立栄養のもの、従属栄養のもの、混合栄養のものが知られている。淡水、海水、土壌中など様々な環境に生息している。このように鞭毛虫は系統的に多様であり、真核生物の多様性を理解するうえで極めて重要である。しかし、未知の部分が多く、近年でも身近な環境から新規系統群の鞭毛虫が見つかることがある。

水圏生態系の栄養経路には、植物プランクトン→動物プランクトン→高次捕食者という生食食物連鎖だけでなく、粒子・溶存有機炭素→バクテリア→鞭毛虫という microbial loop と呼ばれる経路が存在する。環境によっては、生食食物連鎖よりも microbial loop の占める炭素フラックスの割合が多いことが知られている。水圏生態系の物質循環を考えるうえで microbial loop は重要であり、バクテリア捕食性の鞭毛虫はその重要な部分を担っている。生態系の物質循環を理解するうえで鞭毛虫相は重要であるにもかかわらず、淡水環境の鞭毛虫相を調べた研究は非常に少なく、どのような環境にどのような鞭毛虫が多いのかという基礎的なことさえ明らかではない。

本研究では筑波大学構内の淡水池を対象にして、生息している鞭毛虫、特にバクテリア食の鞭毛虫を調査し、鞭毛虫相や淡水生態系の基礎的知見を得ることを目的とした。またその過程で新規鞭毛虫を得ることも目指した。

方法

調査地点として、筑波大学構内の兵太郎池、天の川、天久保池の3カ所を選択した。表層水を採取し、同時に水温、COD、アンモニア態窒素濃度、pH を測定した。試料水は Elix 水で 0-数細胞/ml になる程度に希釈して 96 ウェルプレートに分注し、暗所、20°C で培養した。1週間培養した後、光学顕微鏡で観察・同定し、出現頻度を調査した。

結果・考察

冬季の調査では、*Neobodo*、*Ancyromonas*、*Rhynchomonas*、ケルコゾア類 (複数種を含む) が特に多く観察された。その他に *Bodo*、*Anthophysa*、*Spumella*、*Goniomonas*、無色渦鞭毛虫なども確認された。これらの鞭毛虫の多くはこれまでの鞭毛虫相調査でもしばしば報告されており、一般的な湖沼で普遍的であり、生態的に重要な構成要素であることが示唆された。一方でケルコゾア類に関してはこれまで報告例が少なく、淡水湖沼におけるその生態的重要性が見逃されていた可能性がある。特にケルコゾア類については基礎的な分類学的研究が不十分であり、今回の調査でも属レベルでの同定も困難であった。淡水生態系の

microbial loop 解明には、この群の基礎的な分類学的研究が必要であることが本研究から示された。現在、このようなケルコゾア類の株確立を試みている。

本研究の結果、湖沼における鞭毛虫の優占種は、極めて短期間 (1週間以内) で変化することが示唆された。例えば兵太郎池では12/8に *Neobodo* が優占していたが、12/17には *Ancyromonas* に変わっていた。このような短期的な変化は植物プランクトンにも知られており、大型生物に比べて微生物においては一般的な現象であると考えられる。また同時期でも、兵太郎池、天の川、天久保池の間では優占種や出現頻度に大きな違いが見られた。上記の時間的な違いだけでなく、場所的にも極めて小さなスケールで鞭毛虫相が変動していることが示唆される。現在、同時に測定した環境要因と鞭毛虫相の関連を検討している。

本研究の結果、これまで詳しく調査されていなかった一般的な湖沼でのバクテリア食鞭毛虫相の一端を明らかにすることができた。ただし本研究では粗培養で出現した鞭毛虫を対象としており、これによるバイアスによって実際の鞭毛虫相を正確に反映していない可能性もある。解決法としては環境 DNA による調査が考えられるが、この場合には別のバイアス (PCR による増幅されやすさなど) があると考えられる。自然環境における鞭毛虫相を解明していくためには、理想的には今回のような光顕レベルの観察と環境 DNA 調査を組み合わせたものが望まれる。

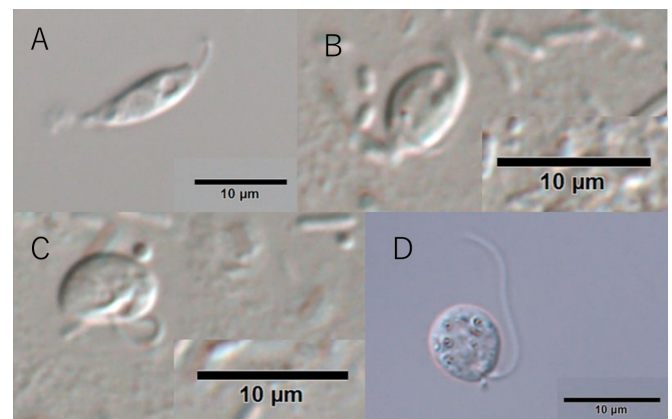


図 1: 光学顕微鏡写真。(A) *Neobodo*。(B) *Rhynchomonas*。(C) *Ancyromonas*。(D) ケルコゾア類。

表 1: 12/08 と 12/17 の各地点における鞭毛虫の出現頻度

調査日時	2022年12月8日			2022年12月17日			
	調査地	兵太郎	天の川	天久保	兵太郎	天の川	天久保
<i>Neobodo</i>		59	8	1	9	24	4
<i>Ancyromonas</i>		1	25	0	60	15	31
<i>Rhynchomonas</i>		6	4	1	0	4	8
ケルコゾア類		39	26	33	17	30	40
その他		12	3	0	3	1	5
合計		117	66	35	89	74	88

環境から分離した糸状仮足アメーバの系統分類学的研究

竹内 涼（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】

ヌクレアリア類は自由生活性のアメーバで、鞭毛をもたず球状または扁平の細胞から放射状に伸ばした糸状仮足を有する。細胞は粘液の皮膜や内因性の珪質鱗片、珪藻の殻や砂粒といった外因性物質に覆われているものも知られている。ヌクレアリア類は世界中の淡水、海水などの水域、土壌に生息しており、種によって細菌、シアノバクテリア、真核藻類などを捕食することが知られる。これまでの分子系統解析によってヌクレアリア類は菌類とともにオピストコンタのホロマイコータを形成することが明らかとなっている。そのため後生動物や菌類といった生物群を含んだオピストコンタの起源や進化、多様性を理解する上でヌクレアリア類の研究は重要である。

しかしヌクレアリア類の研究はほとんど行われておらず、特に分子系統学的研究は非常に少ない。これまでに分子データが報告されているのは 5 属のみであり、形態学的特徴からヌクレアリア類に分類されてきた 6 属はその系統的位置が不確実である。また属内の分類について最も研究が多い *Nuclearia* についても形態学的に記載された 12 種のうち分子データが報告されているのは 4 種のみである。さらに多くの形態学的特徴が種を反映していない可能性があり、分子系統解析と合わせた再検討が必要である。

これまでの環境 DNA 解析の結果から複数の環境クレードが確認されており、海産種のみからなるクレードの存在も示唆されている。しかし、近年行われている研究の多くは淡水環境を対象としたものであり、海水に生息するヌクレアリア類の形態的情報と結びついた分子情報はほとんどない。

そこで本研究は、1) 一般的な淡水及び海水環境におけるヌクレアリア類の生息状況、培養の可能性を調査し、今後の研究利用可能性を探る、2) 研究の進んでいない海水域のヌクレアリア類について形態学データと結びついた分子データを取得し、系統分類学的研究を行う、の 2 点を目的に行った。

【材料・方法】

サンプリング

2022 年 4 月から 2023 年 1 月にかけてつくば市周辺の湖沼、東京湾を中心に複数の水域でサンプリングを行った。サンプルはプランクトンネットのほか、水底の堆積物、大型藻類の表面などから採取した。淡水サンプルは AF-6, CSI、海水サンプルは滅菌海水、ESM などの液体培地を使用して培養を行った。

I. 形態観察

細胞の観察は微分干渉顕微鏡 (DIC) を用いて行った。また鱗片を有する個体は走査型顕微鏡 (SEM) による鱗片構造の観察を行った。

II. 分子系統解析

8 月に千葉県船橋市海老川河口において得られた海水サンプルの混合培養物 TK2208 株 (珪藻、鞭毛虫等を含む) からマイクロピペットを用いて単一細胞を単離し、DNA 抽出、18S rRNA

遺伝子配列の PCR 増幅をおこなった。その後、シーケンシングした配列を GenBank から取得した近縁配列に加えてデータセットを作成した。データセットは MAFFT v7 によるアラインメント、TrimAl v1.2 および手動でトリミングを行った。最尤系統樹は IQTree v1.6 を用いて作成した。

【結果・考察】

1) ヌクレアリア類の生息調査

調査を行った淡水 6 地点、海水環境 3 地点でヌクレアリア類の細胞が観察された。またこれらの多くが液体培地中でも生存した。今回見つかった細胞はほぼすべてが *Nuclearia* と同定された。*Nuclearia* は淡水、海水に比較的豊富に生息していることが報告されており、今回の結果はそれを裏付けていると考えられる。それ以外の属については長野県上田市のため池において *Pompholyxophrys* sp. を確認した。*Nuclearia* 以外の属については報告例が少なく、また光学顕微鏡での同定は困難であることから、過小評価している可能性がある。

2) 新規海産個体の系統分類学的研究

今回新たに得られた TK2208 株 (図 1) の 18S rRNA 遺伝子の部分配列を用いて系統解析を行った結果、この個体は *Pompholyxophrys* や *Lithocolla* を含むクレードの基部から分岐しており (図 2)、*Nuclearia* クレードとは異なるクレードに含まれることが明らかとなった。

現在、SEM を用いた表面超微細構造の観察を行い、属及び種の同定を進めている。

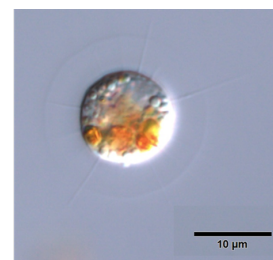


図 1 ヌクレアリア様アメーバ (TK2208)

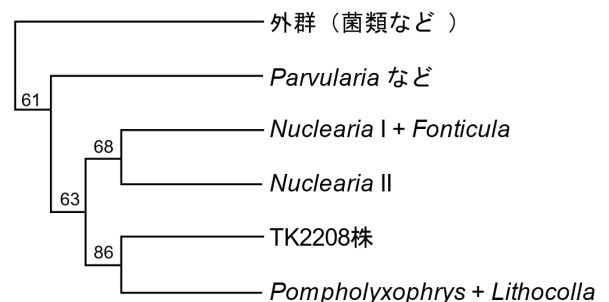


図 2 18S rRNA 遺伝子を用いたヌクレアリア類の ML 系統樹の概略

クロララクニオン藻におけるミトコンドリア局在の解糖系酵素の分子進化

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

【背景と目的】

解糖系は真核生物・原核生物の細胞における中心的な代謝経路で、グルコースからピルビン酸にいたるまでの反応を、主に10個の酵素が触媒している。

哺乳類などでは、解糖系の反応は細胞質で行われる。しかし、真核生物の中の卵菌や珪藻が含まれるストラメノパイルでは、解糖系の後半に関わる酵素であるホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGM)、エノラーゼ (EN)、ピルビン酸キナーゼ (PK) が、細胞質だけではなくミトコンドリアにも局在していることが報告されている¹⁾。また、リザリアに含まれるクロララクニオン藻の一種 *Bigelowiella natans* でも、PGK と EN の酵素がミトコンドリアに局在することが予測されている²⁾。しかし、その他の酵素に関しては、情報が少ない。

本研究では、ストラメノパイル以外の生物にも、ミトコンドリアで働く解糖系が存在するのかを知るために、9種のクロララクニオン藻において、PGK、PGM、EN、PKの遺伝子の探索と分子系統解析による進化の考察を行った。

【材料と方法】

i) 相同性検索

9種のクロララクニオン藻 (*Bigelowiella natans*, *Bigelowiella longifila*, *Partenskyella glossopodia*, *Norrisiella sphaerica*, *Lotharella globose*, *Lotharella oceanica*, *Amorphochlora amoebiformis*, *Chlorarachnion reptans*, *Gymnochlora* sp.) のトランスクリプトームデータを用いて BlastP 検索を行い、PGK、PGM、EN、PK のアミノ酸配列を取得した。先行研究で細胞質に局在が予想された *B. natans* の配列をクエリとして用いた。

ii) 分子系統解析

先行研究²⁾で報告されている分子系統樹に、本研究で得られたクロララクニオン藻の配列を加え、IQ-TREE2 を用いて最尤系統樹の構築を行った。配列のアライメントには、MAFFT と trimAl を用いた。ブートストラップ値 (BP) は、Ultrafast で1000回計算した。

iii) タンパク質の局在予測

ミトコンドリアや色素体へ輸送されるタンパク質には、N末端に特異的な輸送シグナル配列が存在する。3つの解析ソフト (PredSL, Predotar, TargetP) を用いて、クロララクニオン藻の4つの酵素 (PGK, PGM, EN, PK) の輸送シグナル配列の有無を予測した。N末端が欠落した配列は解析から除いた。

【結果】

相同性検索により9種のクロララクニオン藻から、37個のPGK、46個のPGM、26個のEN、35個のPKの配列を得ることができた。

i) PGKの分子系統樹と局在予測

クロララクニオン藻のPGKは5つのクレードにまとめられた。そのうち1つのクレードに含まれる配列がミトコンドリア輸送シグナルをもつことが予測された。そのクレードは、ストラメノパイルに属する *Blastocystis hominis* と姉妹群を形成した。

ii) PGMの分子系統樹と局在予測

クロララクニオン藻のPGMは7つのクレードにまとめられた。そのうち1つのクレードに含まれる配列がミトコンドリア輸送シグナルをもつことが予測された。そのクレードは、ストラメノパイルの *Aureococcus anophagefferens* や *Phaeodactylum tricorutum* と姉妹群を形成した。

iii) ENの分子系統樹と局在予測

クロララクニオン藻のENは4つのクレードにまとめられた。そのうち1つのクレードに含まれる配列がミトコンドリア輸送シグナルをもつことが予測された。そのクレードは、色素体や細胞質に局在が予測される本藻の配列と近縁であった。

iv) PKの分子系統樹と局在予測

クロララクニオン藻のPKは5つのクレードにまとめられた。そのうち1つのクレードに含まれる配列がミトコンドリア輸送シグナルをもつことが予測された。そのクレードは、細胞質や色素体に局在が予測される本藻の配列と近縁であった。

【考察とまとめ】

本研究では、解糖系に関わる4つの酵素を複数種のクロララクニオン藻で探索した結果、全ての酵素において、ミトコンドリアに局在すると思われる配列が見つかった。先行研究で、クロララクニオン藻にも一部の解糖系酵素が存在すると予測されていたが、本研究で解糖系の後半がミトコンドリアに存在することが示唆された。つまり、ストラメノパイル以外の生物にも、ミトコンドリアの解糖系が存在することを示唆する結果である。

分子系統樹を基に各酵素の進化を考察すると、ミトコンドリアに局在予測されたPGMとPGKに関しては、ストラメノパイルとクロララクニオン藻の間で近縁性が示された。つまり、ストラメノパイルとリザリアの共通祖先でミトコンドリア局在のPGMとPGKが存在していた可能性がある。一方、ENとPKに関しては、ストラメノパイルとクロララクニオン藻の間でミトコンドリア局在の配列に近縁性はなく、独立に進化してきたものと考えられる。つまり、ミトコンドリアで働く解糖系の一部は、各生物群で独立に進化した可能性を示唆した。

【引用文献】

- [1] Melania et al. 2017. *BMC Plant Biology*, 17; 241
- [2] Nakamura et al. 2012. *PLOS ONE*, 7; 12

ヌタウナギの嗅覚受容

大井 雄介 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 大地 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

美味しそうな匂いに食欲をそそられたり、悪臭が漂う路地を避けたりといった経験は誰しもあるだろう。このように匂いの感知は、我々ヒトを含めた脊椎動物において、餌や生殖相手の探索、危険の回避などの行動を引き起こす。つまり、嗅覚は脊椎動物が世界を認識し、応答する過程において重要な役割を担っている。では、なぜ我々や脊椎動物は匂いを感じるのだろうか。この問いに答えるアプローチのひとつは、脊椎動物が進化の過程でどのように匂いを感知する仕組みを獲得してきたか、つまり脊椎動物の進化における嗅覚系の起源と多様化を調べることである。

現生の脊椎動物は、哺乳類、爬虫類、両生類、魚類を含む顎口類と呼ばれる系統と、円口類という系統の大きく二つに分けられる。脊椎動物の初期の段階で分岐したとされる円口類はヤツメウナギとヌタウナギからなり、顎をもたないなどの原始的な特徴を多く残す系統群である。したがって脊椎動物の嗅覚系の起源を明らかにするために、円口類の嗅覚系を調べるのが鍵となる。

ところが円口類において、ヤツメウナギとヌタウナギはそれぞれの生態を反映して嗅覚系に大きな違いがある。とくにヌタウナギは深海適応のため嗅覚系がよく発達しており、円口類の祖先的な形質とヌタウナギ独自の派生的な形質を見極める必要がある。

以上の背景のもと、本研究ではヌタウナギの嗅覚受容メカニズムの解明を目指し、嗅覚受容体遺伝子の探索と系統解析、発現解析を行った。加えて、電気生理的手法による嗅覚受容における嗅上皮の電気的な応答を調べた。

【材料と方法】

• 遺伝子探索と系統解析

Ensembl のヌタウナギ *Eptatretus burgeri* のゲノムデータベースから、脊椎動物の嗅覚受容体遺伝子 (mOR, TAAR, V1R, V2R) を対象として Reciprocal Blast Hit を抽出し、ヌタウナギ嗅覚遺伝子の候補遺伝子を探索した。見つかった候補遺伝子について、他の脊椎動物の嗅覚受容体遺伝子を含めた分子系統解析を行い、脊椎動物の嗅覚受容体遺伝子の分子系統樹におけるヌタウナギ嗅覚受容体候補遺伝子の位置を調べた。

• *in situ* hybridization 法を用いた遺伝子発現解析

遺伝子探索で見つかった mOR、V1R、V2R 候補遺伝子の一部について、ヌタウナギ成体の嗅上皮を用いて切片 *in situ* hybridization を行い、発現を調べた。

• 嗅電図 (EOG) の記録

ヌタウナギとカワヤツメ *Lethenteron camtschaticum* 成体の嗅上皮を採取し、生理食塩水で灌流した。参照電極を嗅上皮の下部に配置し、記録電極を嗅上皮表面に接触させその周辺の細胞の神経活動を記録した。いくつかのアミノ酸溶液 (Gln/Arg, 10^{-3} M) を記録電極付近の嗅上皮に噴射し、におい物質に対する嗅細胞の膜電位の変化を測定した。

【結果】

• 遺伝子探索と系統解析

遺伝子探索では、ヌタウナギの嗅覚受容体遺伝子の候補として 19 個の mOR、1 個の V1R、約 40 個の V2R が見つかった。TAAR は今回の探索法では見つからなかった。

mOR の系統解析では、ヌタウナギ mOR 候補遺伝子は、mOR type1 のサブファミリーに含まれることがわかった。V1R の系統解析では、ヌタウナギ V1R 候補遺伝子は V1R3 と V1R4 サブファミリーの外側に位置した。V2R の系統解析では、ヌタウナギ V2R 候補遺伝子の多くが単系統群を成し、既知のサブファミリーの姉妹群となった。

• 発現解析

発現解析を試みた嗅覚受容体候補遺伝子の少なくとも一部で、嗅上皮において嗅細胞特異的と思われる発現パターンが観察された (下図)。

• 嗅細胞の応答の測定

ヤツメウナギでは、Gln 10^{-3} M を繰り返し噴射した際に、嗅細胞の応答を記録できた。さらにヌタウナギでも、Arg 10^{-3} M を噴射した際に、嗅細胞の応答を記録できた。

【考察・展望】

今回の系統解析の結果および先行研究を踏まえると、mOR、V1R、V2R (および TAAR) は脊椎動物の共通祖先の段階で獲得されたと考えられる。とくに V2R はヌタウナギにおいて大幅に増加しており、深海適応に伴う嗅覚の発達との関連が示唆される。

嗅覚受容体候補遺伝子の発現については、一部で嗅細胞特異的と思われる発現パターンが観察されたが、確証を得るためにはさらなる実験が必要である。また、蛍光 *in situ* hybridization 法を用いて嗅細胞マーカーとの多重染色を行い、嗅覚受容体遺伝子が嗅細胞で特異的に発現が見られるかを検証する計画である。

嗅電図については、ヤツメウナギとヌタウナギの嗅細胞の応答が確認され、アミノ酸の嗅覚受容を行なっていることが確かめられた。今後はアミノ酸の種類や濃度を変えた際の嗅細胞の応答を記録することにより、嗅覚受容の特性を調べる予定である。

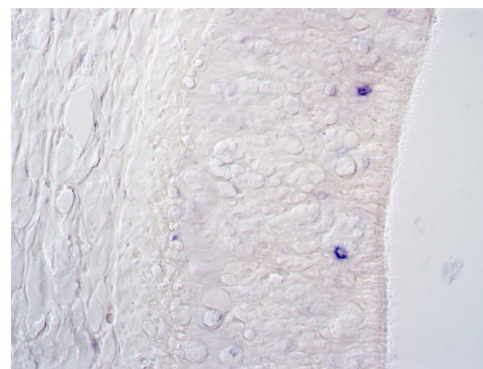


図: 嗅上皮における mOR7 の発現

Expression analysis of key genes for germ layer specification in mollusc: insight into the evolution of spiralian development

LI YUANHONG (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)

Introduction

Spiralia is known as an animal clade which mainly include mollusks, annelids, platyhelminths, etc. Unique characteristics of Spiralia include its spiral cleavage during early development and its early cell fate segregation along animal-vegetal axis. (Lambert 2010). However, it remains unclear about the gene regulatory network (GRN) for cell fate segregation and germ layer specification. Recent studies suggest that the insertion of novel TALE transcription factor, Spiralian-TALE (SPILE), into GRN of early development may have contributed to the evolution of the cell fate separation mechanism (Morino et al. 2017)

Despite the previous research, it is still unclear how the SPILE genes could have been inserted in early developmental GRN without disrupting the downstream development. As an initial step to solve it, this study aimed to verify whether the expression sites of key transcription factors for germ layer specification were affected by the insertion of the SPILE gene. Since Echinodermata (sea urchin)'s mesoderm genes in GRN were best understood (Peter. et al 2012)). It would be a good comparison to mollusks. I chose five genes (*alx*, *erg*, *ets-1*, *hex*, *tgif*) which were crucial in mesoderm specification of sea urchin. In this study, I conducted *in situ* hybridization of the five genes, using *Nipponacmea fuscoviridis* (Nf) embryo samples to observe the expression patterns of those genes. In addition, I did comparative studies of results in limpets with other non-spiralian animals to test my question.

Material & Method

I collected samples of *Nipponacmea fuscoviridis* and fixed their embryos in several developmental stages in germ layer differentiation occur (4 and 5 hpf, gastrula; 7 hpf, early trochophore; and 10hpf, trochophore). After that, I performed *in situ* hybridization according to the method described in Morino et al., 2017.

Results

From my observation, there is no clear signal of gene *hex*, so I will discuss the genes except *hex*. *alx* expressed in only apical ectoderm in gastrula and early trochophore. In trochophore stage, the expression of *alx* was detected in ectomesoderm. For *erg*, consistent expression in apical ectoderm was observed from gastrula to trochophore. For *ets-1*, from gastrula to trochophore stages, the expression in apical ectoderm and posterior epidermis were observed. Since the expression were shown in epidermis, I judged the posterior expression site was in ectoderm. For *tgif*, from gastrula to early trochophore,

expression in apical ectoderm and posterior epidermis region were observed, which might be ectoderm. In trochophore stage, there was no expression detected in apical region, but bilateral and posterior expression in epidermis was still detected.

Discussion

In sea urchin, all five genes were expressed in mesodermal cells. In cnidaria, although there are no data of gene *tgif*, three of the genes (*erg*, *ets-1*, *hex*) were found to be expressed in endomesoderm region. In limpet, only one gene, *alx* was shown expression in mesoderm.

Through those comparisons, there were obvious differences in the expressions of those genes, which suggested that there is change in expression patterns of spiralian lineages. From those results, it might imply that the insertion of novel gene SPILE had effect on the expression patterns of downstream genes in spiralian's GRN. However, further research like expression patterns of other downstream transcription factors and SPILE gene function analysis are required to reveal evolutionary history of early developmental GRN in spiralian development.

References

1. Lambert, J. D. Developmental patterns in spiralian embryos. *Curr. Biol.* (2010)
2. Morino et al. Expansion of TALE homeobox genes and the evolution of spiralian development *Nat. Eco. Evo.* (2017)
3. Peter. et al. Predictive computation of genomic logic processing functions in embryonic development *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2012)

Web3 新しい景色を

富所 怜央 (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)

情報の提供者が中心であった Web1.0、SNS などの巨大 IT 企業による中央集権的なコミュニケーションプラットフォームを中心とした Web2.0 に続き、未来のインターネットのバージョンの概念として Web3.0 が存在する。Web3.0 は、個人を主体として、インターネット上で自由な交換や取引を行うことを目指す動きである。Web3.0 の概念が生まれた後、ブロックチェーンと呼ばれる技術が誕生したことによって、Web3.0 から派生する形で Web3 という概念が誕生した。Web3 はブロックチェーン技術によるリブランディングとも言え、ブロックチェーン技術を活用することで Web3.0 が目指すものを実現しようとする動きである。

ブロックチェーンは、2008 年にサトシ・ナカモトを名乗る人物によって提唱され、2009 年に仮想通貨のビットコイン(Bitcoin)の基盤技術として実装された分散型データベースである。ブロックチェーンは、ブロックチェーンネットワーク上の端末同士を直接接続し、暗号技術によって取引の記録や追跡のプロセスを、分散的に処理することを可能とする。ブロックチェーンを活用することで、特定の管理者を介さずに不特定多数の参加者がセキュアに取引できる環境を構築できる。ブロックチェーン技術が持つ性質として、データを分散保持すること、暗号技術によるデータの改ざんへの耐性があること、情報の更新のための合意形成の仕組みがあること、追跡可能性があることなどがある。

ブロックチェーンの開発が進むことで実現可能となった技術として、スマートコントラクト(Smart Contract)、NFT(Non-Fungible Token)、DAO(Decentralized Autonomous Organization)が存在する。これらの技術はブロックチェーン技術をベースとしているので、その性質を基本的に継承している。スマートコントラクトは特定の条件が満たされた時に、自律的に実行されるブロックチェーン上に格納されたプログラムである。スマートコントラクトによって、契約や取引を自動化することができるようになり、契約条件の遵守性を保証することができるようになる。また、スマートコントラクトによって、ブロックチェーン上で複雑な計算処理が可能となったことで、NFT や DAO などの技術が実現できるようになった。NFT は仮想通貨と同じトークンの一種であり、これまでコピー可能であったデジタルデータに対して一意性を保証するような、代替不可能なトークンの生成を可能にし、その所有権を証明できるようにする技術である。DAO は分散型自律組織のことを指し、組織の管理者の存在を必要とせず、組織に所属するメンバーを平等に扱いながら、透明性の高い組織運営を行うことができるようになる。DAO はスマートコントラクトによって自律的に運営され、運営方針の決定を提案および投票による承認によって行うことができる。

ブロックチェーン技術は誕生後しばらくの間、主にビットコインのような金融分野において活用されてきた。ブロックチェーン技術の発展により、金融以外の分野でもブロックチェーン技術の

活用価値が注目されるようになった。実用化が期待されている分野として、医療、医薬品開発、サプライチェーンなどがあり、科学研究においても活用方法について模索が行われている。基礎生物学研究において、ブロックチェーン技術が活用されている事例は現時点で多く存在しない。しかし、生物保全活動、環境保全活動、医薬品開発などで、ブロックチェーンを活用した研究の事例があるため、基礎生物学研究の分野がこれらの分野に続く可能性がある。現時点で生物学研究において注目すべきプロジェクトや技術として、DeSci(Decentralized Science: 分散型科学)と NFT がある。

DeSci は、アイデアや情報を自由に共有することで、誰もが研究プロセスにアクセスして貢献できることを目的としたオープンサイエンスの概念をベースとしており、ブロックチェーン技術を活用することによって、オープンサイエンスを実現しようとするムーブメントである。ブロックチェーンの活用によって、研究データの保存、共有、管理について、透明性や信頼性を高めるというアプローチが可能となる。プロジェクトの組織の主体を DAO とすることによって、クローズドであった従来型の研究コミュニティを、よりオープンでグローバルなものに拡張することができる。

NFT の活用方法として、IP-NFT や CC0NFT がある。IP-NFT は、IP(intellectual property: 知的財産)を NFT 化し、研究の知的財産を自身が所有することを証明することができる。透明性のある条件でそれを配布することもでき、研究に関するすべてのステップをブロックチェーン上に記録することによって、失敗も含めたすべての研究データを共有できる。CC0NFT は、CC0(Creative Commons Zero)化した NFT を作成することで、NFT に関連付けられたデータの著作権を放棄する。これによって NFT に関連付けられたデータのオリジナルのクリエイターに関する情報を維持したまま、研究データへの二次的な使用が可能となり、権利関係や所有権問題などに関するトラブルを回避しながら、データの活用を行うことができるようになる。

ブロックチェーン技術は比較的新しい技術であり、規制等が追いついていない点については注意が必要である。例えば IP-NFT として発行された研究データに関して、その所有権証明などを法的に保証することは現時点では不可能である。また、ブロックチェーンは依然として試験段階にある技術である。例えば、ブロックチェーンにおける、分散性(非中央集権性)、処理能力(スケーラビリティ)、セキュリティはトレードオフの関係にあるため、すべての要素を完全に満たすことは難しいとされている。さらに、ブロックチェーンには様々なプラットフォームやプロトコルが存在し、業界標準と言えるものは存在しない。これらの差異はブロックチェーンにおける開発や活用において影響を与えると思われる。

Paracoccus denitrificans Pd1222 を用いた細胞外膜小胞の伝達に関わる因子の探索

柏俣 青葉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 豊福 雅典 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

多くの細菌は細胞外にシグナル物質を分泌するとともに環境中のシグナル物質を受け取ることで、コミュニケーションを行っている¹⁾。菌体濃度依存的なコミュニケーション機構は quorum sensing(QS)と呼ばれており、細菌集団の遺伝子発現を調節することで、集団の挙動を制御している。先行研究では、QS 機構を介して細菌の病原性や抗生物質産生、バイオフィーム形成といった重要な形質の制御が報告されており²⁾、本機構の理解と制御が求められている。

従来の QS 機構のモデルでは、細菌によって産生された QS シグナルが単純拡散によって細胞外へ放出され、周囲の細胞に伝達されると考えられていた³⁾。しかし、近年、QS シグナルを membrane vesicle (MV) と呼ばれる膜小胞に内包させることで細胞選択的に伝達していることが明らかとなった⁴⁾。MV とは、多くの細菌が自身の細胞膜から形成する直径 20~400 nm の球状の膜構造体のことである。その内部には核酸やタンパク質といった菌体由来成分が豊富に含まれることから、物質のキャリアとして機能することが報告されている。一部の細菌において、MV は細胞選択的な QS シグナルの伝達を可能にしているが、MV がどのように細胞を認識して付着し、QS シグナルのような内包物が伝達されているのか、その伝達機構のメカニズムについては未だに分かっていない。

土壌脱窒素細菌の *Paracoccus denitrificans* は、QS シグナルとしてアシル化ホモセリンラクトン(AHL)の一種である *N*-hexadecanoyl-L-homoserine lactone (C16-HSL) を産生することで知られている、非運動性のグラム陰性菌である。C16-HSL は長い炭素鎖を有することから高い疎水性を示す。当研究室の先行研究によって、*P. denitrificans* Pd1222 では C16-HSL が MV に濃縮されて細胞間で伝達されることが明らかとなった⁴⁾。また、*P. denitrificans* Pd1222 が放出した MV は異種細菌よりも同種細菌への付着性が高い様子が観察されており⁴⁾、MV が特定の細胞を認識できることが示唆されている。

このように、MV の内包物や付着に関して興味深い特徴のある *P. denitrificans* Pd1222 を用いることで、MV 伝達機構の解明に繋がると考え、研究を進めている。

MV 伝達機構の理解は環境中の微生物相互作用を理解する上で鍵となりえる。これは細菌集団の制御につながると考えられ、病原細菌による感染症の予防や治療、水処理技術の向上といった分野で私たちの生活に大きく貢献できると考えられる。本研究では、MV 伝達機構の解明の第一歩として、MV の伝達に関わる遺伝子を探索することを目的とした。

【実験方法】

1) 供試菌株

Paracoccus denitrificans Pd1222 $\Delta pdnI \Delta pxm$
pPROBE-NT_P_{lasB}-mNeonGreen Cp (Tc^r)

を用いた。自らは C16-HSL を生産しないが、外部からの C16-HSL には応答して、蛍光を発する *P. denitrificans* のレポーター株である。

2) MV の回収

P. denitrificans Pd1222 野生株を Tryptic Soy Broth (TSB) 培地にて培養し、定常期に培養上清を 4°C, 1 h, 150,000 xg で遠心分離を行うことで MV を回収した。

3) MV 伝達に関わる因子のスクリーニング

レポーター株に対してランダムに変異を入れたトランスポゾンミュータントライブラリーを作製した。得られたトランスポゾンミュータントを 2.5 µg/ml テトラサイクリンを含んだ 100 µl TSB 培地に植菌し、30°C, 400 rpm, 24 時間、液体培養した。元々のレポーター株と比べて MV に対する応答(蛍光強度)が異なるトランスポゾンミュータントを選抜し、これを 1 次スクリーニングとした。

続いて、1 次スクリーニングで選抜された株を 2.5 µg/ml テトラサイクリンを含んだ 100 µl TSB 培地に植菌し、30°C, 400 rpm, 24 時間、液体培養した。培養後のトランスポゾンミュータントに対して、MV を添加した場合と C16-HSL を添加した場合で蛍光を比較し、蛍光強度の変化が MV 依存的なものか検証する 2 次スクリーニングを行った。

一連のスクリーニングによって選抜された株に対して、シーケンズ解析を行い、どの遺伝子にトランスポゾンミュータントが入っているかを確認した。

【結果・考察】

合計で 933 株のトランスポゾンミュータントをスクリーニングし、そのうち 7 株が選抜された。7 株全ての株は元々のレポーター株と比べて MV に対する応答(蛍光強度)が高かったことから、MV 伝達を抑制するような遺伝子に変異が入っていると考えられる。

今後はこれらの遺伝子のノックアウト株を作製し、MV に対する付着性やその特異性などを検証していく予定である。

【参考文献】

- Whiteley M. *et al.* (2017) Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* **551**: 313-320.
- Whitehead N.A. *et al.* (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365-404.
- Pearson J.P. *et al.* (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**:1203-1210.
- Toyofuku M. *et al.* (2017) Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *ISME J* **11**:1504-1509.

細胞外膜小胞の受け渡しに関わる因子のスクリーニング系の検討

館内 稟太郎 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 豊福 雅典 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

多くの細菌は細胞膜に由来する直径 20~400 nm の膜小胞である membrane vesicle (MV) を産生し、環境中に放出する機構を持つことが明らかになっている。MV は主に脂質二重膜で構成される粒子であり、タンパク質や DNA、シグナル伝達物質などの細胞由来成分を内包している。MV はこれらの内包物を外部環境から保護し、周囲の細胞と融合などにより内容物を伝達することで細胞間での物質の輸送やコミュニケーション、遺伝子の水平伝播などの機能を発揮していると考えられている。MV の産生機構に関しては blebbing や explosive cell lysis (ECL) など幾つか知られているが、MV の受け取り機構に関しては詳しく分かっていない。

本研究は代表的なグラム陰性細菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に着目し、MV 受け取り機構に関わる因子のスクリーニング系の確立を目的とするものである。緑膿菌は複数の MV 産生機構を持ち、異なる特性を持つ複数種の MV を産生するが、本研究ではその一つである ECL によって産生された MV に着目する。ECL は集団中の一部の細胞が溶菌を伴って破裂し、破裂した細胞膜の断片から MV が産生されるものである。

緑膿菌は日和見感染症を引き起こす細菌であるため、緑膿菌の MV 受け取り機構の解明は医学的に重要な意味を持つと考えられる。緑膿菌の MV の受け取り機構の解明は、緑膿菌にのみ抗生物質などを輸送するドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発や緑膿菌の MV の機能の妨害に関わる可能性がある。これにより、副作用が低く効果の大きい薬の開発にも貢献しうる。

また、ECL はホリンが細胞内膜に穴をあけ、エンドリシンがペプチドグリカン層を分解することで引き起こされるが、この二つの酵素はほとんどの細菌で保存されている。そのため、ECL によるベシクル産生はグラム陰性菌において普遍的な機構であると考えられている。本機構で産生される MV は別種の細菌によって産生されたものでも近い性質を持つ可能性があるのでは無いかと考えられる。そのため緑膿菌の MV の受け取り機構を解析することにより、グラム陰性細菌に共通する MV 受け取り機構の発見出来る可能性がある。

【方法】

本研究室における先行研究により、緑膿菌の ECL を誘導する事で培地成分を MV の内部に内包させる技術が確立された。そこで、本研究では、抗生物質を内包した MV を作製することで、MV 受け取り機構に関するスクリーニング系を検討した。トランスポゾンによるランダムな変異を導入した緑膿菌株の培養を抗生物質内包 MV の存在下で行う事により、抗生物質内包 MV に対する感受性に変化がある変異株を得られる。得られた株に対する 2 次スクリーニングとして、内包させた抗生物質に対する感受性に変化が無い株を選ぶことにより、MV 受け取り機構に異常のある株が得られると考えられる。

【結果および考察】

検討の結果、MV に抗生物質を内包させることに成功した。今後、今回検討したスクリーニング系を用いて得られた変異株を利用した研究を検討している。得られた株について、変異箇所をシーケンシングし、MV の受け取りに関連するタンパク質とそれをコードする遺伝子の特定を行い、特定した遺伝子が MV の受け取りにおいてどのような機能を担っているかを実験により明らかにすることにより、MV 受け取り機構全体の解明を目指す。ライブセルイメージングの手法を用いた当研究室の先行研究により、菌体に近接した MV がブラウン運動とは異なった運動をする事が観察されており、このことは MV と細胞を接着する機構と、融合する機構が別にある事を示唆しているのではないかと推測されている。この推測が正しければ MV の受け取りが正常に行えない株には、MV と接着に問題があるものと融合に問題があるものがあると思われる。複数種の変異株に対してライブセルイメージングによる解析を行う事によりこの仮説の検証を行うと同時に、他に MV の受け取りを説明する仮説が無いかを探ることにより、緑膿菌の ECL により産生された MV の受け取り機構を明らかに出来る可能性がある。

また、今後緑膿菌の MV 受け取り機構が他の多くの細菌に対して普遍性を持つどうか検討し、細菌種によらない普遍的な MV 受け取り機構の発見へと結びつけたい。同時に、MV 受け取り機構に種特異的な部分が無いかに関しても検討したい。先行研究により、MV の内部に抗生物質などの物質を内包させる手法が開発されているため、これらを明らかにすることができれば、特定の細菌のみに影響を与える DDS の開発などに繋がると考えられる。

分子シミュレーションで解明する

ホモ二量体チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) のハーフサイト活性

岡本 慶乃 (筑波大学 生物学類)

指導教員：原田 隆平 (筑波大学 計算科学研究センター)

【導入】

細胞内でタンパク質が合成される翻訳過程では、mRNA の塩基配列に対応したアミノ酸がリボソームに運搬される必要がある。この運搬は、アミノアシル tRNA (aa-tRNA) により達成される。aa-tRNA は、mRNA のコドンに対応したアミノ酸が付加された tRNA であり、コドンごとに 40 種類以上が存在することが知られている。aa-tRNA は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) と呼ばれる酵素により合成される。tRNA にはアミノ酸を識別する能力がないため、アミノ酸ごとに異なる種類の aaRS が存在することで、アミノ酸と tRNA の特異性は担保されている。そのため、aaRS は翻訳の正確な遂行に必要な不可欠な酵素である。aaRS の一種であるチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) は、チロシンを tRNA に結合させ、Tyr-tRNA を合成する酵素である。TyrRS は、細菌などにおける薬剤の標的タンパク質でもあることから、aaRS の中でも特に研究されている酵素である。そのため、これまでに複数の立体構造が解析されてきた。構造解析の結果、TyrRS は細胞内においてアミノ酸配列が同一のタンパク質が 2 つセットになった「ホモ二量体」として存在することが明らかになった。[1] 一方で、生化学的実験から TyrRS はホモ二量体あたり 1 mol の基質としか反応しないことが示された。[2] これらの結果から、TyrRS は二量体で存在するものの、片方のサブユニットのみで反応すると考察されてきた。この非対称的な特徴は、「ハーフサイト活性」と呼ばれ、TyrRS 二量体の両サブユニットのアミノ酸配列は同じであるにも関わらず、機能に違いがあることを示唆している (図 1)。[2-3] しかしながら、サブユニットごとの活性の差異がどのように生じるかというメカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、分子動力学シミュレーション (MD) を用いて TyrRS におけるハーフサイト活性のメカニズムを解明することを目的とし、研究を行った。

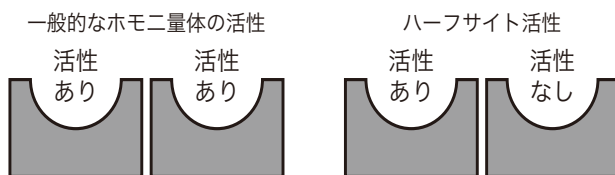


図 1. ハーフサイト活性の模式図

【方法】

タンパク質は生体内で絶えず揺らいでおり、そのダイナミクスは生体機能に直結している。つまり、ダイナミクスを調べることは生体機能を知るために重要である。そこで本研究では、タンパク質ダイナミクスを追跡できる MD を使用した。MD では、原子間に働く力を計算して原子の位置と速度を更新することにより、タンパク質の構造変化が時系列データ (トラジェクトリ) として得られる。トラジェクトリを解析することで、タンパク質のダイナミクスや構造安定性などを評価できる。

【材料】

TyrRS 二量体におけるハーフサイト活性メカニズムを解明するため、MD を実行した。初期構造として、TyrRS 二量体の結晶構造 (PDB ID: 1X8X) から基質を除いたアポ体のホモ二量体を使用した。なお、サブユニット間の初期条件を統一するため、2 つのサブユニット構造が同一の構造を使用した。計算条件は、300K・1 atm で、1 μ s の MD を独立に 6 回実行した。

【結果と考察】

MD により得られたトラジェクトリを用いて、以下の解析を行った。初めに、TyrRS の主要な動きを抽出するため、主成分分析 (PCA) を実行した。PCA は、特徴量の次元削減を行う解析手法であり、タンパク質の特徴的な動きを抽出できる。PCA の結果、第一主成分として各サブユニットの構造を Open/Closed の二状態に分離でき、各サブユニットは Open/Closed、あるいは Closed/Closed のいずれかの状態で存在することが明らかになった。つまり、初期構造が完全に同一であるにも関わらず、TyrRS 二量体は非対称構造を安定構造にもつことが示唆された。次に、サブユニット間の構造非対称性を引き起こす原因を特定するため、各サブユニットの分子内コンタクトを Open/Closed 構造で比較した。解析結果として、Closed 構造で特異的な分子内コンタクトが観察され、構造非対称性は各サブユニットにおける分子内コンタクトの差異によって引き起こされることが示唆された。最後に、サブユニット間の構造非対称性が基質結合能に与える影響を評価した。具体的には、各サブユニットの基質結合ポケットの大きさを測定したところ、ポケットの大きさが異なる (大小) 2 状態に分離することが明らかになった。さらに、結合ポケットが大きい (小さい) とき、全体構造は Open (Closed) に対応していることが明らかになった。ここで、結合ポケットの大きさと基質結合能の関係について注目すると、結合ポケットが小さい場合、基質結合能は低いと考えられる。そのため、全体の構造変化と協同して、基質結合能もサブユニット間で非対称になることが示唆された。解析結果から導かれる結論として、TyrRS のハーフサイト活性は、分子内コンタクトの差異がサブユニット間の構造非対称性を引き起こし、基質結合ポケットの大きさが変化することで生じing と考えられる (図 2)。

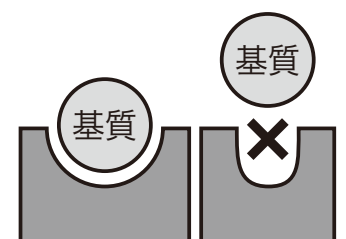


図 2. 本研究から推察されるハーフサイト活性のメカニズム

【参考文献】

1. T. N. Bhat et al., *J. Mol. Biol.*, **158**, 699-709 (1982)
2. A. R. Fersht et al., *Biochemistry*, **14**, 1-4 (1975)
3. G-R Raquet et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19578-19581 (2011)

大規模分子系統解析による Archaeplastida 内部系統関係の再評価

磯貝 龍邑 (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)

【背景と目的】

光合成生物と言えば目に鮮やかな陸上植物をまず思い浮かべるかもしれないが、陸上植物以上の多様性を微細藻類は持っている。近年、真核生物は約 19 つの大規模分類群に分類されているが、微細藻類は系統的に近縁ではない約 9 つの大規模分類群に分布する。興味深いことに、光合成性真核生物は系統的に多様であるが、一方そのほとんどにおいて光合成を行う細胞小器官である色素体 (葉緑体) は互いに近縁であり、真核生物の進化上でたった一度のシアノバクテリアの細胞内共生 (一次共生) で確立されたと考えられている。これら光合成性真核生物のうち、緑色植物類 (陸上植物や緑藻類等)、紅藻類、灰色藻類の主に 3 グループを含むスーパーグループ Archaeplastida は、一次共生により色素体を確立した単一の祖先生物から派生した、つまり単系統であると考えられ、光合成の進化を研究する上で特に重要なグループである。

ところで、真核生物のスーパーグループなどの主要分類群間の系統関係を解明するのに、近年では大規模分子系統解析という手法が用いられている。分子系統解析では、核酸配列やアミノ酸配列等を比較することで系統関係を推測するが、特に数百種類のタンパク質データに基づいて行うものを大規模分子系統解析と呼ぶ。大規模分子系統解析は、シーケンス技術の進歩、コンピュータの高速化、系統解析プログラム・アルゴリズムの改善に伴って、真核生物の主要系統関係や初期進化の推測に用いられるようになったのである。

それでは、Archaeplastida は大規模分子系統解析においてどのように捉えられているのだろうか。核ゲノムコードのタンパク質に基づく大規模分子系統解析では、最近まで Archaeplastida が単系統か否かという問題について一貫した結論を出せていなかったが、昨年発表された Yazaki らによる論文¹ (以下、先行研究) によりその原因が特定された。緑色植物類、紅藻類、灰色藻類の系統関係は、Archaeplastida の姉妹群となるスーパーグループ Pancryptista に属する生物種がどの程度解析に含まれるかに大きく影響を受けるということが明らかとなったのだ。

先行研究により、Archaeplastida が単系統であり、Pancryptista と姉妹群関係にあることには結論が出たと考えられる。ところが、Archaeplastida 内部の系統関係には不明点がある。まず、灰色藻類の葉緑体は、色素体の起源であるシアノバクテリアの特徴を持っており、更に色素体タンパク質に基づく分子系統解析では、灰色藻類が最初に分岐したと推測されることが多い。これらのデータは、Archaeplastida を構成する緑色植物類、紅藻類、灰色藻類のうち、灰色藻類が最も原始的であることを示唆する。一方、これまでに実施された核ゲノムコードタンパク質に基づく大規模分子系統解析のほとんどでは Archaeplastida 内部では紅藻類が最初に分岐したと推測されている。従って、Archaeplastida 最原始系統群が何かは現在も未解明のままである。また、なぜ色素体タンパク質に基づく解析結果で分岐順序が異なるのかについて十分理解されているとは言えない。

こうした背景を踏まえ、本研究では Archaeplastida の 3 つのサブグループ間の系統関係について詳細に検討することを目的とし、暫定的に 220 タンパク質配列から構成されるアライメントデータの作成と大規模分子系統解析を行なった。具体的には、分子系統解析に用いる Archaeplastida の種数を先行研究の 13 種から 45 種に増やして大規模分子系統解析を実施した。

【材料と方法】

Adl ら² の分類体系を参考に、Archaeplastida 内の各綱に属する生物種を可能な限り 1 種ずつは含むように追加種を選定し、内部系統種を 13 種から 45 種に増やした。今回新たに追加した生物種のゲノム/トランスクリプトームデータは、OneKP や Sequence Read Archive 等の公共データベースから適宜取得した。先行研究のアミノ酸配列データをクエリとして追加種のゲノム/トランスクリプトームデータに対して相同性検索 (BLAST) を行なった。クエリ配列にヒットした配列を先行研究のデータセットに追加し、予備的に単一タンパク質ごとの分子系統解析を行った。この予備的解析に基づき、アライメントから他の生物由来の混入配列やパラログ配列を検出・排除した。これまでに確認が終わった 220 の単一タンパク質アライメントを連結し、大規模分子系統解析用アライメント (140 種, 65,359 アミノ酸座位) を作成した。

今回作成した 220 タンパク質アライメントを基に最尤法による系統解析を行った。解析プログラムには IQ-TREE を使用し、アミノ酸配列の置換モデルは LG+C20+F+G を選択した。また、最尤系統樹で復元された分岐の統計的支持として、ウルトラファストブートストラップ値 (UFBP) を算出した。

【結果と考察】

その結果、先行研究と同様に Archaeplastida が単系統として復元され、その中では紅藻類が最初に分岐し、Archaeplastida と Pancryptista は姉妹群となった。なお、上記の系統関係はいずれも UFBP100% で支持された (下図参照)。

現在 Archaeplastida 内部の系統関係を詳細に検証するため、更なる解析を行っている。発表会では、現在進行中の解析からの結果も含めて Archaeplastida 内部の系統関係について議論する。

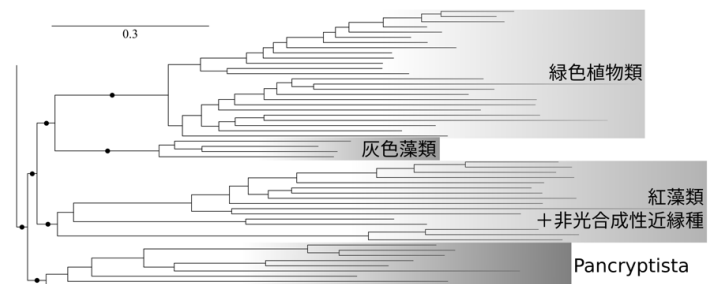


図 220 タンパク質 140 種の最尤法系統解析結果から一部抜粋 (枝上の黒丸は UFBP100% の支持を表す)

【参考文献】

1. Yazaki *et al.* 2022. *Open Biol.* 12:210376.
2. Adl *et al.* 2019. *J Eukaryot Microbiol.* 66:4-119.

Form I/I'型ルビスコに関連する新規タンパク質群の発見

番場 浩平 (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・目的】

ルビスコタンパク質は、一般に Calvin-Benson-Bassham (CBB) 回路で CO₂ を固定する酵素であり、陸上植物や藻類、シアノバクテリアなどの光合成生物に広く分布している。ルビスコタンパク質ファミリーは、陸上植物やシアノバクテリアにみられる Form I や、渦鞭毛藻と一部のプロテオバクテリアにみられる Form II、古細菌にみられる Form III、細菌と古細菌にみられカルボキシラーゼ活性に必要な残基を欠く Form IV に分類され、そのアミノ酸配列に大きな多様性が存在する。カルボキシラーゼ活性の有無から、Form I-III は true rubisco、Form IV は rubisco-like protein (RLP) とも呼ばれる。Form I ルビスコには large subunit (LSU) と small subunit (SSU) があり、LSU と SSU が 8 つずつ組み合わさってできる複合体が酵素として機能する。一方で他の Form のルビスコには SSU が存在せず、Form I の LSU に当たるドメインのみが存在し、この二量体が機能単位である。

Form IV の内部系統まで反映したルビスコタンパク質ファミリーの横断的な系統解析は、2012 年の Erb, T.らによる報告^①が最新のものである。そこから今に至るまでの十余年、シーケンス技術の向上によってゲノムデータの集積が進んでいる。本研究では最新のゲノムデータ中の細菌・古細菌のルビスコタンパク質を探索した。

【手法】

ルビスコ配列の収集

NCBI BLAST+にて、Erb, T.らの系統解析^①に用いられた 333 配列をクエリとして同源性検索を行った。対象データベースは nr, refseq_protein, env_nr の 3 つで、対象系統は細菌と古細菌である。得られた配列のうち、hsp 毎の query coverage が 50 以上かつ e-value が 1e-10 以下のものを以降の解析に使用した。

系統解析

Forms I-IV を対象とした系統解析では、前処理として CD-HIT にて収集したルビスコ配列のクラスタリングを行い、MAFFT で整列後、trimAl でギャップが 20 %以上ある座位を削除した。最終的に 351 アミノ酸残基を含む 305 配列からなるアライメントから最尤系統樹を復元するには IQ-TREE を用いた。置換モデルには ModelFinder によって選択された LG+F+R10 を使用し、トポロジーの信頼性を 100 回の bootstrap 解析によって検証した。

Form I とその近縁配列の系統解析では BLAST で収集した配列のうち、(1) Form I、(2) 外群として Form III の一部、そして (3) 先行研究^②にて報告された Form I' 配列を使用した。前処理として (1) の配列のみを CD-HIT でクラスタリングし、MAFFT で整列、trimAl でギャップが 30 %以上ある座位を削除した。最終的に 486 アミノ酸残基を含む 425 配列から構成されるアライメントを、IQ-TREE を使用して最尤法により解析した。置換モデルには ModelFinder によって選択された LG+R10 を使用し、トポロジーの信頼性を 100 回の bootstrap 解析によって検証した。

【結果・考察】

ルビスコタンパク質ファミリーの系統解析

True rubisco では Form I と Form II が単系統を形成し、Form III がその側系統となった。RLP では分岐順こそ先行研究^①と異なるものの、Aful や YkrW といった既知のグループが再現された。

この系統解析結果において注目すべき点は以下の 3 つである。一点目として、Form I の基部で分岐し、Form I と姉妹群を形成することが BP 値 91 % でサポートされている配列群の存在、二点目として、IV-GOS の姉妹群となる配列群の存在、三点目は IV-AMC と姉妹群を形成する配列群の存在である。本研究ではこのうち Form I の進化を考える上で重要になり得る Form I の基部から分岐する配列群についてより詳細な研究を行った。

Form I' に関連する系統の調査

Form I の基部で分岐する配列群として、Form I' が報告されている^②。これは Anaerolineae 目の Chloroflexi 門細菌にみられるルビスコタンパク質で、LSU が八量体を形成する点は Form I と類似しているが、こちらは SSU を持たないと考えられている。本研究で検出した Form I 関連ルビスコタンパク質が Form I' に該当するか検討した結果、今回検出した Form I 関連ルビスコタンパク質群は Form I' よりもさらに基部で分岐する配列をふくむことがわかった。以降この新規タンパク質群を Form I'' とする。

Form I'' が Form I' と同様に SSU を必要としないかを推測するため、ゲノム中で Form I'' の LSU をコードする遺伝子の近傍遺伝子を調査した。一般的に Form I を用いる生物のゲノム中では、Form I の LSU をコードする *rbcL* 遺伝子と近接して SSU をコードする *rbcS* 遺伝子が存在する。しかし Form I'' の LSU をコードする遺伝子周辺に SSU をコードする遺伝子は見つからなかった。このことから、Form I'' には SSU が不要であると示唆された。また、Form I'' をコードするゲノム配列では、LSU 遺伝子が CBB 回路の構成要素をコードする遺伝子に囲まれているものと、Form III と同じ代謝経路の構成要素をコードする遺伝子と近接するものがあつた。これより Form I'' は Form III から Form I に進化する途上にある可能性が示唆された。

【展望】

Form I'' は、Form I・I' のクレードと Form III の中間的な系統的位置をとる。Form I'' が Form III のように二量体単位で機能するのか、Form I・I' のように八量体で機能するのかは現状不明である。今後 Form I の起源と進化を解明するためのカギとなる可能性がある Form I'' について、機能や高次構造の予測を行う。また、本研究で新たに発見された 2 つの RLP 配列群についても解析を進める。

【参考文献】

- (1) Erb, T., et al. (2012). *Nat Chem Biol*, **8**, 926-932.
- (2) Banda, et al. (2020). *Nat. Plants*, **6**, 1158-1166.

Histioneis 属渦鞭毛藻に共生するシアノバクテリアのゲノム解析および系統解析

浅賀 巧匠 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中山 卓郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

貧栄養な外洋域に分布する従属栄養性の微生物には、生態的戦略としてシアノバクテリア等の光合成微生物と共生する例が多く知られる。Dinophysis 目渦鞭毛藻のうち外洋域に分布する非光合成性の種も、その多くがシアノバクテリアと共生関係にあり、シアノバクテリアを共生させる空間である共生チャンパーを発達させるなど、共生を前提とした細胞形態を持つ。そのような Dinophysis 目渦鞭毛藻のうち、*Ornithocercus* 属の共生シアノバクテリアについてはゲノムが解読され、この共生体は *Synechococcus* 属シアノバクテリアに由来することが明らかとなった。さらに当該共生シアノバクテリアは宿主と絶対共生の関係にあり、宿主の世代を超えて受け継がれてきたことが示唆されている^[1]。一方で、Dinophysis 目渦鞭毛藻に見られる共生シアノバクテリアには形態的特徴に多様性があり、宿主となっている渦鞭毛藻の系統間で異なる場合がある。特に *Histioneis* 属渦鞭毛藻の種では、単一個体の共生チャンパー内においても明らかに形態の異なる 2 タイプのシアノバクテリアが存在することが知られ、先行研究において一方の種類のシアノバクテリアには窒素固定能があることが示唆されている。これを踏まえると、*Histioneis* をはじめとする Dinophysis 目渦鞭毛藻の共生シアノバクテリアには系統的な多様性があり、それぞれ独立して宿主渦鞭毛藻と共生関係を構築したと推測されるが、その進化過程は詳細には明らかとなっていない。そこで本研究では Dinophysis 目渦鞭毛藻の中でも特に *Histioneis* 属に着目し、渦鞭毛藻宿主と 2 タイプのシアノバクテリアとの共生進化過程を類推することを目的とした。

研究室内の先行研究で、*Histioneis biremis*, *H. pietschmanii*, *H. depressa* の 3 種それぞれに見られる 2 タイプの共生シアノバクテリアゲノムについて、illumina シーケンサによるショートリードおよび Oxford Nanopore シーケンサによるロングリードの配列が得られていた。本研究ではこれらの配列を元にゲノム解析を行い、共生体間の系統関係や遺伝子の有無などを調査することで *Histioneis* 属にみられる 2 タイプのシアノバクテリアの進化を推定した。

【方法】

■ゲノム配列の再構築

シーケンサが出力したリードから、fastp および filtlong によって低品質のリードを除去した。その後、Unicycler でゲノム配列の再構築 (アセンブリ) を行った。

■ゲノムアセンブリの評価

得られたゲノムアセンブリに対して、DFAST を用いてアノテーションを行った。その後、推定されたタンパク質のアミノ酸配列それぞれを用いて diamond で NCBI RefSeq proteins データベースに対して相溶性検索を実行し、それぞれのタンパク質がシアノバクテリアに由来するかどうかを検討した。相溶性検索の結果と併せてアセンブリグラフも参照し、シアノバクテリア以外の生物に由来すると思われる配列を除去した。最終的に得られたゲノム配列を共生体のゲノムとして扱った。

得られたシアノバクテリアゲノムを用いて再び DFAST によるアノテーションを行った後、他の自由生活性のシアノバクテリア (計 334 OTU) とともに OrthoFinder によるオルソログ推定を行った。

■多遺伝子系統解析

オルソログ推定の結果から、①98%以上の OTU が持っており、②コピー数が 1.00 であるオルソログのアミノ酸配列を抽出 (計 85 遺伝子) し、これらを多遺伝子系統解析に用いた。最尤法による分子系統解析は IQ-TREE を用いて行った。置換モデルには LG+C20+F+G を用いた。

■系統マーカー遺伝子の単遺伝子系統解析

2 タイプの共生体それぞれのゲノムから、系統マーカーとなる領域 (窒素固定系統: *nifH*、非窒素固定系統: 16S rRNA および 23S rRNA コーディング領域のスペーサー配列 (ITS)) を抽出し、近縁系統の自由生活性シアノバクテリアの相同配列も含め、IQ-TREE を用いて最尤法による分子系統解析を行った。

■比較ゲノム解析

OrthoFinder によるオルソログ推定や、BlastKOALA による KEGG Orthology ID の割り振りの結果を元に、それぞれの共生体を持つタンパク質遺伝子のレポトリーを抽出し、近縁な自由生活性シアノバクテリアのゲノムと比較を行った。

【結果・考察】

多遺伝子系統解析では、*H. biremis*, *H. pietschmanii*, *H. depressa* のいずれの共生体も、既知の *Ornithocercus* 属渦鞭毛藻の共生体とは異なる系統のシアノバクテリアに由来することがわかった。また、2 タイプの共生シアノバクテリアは窒素固定性および非窒素固定性のシアノバクテリア系統において、それぞれ単系統群を形成した。また単一の系統マーカー遺伝子を用い、より近縁な OTU を取り入れた系統解析においても、同様に窒素固定系統・非窒素固定系統それぞれにおいて単系統群が形成された。これらの結果から、*Histioneis* 属渦鞭毛藻はその共通祖先において *Ornithocercus* 属渦鞭毛藻とは独立にシアノバクテリア共生体を獲得し、その後の種分化の過程を通じて共生体を垂直伝播してきたことが示唆される。本属における共生関係は、Dinophysis 目渦鞭毛藻とシアノバクテリアの共生関係の構築過程についての洞察を深める材料ともなるだろう。

2 タイプの共生シアノバクテリアは *Histioneis* 属の進化過程を通じて保持されてきたと予想される一方で、比較ゲノム解析からは、既知の細胞内共生性シアノバクテリアと比較して明らかでないゲノム縮小はみられなかった。これは *Histioneis* 属渦鞭毛藻とシアノバクテリア間の共生関係の確立が比較的最近であることに起因すると考えられる。

【参考文献】

1. Nakayama, T. et al. Single-cell genomics unveiled a cryptic cyanobacterial lineage with a worldwide distribution hidden by a dinoflagellate host. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 15973–15978 (2019).

細胞サイズ別環境 DNA を用いた共生性シアノバクテリアの探索

宮本 知世 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中山 卓郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

海洋は地球上の広い面積を占め、海洋バイオマスの約 7 割は微生物で構成されている。特に光合成および窒素固定を行うシアノバクテリアは海洋の地球化学的循環において重要な役割を担っており、その多様性及び生態的特徴は広く研究されてきた。近年では次世代シーケンス技術を用いた環境 DNA 解析の発達により、海洋シアノバクテリアの多様性は網羅的に調査されている。

これまでの多様性解析は主に自由生活を行うシアノバクテリアを対象として行われてきた。その一方で、様々なシアノバクテリアが単細胞の真核生物など別の生物と強く共生した状態で海洋に広く分布することが明らかとなってきた。近年の研究により、このような共生性シアノバクテリアは従来の自由生活性シアノバクテリアを対象とした網羅的解析では検出されない場合があることが示されている。これを踏まえると、共生性シアノバクテリアの中にはこれまで見落とされてきた未知の多様性が存在する可能性があるが、共生性シアノバクテリアを対象とした網羅的な環境 DNA 解析は行われておらず、その多様性の全体像は明らかでない。

共生性シアノバクテリアが従来の多様性解析において検出されなかった原因には、環境から細胞を回収する際の濾過作業が関与すると考えられる。自由生活性シアノバクテリアを濃縮する過程において、多くの場合細胞サイズの大きな真核生物は排除されるが、その結果として共生性シアノバクテリアも排除されていたと予想される。そこで本研究では、真核生物画分を含む複数の細胞サイズ画分の環境 DNA について、シアノバクテリア 16S rDNA 配列の多様性を解析することにより、共生性シアノバクテリアの網羅的探索を試みた。

一般に環境 DNA 解析では、Illumina シーケンサー等のショートリードを用いてゲノム中の短い超可変領域を解析する、メタバーコーディング解析がよく用いられる。一方で短いバーコード配列では全く未知の配列に対する解釈に制限があり、新しい系統の検出には不向きと考えられる。よって本研究では PacBio シーケンサーによるロングリードシーケンスを用いる試みを実施した。シアノバクテリア全体の分子系統解析に利用可能な比較的長い配列を解析することで、未知のシアノバクテリア系統の効率的な探索を目指した。

【材料と方法】

細胞サイズ画分ごとの環境 DNA の抽出

静岡県下田沖で採取された海水サンプルを、フィルター濾過により 0.45-5、5-20、20-120 μm の細胞サイズ画分に分けてそれぞれ DNA を抽出した。当該作業は本研究の開始以前に研究室内の先行研究によって行われていた。

16SrDNA 配列の増幅およびロングリードシーケンス

3つのサイズ画分の環境 DNA について、シアノバクテリア 16S rDNA 特異的プライマーセットを用いて約 1 kbp の部分配列を増幅した。得られた PCR 産物について、PacBio シーケンサーでロ

ングリードシーケンスを実施した。本研究では、単一分子を複数回解析して得られる高精度なコンセンサス配列 (CCS 配列) を取得し解析に用いた。

分子系統解析データセットの作製

16S rDNA 配列が入手可能なシアノバクテリアの全ての属について、rDNA のデータベースである RDP、Silva、および GenBank より各属複数配列ずつ 16SrDNA 配列を入手した。これらより CD-HIT を用いて多様性を保持しつつ冗長性を削減し、系統解析を行うためのシアノバクテリアのデータセットに利用した。また、共生性シアノバクテリア由来の可能性のある既知配列を GenBank より取得し系統解析に含めた。

各細胞サイズ画分から得られた CCS 配列について、遺伝的距離に基づいて配列の系統的な冗長性を削減し、系統解析に用いる配列を選択した。

収集した 16S rDNA 配列から MAFFT を用いて多重アライメントを作成した。さらに trimAl によって系統解析に適さない座位のトリミングを行うことで系統解析に供するデータセットを作成した。

系統解析

得られたデータセットを用いて IQ-TREE による最尤系統解析を行った。塩基置換モデルには GTR+I+F モデルを用い、ultrafast bootstrap approximation によって各枝の信頼性を評価した。

【結果と考察】

0.45-5、5-20、20-120 μm のサイズ画分環境 DNA よりそれぞれ 6,692、16,333、16,028 の PacBio CCS 配列が得られた。そのうち約 65% のリードで 99.99% 以上の推定精度が認められ、リード全体の推定精度の平均値は約 99.9% であった。また、各サイズ画分の CCS 配列でユニークな配列はそれぞれ 4,540、9,059、7,127 であった。

単細胞性かつ自由生活性のシアノバクテリアは 0.45-5 μm のサイズ画分に検出されると予想できる。本研究では単細胞性の系統にもかかわらず、真核生物のサイズである 5-20、20-120 μm 画分に多く現れる系統に着目して系統解析結果を精査した。

5-20 μm のサイズ画分から海洋性珪藻 (*Epithemia pelagica*) の細胞内に絶対共生するシアノバクテリアの配列が発見された。この細胞内共生シアノバクテリアが海洋に分布することは最近まで知られておらず、従来の多様性解析において見落とされてきたとされる。このことから本研究の手法は共生性シアノバクテリアを検出する上で有効である事が示唆された。

さらに系統樹には 5-20、20-120 μm 画分から得られた配列が優占する系統が複数見られた。これらの系統は未知の共生性シアノバクテリア系統である可能性があり、研究発表において詳しく論じる。

筑波大学構内と筑波実験植物園に生育する常緑樹数種の植物内生性担子菌類の調査

秋成 怜美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岡根 泉 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

植物内生菌は、生活環のある時期に害を及ぼすことなく植物組織内に生息する菌類と定義され、2,770 種以上が知られる。そのうち約 87%が子嚢菌門に属し、担子菌門は約 9%であるが、その調査は分離培養が主体である。担子菌門の菌類は一般に成長が遅く、人工培地による分離が難しい分類群を含む。したがって、培養依存的方法では担子菌門の内生菌の多様性が見落とされている可能性がある。さらに、葉内の担子菌の DNA を担子菌特異的プライマーセットで検出する菌類相の調査研究は、土壌や根圏を扱ったものに比べ非常に少ない。

タケ類の内生菌のほとんどは子嚢菌門のフンタマカビ綱とクロイボタケ綱が占めるとされる。一方、ギンバイカの葉の菌類相のメタバーコーディング研究で、菌相の半分程度が担子菌であることが報告され、樹種により内生性担子菌類の多様性に違いがあることが予想される。

本研究では、筑波大学構内及び筑波実験植物園に生育するホテイチク及びギンバイカをはじめとする常緑樹数種の葉の内生性担子菌の菌類相を明らかにすることを目的として、特異的プライマーセットを用いた培養非依存的方法と、一部の樹種については培養依存的方法での内生菌調査を行った。

【材料と方法】

(1) 供試植物

2022 年 5 月と 8 月に筑波実験植物園で採取したギンバイカ (MC) 1 個体とその亜種 (MCT) 1 個体、斑入り品種 (MCV) 2 個体、ギンバイカ属の一種 (MCS) 1 個体、及び同年 2 月と 8 月に筑波大学構内で採取したホテイチク (Pa) 3 株、クスノキ (Cc) 3 個体、ヒラドツツジ (R×p) 2 個体とツツジ属の一種 (RS) 1 個体、サザンカ (Cas) 2 個体とヤブツバキ (Caj) 1 個体、シラカシ (Qm) 3 個体、モミ (Af) 3 個体の生葉 5 から 10 枚を以下の実験に供試した。

(2) 特異的プライマーセットによる葉圏の担子菌の検出

上記の供試植物の生葉をエーロゾル OT 0.005%による洗浄液 (徳増、1980) で処理し、CTAB 法で DNA 抽出を行った。菌類特異的プライマー ITS1F と担子菌特異的プライマー ITS4B または担子菌・接合菌・植物特異的プライマー LB-W による ITS 領域の PCR 増幅と PCR 産物の TA クローニングを行った。得られた配列を用いて BLAST 検索による簡易同定を行った。また、担子菌が検出された樹種については葉面菌の分離培養も試みた。

(3) 分離培養によるギンバイカ属、ホテイチクの内生菌の調査

供試植物のうち、ギンバイカ属とホテイチクの生葉に対し 70% エタノールと 1% 次亜塩素酸ナトリウムによる表面殺菌処理の後に葉片を PDA 培地に置き内生菌の分離培養を行った。分離株から DNA の抽出、rDNA の ITS 領域の PCR 増幅を行い、得られた塩基配列で BLAST 検索による簡易同定を行った。

【結果および考察】

(1) 特異的プライマーセットで検出された担子菌

リード総数 118 配列を得て、各個体で重複する分類群の配列を除き 87 配列を得た。2 月に調査したツツジ属の一種 1 個体、クスノキ 1 個体、5 月に調査したギンバイカ属の 5 個体、8 月に調査した全ての樹種で担子菌が検出された。最も多くの宿主から検出されたのは順にシロキクラゲ目、エリスロバシジウム目、モチビョウキン目だった。目が不明な菌の半数以上はモチビョウキン綱だった。モチビョウキン属 (*Exobasidium*) が検出されたツツジ属を含むほとんどの樹種からモチビョウキン綱が検出されたが、クロボキン亜門の分類群による病害が未報告のモミでも *Exobasidium* 属が検出され、潜在的な病原菌の内生や宿主範囲の広さが示唆された。また、検出された分類群の多くが酵母に類別される種だった。その中には、シロキクラゲ目の *Carlosrosaea foliicola*、*Derxomyces melastomatis*、レウコスפורジウム目の *Leucosporidium intermedium*、フクロタンシキン目の *Robertozyma ningxiaensis* のように、内生菌として未報告の種も検出された。葉面菌の分離培養では、葉面菌として知られる *Cladosporium* 属や *Aureobasidium* 属などと共に、クローニングで検出された *C. foliicola*、*Erythrobasidium hasegawianum*、*Derxomyces* 属、*Dioszegia* 属などの菌が分離された。一方、クローニングで検出された *Exobasidium* 属や *Leucosporidium* 属、*Robertozyma* 属などは葉面菌の分離培養では検出されなかった。

(2) 分離培養で検出された菌類

ギンバイカ属 5 個体から 29 株、ホテイチク 3 株から 12 株が得られたが、全て子嚢菌門のクロイボタケ綱またはフンタマカビ綱に属し、担子菌門の分類群は検出されなかった。

【まとめ】

内生菌の分離培養では担子菌が検出されない一方で、特異的プライマーを用いた検出ではいずれかの採取時期で全樹種の生葉で担子菌が検出された。担子菌の検出頻度が低いと推測したホテイチクでも複数の担子菌が検出された。また、潜在的な病原菌の内生や宿主範囲の広さが示唆される分類群も検出された。葉面菌の分離培養により、内生菌として未報告である一部の種は葉面菌としての定着が示唆された。一方、葉面菌として分離されずクローニングのみで検出された *L. intermedium*、*R. ningxiaensis*、*Exobasidium* 属などは葉の組織内部での生息が示唆された。

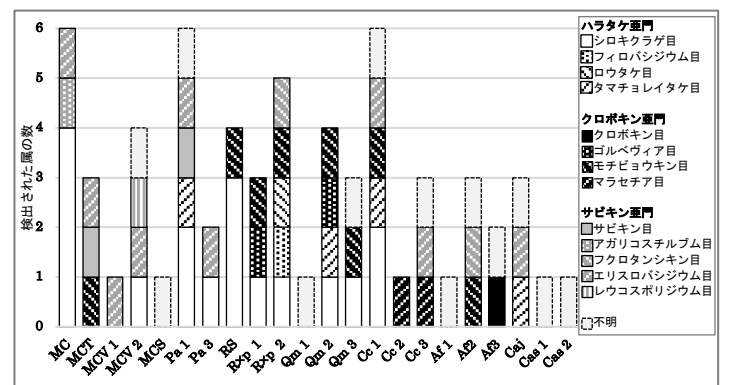


図 1 特異的プライマーセットで検出した宿主個体葉内の担子菌分類群の内訳。横軸は宿主、縦軸は 2 回の採取分で検出された属数を合算した値。

日本産ムカデ綱4目における糞生菌相の比較検討

清原 広海 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】糞生菌とは、動物の糞上で孢子形成をする菌類のことである。脊椎動物の糞生菌に関してはこれまでの研究でよく調べられているが、無脊椎動物の糞生菌はほとんど調べられていない。また、その多くは草食動物の糞から知られているが、肉食動物の糞からも、草食動物ほど多様ではないものの複数の特異な糞生菌が確認されている。

そこで本研究では、無脊椎動物の中でも肉食であるムカデ綱に着目した。当研究室ではこれまでにムカデ綱イシムカデ目の糞から特異的に発生するキクセラ目菌 *Myconymphaea yatsukahoi* や、ムカデ綱ゲジ目の糞から発生するクサレケカビ目菌 *Mortierella thereuopodae* を発見している。これらは土壌等の他の環境からは発見されておらず、ムカデ綱の糞には顕著な特異性を示す糞生菌が多数存在する可能性がある。また、前者は同所的に存在するオオムカデ目の糞からは発生しておらず、分類群によって異なる糞生菌相をもつ可能性も考えられる。しかし、ムカデ綱動物の糞生菌に関するまとまった調査は未だ行われていない。

本研究では、日本産ムカデ綱4目(ゲジ目、イシムカデ目、オオムカデ目、ジムカデ目)の糞生菌相を明らかにすると共に、目ごとの糞生菌相の違いとその特異性をもたらしている原因について、*M. yatsukahoi* を用いて実験を行い、検討した。

① 糞生菌相調査

【方法】2022年4月から11月にかけて、筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所及び周辺地域にてムカデ綱の動物を採集し、湿度を保ったクリーンカップで飼育した。ムカデ採集日以後、糞が溜まり次第回収し、細菌の繁殖を防ぐため抗生物質を加えた1.5%素寒天培地で培養した。糞から発生した糸状菌を実体顕微鏡下で観察し、主にLCA培地に分離し室温で純粋培養を行なった。形態的特徴からまず属までの分類を行い、ケカビ門とトリモチカビ門に関しては種までの同定を行なった。既知の種に該当しないものに関しては、便宜的に分離順に番号をつけ仮称を与えた。

【結果】ムカデ綱動物を4目計88個体(イシムカデ目53個体、オオムカデ目14個体、ジムカデ目16個体、ゲジ目5個体)を採集し、液浸標本を残した。糞から発生する菌の種数は、採集日以後時間経過とともに減少した。計206株の糸状菌が得られ、23属に分類された。糸状菌の85%はイシムカデ目とオオムカデ目の糞から得られた。そのうち18属は“不完全菌類”(二核菌の不完全世代)で、*Penicillium* 属菌や *Aspergillus* 属菌が多いものの、植物基質から知られる菌も含まれていた。

ケカビ門とトリモチカビ門については5属19種が得られた。主にイシムカデ糞から *Mortierella* 属菌が、オオムカデ糞から *Mortierella* 属菌と *Mucor* 属菌がよく発生した。また、イシムカデ糞からのみ得られた *Mortierella* sp. 1 と、オオムカデ糞からのみ得られた *Mortierella* sp. 2、*Mortierella* sp. 3 について詳細な形態観察を行なった。*Mortierella* sp. 1 は孢子嚢柄が孢子嚢直下で主軸分枝し培地周縁で不揃いな厚壁孢子を作る点で、*Mortierella* sp. 2 と *Mortierella* sp. 3 は孢子嚢柄の先から不稔の装飾菌糸が伸び大きく球形の厚壁孢子を作る点で、既知の

Mortierella 属菌のいずれの種の形態的特徴とも一致しないことから、未記載種と考えられる。

【考察】本研究で発見された未記載種は土壌からは全く発見されず、ムカデ綱動物の糞に特異的な菌と考えられる。これらの菌はムカデ綱動物の生態と深く関わっている可能性がある。また、本研究からは肉食の無脊椎動物の糞にも多様な糞生菌が存在することが確認された。日本においてムカデ綱は南西諸島で多様化していることから、今後、南西諸島のムカデ糞を調べることで、より多様な糞生菌が発見される可能性がある。

② 特異性の原因を探る

①において、ムカデ綱の目特異的な糞生菌が存在することが確認された。特異性をもたらす原因を探るため、*M. yatsukahoi* を用いて2つの実験を行なった。

【方法: 摂食実験】糞から *M. yatsukahoi* の発生がなかったムカデ綱4目の個体を2週間以上絶食させ糞が出なくなったことを確認したのち、市販の鶏肉に *M. yatsukahoi* の孢子を付着させたものを与え、*M. yatsukahoi* が糞上に孢子形成するかを観察した。

【方法: 付着実験】イシムカデ目個体とオオムカデ目個体を摂食実験と同様に絶食させたのち、*M. yatsukahoi* を孢子形成させた状態のLCA培地上を2時間以上歩かせた。ムカデ綱では自身の触角や歩肢を舐めて掃除するグルーミング行動が知られている。本実験でも、培地上でグルーミング行動を少なくとも1度は確認した。その後、ムカデをクリーンカップに移し、何もつけていない鶏肉を与え、*M. yatsukahoi* が糞上に孢子形成するかを観察した。

【結果】摂食実験では、イシムカデ糞で15回中10回、オオムカデ糞で10回中3回、ゲジ糞で2回中1回、*M. yatsukahoi* が糞上に孢子形成をした。ジムカデ糞は液状で観察できなかった。付着実験では、イシムカデ糞で3回すべて、オオムカデ糞で2回中1回、糞上に孢子形成が認められた。

【考察】ムカデ綱では、孢子を餌と共に食べることに加え、体表に付着した孢子も摂取されると考えられる。培地上の歩行で体表に孢子が付着し、それがグルーミングによって摂取されたのだろう。これらの実験から、野外ではイシムカデ糞からのみ得られる *M. yatsukahoi* の孢子は、オオムカデ目とゲジ目の消化管も通り抜けることが確認された。しかし、オオムカデ糞からの出現率はイシムカデ糞と比較して小さかった。以上を踏まえ、ムカデ綱糞生菌の特異性の原因は野外での食性と消化管構造の双方にあると考えられる。ムカデ綱では目ごとに獲物の狩り方が異なる。オオムカデ目やゲジ目は歩き回って餌を探す、イシムカデ目は獲物を待ち伏せする。そのため、イシムカデ目は他の目に比べて自らの糞に接触する機会が多く、糞生菌の特異性が高まる可能性がある。消化管構造の違いとしては、オオムカデ目の中腸にのみ gizzard という器官が存在する点が挙げられる。gizzard には硬い棘が並んでおり、ふるいの役割を果たしている。

本研究では、無脊椎動物であるムカデ綱の糞に特異的で多様な糞生菌が得られた。特異性の原因に関して、今後、解剖等によりムカデ綱の消化管の構造的側面からの検討も行いたい。

菅平高原における変形菌相調査

上辰 俊広 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

広義の粘菌とは生活環の中で子実体を形成するアメーバの仲間のことであり、その中で多核・単細胞の巨大な変形体を形成する一群が変形菌類である。多くの種は腐木や落葉に発生するが、一部の種は特定の微小生息場所に特異的に発生することが知られている。また、子実体の微小さや発生量の少なさから、野外における目視での採集による報告が少なく、樹皮や落葉を用いた湿室培養による報告が主である種も存在している。

日本における変形菌類の多様性調査は比較的進展しており、暖温帯を中心に調査が行われ、約 550 種が報告されている。しかし、暖温帯と比較して高山帯や北方の地域のような冷温帯では十分な調査が行われておらず、長野県内では 2011 年までに 189 種のみが報告されており、菅平高原からは 109 種が記載されている。これらの調査は、野外での目視による子実体の採集が主であり、その採集場所は変形菌類が多く発生すると考えられる腐木や落葉の多い環境に集中している。そこで本研究では目視による調査に加え、現在までにほとんど採集が行われていない草原等の環境での調査や、湿室培養を行うことで、菅平高原で未報告の変形菌類を発見し、冷温帯における変形菌相の情報を拡充することを目的とした。また、各調査方法によって得られた種数を比較することで、変形菌相調査に効果的な調査方法を考えることも目指した。

【材料と方法】

1) 調査

定期調査: 菅平高原実験所内に定めた 2 つのルート(アカマツ林、樹木園)をそれぞれ隔週で歩き、目視によって変形菌類の子実体を採集した。**不定期調査:** 定期調査対象外の場所や定期調査では重点的に調査を行えなかった場所で不定期に補充調査を行った。**湿室培養:** 定期調査時に立ち枯れの樹木から樹皮を採集し、実験室内で使い捨てフードパックに入れて保湿し、湿室培養を実施した。その後約 2 ヶ月間観察を続け、発生した子実体を採集した。**標本作成:** 採集した子実体は紙製の標本箱に木工用ボンドで固定し、採集データを記入した。カビや虫による害を防ぐため、標本を 60 °C の熱風乾燥機で一晩乾燥させ、防虫剤と共にプラスチックケースに保管した。**種同定:** 実体顕微鏡、光学顕微鏡で子実体を観察し、日本変形菌誌 (山本, 2021) を参照して種同定を行った。また、自身での同定が困難な種については、変形菌類の分類を専門とする松本淳氏 (福井総合植物園) に指導を仰いだ。

2) 調査方法ごとの比較

過去の文献より、日本国内の冷温帯で採集された変形菌類の種リストを作成し、本研究で採集された種と比較した。また、変形菌相調査のための各調査方法の妥当性について評価した。

3) 菅平高原産変形菌類リスト、図版資料の更新

過去の卒業研究 (坂梨, 2018) で作成された菅平高原産変形菌類リストに、本研究で新知見を加え、リストを更新した。また、菅

平高原新産種に関しては、同定に重要となる形態的特徴を写真を用いて記録した図版資料を作成した。

【結果】

1) 調査

定期調査: アカマツ林ルートでは 4 月 4 日から 11 月 18 日まで計 8 回実施し、68 標本 17 属 30 種 7 変種 1 品種が得られた。樹木園ルートでは 4 月 12 日から 11 月 25 日まで計 11 回実施し、119 標本 20 属 47 種 8 変種 2 品種が得られた。**不定期調査:** アカマツ林、樹木園を含む 11 地点で 3 月 16 日から 12 月 7 日まで計 47 回実施し、362 標本 25 属 68 種 9 変種 2 品種が得られた。うち 6 属 27 種 1 変種は定期調査では得られなかった種であった。**湿室培養:** アカマツ林および樹木園で立ち枯れ樹木から採集した樹皮を用いて、6 月 27 日から 11 月 25 日の期間に計 25 個の湿室を作製し、26 標本 8 属 10 種 1 変種が得られた。うち 2 属 5 種 1 変種は野外採集で得られなかった種であった。

2) 調査方法ごとの比較

日本国内の冷温帯での報告をまとめた結果、43 属 231 種 25 変種 2 品種が確認された。うち、定期調査では 48 種 9 変種 1 品種が重複しており、1 品種は未報告の種であった。不定期調査では 67 種 9 変種 2 品種が重複しており、1 属 1 種は未報告の種であった。湿室培養では 10 種 1 変種が重複していた。

3) 菅平高原産変形菌類リスト、図版資料の更新

今年度の調査で 575 標本が得られ、28 属 85 種 12 変種 3 品種に同定された。そのうち 1 属 28 種 3 変種 2 品種は菅平高原新産種であり、過去に同定された標本と合わせると菅平高原産の変形菌類は計 34 属 126 種 13 変種 5 品種となった。また、新産種の図版資料を菅平高原実験所のウェブサイトで開催予定である。

【考察】

本研究で得られた菅平高原新産種のうち、7 種 2 変種 1 品種が定期調査のみで、1 属 14 種 1 品種が不定期調査のみで、3 種 1 変種が湿室培養のみで得られた。また、不定期調査でのみ得られた新産種には標本数の少ないものが多い傾向があった。これは、不定期調査では特定の調査地を重点的に調査するため、発生量の少ない種の発見が可能である為だろう。一方、定期調査では定められたルートを均一に調査するため多産種を網羅すること可能だが、発生量が少ない種を見落としやすい。また、過去に冷温帯で採集された種との重複が不定期調査で最も多いことも、同様のことを示していると考えられる。以上から、網羅的な変形菌相調査が求められる場合には定期調査の、既に調査が行われている地域において補充調査をする場合には不定期調査の方法が効果的であると考えられる。また、湿室培養は湿室作成から子実体の発生までに時間を要するため多数の標本を得ることは難しいが、湿室培養でのみ特異的に発生する種の発見が求められる場合には効果的であるとされる。また、今後の展望として、環境配列などの解析から多様性を調べ、実際に生息している種と各方法で採集された種との比較等をしていきたいと考えている。

菅平高原周辺のミミズの遺伝的多様性

塚越 優喜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

「ミミズは世界の歴史において重要な役割を果たした動物グループ」

これは進化学の祖である Charles Darwin の最後の著作である「ミミズと土」(Darwin 1881) の作中で書かれている一文である。この「ミミズと土」では、ミミズの生態とその土壌を耕す力について Darwin が 40 年にわたって研究した成果が書かれている。このようにミミズは 100 年以上前から研究者によって研究の対象にされており、科学の発展において一役買っていた存在である。

ミミズは土壌無脊椎動物バイオマスの 90% を占めており (Huang 2007)、全世界で 5000 種以上存在すると考えられている (Chang 2011)。土壌動物として比較的大型なミミズは、土壌形成や通気、排水、有機物の分解と取り込みなどの多くの土壌プロセスで重要な役割を担っているほか、様々な無脊椎動物や脊椎動物の餌となっており、食物網においてきわめて重要な役割を果たしている (Andrew 2008)。また Taheri et al. (2018) で行われた外来ミミズの生態系影響評価からもミミズは生態系において重要な役割を果たしていることがわかる。またミミズは農業において土壌改良のために利用される益虫であり、人間の生活においても欠かせない存在である。

日本にはジュズイミミズ科、ピワミミズ科、ツリミミズ科、カイヨウミミズ科、ムカシフトミミズ科、フタツイミミズ科、フトミミズ科、ナンベイミミズ科の 8 科が分布しており、のべ 500 種のミミズが生息していると考えられている。そのうち 95% 以上をフトミミズ科が占めていると考えられているが (石塚 2014)、実際に何種類のミミズが存在するか詳しいことはわかっていない。また、ミミズは能動的な移動能力が極めて低いために、地域固有性が非常に高いと考えられるが、地域ごとの詳細なミミズのファウナの情報は東京都や栃木県など限られた地域のものしかない。

また、これまでのミミズの分類の先行研究は、石塚 (2014) を含めて、雄性孔や受精囊孔などの外部形態や生殖腺などの内部形態など形態学的分類に基づいたものであり、分子系統情報など遺伝的変異も用いた分類評価はほとんどされていない。

以上のことから本研究では、分布しているミミズの情報が少ない菅平高原周辺のミミズのファウナ情報を調べるとともに、種間および種内の遺伝的系統関係を評価することを目的とした。

方法

1) サンプル採集

長野県上田市菅平高原の筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所およびその周辺地域の森林や畑・草地から、菅平高原内 15 か所、菅平高原外の上田市内 2 か所の計 17 か所から 151 個体をサンプリングした。

2) 種同定

サンプリングした個体は石塚 (2014) を参考に、形態学的分類を用いて種同定を行った。

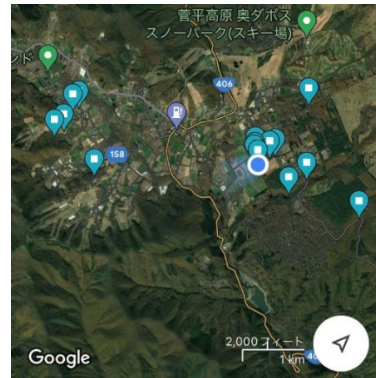


図 1 菅平高原内のサンプリング場所 (Googlemap で作成)

3) 遺伝データの取得と解析

サンプリングした個体からキアゲン社 DNeasy Blood and Tissue Kit を用いて DNA を抽出した。これら DNA サンプルを対象に、Minamiya et al. (2009) を参考に、母性遺伝するミトコンドリア DNA の COI 領域および 16S 領域を対象に塩基配列の決定を行った。これら塩基配列データから種同定結果も踏まえて、種間および種内の遺伝的関係や遺伝的多様性について評価した。

結果・考察

採取した 151 個体は、フトミミズ科 90 個体 12 種、ツリミミズ科 59 個体 6 種、ジュズイミミズ科 2 個体 2 種であることを確認できた。しかし、個体が未成熟であったり、個体のエタノール固定が不十分であったことにより、47 個体は同定不能であった。また同定できたフトミミズ科 90 個体のうち 24 個体がフキソクミミズであり、菅平高原内 15 か所のうち 5 か所から検出された。また、菅平高原内外では種構成に大きな差はみられなかった。

本研究結果を長野県内のミミズのファウナ情報に関する先行研究 (上平 2015) と比較すると、フトミミズ科はフツウミミズやクソミミズなど、本研究により、長野県で初記録となる種を検出できた。しかし、地域固有の種と考えられる種は見つからなかった。ツリミミズ科・ジュズイミミズ科については未記載と思われる種を見つけることができた。ただこれら未記載と思われる種は、ツリミミズ科に関しては菅平高原実験所内の倒木樹皮下、ジュズイミミズに関しては菅平高原外の畑でサンプリングしたものであった。

本研究では、菅平高原周辺のミミズは地域固有種ではなく、全国分布種で優占されていることを明らかにできた。その理由としては、菅平高原は 150 年ほど前までは草原が広がっており (井上 2021)、森林の歴史が浅いこと、観光・農業地域である菅平高原における人間活動による受動的なミミズ移動の可能性などが考えられる。目下、これら結果にミトコンドリア DNA の多型情報を加え、菅平高原周辺のミミズの遺伝的多様性について解析を進めている。

アブラナ科 4 種における植物炭疽病菌の植物宿主・組織への特異性と季節性

鈴木 暁久 (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】

植物は多くの微生物と相互関係を築いている。多くの病原性微生物が植物の成長・生存・繁殖に悪影響をおよぼす一方で、植物に内生する微生物の一部は植物に利益を与える共生菌として振舞い、植物の免疫機能の強化や、土壌から植物への栄養輸送を担っている。例えば真菌界子囊菌門 Glomerellales 目の *Collettrichum* 属菌は、植物炭疽病を引き起こす病原菌として従来知られており、アブラナ科シロイヌナズナにも病原性を示す。その反面、特定の条件下では土壌からシロイヌナズナへのリン酸塩輸送を担い、シロイヌナズナの成長を助けることが近年報告された¹。しかし、野外生態系におけるアブラナ科植物—*Collettrichum* 属菌の相互関係はほとんど分かっていない。そこで本研究では *Collettrichum* 属菌の植物宿主・組織特異性と季節消長を追跡調査することで、アブラナ科植物—*Collettrichum* 属菌の相互関係を考察した。

【方法】

長野県上田市の菅平高原実験所草原・打越城跡遊歩道・横尾城跡遊歩道という3箇所草原環境を調査地とした。これらの調査地を5~10月に1~4週間隔で訪れ、4属・4種のアブラナ科植物(ハタザオ・ヤマハタザオ・マメグンバイナズナ・ミヤマハタザオ、ただしミヤマハタザオは実験所の実験圃場のみ)を対象とし、1回の調査で各地・各種1~2個体を選択し、葉や根の一部を採集した。合計23回の調査でのべ109個体から313の試料(茎葉が147、老化していないロゼット葉が64、老化したロゼット葉が8、根が94)を採集した。これらの試料を滅菌水で洗い、ろ紙を入れた滅菌シャーレに滅菌水でろ紙を湿らせてその上に試料を置く湿室培養を25°Cの暗室で行い、真菌を発生させた。発生した菌類を観察し、剛毛・分生子等の形態的特徴を持つ物を *Collettrichum* 属菌の候補菌として記録し、単離を試みた。さらに、候補菌の発生を目的変数、植物種・組織・月を説明変数とするロジスティック回帰を行った。

【結果・考察】

湿室培養した313試料の根・葉のうち12試料の葉から、*Collettrichum* 属菌の候補菌系統(以下、候補菌系統)が得られた。剛毛が分生子柄よりも大きく発達し、分生子は紡錘形⁵という *Collettrichum* 属菌の形態学的な特徴から少なくとも3系統を含むと考えられた(図1)。候補菌系統aは黒い剛毛を持ち、候補菌系統bは白い剛毛を持ち、候補菌系統cは剛毛の密度が高かった。植物4種すべての試料から1つ以上の候補菌系統が確認され、各植物種の試料における候補菌系統の発生頻度は0.75~12%だった。ハタザオは最も発生割合が高く、複数の系統が確認された(図2)。候補菌系統aは全ての植物種から確認され、候補菌系統b・cはハタザオにおいて1サンプルずつしか確認されなかった(図2)。統計解析の結果、宿主植物間で発生頻度が異なり($p < 0.05$)、植物組織ごとの *Collettrichum* 属菌発生頻度を見てみると、茎葉と老化したロゼット葉に対して特異的に発生していた($p < 0.001$) (図2)、根では確認されなかった。健康な緑色の葉サンプルから *Collettrichum* 属菌が確認された。

また、5月末から6月上旬に採取した植物サンプルから *Collettrichum* 属菌の発生頻度が高く、季節性がみられた(図3)。

以上より、*Collettrichum* 属菌は系統aがアブラナ科植物で一般的に生息し、5月から6月にかけて活発に生存していることが明らかになった。11~4月の追跡調査ができていないため、*Collettrichum* 属菌の植物宿主特異性と、1年間の *Collettrichum* 属菌の季節消長についてのデータ収集が望まれる。

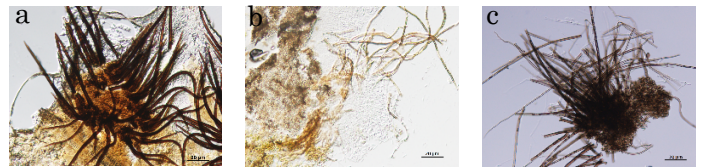


図1 剛毛が分生子柄よりも大きく発達している *Collettrichum* 属菌と思われる菌の顕微鏡写真。aは黒くて太い剛毛、bは白くて細い剛毛、cは剛毛が黒くて密度が高い。

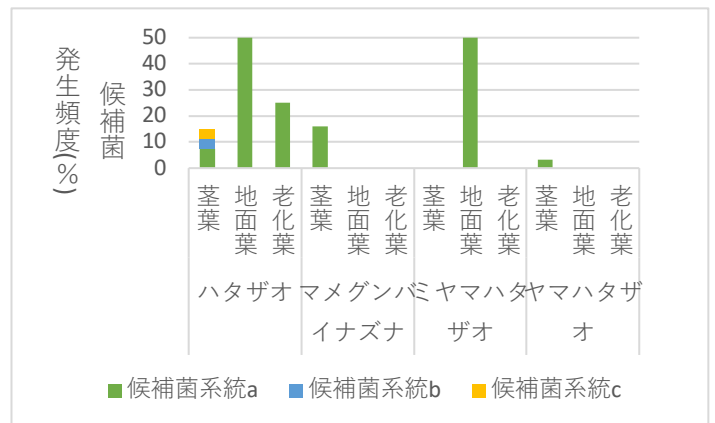


図2 候補菌系統aは全ての植物種から確認された。茎葉と老化したロゼット葉によく菌が発生した ($p < 0.001$)。(地面葉: 老化していないロゼット葉、老化葉: 老化したロゼット葉)

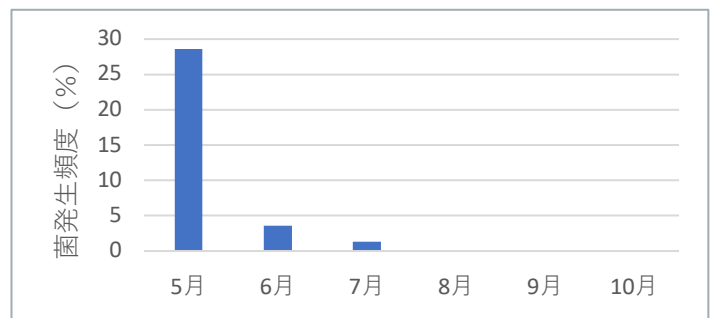


図3 5月に最も発生頻度が高く ($p < 0.001$)、8~10月は *Collettrichum* 菌が発生しなかった。

【参考文献】

- Hiruma et al. 2016. Cell 165:464-474
- 宇田川俊一ら 1978 菌類図鑑 下

筑波大学構内アカマツ林のシラカシ林への急速な遷移：松枯れを含む 37 年間の変化

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

【背景・目的】

日本の温帯で薪炭林・里山林として利用されるマツ類・ナラ類を中心とした陽樹林は、下層伐採の管理を中止すると陰樹林へと遷移していく。この過程の中の陽樹林の後期段階でアカマツが枯死する松枯れが発生しやすく、陰樹林への遷移を早めると考えられている³。アカマツ林は関東地域の典型的な先駆林であるため、下層伐採中止後の松枯れを伴う森林動態は、地域の二次遷移過程の理解にも役立つと考えられる。しかし、松枯れの状況を短期間観察した例はあるが、長期観測によって松枯れから陰樹林への遷移過程を明らかにした例は少ない。本研究では、関東地方で典型的な人工アカマツ純林の管理放棄後の遷移を先行研究のデータを含めることで 37 年間追跡し、陽樹林の二次遷移にもなる樹木群集の動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】

調査地は筑波大学アイソトープセンター脇のアカマツ林である。北緯 36.064469 度、東経 140.054485 度、標高 25 m に位置する。ここはかつてアカマツ純林として人工的に管理されていたが、1980 年に下層伐採が中止され、それ以降は人為的な管理は加わらずに森林は自然状態での変化に晒されている。2009～2022 年の計 11 年間には 8～15 a の面積で胸高周囲 15 cm 以上の樹木個体を対象に樹種・胸高周囲・生死を測定する毎木調査が行われ、私は 2019・2022 年の野外調査を行うとともに期間全体のデータ解析を行った。また、1985・1992・1999・2001 年には同センターの前身施設の敷地内で 4～9 a の面積で森林調査が行われて、樹高 5 m 以上あるいは胸高周囲 15 cm 以上の全種またはアカマツのみを対象にした毎木調査が行われている^{1,2,4,5}。これらのデータも解析に加えて時系列による森林群集の変化を調べた。

【結果・考察】

1985 年には樹木全種が調査されたが樹高 5 m 以上の個体はアカマツ 1 種のみであった²。そのアカマツの総個体数のうち、40% が 1992 年までに死亡し¹、2017 年にはこの林内のアカマツ個体が全て死亡した（図 1）。一方で 2001 年頃からシラカシ・ヒサカキの進入が顕著になり、陰樹であるシラカシの胸高断面積が急速に増えた（図 1）。

Shanon-Winer の種多様度は、1985～2013 年の期間に急速に増え、その後ゆるやかに減った（図 2）。アカマツ純林に様々な樹木種が進入することで多様度が上がり、さらにシラカシ優占状態に移行することによって多様度が低下したと考えられる。このようなアカマツからシラカシへの優占種の移行はこの地域の自然の二次遷移による典型的なパターンの 1 つである²。

胸高周囲 90 cm 以上の大木を含む、観察されたアカマツ全個体が、周囲のシラカシ個体が同程度のサイズに到達するよりもはるかに早く枯死している。このことから アカマツが死亡した理由は、下層成長による光環境の悪化だけでなく、マツノマダラカミキリによる「松枯れ」も主要因の 1 つだと考

えられる。松枯れの影響を考慮しない 2003 年の単純予測と比べても⁴、アカマツが完全枯死した時期は早かった。このように 1985～2017 年において、下層伐採中止による光環境の悪化と松枯れによりアカマツが完全消失し、すみやかに陰樹林へ遷移したと考えられる。藤原ら³と同様に、成熟したアカマツ林での松枯れは陰樹林への遷移を促進すると結論づけられた。

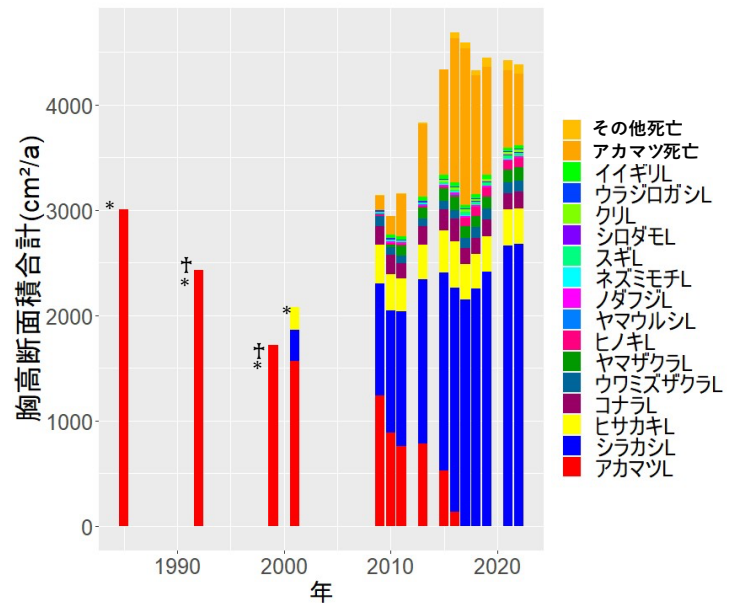


図 1：高木全種の胸高断面積合計の経年変化。胸高断面積を合計し、1 a あたりの平均を求めた。1985～2017 年にかけてアカマツは急速に減り、2001 年から 2022 年にかけてシラカシは増えている。*生存個体のみ、†アカマツのみ対象。

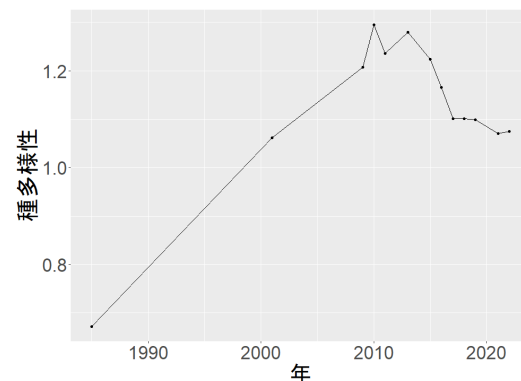


図 2：全種を調査した年における Shanon-Winer の種多様度はアカマツ死亡に伴い急速に増え、その後ゆるやかに減った。

【参考文献】

- 1 宇佐美・及川.(1993). 筑波大学水理実験センター報告, 17, 79-89.
- 2 山下・林.(1987). 筑波大学農林技術センター演習林報告, 3(4), 59-82.
- 3 藤原ら.(1992). *The Ecological Society of Japan*, 42, 71-79.
- 4 飯田ら.(2003). 筑波大学陸域環境研究センター報告, 4, 1-9.
- 5 飯田ら.(2001). 筑波大学陸域環境研究センター報告, 2, 1-6.

リンゴの送粉サービスに関わる単独性ハナバチ *Osmia* 属の基礎生態の解明

天野 史子 (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】

農業分野における送粉サービスは特に注目されており、在来の野生送粉者による貢献も見直されつつある。一方で、気候変動や大規模な土地開発、外来種侵入など生態系破壊のリスクは年々高まっている。そのため、在来生物による送粉サービスを持続的かつ有効に利用するにあたっては、その基礎生態を明らかにする必要がある。

単独性ハナバチである *Osmia* 属は果樹の送粉に利用されており、特にマメコバチ, *Osmia cornifrons*, はリンゴ園の野生送粉者として伝統的に利用されてきた経緯をもつが、近年は本種を含めた *Osmia* 属の種多様性や生息実態について調査された例がほとんどない。福島県南会津郡下郷町大内 (以下、大内宿) は、茅葺屋根の住居が立並ぶ山間部の観光名所で、毎年多くの *Osmia* 属の営巣が確認されている。一方、福島県会津若松市内にあるリンゴ園 (以下、リンゴ園) は送粉に必要な個体数を維持するため、定期的に大内宿から個体を導入している。それぞれ利用可能資源が異なるため、種組成や体サイズ、性比など個体群維持に関わる基礎生態に違いがみられることが予想される。数十年に渡り、送粉サービスに利用されているが、近年の環境変化による影響があるのかは明らかではない。さらに、*Osmia* 属の体サイズは遺伝よりも与えられた花粉団子の量に依存することや、花粉の化学的組成がハナバチの生活史形質に影響することが知られており、利用資源の質もまた基礎生態に関わると考えられる。

そこで本研究は、会津地方に生息する *Osmia* 属の基礎生態を明らかにすることを目的として、(i) 生息実態の調査と (ii) 花粉栄養 (タンパク質) の分析を行なった。

【方法】

Osmia 属の営巣用の筒は、ヨシを原材料とし、大内宿にある茅葺屋根の建物の一角および、リンゴ園内に設置した。

(i) 生息実態の調査

営巣済みの巣筒を羽化後の秋から冬に回収し、実験室で解体した。繭から成虫を取り出し、種と性別、IT スパン (体サイズの指標)、巣内の位置を記録した。大内宿は2019年から2022年、リンゴ園は2022年営巣分を調査した。

(ii) 花粉栄養の分析

2022年春に営巣した直後の巣筒を両地点で回収し、実験室で解体して花粉団子を取り出した。卵や幼虫を取り除き、花粉団子の巣内の位置と質量を記録した後、Qubit Protein Assay Kit を用いて花粉団子のタンパク質濃度を測定した。

【結果】

(i) 生息実態の調査

大内宿では、マメコバチとツツハナバチ, *Osmia taurus*, の2種が確認できた。2種の出現個体数比は2019年と2021年は1:1に近い割合であったが、2020年と2022年ではおよそ1:4と隔年変動する傾向がみられた (図1)。加えて、両種の雌割合は緩やかに減少する傾向がみられた。一方、リンゴ園でみられたのはマメコバチのみであった。2022年の両地点のマメコバチについて、体サイズの違いはみられなかった。

かに減少する傾向がみられた。一方、リンゴ園でみられたのはマメコバチのみであった。2022年の両地点のマメコバチについて、体サイズの違いはみられなかった。

(ii) 花粉栄養の分析

花粉団子の質量は大内宿の方が大きく、タンパク質濃度はリンゴ園で高くなった。一方、タンパク質含有量に大きな違いは見られなかった (図2)。

【考察】

本研究の結果から、大内宿個体群はマメコバチとツツハナバチの2種で構成され、種組成は大きく年変動することが明らかになった。リンゴ園では得られた成虫サンプル数が少なかったため、ツツハナバチがみられなかった可能性があるが、元となった大内宿個体群では4年間を通して常にツツハナバチが優勢であることから、2地点では種組成が異なっている可能性が高いと考えられる。また、ツツハナバチは他県においてもリンゴ園で出現割合が減少しており、現状のリンゴ園がツツハナバチにとって適切な生息環境ではない可能性が考えられる。

地点間で花粉団子のタンパク質濃度に差がみられたことから、利用可能資源の質は2地点で異なると思われる。しかし、タンパク質含有量は差がみられなかったことから、母親は仔の餌資源として適当な花粉を選択的に利用している可能性がある。

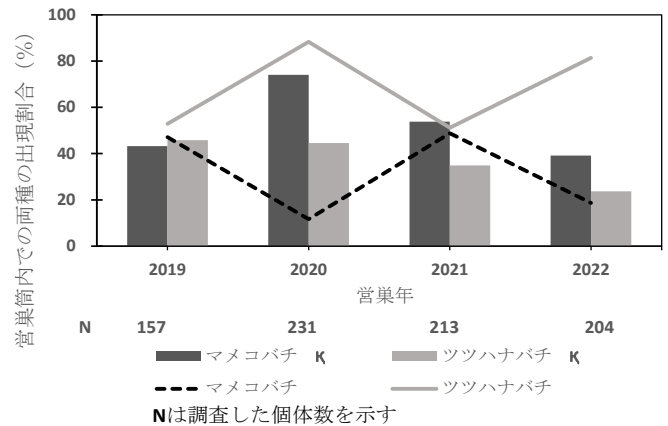


図1 大内宿個体群の種組成の年変動

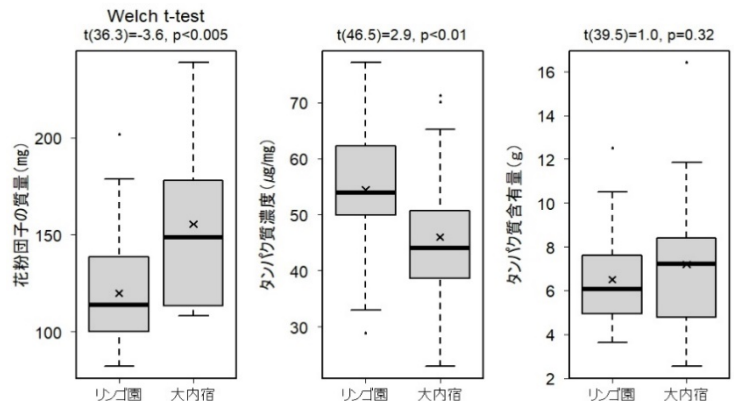


図2 2022年における花粉栄養分析 (タンパク質含有量)=(花粉団子の質量)×(タンパク質濃度)

居住空間サイズがクロマルハナバチ, *Bombus ignitus*, ワーカーの卵巣発達と育仔行動に及ぼす影響

和田 直樹 (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】

社会性昆虫は、分業を伴う高度な社会性のもとで集団生活しており、一般的には女王のみが産卵を行なう。ただし、マルハナバチのワーカーは産卵能力を有しており、コロニー内の女王が死亡した時や勢力が衰えた時、ワーカー内でヒエラルキー上位の個体が卵巣を発達させ産卵を開始する。しかし、下位のワーカーも卵巣を発達させているが、産卵には至っていない場合がある。これは通常の巣では常に他個体が存在するため、何らかの抑制が働くためと考えられる。そこで、居住空間が大きければ他個体から受ける影響は小さくなり、各個体が独自に育仔環境を形成するのではないかという仮説を立てた。

本研究では、ワーカー1 個体あたりの居住空間のサイズの変化が産卵や育仔行動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。そのために、居住空間サイズの変化に伴う①卵巣を発達させる個体の割合、②育仔環境の形成位置、③育仔行動の割合を検証した。

【方法】

市販されているクロマルハナバチの巣箱 (体積: 約 7850cm³) の 1/2 (14×14×20 cm³)、1/8 (9×9×12 cm³)、1/16 (7×7×10 cm³) の巣箱を制作した (図 1)。巣箱内の一角に餌場を設置し、はちみつと花粉団子 (1.2 g) を 3 日おきに与えた。各サイズの巣箱で 1 個体、3 個体の新生ワーカーを 14 日間飼育し、以下の 3 つの実験を行なった。

- ①各巣箱で 14 日間飼育した個体を解剖し、体サイズと卵巣発達度を測定した。体サイズは翅の基部間の距離である IT スパンで評価し、卵巣発達度は「I、II、III、IV」の 4 段階で評価した。
- ②巣箱サイズによる育仔環境の形成状況を明らかにするために、形成された卵室と蜜つぼの位置や餌場からの距離を記録した。
- ③3 個体飼育区の各サイズの巣箱において、ワーカーの巣箱導入初日を除く 13 日間の 10、14、18 時から 30 分間ビデオ撮影を行なった。撮影個体にマーキングをして、「歩行」「停止」「蜜への滞在時間」「花粉への滞在時間」「蜜つぼへの滞在時間」の 5 つの時間を計測した。

【結果】

①1 個体飼育区では、巣箱サイズが小さくなると卵巣を発達させる個体が多くなる傾向が見られた。3 個体飼育区では巣箱サイズにかかわらず卵巣発達度に有意な差は認められなかった (図 2)。また、卵巣発達度と体サイズの間にも有意な関係は見られなかった。

②1 個体飼育区では育仔環境の形成は見られず、3 個体飼育区でのみ卵室と蜜つぼの形成が見られた。巣箱サイズが変化しても卵室と蜜つぼの餌場からの距離はほぼ同じで、卵室は 6.03 cm ± 2.50 cm、蜜つぼは 8.04 cm ± 2.58 cm の範囲に作られていた (図 3)。

③卵室が形成された巣箱では、ワーカーの花粉滞在時間が長くなった (卵室有: 平均 45738 秒、卵室無: 平均 3698 秒)。一方、形成されなかった巣箱では歩行、もしくは静止している時間が長

くなった (【歩行】卵室有: 6147 秒、卵室無 20017 秒、【静止】産卵有: 2111 秒、産卵無: 23173 秒)。卵室の有無に関わらず、同じ巣箱内の 3 個体の各行動に要する時間はほぼ同じであった。

【考察】

1 個体飼育区で見られた卵巣発達度の違いが、3 個体飼育区では見られなかった。これは 3 個体飼育区に餌場が 1 か所しか存在していなかったため、個体間の接触が増えたからと考えられる。巣箱のサイズを大きくしても育仔環境は一つの巣箱に二つ以上作られることはなかった。巣箱サイズが影響しなかった理由として、全ての個体が同じ餌場を利用したために、活動エリアが餌場の近くに限定されていた可能性があげられる。

3 個体飼育区ではどの個体も同様の行動割合を示しており、巣箱内の 3 個体がコミュニケーションをとって産卵の有無を決定していた可能性がある。卵室が形成された巣箱では花粉を訪れる時間が長くなり、その後産卵が行われると考えられる。

本研究から、クロマルハナバチにおいてワーカーの卵巣発達や育仔環境形成位置の決定には居住空間サイズではなく、餌場の場所や餌場からの距離が影響している可能性がある。

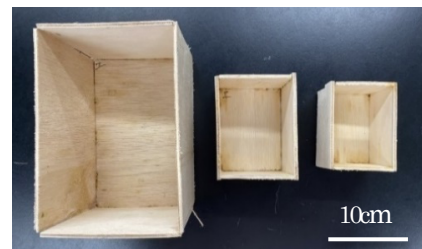


図 1 実験に用いた巣箱 (左から 1/2、1/8、1/16)

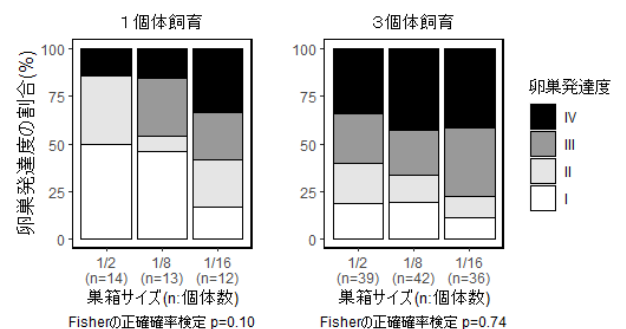


図 2 巣箱サイズと卵巣発達度の関係

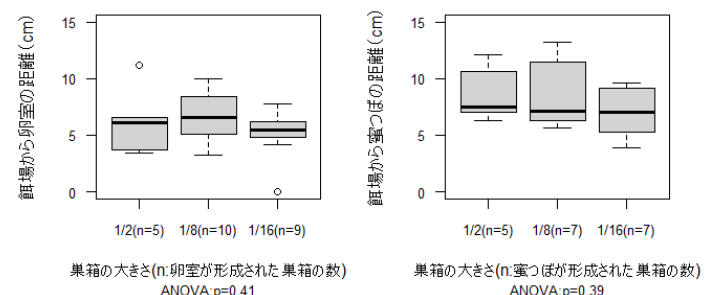


図 3 餌場から卵室・蜜つぼの距離

ウシガエル, *Rana catesbeiana*, の侵入初期段階にある個体群の餌選好性

沼澤 青葉 (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】

生物多様性の喪失を引き起こす最大の要因の1つとして、外来種の捕食圧による影響があげられる。外来種が選好する在来種は、外来種の侵入の初期段階で減少、絶滅する可能性がある。一方で、繁殖が開始されていない侵入初期段階に、外来種がどのような餌選好性を示すかは知られていない。

ウシガエル, *Rana catesbeiana*, は在来生態系に大きな影響を及ぼす外来種の一つで、世界の侵略的外来生物ワースト 100 に認定されている。本種は 1918 年に導入され、現在では日本全国で定着が確認されている。また、定着した本種は、同時に侵入することの多いアメリカザリガニを主に利用することが報告されている。千葉県君津市三石山では在来両生類のみが生息していたが、繁殖には至っていないウシガエル個体群が近年確認された。そこで、本研究では調査地の水場に生息する未繁殖なウシガエル個体群の餌選好性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

2021 年 2 月から 2022 年 7 月にかけて、千葉県君津市三石山の草川原線沿いにある間欠河川および側溝に生息するウシガエル個体群を対象に、餌選好性を調べた。調査地でウシガエルを捕獲し、頭胴長 (以下、SVL) と成長段階 (成体もしくは幼体) を記録し、胃内容物を摘出した。

(1) 餌の重要度

各餌生物について、ウシガエルによる捕食割合 (%F) と選択的捕食割合 (%PN) を以下の公式に従って求めた。

$$\%F_i = \frac{\text{(餌を捕食したウシガエル個体数)}}{\text{(総ウシガエル個体数)}} \times 100$$

$$\%PN_i = \frac{\sum_{j=1}^n \left(\frac{\text{(ウシガエルjが捕食した餌の個数)}}{\text{(ウシガエルjの胃内容物個数)}} \times 100 \right)}{\text{(餌を捕食したウシガエル個体数)}}$$

解析には胃内容物を 3 個以上含むウシガエル個体のみ利用した。

(2) ウシガエルの SVL や成長段階と食性の関係

成長段階ごとに SVL と胃内容物個数、各餌の体積および重量の関係を調べた。元の形状が不明な餌は解析から省いた。

(3) 先行研究との比較

日本でウシガエルの胃内容物を調査した 4 つの論文から、餌リストにおいて目より大きい分類群を抽出し、調査結果と比較した。

(4) ウシガエルの餌と環境中の生物との比較

調査地周辺の環境中で見られた生物を記録し、ウシガエルの胃内容物と比較した。また、それぞれの種について、IUCN、環境省、千葉県における保全状況を調べた。

【結果】

(1) 餌の重要度

最も %F が高かった餌はその他の昆虫で、次にアメンボ、サワガニ、甲虫成虫が高かった。一方、最も %PN が高かったのはアメンボで、次にサワガニが高かった (表 1)。

(2) ウシガエルの SVL や成長段階と食性の関係

ウシガエル幼体の SVL と各餌の重量の間にはのみ有意に正の相関がみられた (図 1)。

(3) 先行研究の比較

今回の調査で餌に含まれ、先行研究で見られていなかった分類群はシリアゲムシ目、ナナフシ目、オビヤスデ目、有鱗目の 4 分類群だった。一方で、トンボ目を除き、先行研究で共通して出現した餌生物は今回の調査でも確認された。

(4) ウシガエルの餌と環境中の生物との比較

環境中で観察された生物のうち、16 種がレッドリストに登録されていた。ウシガエルはトウキョウサンショウウオ、アズマヒキガエル、アカガエル属の 3 種以上の両生類と、サワガニ、トゲナナフシ、アオダイショウを含む 6 種以上の絶滅危惧種を捕食していた。

【考察】

本研究により、侵入の初期段階にあるウシガエル個体群は、幅広い分類群を利用するジェネラリストであることが明らかになった。アメンボの %F、%PN が共に高かったのは、環境中の個体数が多く、利用しやすかったためと考えられる。また、先行研究では見られていなかった 4 分類群はいずれも森林性であり、調査地の環境が反映された結果と言える。

ウシガエル幼体において自身の体サイズに適した重量の餌生物を選択する傾向が見られた。このことから、幼体は餌生物を選択的に採餌し、成体はサイズに拘らずに捕食していると考えられる。

絶滅危惧種の中で、サワガニは特に重要な餌生物となっており、サワガニ類がウシガエルの影響を受けている可能性が示唆された。

表 1 各餌の重要度 (太字: 上位 2、下線: 最大)

餌分類群	捕食したウシガエル個体数	胃の中から見つかった餌個数	%F	%PN
アメンボ	5	36	41.7	<u>52.1</u>
その他昆虫	9	15	75.0	31.5
サワガニ	5	14	41.7	40.6
クモ	2	6	16.7	34.4
ヤスデ	4	6	33.3	16.1
甲虫成虫	5	5	41.7	18.4
カエル	4	4	33.3	12.1
アリ	2	3	16.7	31.3
ヒメフナムシ	1	2	8.3	33.3
トウキョウサンショウウオ	1	2	8.3	28.6
マキガイ	2	2	16.7	14.9
アオダイショウ	1	1	8.3	25.0

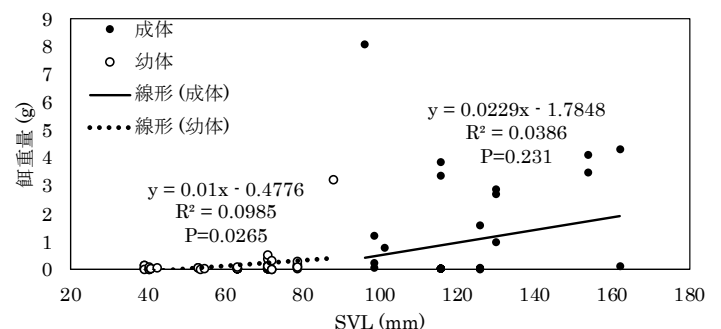


図 1 各成長段階におけるウシガエルの SVL と餌重量の関係

熱脱着法と陽子移動反応質量分析計による生物起源揮発性有機化合物の定量法の確立

伊藤 響生 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 大森 裕子 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

硫化ジメチル (Dimethyl sulfide: DMS) は、硫黄を含む揮発性有機化合物のひとつであり、大気中で雲凝結核となり、雲形成に寄与している。そのため地球の気候システムを理解する上で重要な役割を担っている。DMS の主な放出源は海洋であり、海洋表層における植物プランクトンや細菌の代謝活動により生成されることが知られている。DMS は、海洋の生物起源の硫黄循環に直接リンクしており、DMS の動態を明らかにすることは、海洋生態系から気候システムへの影響を理解する上で重要だ。

DMS の海洋-大気間収支を精度良く評価するには、海洋表層における DMS の観測データが不足している。原因のひとつは、DMS の揮発性および生物に対する反応性が高いため、海水試料を保存できないことである。採水現場で DMS 濃度を速やかに測定する方法として、パージ&トラップ法とガスクロマトグラフ (GC) を組み合わせた方法や、平衡器と陽子移動反応質量分析計 (PTR-MS) を用いた連続測定システムが用いられている。しかし、測定装置を載せられる大型の船で高頻度の観測が難しいという課題がある。

近年、Li et al. (2020) により、吸着剤「CarbopackX」が海水からパージ&トラップ法で得られた DMS を室温下で吸着保持し、7日間保存可能であることが報告された。また、保持された DMS を吸着剤から熱脱着し、GC により精度よく測定できることが示された。そこで、GC と比較し、カラムに依存せず網羅的に化合物を高感度で検出することが可能であり、測定時間も短時間 (約 30 秒) という利点がある PTR-MS と熱脱着法を組み合わせた測定方法の開発を目的とした。本研究により測定時間の短縮、DMS 以外の揮発性有機化合物の保存および測定への応用も期待される。

【方法】

(1) 熱脱着法と PTR-MS を用いた DMS 測定方法

DMS の吸着剤に CarbopackX を 80 mg 用いた。吸着剤を充填した石英ガラス管に、DMS を含むガス試料を流し、DMS を吸着させた。その後、石英ガラス管をキューポイントインジェクターに挿入し、358°C で熱脱着したガス試料をキャリアガス (N₂、流量 100 sccm) 中に導入し、PTR-MS で DMS (m/z 63) のイオン強度を検出した。

(2) DMS 標準ガスを用いた検量線の作成

DMS 標準ガスを、吸着時間を変えて 0~300 pmol (海水中の濃度 0~15 nM に該当) を吸着剤に吸着させ、熱脱着して PTR-MS で測定した。

(3) DMS 水溶液を用いた検量線の作成

パージ&トラップ法により、DMS 水溶液から DMS を気相に移動させ、吸着剤に吸着させた。そこで、DMS 水溶液を N₂ ガス (流量 200 sccm) でパージしたとき、最も DMS の吸着量が高くなるパージ時間を調べた。そして、NaCl 水溶液に DMS (aq) を添加し、DMS 濃度が 0~15 nM の DMS 水溶液を作成した。作成した水溶液を用いて、検量線を作成した (n=2)。

(4) 自然海水中の DMS 濃度の測定

静岡県下田市鍋田湾で採水した沿岸海水の DMS 濃度を、(3) と同様の方法で測定した。

(5) DMS を吸着させた吸着剤の保管期間の確認

DMS を吸着させた吸着剤を、室温または -30°C のもと、1~3 日間保管し、保管前後の DMS 量を測定した。

【結果と考察】

標準ガスの吸着量を変えた実験では、DMS 吸着量と測定されたイオン強度の間に一次直線の関係がみられた ($R^2=0.997$)。このことから、本測定方法は DMS 測定が可能であることが示された。

DMS 水溶液のパージ時間の検証において、吸着量が 0 分から 7 分までは上昇し、7 分から 9 分までは一定になり、10 分以降は減少したことから、パージ時間を 7 分間に決定した。DMS 水溶液を用いて得られた検量線は、高い相関係数 ($R^2=0.997$) をもつ一次直線であった (図 1)。自然海水の測定の結果、DMS 濃度は 0.56 ± 0.16 nM、従来報告された沿岸海水の DMS 濃度範囲内であった (Lana et al. 2011)。これらの結果から、熱脱着法と PTR-MS を組み合わせた本測定方法は水試料中の DMS 濃度の分析を十分に行えることが示された。

吸着剤の保持率は、吸着剤に DMS 標準ガスを 100 pmol 吸着させ、室温の 22 度で保存した場合でも約 22 時間後に 83.2% の高い保持率であった。一方、-30 度で冷凍保存した場合は 22 時間後に 96.7% の保持率であり、保存に際して冷凍が有効であることが示された。

これらのことから、その場測定かつ大型の測定装置が必要という従来の課題を解決できる、吸着剤 CarbopackX での DMS の吸着保存と PTR-MS での定量が可能だと示された。

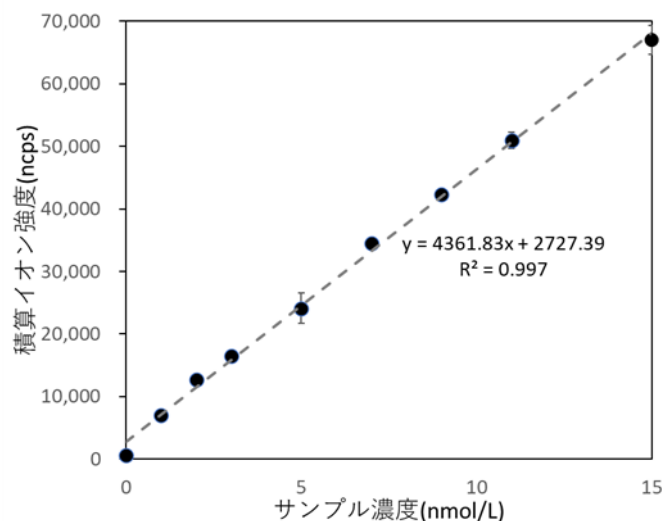


図 1. DMS 水溶液から得られた検量線
エラーバーは誤差を示す (n=2)

【参考文献】

- Lana et al. (2011). *Global Biogeochemical Cycles*, 25.
Li et al. (2020). *Marine Chemistry*, 222.

魚食性猛禽類であるミサゴの水銀濃度に影響を及ぼす要因を探る

鈴木 龍晟 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 庄子 晶子 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

人為的な水銀の排出によって海洋の水銀汚染が問題となっている。水銀は低濃度の蓄積であっても鳥類の繁殖機能などに悪影響を及ぼすことが知られている。猛禽類であるミサゴ *Pandion haliaetus* は水圏生態系における高次捕食者であり、食物連鎖の過程で高濃度の水銀を体内に蓄積する。鳥類では餌動物の栄養段階や採餌場所などの要因が体内の水銀蓄積量に影響することが知られており、ミサゴも同様に様々な要因によって水銀蓄積量が決定すると考えられる。しかし、ミサゴの水銀蓄積量がどのような要因によって決定されるかは明らかになっていない。本研究ではミサゴの羽に蓄積した水銀濃度を測定し、安定同位体比分析の結果や営巣地内で撮影した餌動物の情報を基に、ミサゴの水銀曝露状況を明らかにしたうえで、水銀濃度に影響を及ぼす要因を検討した。

【方法】

2019年から2022年にかけてミサゴの巣の下および巣の中から羽サンプルを採取した。2019年は宮城県気仙沼市と秋田県湯沢市において、2020年から2022年には宮城県岩沼市と仙台市において調査を実施し、羽を採取した。また、2020年から2022年にかけて繁殖期における各巣の営巣観察を行い、繁殖状況を記録した。各巣において雛の巣立ちが確認できた場合を「繁殖成功」、雛の巣立ちがなかった場合を「繁殖失敗」と定義した。さらに、2021年から巣近辺の樹冠にセンサーカメラを設置し、1年ごとに回収した。2021年は3巣(岩沼市)にカメラを設置し、画像データを入手した。2022年は前年の3巣に加えて新たに1巣(仙台市)にカメラを設置し、そのうちの3巣から画像データを入手した。

調査で採取した羽の種類を同定し、水銀濃度の測定と安定同位体比分析を行った。風切羽は繁殖期の水銀の蓄積を反映し、体羽は非繁殖期の蓄積を反映するとして解析を実施した。安定同位体比は、採餌場所が淡水域か沿岸かを調べるために炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) を、餌動物の栄養段階を調べるために窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を分析した。また、センサーカメラで撮影された画像データから、繁殖期にミサゴが巣に持ち帰った餌動物について科レベルの分類群の同定および体長の推定を行った。

【結果】

4年間で体羽・風切羽合わせて61枚の羽を11巣から入手し、全ての羽の水銀濃度は $7.55 \pm 5.06 \mu\text{g/g}$ (平均±標準偏差) であった。水銀濃度と $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ はともに相関が見られなかった。気仙沼市の個体群 ($18.4 \pm 8.57 \mu\text{g/g}$, $n=3$) は岩沼市 ($6.33 \pm 3.02 \mu\text{g/g}$, $n=22$) および仙台市 ($5.62 \pm 1.82 \mu\text{g/g}$, $n=6$) の個体群よりも水銀濃度が高かった(気仙沼市-岩沼市: $p=0.018$ 、気仙沼市-仙台市: $p=0.036$, 図1a)。湯沢市の個体の水銀濃度も $13.4 \mu\text{g/g}$ ($n=1$) であり、仙台市や岩沼市の個体群よりも高かった。仙台市 (-21.3%) や岩沼市 (-19.4%) は気仙沼市 (-16.4%) と比較して $\delta^{13}\text{C}$ の最小値が小さかった。また、沿岸の調査地(岩沼市、気仙沼市、仙台市)における水銀濃度は $7.20 \pm 5.74 \mu\text{g/g}$ ($n=17$) であり、内陸の調査地(湯沢市)よりも低かった。

$\delta^{15}\text{N}$ は沿岸で $12.5 \pm 0.43\%$ (平均±標準誤差)、内陸では 9.20% であり、 $\delta^{15}\text{N}$ は内陸の個体の方が沿岸の個体群よりも低かった。また、「繁殖成功」の巣では体羽の水銀濃度が $6.50 \pm 2.37 \mu\text{g/g}$ ($n=12$) であるのに対して、「繁殖失敗」の巣では $2.57 \pm 0.99 \mu\text{g/g}$ ($n=3$) であり、「繁殖成功」の巣の方が水銀濃度が高かった ($p=0.017$)。一方、風切羽の水銀濃度は繁殖成績間で違いは見られなかった ($p>0.05$)。

画像データから、2021年は21個体、2022年は94個体の餌動物(魚類)の搬入を確認し、そのうち2021年は5個体、2022年は15個体の魚類の科を同定できた。その結果、コイ科やボラ科などの10科の魚類が確認でき、巣間で利用する魚類の科組成や体長に違いが見られた。一方で、2021、2022年ともにカメラを設置した巣間では水銀濃度に違いは見られなかった ($p>0.05$)。

【考察】

気仙沼市や湯沢市の2地点で水銀濃度が高かったことから、繁殖場所により水銀濃度が異なることが確認できた(図1a)。また、 $\delta^{13}\text{C}$ の値の低さは、より淡水を含む水域で採餌していたことを示す。仙台市や岩沼市の個体群は気仙沼市よりも $\delta^{13}\text{C}$ の値が低かった。よって、気仙沼市の個体群は主に沿岸で採餌しているのに対して、仙台市や岩沼市の個体群では沿岸だけでなく淡水域でも採餌していたと考えられる。しかし、 $\delta^{13}\text{C}$ と水銀濃度に相関が見られなかったことから採餌環境では水銀濃度を説明できなかった。

また、「繁殖成功」と「繁殖失敗」の巣間で体羽の水銀濃度に差が見られたことから、非繁殖期に蓄積した水銀量が異なっていると考えられる。ミサゴは長距離の渡りを行い、繁殖地と越冬地を移動する。繁殖成績と水銀濃度間で見られた関係は、越冬地での水銀曝露量の違いを反映していると考えられる。

鳥類では餌動物の栄養段階と水銀濃度に正の相関が見られる傾向があるが、本研究では餌動物の栄養段階と水銀濃度には関連がなかった。さらに、巣間で餌動物の科組成は異なっていたが、水銀濃度には差がなかったことから、餌動物は水銀濃度に影響していなかった。先行研究では、内陸で繁殖するミサゴは沿岸で繁殖するミサゴよりも高い水銀濃度が報告されている。ダムや湖などの閉鎖的な環境では水銀が滞留しやすいことから、内陸で繁殖するミサゴには水銀が蓄積しやすい可能性がある。

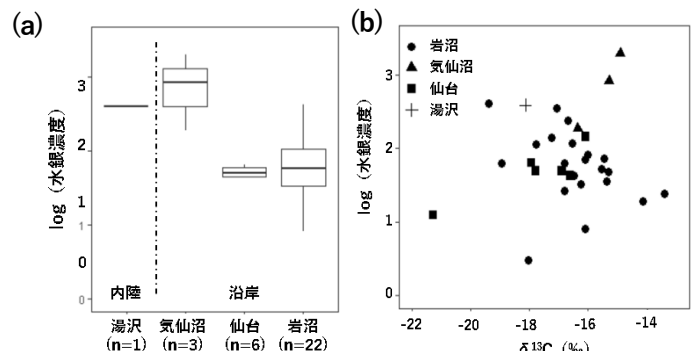


図1. 各調査地の (a) 対数変換した水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$) と (b) $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

【文献】 Cahill et al. 1998. Arch. Environ. Contam. Toxicol.; 千葉 et al. 2009. NMCC 共同利用研究成果報文集

国内希少水生植物ナガバエビモの保全を目的とした交配・種子発芽特性の研究

福田 ゆき (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】

ナガバエビモ *Potamogeton praelongus* Wulfen は北半球の周極域に分布しているヒルムシロ科ヒルムシロ属の沈水性の維管束水生植物である (Prausová et al., 2014)。本種は近年減少が著しく (Prausová et al., 2014; 角野, 2018) 日本では絶滅危惧種 IA 類 (環境省, 2020) および国内希少野生動植物種に指定されている (環境省, 2018)。

本種の生態的特性に関する研究は少なく、特に保全を進めるために必要な交配特性や種子発芽特性に関する知見は限られている。

【目的】

ナガバエビモの生育域内外における保全のための基礎情報を得るため交配特性および種子発芽特性を明らかにする。

【材料と方法】

・交配特性

2021 年および 2022 年の花期 (5 月頃) に、北海道東部で採集され、国立科学博物館筑波実験植物園の圃場で栽培保存されている個体を用いて実験を行った。花序への袋がけや人工授粉により、次の交配処理を行い、結実率 (結実率 = 全子房のうち全長 3mm 以上に肥大した子房の割合) を計測した: 自家受粉促進 (n=4)、他家受粉阻害 (n=4)、他家受粉促進 (n=5)、無処理 (n=11)。

比較として、北海道の東部および北部の野生集団で結実した花序を無作為に採取し、結実率を計測した (東部: n=6; 北部: n=15)。

・種子発芽特性

2018 年に北海道東部の自生地で採集した後、冷温条件で水中保存していた種子について、温度 (15°C, 20°C, 25°C)、光 (明, 暗) および冷温処理を変えて栽培し、発芽数を記録した。冷温処理は、栽培中に温条件と冷条件を図 1 の A, B, C のように組み合わせたもので、1 期間を約 3 か月とした。

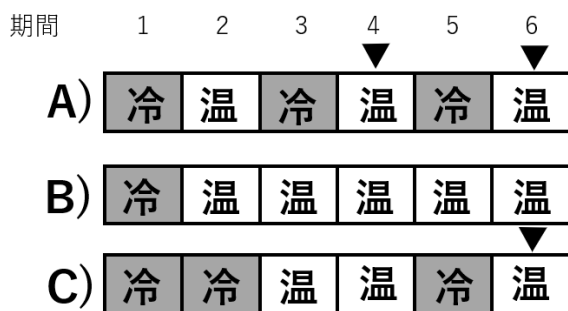


図 1 冷温処理条件. ▼は発芽が見られた期間を示す

【結果および考察】

・交配特性

他家受粉促進区、野生集団 1、野生集団 2 の結実率は無処理区と比較して有意に高かった。自家受粉促進区、他家受粉阻害区、無処理区に関しては同様に低い結実率を示し、それぞれの結実率の間に有意差が見られなかった。

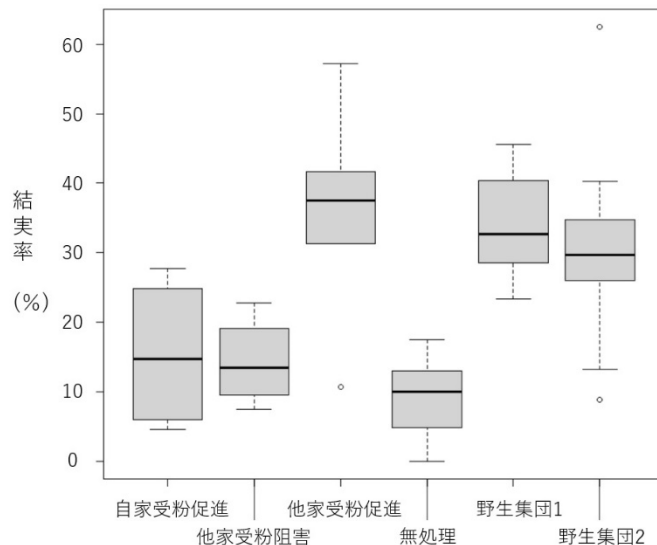


図 2. 各交配条件における結実率

結果から、ナガバエビモは自家受粉でも結実するものの結実率は低い傾向にあることが分かった。また、野生集団では他家受粉が行われていることが示唆された。

筑波実験植物園での栽培下では、花序に処理をしなければ他家受粉が制限された状態にあると推測された。これは、本種の生育域外保全を長期的に行った場合に、近交弱勢等の問題を生じさせる可能性があることを示唆する。この問題に対応するには、今後本種の送粉様式を明らかにする必要がある。

・種子発芽特性

すべての温条件 (15°C, 20°C, 25°C) において発芽が見られた。発芽は、図 1 中に ▼ で示した期間に見られた。なお、暗条件で栽培した種子は発芽しなかった。

この結果から、本種の種子は秋に結実した後、冷条件をはさんだ 2 回目以降の温条件 (自然界では種子散布後 2 回目以降の春) で発芽が促進されることが示唆された。冷条件の積算時間、温条件の積算時間ではなく冷温条件の繰り返しが発芽に重要であると考えられた。

【参考文献】

- ・角野康郎. 日本の水草. 文一総合出版, (2018), 326p.
- ・環境省自然環境局野生生物稀少種保全推進室 (2020), 【維管束植物】環境省レッドリスト 2020. <<https://www.env.go.jp/press/files/jp/114457.pdf>> (2023 年 1 月 23 日アクセス)
- ・環境省自然環境局野生生物稀少種保全推進室 (2023) 国内希少野生動植物種一覧. <<https://www.env.go.jp/nature/kisho/domestic/list.html>> (2023 年 1 月 23 日アクセス)
- ・Prausová et al., Aquatic Botany (2014), 120, 268-274

冷温帯二次林におけるつる植物の空間分布～ホスト樹木無しでは生存不可能！？稀有なその生態に迫る～

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

【導入・目的】

つる植物の生存戦略は、多様な攀じ登り方を駆使しながら直立した植物（ホスト樹木）等を利用するというものである。その生存戦略からも分かるように、つる植物の生態を理解するうえではホスト樹木への嗜好性を明らかにする必要がある。つる植物の研究が多い熱帯域では、つる植物とホスト樹木との関係の理解が進んでおり、つる植物が攀じ登る宿主を種類や幹直径の大きさによって自ら選んでいることが明らかになっている。一方、比較的つる植物が少ないとされる冷温帯域ではつる植物に関する知見そのものが少なく、ホスト樹木との関係も明らかになっていない。

また、樹木に攀じ登るつる植物において登攀型も、各々の生態特性を理解するうえで大切である。そこで、本研究では、ホスト樹木との関係を考察する際に3つの登攀型、根を利用するルートクライマー（RC）型、茎で巻きつくステムツイナー（ST）型、まきひげ等を利用するテンドリルクライマー（TC）型の3つに分類した。

上記のような背景から、本研究では、1）冷温帯林でのつる植物の分布状況の把握とその分布要因の解明、および2）登攀型によるホスト樹木の嗜好性の違いの解明を目的とした。

【調査地と調査方法】

本調査は、筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所（長野県上田市）のアカマツ二次林内の2つの固定調査区（50 x 200 m）で行った。合計2haにおよぶこれらの固定調査区では、毎年毎木調査が行われており、ホスト樹木に関してはそのデータを利用した。この調査区を森林構造と環境の違いから、8つの小区画（50 x 50m）に分けて解析を行った。

固定調査区内のつる植物を対象として2023年の6月～10月に、胸高直径1cm以上の全てのつる植物にタグ付をした後に、種同定、胸高直径（DBH）の計測、調査区内のx座標とy座標の測定、および攀じ登られていたホスト樹木の確認を行った。

【結果】

つる植物は5種、計697個体が存在しており、ツタウルシ（RT）が331個体、ツルウメモドキ（ST）が252個体、ヤマブドウ（TC）が86個体、サルナシ（ST）が27個体、ツルアジサイ（ST）が1個体だった。樹木は51種、計2064個体が存在しており、うちアカマツが814個体、胸高断面面積合計でみると全体の7割以上を占めていた。また、ホスト樹木のDBHの平均は、ツタウルシが34.1cm、ツルウメモドキが29.8cm、ヤマブドウが28.9cm、サルナシが21.0cm、ツルアジサイが15.3cmだった。

一方、つる植物の密度と存在するホスト樹木の密度には、林道沿いの2つの小区画（区画2と3）を除き、有意な正の相関が見られた（図1）。また、DBHが大きいホスト樹木はつる植物に巻かれている割合が高かった（図2）。一方、5種のつる植物の分布は、

いずれもホスト樹木の種レベルの嗜好性と、林床を優占するササ相対量の影響は見られなかった。さらに、5種のつる植物を登攀型に分けてみたところ、特にRC型のつる植物がDBHの大きいホスト樹木に多く見られることがわかった。

【考察】

つる植物はホスト樹木を攀じ登る戦略をとるため、分布は森林の構造の影響を受ける。本研究では、樹木密度が高い場所や林道がある地点においてつる植物の個体数が増えた（図1）。これらの結果からつる植物の侵入・定着には以下の2つが重要であると示唆される。1つ目は攀じ登る機会が増える高い樹木密度、2つ目は林道の特徴である光資源の供給と種子の運搬に関わる鳥等の往来である。

一方、つる植物、特にRC型のつる植物は、より太いホスト樹木を利用する傾向があった（図2）。図1の結果から予測されるのは密度が高い林分に多く存在する細いホスト樹木を利用するということである。これらの相反する結果から、つる植物には、より太いホスト樹木狙って利用する機構の存在が示唆されると考えられる。

登攀型に着目すると、RC型のツタウルシのみがより太いホスト樹木を利用する傾向が見られた。RC型の特徴はホスト樹木に巻きつく必要がないこと、ホスト樹木の乗り換えが出来ないことであり、他2つの型のつる植物とすみ分けが起きているかもしれない。

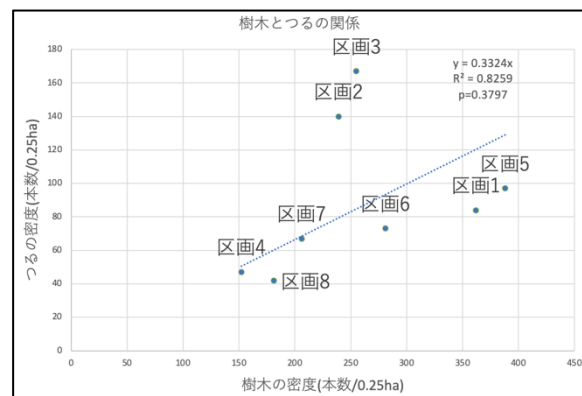


図1：小区画ごとのつる植物と樹木密度の関係

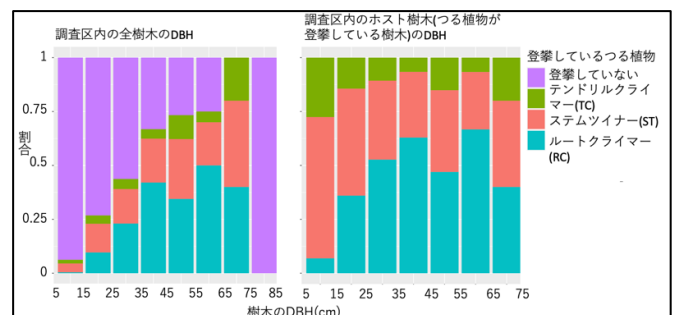


図2：つる植物と樹木のDBHの関係

異なる産地のダケカンバ幼樹の光合成特性に対する窒素負荷の影響

柘 権 匡 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 廣田 充 (筑波大学 生命環境系)

[背景および目的]

人為活動由来の過剰な窒素が生態系内に沈着し、多くの植物種の光合成速度や暗呼吸速度を増減させ、炭素収支に多大な影響を及ぼすことが知られている (Krupa, 2003)。特に、窒素負荷の影響が顕著な高山草本植物の光合成や呼吸に及ぼす影響について、多くの研究がなされている (Shen et al., 2019; Jiang et al., 2010)。一方で、窒素負荷が高山木本植物の光合成と呼吸にどのように影響し、個葉スケールの炭素収支がどう変化するかを調べた研究は少なく、知見が不足している。

そこで、本研究では典型的な高山木本植物であるダケカンバを用い、窒素負荷が本種の葉の形質に加えて、光合成速度や暗呼吸速度に及ぼす影響の解明を目的として窒素負荷実験を行った。

[調査地と窒素負荷処理]

筑波大学山岳科学センター八ヶ岳演習林内の圃場で、窒素負荷実験を行った。2020年4月に国内6つの産地 (Fig.1) から集めたダケカンバ幼樹を180個体植栽し、2021年から2つの窒素濃度の施肥処理を行い、高窒素施肥区と窒素施肥区、および対照区を設置した(それぞれの窒素施肥量は、 $10 \text{ gN m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ 、 $2 \text{ gN m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ 、 $0 \text{ gN m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ とした)。尚、高窒素施肥区の窒素施肥量は、土壌表層0-30cmの土壌無機態窒素量の約5倍に相当する量である (Shibata et al., 2007)。

Table.1 産地情報 (太字は光合成速度を測った個体の産地)

産地	地方	標高(m)	年平均気温(°C)	年降水量(mm)
厚岸	北海道	43	5.5	1114
能郷白山	北陸	1503	12.7	3229
釈迦ヶ岳	近畿	1780	13.2	2714
南アルプス	中部	1450	7.6	1956
八甲田山	東北	898	4.7	1624
磐梯山	東北	1076	5.7	1887
八ヶ岳演習林	中部	1350	8.1	1471



Fig.1 産地の位置

[方法]

2022年の7月から8月までに携帯型光合成・蒸散速度測定装置を用いて個葉レベルの光合成速度と暗呼吸速度を、携帯型分光特性測定装置を用いてクロロフィル含有量を計測した。その後、C/Nコーダーを用いて採取した葉の単位葉面積あたりの窒素含有量を計測した。また、光合成速度と暗呼吸速度のデータから Thornley の非直角双曲線 (Thornley, 1976) を用

いて光—光合成曲線を求め、この式から

最大光合成速度 (P_{max}) と初期勾配 (α) を算出した。 P_{max} は個葉の炭素固定能力、 α は光合成の光利用効率の指標とした。さらに、 P_{max} を暗呼吸速度 (R_d) で除して個葉スケールの生産効率 (P_{max}/R_d) を、 P_{max} を単位葉面積あたりの窒素含有量 (N_{area}) で除して光合成の窒素利用効率 (PNUE) を算出した。

[結果]

高窒素施肥区の個体は、対照区個体と比べて個葉の P_{max} が約1.3倍したものの、 R_d も約1.6倍増加しており、 P_{max}/R_d は約0.8倍に減少した (Fig.2a-c)。 N_{area} とクロロフィル含有量は、いずれも約1.1倍増加した。一方、 α と PNUE は、処理区間で有意な差がみられなかった。

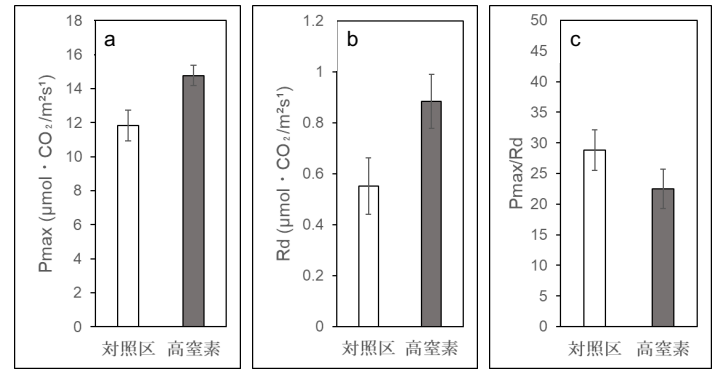


Fig.2 対照区と高窒素施肥区の P_{max} 、 R_d 、 P_{max}/R_d

[考察]

N_{area} と共に P_{max} が上昇したことから (Fig.2a)、吸収された窒素の多くは光化学系タンパク質に運ばれ、光合成速度増加に貢献したことが推測される。また、PNUE や光—光合成曲線の α は大きく変化しなかったことから、葉に吸収された窒素や照射された光子あたりの炭素固定量は、窒素負荷を受けてもあまり変化しないと考えられる。

ただ、一部の個葉では、 P_{max} 以上に R_d の上昇幅が大きく、高窒素施肥区で P_{max}/R_d は低下したことから (Fig.2c)、窒素負荷によって一部の個葉の生産性はむしろ減少していた可能性が考えられる。

一般に、窒素は植物の成長や光合成を促進することが知られているが、本研究の結果から、過剰な窒素負荷は個葉スケールでの生産性の低下を招くことが示唆された。

[引用文献]

- Shibata H., et al. (2007). *J. Jpn. For. Soc.* 89(5), 314-320.
- Jiang C., et al. (2010). *Atmospheric Environ.* 44(24), 2920-2926.
- Shen H., et al. (2019). *Environ. Pollut.* 251, 731-737.
- Krupa S.V. (2003). *Environ. Pollut.* 124, (2), 179-221.
- Thornley J.H.M. (1976). *Academic Press.* 86-110.

花を集めれば遠くまで目立つ? : 花密度に伴うハチの検出限界の変化

穴澤 颯太 (筑波大学 生物学類) 指導教員 : 大橋 一晴 (筑波大学 生命環境)

【背景と目的】

複数の花を咲かせる植物には、より多くのポリネーター (花粉媒介動物) が訪れる。しかしながら、この誘引効果が生じるメカニズムは未だによくわかっていない。昆虫の視覚に基づく1つの有力な可能性として「複数の花が集まることで視覚的に大きな塊に融合し、ポリネーターが遠くから発見しやすくなる」という仮説が考えられる。本研究では、この視覚融合の効果がすでに実証されている青い花 (上原 2022) と同様に長波長光を強く反射し、遠くから検出されやすいと予想される黄色い花においても、複数集まることで視覚融合の効果が生じることを確認するために、クロマルハナバチを用いた室内実験をおこなった。

【材料と方法】

実験にはY字迷路と人工花序 (図1) を用いた。人工花序には、花数あるいは花序内の花間距離を変えた3タイプの花序を用いた: 黄色の円 (以下、花) が密に3つ並んだ花序A、まばらに3つ並んだ花序B、花1つからなる花序C。花序AとBの花間距離は、Rパッケージpavoのprocimg関数を用いて、マルハナバチにとって花序Aは3つの花が融合し大きな塊に見えるように、花序Bは3つの花が点在してみえるように、それぞれ調整した。仮説が正しければ、ハチは花序AをBやCよりも遠くから検出できるはずである。

トレーニング Y字迷路の腕の長さを40cmに固定し、一方の腕には花と50%ショ糖水溶液 (以下、蜜) 20μLを一緒に提示した。他方の腕には0.12%硫酸キニーネ溶液 (以下、苦水) 20μLのみを提示した。このY字迷路にハチを1匹ずつ入れ、花がある方の腕を選んで吸蜜することを学習させた。なお、花とY字迷路の明度は等しく、ハチが明度のみを手がかりに花を選ぶことはできない。また、ハチが特定の花サイズや一方の腕を学習しないよう、試行ごとに花の直径を変え (4~11cm)、左右を適宜入れ替えた。

テスト Y字迷路の腕の長さを40cmに固定し、一方の腕には花と蜜を、他方の腕には苦水を提示した。トレーニングで学習が成立したハチを1匹ずつY字迷路に入れ、試行ごとに花の位置を左右入れ替えながら、一方の腕を選ばせる試行をくり返した (以下、試行セット)。花を選ぶ割合 (正答率) が二項検定で有意に0.5を上回ったら、試行セットを終えた。また、20回くり返しても有意差が生じなかった場合も、試行セットを終えた。花のサイズを小さくすることで次第に遠ざかる花序を模し、この試行セットをくり返した。試行セットごとに花の40cmにおける視角度も記録した。各花について、視角度と正答率の関係を明らかにした。

【結果】

ハチは、花序Cよりも花序B、花序Bよりも花序Aを遠くから検出することができた (図2)。花序Cは視角度6°で正答率60%を下回ったため、推定検出限界は6°程度と考えられる。一

方、密な花序Aは視角度1.5°でも正答率60%を大きく上回った。また、まばらな花序Bは視角度3°で正答率が60%まで大きく下がったため、推定検出限界はほぼ3°程度と考えられる。

【考察】

実験結果は、青い花と同様、黄色い花においても「複数の花が集まることで視覚的に大きな塊に融合し、ポリネーターが遠くから発見しやすくなる」という仮説を支持する。とくに、密な花序Aがまばらな花序Bより遠くから検出されたという結果は、視覚融合の重要性を示す。ただし、まばらな花序Bが花1つからなる花序Cよりも遠くから検出されたという結果は、花密度が低いときには個々の花が点在してみえる、との予想に反する。同様の結果は青い花でも得られており、視覚融合の効果は低い花密度でも生じる可能性が示唆される。また、黄色い花1つの推定検出限界 (6°) が青い花1つ (3.6°) に比べてやや大きかったのに対応するように、黄色い花のまばらな花序の推定検出限界 (3°) も青い花のまばらな花序 (1.9°) に比べてやや大きかった。

複数の花を咲かせたときの誘引効果が、花色や密度によって変わる可能性を示す今回の結果は、花序形態の適応進化を考える上でたいへん興味深い。単独では見つけにくい色特性の花をもつ植物においては、大きな花序の進化が起こりやすいかもしれない。

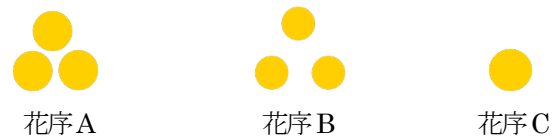


図1 実験に使用した花序。左から花序A、花序B、花序C

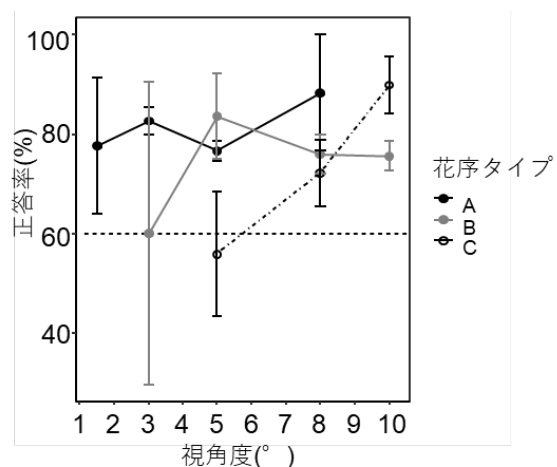


図2 クロマルハナバチによる各人工花序の検出率は各条件下における正答率の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。x軸に平行な破線は正答率60%を示し、正答率がこのライン以上となった場合を「検出可能」とみなす。

三花寄れば送受が増える？：ハナウドの花密度が訪花昆虫による送受粉におよぼす影響

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

【背景と目的】

自然界の多くの植物は、しばしば多数の小さな花を集合させた花序をつける。このような「密集花序」をつくる植物には、さまざまなタイプの訪花昆虫を誘引し、うまく送受粉に役立てているものが多い。しかしながら、密集花序が送受粉の量や効率にどのように役立っているのか、実験的に調べた例はない。密集花序を訪れた昆虫は、形や大きさによらず、花間を歩いて移動しながら採餌する傾向がある。そこで「密集花序は、昆虫に花間を歩いて移動させることにより、さまざまなタイプの昆虫の送受粉の量や効率を高める効果を発揮している」という仮説を検証するため、密集花序をつくる代表的な植物分類群であるセリ科の1種ハナウドを用いて、花序の花密度を操作する野外実験を試みた。

【材料と方法】

野外実験は、茨城県つくば市神郡「すそみの森」に自生するハナウドの集団で行った。ハナウドは、茎頂および分岐した先端に、1株あたり3つ程度の大型の散形花序をつける。1つの散形花序は20~30個の小散形花を含み、さらに個々の小散形花は、20~40個の小花（胚珠を2個ずつ含む）からなる。5~6月に、集団内の30株について、茎頂の散形花序につぼみの時期から網袋をかけておき、開花後に袋を取り、小散形花に以下の3種類の処理を施した：コントロール（以下、C）、隣り合う小花をまとめて15~20個（小散形花全体の2/3）を摘花したもの（以下、P）、1~2個おきに合計15~20個（全体の2/3）を摘花したもの（以下、T）。TはCやPと異なり小花の密度が低いため、訪れた昆虫が小花間を歩いて移動することが困難になると予想される。そこで、この変化が(A)各小散形花への訪問中に昆虫の身体が接触する小花数を減らす、(B)小花あたりの結実種子数を減らす、という2つの仮説を、以下の方法で検証した。

- (A) 採餌中に昆虫の身体が接触した小花数：9日間にわたり、1日2~3時間ずつ、花序をビデオカメラで撮影した。動画を解析し、訪れた昆虫が各小散形花内で採餌（吸蜜・花粉食）した小花数と、身体が接触した小花数とを調べた。
- (B) 結実率：開花終了から約2週間後に各小散形花を回収し、含まれるすべての小花について結実種子を計数し、処理ごとに結実率を比較した。

【結果】

(A) 採餌中に昆虫の身体が接触した小花数

1個の小花まで移動して採餌するまでの間に昆虫の身体が触れた小花の総数は、花密度を低下させたTで、CやPよりも有意に少なかった（図1a）。ただし昆虫タイプ別にみると、甲虫目とハエ目（小サイズ）では、処理間で有意差は認められなかった。また、ハエ目（大サイズ）では、PとTのいずれにおいても、Cにくらべて接触小花数が有意に少なかった（図1b）。

(B) 結実率

処理間で有意差はみられなかった（C：38%、T：40%、P：40%；GLMMに基づくモデル調整済み平均、 $p=0.36$ ；尤度比検定）

【考察】

採餌中に昆虫の身体が触れる小花数は、花密度を低下させるTの処理により減少した。これは仮説(A)で考えた通り、花が密集すると訪花昆虫が小花間を歩いて移動し、採餌しない小花にも頻りに身体が触れるためと考えられる。ただしこの効果は、甲虫目とハエ目（小サイズ）では見られなかった。これは、甲虫目は花密度が低下しても花間を飛行することが少なく、大きな身体を活かし、歩いて移動する傾向があったこと、反対にハエ目（小サイズ）は身体が小さいため、花密度が高いときにも飛んで移動する傾向が強かったことが原因と考えられる。また、ハエ目（大サイズ）では、小花密度を低下させたTだけでなく、密度を変えずに小花数を1/3に減らしたPでも、接触小花数が減少した。これは、身体が大きいハエ類は花が少ない小散形花を好まず、花密度によらず、早めに去ってしまう傾向があったためと考えられる。

一方、こうした行動の変化は、仮説(B)で考えたような結実率の差にはつながらなかった。これは、ハナウドの小花あたりの胚珠数が2個であることに加え、現地では訪花昆虫が豊富であり、どの処理における小花も、最終的には十分な量の花粉を受け取ることができたためと考えられる。

以上のように、密集花序は訪花昆虫の歩行を促し、花への接触頻度（送受粉の機会）を増やすことが示された。ただし、訪花昆虫が多いときは、この効果は種子結実を増やさなかった。また、歩行を促すのに最適な花密度や花序サイズは、昆虫の種類によって異なる可能性も示された。今後は、花密度の増加が、花粉の持ち去り量におよぼす影響についても調べてゆく予定である。

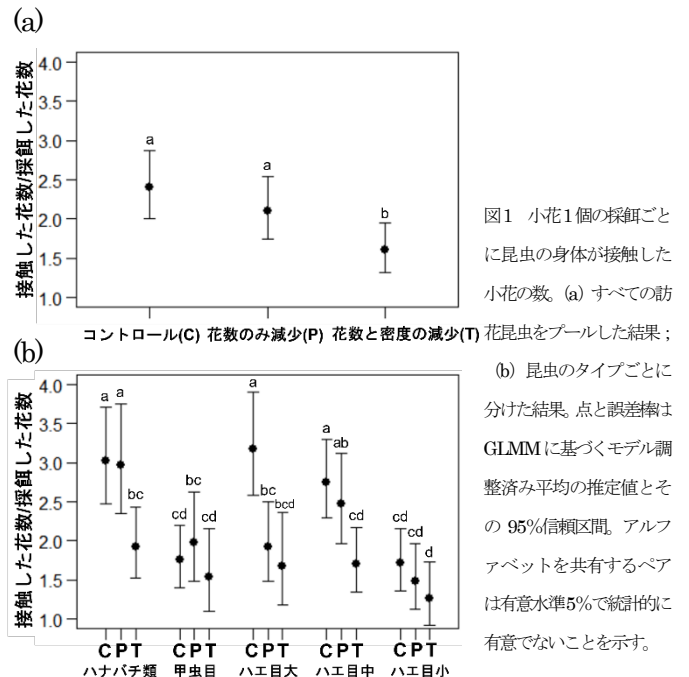


図1 小花1個の採餌ごとに昆虫の身体が接触した小花の数。(a) すべての訪花昆虫をプールした結果；(b) 昆虫のタイプごとに分けた結果。点と誤差棒はGLMMに基づくモデル調整済み平均の推定値とその95%信頼区間。アルファベットを共有するペアは有意水準5%で統計的に有意でないことを示す。

窮鼠、猫を噛む～社会性ハダニにおける反撃能力と雄間闘争との関係～

谷田部 龍 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 佐藤 幸恵 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

一般に、被食者が捕食者と対峙することになった場合は、逃げるかその他の回避行動を行う。しかし、「窮鼠猫を噛む」ということわざがあるように、被食者が捕食者に反撃行動をとることが稀にある。

そのような反撃行動を行う被食者として、ススキスゴモリハダニ種群 (*Stigmaeopsis miscanthi* species group) が知られている。本種群は、クモ綱ダニ目ハダニ科に属する体長 1 mm 未満の植物寄生性節足動物である。本種群はススキの葉の裏に巣網を張り集団で共同営巣を行うが、巣内に侵入してきた捕食者 (主にカブリダニ類) を集団で反撃して巣から追い出し、捕食者が未成熟であれば殺すこともあることが報告されている。また、本種群は捕食者だけでなく同種の雄に対しても攻撃的であり、雄同士が殺し合いを行ってハーレムを形成することが知られている。この雄同士の攻撃性には地理的変異が存在し、東日本などの寒い地域には攻撃性の低い種 (トモスゴモリハダニ、以降、トモ) が、琉球諸島などの暖かい地域には攻撃性の高い種 (ススキスゴモリハダニ HG 型、以降、HG) が分布している。雄同士の攻撃性が低いトモでは反撃能力も低く、雄同士の攻撃性が高い HG では反撃能力も高いため、この雄同士の攻撃性は反撃能力と対応関係にあると考えられている。そして、近年になって中間の雄同士の攻撃性を示す集団 (ススキスゴモリハダニ ML 型、以降、ML) が南琉球諸島や台湾で発見された。ML の反撃能力は調べられていないが、もし雄同士の攻撃性と反撃能力に対応関係があるのであれば、ML の反撃能力はトモと HG の中間型である考えられる。

そこで、本研究では ML の反撃能力を調査し、本種群における反撃能力と雄同士の攻撃性との関係を明らかにすることを目標とした。

【材料・方法】

ML として、2022 年 7 月に沖縄県石垣島の伊原間と名蔵ダムにて採集し、室内にて継代飼育した 2 個体群を使用した。(以降、伊原間と名蔵)。比較対象のトモとして、2022 年 6 月に静岡県天城山 (標高 500 m) にて採集し、室内にて継代飼育した 1 個体群を使用した (以降、天城)。比較対象の HG としては、2022 年 7 月に沖縄県本島の金城ダムと 2022 年 6 月に静岡県天城山付近 (標高 0 m) にて採集し、室内にて継代飼育した 2 個体群を使用した (以降、金城と静岡)。捕食者であるタケカブリダニは 2021 年 11 月に筑波大学山岳科学センター筑波実験林で採集し、継代飼育したものを使用した。被食者は寄主植物であるススキの葉を用いてリーフディスク法により飼育した。捕食者はクマザサの葉を用いてリーフディスク法により飼育したケナガスゴモリハダニを餌として飼育した。飼育と下記実験は 25°C、50~70%r.h.、15L9D の条件下で行った。

実験は以下の手順で行った。①ススキの葉を 2×1 cm に切り取り、水に浸した綿で囲むことで実験アリーナを作成し、そこに被食者を雄 1 匹雌 4 匹の組み合わせで導入、②4~5 日間かけて雌成虫に巣を作らせ、その中に約 10 個の卵を産ませる、③巣内の被食

者を雄 1 匹、雌 1 匹、雄 1 匹雌 4 匹、成虫無し (対照区) に整理する、④1 日後に、捕食者であるタケカブリダニ幼虫 (孵化後 24 h 以内) を各実験アリーナに 1 匹ずつ導入、⑤1 日後と 4 日後に被食者と捕食者の状況を観察し記録する。

①~④の操作を各個体群各処理区につき 25 回行った。

被食者による反撃行動の評価は、先行研究にならって次の基準を用いた。1.) 追い払い: 捕食者が巣外にいた、2.) 殺害: 捕食者が死亡していた。いずれかの行動がみられた場合には反撃成功とした。実験中に、捕食者が実験アリーナ外の綿に絡まってしまうことがしばしば観察された。この際に、捕食者が卵を全く捕食していなかった場合は、巣内に侵入出来なかったとみなして解析から除外し、卵捕食の痕跡があった場合には追い払いと判断した。

解析には R (version 4.2.2) を使用した。一般化線形混合モデルを用いて、1 日目の反撃成功率や 4 日目の殺害成功率を、個体群の違いを混合効果に組み入れて、処理区間と種間で比較した。

【結果・考察】

1 日目の反撃成功率は、処理区間で有意に異なり ($P < 0.001$)、雄 1 匹雌 4 匹の処理区で高い傾向がみられた。一方、種間では ML (伊原間と名蔵) で高い傾向がみられたが、その差は有意ではなかった ($P = 0.540$)。

4 日目の殺害成功率は、処理区間で有意な違いはみられなかったが ($P = 0.395$)、種間では有意に異なり ($P < 0.05$)、トモに比べて ML の殺害成功率は有意に高かった ($P < 0.05$)。

以上の結果から、4 日目の殺害成功率に着目すると、予想と反して雄同士の攻撃性は反撃能力とは直結しないことが分かった。しかし、反撃能力、特に殺害能力には種間で違いがみられた。その理由としては、捕食圧や捕食者相の違いが考えられる。一般的に、低緯度であるほど捕食圧は強いとされている。本研究では最も南方に位置する ML の殺害成功率が高かったことから、捕食圧の違いが反撃能力に影響を与えている可能性が考えられる。一方で、反撃成功率には種間で有意な違いがみられなかった。この点に関しては、今回の実験では反復数が十分ではなかったことから、今後は反復数を増やすとともに、種間での捕食者相の違いや各捕食者との遭遇頻度についても野外調査等により検討していきたい。

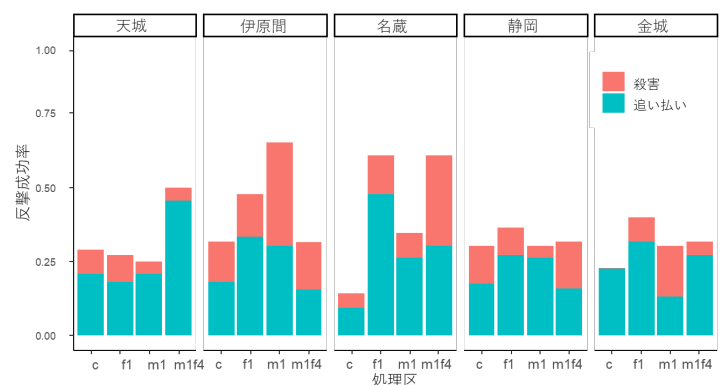


図. 各個体群における 4 日目の反撃成功率

c: 成虫無し, f1: 雌 1 匹, m1: 雄 1 匹, m1f4: 雄 1 匹雌 4 匹

窮鼠に噛まれた猫の戦術 ～ 捕食者タケカブリダニの卵はコロコロされて孵化遅延するのか？ ～

古川 顕充 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 佐藤 幸恵 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

被食者と捕食者の間には、捕食者が効率的な採餌を可能とする行動や形質を進化させる一方で、被食者は捕食回避行動や防衛行動を進化させ、相互にこれを繰り返すといった、進化的軍拡競争がみられる。ダニたちの間でも、被食者と捕食者には進化的軍拡競争がみられる。その例として、ササ葉上に生息するケナガスゴモリハダニ *Stigmaeopsis longus* (被食者、以降、ケナガスゴモリ) とタケカブリダニ *Typhlodromus bambusae* (捕食者、以降、タケカブリ) が挙げられる。ケナガスゴモリは造巢性の社会性ハダニであり、糸を張ってトンネル状の巣を葉上に形成し、集団で生活している。その巣網は捕食者の巢内侵入阻止に役立っているが、それに対してタケカブリは巢内に侵入しやすい形質を獲得している。一方、ケナガスゴモリは巢内に侵入してきたタケカブリに対して、集団での防衛行動を発達させており、タケカブリを追い出すのみならず、タケカブリ幼若個体であれば体液を吸汁して殺すことも行っている。これらはケナガスゴモリとタケカブリの間で進化してきた戦術の一部であり、他にも様々な戦術があると思われる。特に、近年の研究では、ケナガカブリダニ *Neoseiulus womersleyi* という捕食性カブリダニの1種で卵に物理刺激をあたえると孵化遅延する現象が見つかっている。カブリダニでは共食いがみられるが、幼若個体は恰好の餌食となって殺されてしまう。卵も捕食対象となるが、卵の状態では殻が固いため捕食を免れることができる。そのため、他個体がいる時に孵化するのは、捕食リスクを高めることにつながる。故に、捕食者をやり過ごす術として捕食試行時の物理刺激による孵化遅延が起こされていると考えられている。タケカブリの幼若個体もケナガスゴモリに殺されやすい立場にあり、さらに、ケナガスゴモリがタケカブリの卵を転がすことで巣から排除する行動も観察されている。そのため、被食者への対策として、タケカブリでも物理刺激による孵化遅延があるのではないかと考えた。そこで本研究では、タケカブリの卵に物理刺激を与えることでの孵化時間への影響を調査した。

【材料と方法】

材料 タケカブリは2020年5月19日に、ケナガスゴモリは2020年5月29日に筑波大学実験林より採集し、継代飼育したものを使用した。ケナガスゴモリは、エサとなるクマザサ *Sasa veitchii* (同実験林より適宜採集) を長方形に切りとり、湿ったコットンの上に広げて、その葉上 (リーフディスク) で飼育した。タケカブリは、上記方法で飼育したケナガスゴモリを餌として飼育した。飼育および実験環境は、25°C、60~100%R.H.、長日条件: 15L: 9D である。

方法 実験方法は、①卵回収、②孵化待機、③刺激操作と孵化観察の3工程からなる。

①卵回収 30以上のケナガスゴモリの巣が張られた状態のリーフディスク1枚にタケカブリのメス20匹を導入したものを6枚準備した (計120匹のタケカブリのメスを使用)。その環境に10

時間順応させ、葉上に産卵されたタケカブリの卵を全て取り除いた上で、3時間産卵させた。その間に産卵された卵を回収した。

②孵化待機 ①で回収した卵は、3cm四方に切り取ったササの葉上に移し、58時間放置した。

③物理刺激と孵化観察 30%孵化後、実験区の卵群では微細な筆を用いて5分おきに90°転がす作業を1時間施した。対照区では卵を転がす操作は行わず、そのまま放置した。実験区、対照区ともに15分おきに孵化数を記録し、孵化した個体はその都度取り除いた。

これら①~③を9月19日から10月6日にかけて8回 (トライアル) 実施した。各トライアルでは実験区または対照区のどちらかの処理を行った。

解析 解析には統計ソフトR (version 4.2.1) を使用した。コックス比例ハザード混合モデルを用いて、トライアルを混合効果に、処理が孵化時間に与える効果を検定した。また、コックス比例ハザードモデルを用いて、処理の違いを考慮せずにトライアルの効果を検定した。

【結果と考察】

処理区では、対照区に比べて孵化遅延が起こっているように見えた (図)。しかし、処理区間の孵化時間の差は有意では無かった ($P=0.12$)。タケカブリはケナガスゴモリ巢内で産卵するという特徴から、産卵された卵を回収することが容易ではなく、今回の実験では卵回収を計8回要した。また、1回に取れる卵数が少なかったこともあり、1回の卵回収分を実験区と対照区に分割することができず、各トライアルでは実験区または対照区の実験のどちらかしかできなかった。しかし、処理に関係なくトライアル間で孵化時間が有意に異なることから ($P<0.05$)、トライアルの違いが強く影響して有意差が検出されなかった可能性が考えられる。一方、飼育や複数回に及ぶ実験を通して、産卵数を多くする手法を開発することができた。従って、今後は各トライアルで回収した卵を実験区と対照区に2分割することでトライアルの影響を小さくして、再実験を行うことを考えている。

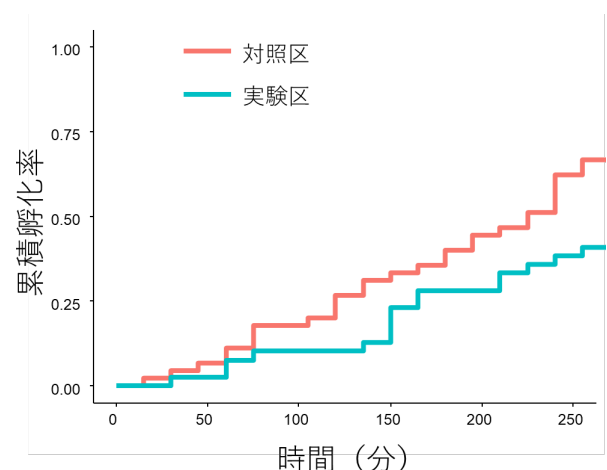


図 時間と累積孵化率

体温の概日リズム生成機構の解明

由本 竜資 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 櫻井 武 (筑波大学 医学医療系)

背景

ほぼすべての生物は概日時計を有しており、生理現象に見られる約24時間周期のリズム(概日リズム)を制御している。

哺乳類において、この体内時計のマスタークロックは視床下部に存在する視交叉上核(suprachiasmatic nucleus; SCN)にあり、様々な生理リズムの形成に関わっている。恒温動物において、深部体温は明確な概日リズムを示し、多くの動物では活動期開始時に体温が上昇し、休息時に低下する(図1)。しかし体温の恒常性制御に関わる神経核や神経回路は解明されつつあるが、体温の概日リズムの形成に必要な神経核及び神経回路は未だ特定されていない。

当研究室で、マウスの脳の前腹側脳室周囲核(anteroventral periventricular nucleus; AVPe)に存在するPyroglutamylated RF amide peptide; QRFP産生ニューロン(Qニューロン)を興奮させると冬眠に似た低代謝・低体温状態を誘導できることが明らかとなった(Takahashi et al., *Nature*, 2020)。さらに、破傷風毒素軽鎖により、Qニューロンのシナプスにおける神経伝達を阻害したマウスでは体温リズムが減弱することが確認された。そのため、Qニューロンが体温リズム制御に関わっている可能性が示唆されたが、実際にQニューロンの活動が経時的に変化しているのかは分かっていない。

そこで本研究は、体温リズム形成に関わる神経核の同定、及びその神経回路による体温リズムの制御メカニズムの解明を目指して、Qニューロンに時刻依存的な神経活動の変化があるかを調べた。

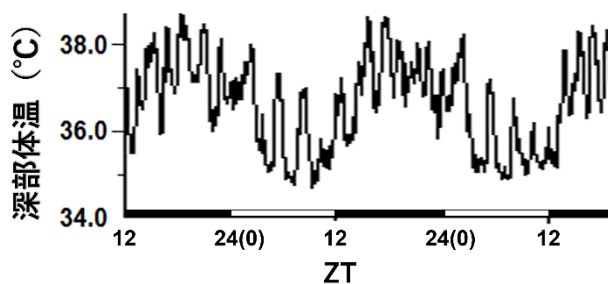


図1 マウスの深部体温の変化の様子

研究手法

Qニューロンの中で神経活動が高い神経細胞の割合が1日のなかでどのように変化しているかを調べた。

まずQニューロンを標識するために、*Qrfp-iCre/Rosa26-DIO-EGFP*マウスを作成した。このマウスではQRFP産生ニューロン特異的にiCreリコンビナーゼが発現しており、iCre依存的に緑色蛍光タンパク質(EGFP)が発現する。神経活動のマーカーとしてc-FOSを用い、c-FOSの発現を免疫組織化学により解析した。

マウスを4時間おき(*ZT0,ZT4,ZT8,ZT12,ZT16,ZT20の時刻

6点)に灌流固定し、脳組織を回収した。脳切片を作成して免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡によって観察した。AVPeの領域で確認されたEGFPを発現している細胞数(Qニューロン)と、そのうちc-FOSも同時に発現している細胞数(活動しているQニューロン)を数えることで、各時刻で活動しているニューロンの割合を算出した(図2,n=3 ZT4のみn=2, 平均±SEM)。

*ZT: Zeitgeber Time 明周期の開始時刻をZT0、暗周期の開始時刻をZT12とする12/12時間の明暗周期における体内時計の時刻

結果・考察

Qニューロンの神経活動は明瞭なリズムを示すことが確認された($p=0.023 < 0.05$) (図2)。Qニューロンの神経活動、すなわちc-FOS陽性細胞の割合はZT20において約20%となり最大値を示し、その後徐々に低下してZT16において約10%と最小値を示し、概日リズムを示すことが明らかになった。

Qニューロンを興奮性に操作すると体温低下が生じることが知られており、またマウスの体温は活動期のZT12~ZT24で高く、休息期であるZT0~ZT12で低くなる。本実験では、Qニューロンの活動がZT20において高い値を示しているため、体温の最大値を示したZT16~ZT20からの体温減少に、Qニューロンの活動が関わっている可能性もある。また、Qニューロンの活動が徐々に低下していく様子が観察されたが、体温が上昇する時点でも活動が下がり続けていることから、体温の上昇に拮抗して活動が低下しているかもしれない。

QニューロンはSCNからの神経投射を受けていないことが明らかになっており、活動の概日リズムは背内側核や室傍核を介するなど、間接的な入力によるものである可能性が高い。今後Qニューロンがどのような神経回路によって制御されているのか、また、実際にQニューロンが体温の概日リズムを生成する上でどのような役割を担っているのか調べる必要がある。

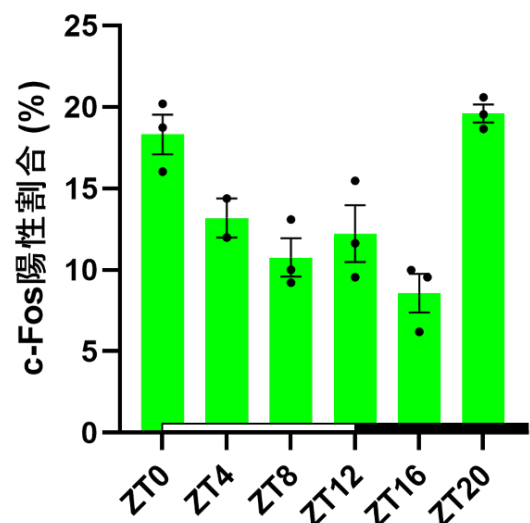


図2 活動しているQニューロンの割合

生後マウス側坐核におけるヘパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1* 遺伝子の発現

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

【背景と目的】

ヘパラン硫酸は細胞表面や細胞外マトリックスに存在する糖鎖で、糖鎖内部の硫酸基を介してさまざまな細胞外シグナル分子と相互作用し、その機能を調節している。ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1/2* はヘパラン硫酸の特定の硫酸基を細胞外で脱硫酸化することで、シグナル分子との相互作用を変化させ、細胞外シグナル伝達を調節する。これまでの研究から、*Sulf1/2* が正常な神経回路形成に必要であることが明らかとなっているが (参考文献 1、2)、成獣マウス脳における役割はほとんど分かっていない。

側坐核は解剖学的に大脳基底核に属し、ほとんどがドーパミン D1 受容体、または D2 受容体を発現する中型有棘ニューロンで構成され、報酬、快感、動機付けなどに関与する。また、側坐核は構造的にも機能的にも異なる Core と Shell と呼ばれる 2 つの領域に分けられる。近年、成獣マウスの側坐核 Shell で *Sulf1* が D1、または D2 受容体と共発現していることが明らかとなったが (参考文献 3)、どの時期から *Sulf1* が側坐核で発現するのかは調べられていない。そこで本研究では、マウス側坐核で *Sulf1* 遺伝子がいつから発現し始めるのか、初めから側坐核 Shell でのみ発現するのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 使用したマウス

本研究では、*Sulf1* 発現細胞を同定するために *Sulf1* 遺伝子内に β -galactosidase (β -gal) をコードする *lacZ* 遺伝子が挿入されたヘテロマウスを使用した。 β -gal は核移行シグナルが付加されているため、*Sulf1* 発現細胞の核に局在する。本研究では生後 1、3、5、7、13、31 日齢のヘテロマウスを使用した。

2. 灌流固定・切片の作製

生後 1、3、5 日齢マウスは氷上麻酔、生後 7、13、31 日齢マウスはイソフルランを用いた吸入麻酔を実施後、速やかに 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流固定した。30 分ほど静置したのち脳を取り出し 4% PFA/PBS でさらに一晩浸漬固定した。その後、PBS で 3 度洗浄したのち 30% スクロース/PBS に一晩以上浸漬し O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン) に包埋した。

クリオスタット (CM1850, CM1860; Leica Biosystems) を用いて 20 μ m あるいは 50 μ m 厚の冠状凍結切片を作成した。マウスの遺伝子型は灌流固定時に尻尾を採取し、抽出したゲノムを用いた PCR で判定した。

3. 免疫組織化学

切片を 25-80% メタノールで脱水、水和処理した後、抗 β -galactosidase 抗体 (1000 倍希釈, 4600-1409, Biogenesis) を一晩室温で反応させた。反応後、PBST (0.1% Tween 20 in PBS) で洗浄し、Alexa Fluor Plus 594 標識抗ヤギ IgG 抗体 (500 倍希釈, A32758, Invitrogen) を 2 時間室温で反応させた後、PBST で

洗浄し、DAPI (0.1 μ g/ml, 043-18804, Wako) を室温で 10 分反応させ PBS で洗浄した。

50 μ m 切片は浮遊切片として染色し、MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に貼り付け、CC/Mount (K002, Diagnostic BioSystems) で封入した。20 μ m 切片はスライドガラスに貼り付けて染色し、封入した。蛍光顕微鏡 Axioplan2 (Carl Zeiss)、BZ-8000 (キーエンス) を用いて観察と撮影を行った。

【結果】

生後 1 日齢の側坐核では β -gal のシグナルがほとんど見られなかったが、生後 3 日齢の段階で Shell にシグナルが見られ始め、生後 7 日齢にかけて発現細胞が増加することを観察した (図 1)。Core にはほとんど発現細胞は認められなかった。また、生後 7、13、31 日齢の β -gal 発現細胞の分布に変化はなかった。

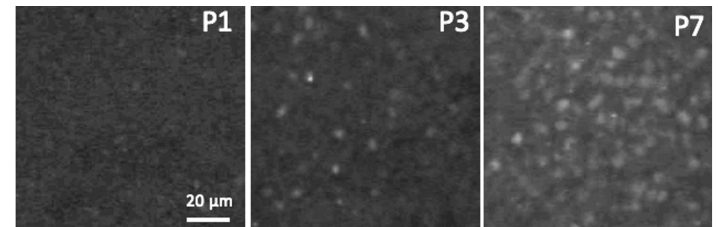


図 1 生後マウス側坐核 Shell の β -gal 染色
側坐核の内側 Shell 領域での β -gal 染色結果を示した。
P1、P3、P7 は、生後 1 日、3 日、7 日を示す。

【考察】

Sulf1 が側坐核で発現し始める生後 3~7 日頃はニューロンが生後発達に伴いシナプス形成などを通してより複雑な成獣の神経回路網へと成熟していく時期と考えられる。*Sulf1* はその後成獣でも側坐核で継続的に発現することから、胎児期の神経回路の形成ではなく、成獣における側坐核の機能自体に関連している可能性が考えられる。

【参考文献】

- Okada, T. *et al.* (2017). Desulfation of Heparan Sulfate by *Sulf1* and *Sulf2* Is Required for Corticospinal Tract Formation. *Sci Rep* 7:13847.
- Aizawa S *et al.* (2020). Abnormal Pyramidal Decussation and Bilateral Projection of the Corticospinal Tract Axons in Mice Lacking the Heparan Sulfate Endosulfatases, *Sulf1* and *Sulf2*. *Front. Mol. Neurosci.* 12:333.
- Miya, K. *et al.* (2021). Expression of Heparan Sulfate Endosulfatases in the Adult Mouse Brain: Co-expression of *Sulf1* and Dopamine D1/D2 Receptors. *Front. Neuroanat.* 15:726718.

黄色ブドウ球菌の核様体凝集

小林 葉奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 森川 一也 (筑波大学 医学医療系)

背景

ブドウ球菌属 *Staphylococcus* はグラム陽性の球菌で、枯草菌やリステリア菌と同様に Bacillales 目に属する(1)。細胞分裂面が直前の分裂面に対して垂直であるのでブドウ状の塊として観察される。ブドウ球菌属細菌の中で黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、表皮ブドウ球菌 *S. epidermidis*、腐性ブドウ球菌 *S. saprophyticus* などが臨床に特に問題となる。中でも最も臨床的に重要な黄色ブドウ球菌は様々な病原因子を獲得しており多様な感染症の原因となる。約3割の健康なヒトの鼻腔・皮膚や、動物にも常在する日和見感染菌である。黄色ブドウ球菌の「黄色」は Staphyloxanthin などのカロテノイド色素を産生することによる。因みにカロテノイドは本菌がファゴソーム中で曝される酸化ストレスに抵抗するための病原因子の一つである。本菌は10%の食塩存在下でも増殖可能であり、鑑別には7.5%食塩が入ったマンニト食塩培地を用いるのが基本である。また乾燥にも強く乾燥表面で長期間、再増殖能を保持したまま存在することが出来る(2)。乾燥耐性は腸球菌やブドウ球菌が院内環境で手すりや汚物入れなどを介して感染を広げるのに重要な特徴である。

細菌はゲノム DNA を核様体として格納している。そこにはゲノム機能に関わる数百種類の核様体タンパク質が存在する。主要な核様体タンパク質の存在量は環境・増殖期に依存して変化することが知られ、特に Dps ファミリータンパク質(大腸菌 Dps、黄色ブドウ球菌 MrgA) は環境にตอบสนองして増加することで、核様体構造を大きく変化させる。大腸菌 Dps は定常期にかけて増加し、核様体を凝集させることでゲノムを物理的に保護する。一方で、黄色ブドウ球菌 MrgA は酸化ストレス環境で誘導され、核様体を凝集させる(3) (図1)。黄色ブドウ球菌の核様体凝集は大腸菌の場合とは異なり、凝集状態でも遺伝子発現や複製は行われており、ゲノム DNA の物理的な保護にも必要ではない(4)。その役割については現在所属研究室で、遺伝子発現への影響に着目した研究が進められている。

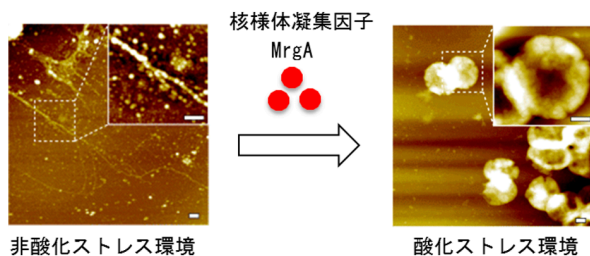


図1 黄色ブドウ球菌の核様体凝集 MrgA タンパク質は核様体タンパク質の中で量的には多いものではないが、酸化ストレスにตอบสนองして発現すると、核様体を凝集させる。図は原子間力顕微鏡像。

黄色ブドウ球菌の対数増殖期、定常期、酸化ストレス下の核様体タンパク質が網羅的に同定されている(5)。同定は、核様体画分に特異的、または量的に他の画分よりも多く存在するものを選択することで行われたもので、核様体に存在することが確からしいもののリストが報告されている (csNAPs: Contaminant subtracted nucleoid associated proteins と呼ばれる)。本菌の核

様体には、凝集、非凝集にかかわらず、リボソームタンパク質などの遺伝子発現機能や、酸化還元酵素などが多く見られるという特徴がある。しかし、機能未知のタンパク質も多く見られる。特に量的に多い機能未知タンパク質の役割を明らかにすることは、核様体凝集のメカニズムやそれによる遺伝子発現への影響などを理解するための一助となることが期待される。そこで本研究では、同定されている核様体タンパク質群のうち、1) 対数増殖期、定常期、酸化ストレス下のいずれの条件でも多く存在するタンパク質 (Smpn1: Staphylococcal major nucleoid protein 1 と名付ける予定) の役割について情報を得ること、2) 核様体タンパク質群が近年真核生物で多く報告されている液-液相分離に関与する可能性があるかを *in silico* で予測すること、の2つを目的とした。

方法

1) Smpn1 の酸化ストレス耐性への関与

牛島らの方法に従った(4)。培養した細胞菌を過酸化水素に暴露し、CFU(colony forming unit)を測定して耐性を調べた。

2) 核様体タンパク質群に天然変性領域を有するものがあるかの予測

本菌の csNAP リストのそれぞれについて、PSPredictor(<http://www.pkumdl.cn:8000/PSPredictor/>) を用いて予測した。

結果

- 1) 菌を過酸化水素水に暴露したときの生存率は、野生株に対して Smpn1 欠損株で高かった。一方、Smpn1 強制発現株では生存率が下がった。ただし、まだ実験回数が少ないので、実験を繰り返し有意差検定をすることで結果を確認する予定である。
- 2) 高スコアを示した csNAP は 対数増殖期で 2/92 (2.17%)、定常期で 9/141 (6.38%)、酸化ストレス下で 11/113 (9.73%) であった。量的に多い核様体タンパク質のほとんどは天然変性領域を持たないものであることが示唆された。

考察

現時点のデータからは Smpn1 の有無が酸化ストレス耐性に単純に相関するわけではないことが示唆されている。Smpn1 の適度な量が重要となっている可能性がある。Smpn1 は酸性タンパク質 (PI=4.33) でコシャペロンとの類似性が低いながらもあることも興味深い。

天然変性領域を持つと予測されたタンパク質群については、更に研究が必要であるが、まずは核様体精製時のコンタミネーションであるかどうかを確認する必要があると考える。

参考文献

1. M. Kuroda, et al.: *Lancet*. **357**(9264), 1225 (2001).
2. L. Maudsdotter, et al.: *Microbes Infect.* **17**(6), 456 (2015).
3. K. Morikawa, et al.: *Genes Cells*. **11**(4), 409 (2006).
4. Y. Ushijima, et al.: *Microbiology*, (2016).
5. Y. Ushijima, et al.: *BMC Microbiol.* **17**(1), 207 (2017).

インフルエンザウイルス感染による二次性細菌性肺炎の発症機序解明に向けた

一細胞生体イメージング技術の開発

中村 勇紀 (筑波大学 生物学類)

指導教員：川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

日本では、季節性インフルエンザは冬季に流行し、毎年1千万人を超える感染者がみられる。季節性インフルエンザによる重症例では重篤な肺炎を引き起こし、その原因として、ウイルス性肺炎だけでなく、呼吸器の常在細菌による二次性細菌性肺炎が大きな割合を占め、公衆衛生上の大きな問題となっている。インフルエンザに続発する細菌性肺炎の原因菌として最も多いのが *Streptococcus pneumoniae* (以下、肺炎球菌) である。肺炎球菌はヒトの上気道に常在化しており、健康者では病原性を示さない。一方、インフルエンザウイルス感染によって肺炎球菌が下気道に移行することで細菌性肺炎が引き起こされるが、その詳細な発症機構は未だ明らかでない。

二次性細菌性肺炎の発症機構の解明には、肺炎球菌の生体内での動態を高感度に追跡できる実験系の構築が有用である。本研究では、レポーター遺伝子を発現する組換え肺炎球菌を用いて、生体内で非侵襲的にその動態を一細胞レベルで観察できるイメージング技術を開発し、インフルエンザウイルス感染による二次性細菌性肺炎の発症機構を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

1. レポーター遺伝子を搭載した組換え肺炎球菌の作製

レポーター遺伝子には変異型 luciferase 遺伝子である *AkaLuc* を用いた (Iwano, S *et al.*; Science 359, 935-939, 2018)。*AkaLuc* は生体組織への透過性が高い近赤外光を発するため、体内深部からでも高感度にシグナルを検出可能である。肺炎球菌のヒストン様タンパク質をコードする *HlpA* 遺伝子の下流に、肺炎球菌にコード最適化した *AkaLuc*、及びスペクチノマイシン耐性遺伝子である *aad9* を挿入し、*HlpA* プロモーター上流領域と *HlpA* 転写終結点の下流領域をそれぞれ相同組換えのアームとするゲノム組換え用の DNA 断片をオーバーラップ PCR 法により作製した (図 1)。

この DNA を肺炎球菌 EF3030 株に導入し、100 ng/μL スペクチノマイシン含有血液寒天培地上に塗布して一晩嫌気培養した。コロニーを THY 液体培地に植菌して嫌気培養し、基質である *AkaLumine* を添加して *AkaLuc* 活性を測定し、目的の組換え肺炎球菌を単離した。

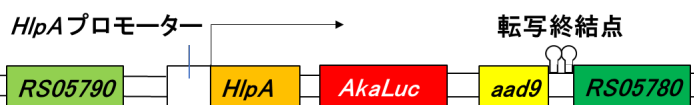


図 1. *AkaLuc* 組換え DNA のコンストラクト

2. マウスへの感染と生体イメージング

組換え肺炎球菌を THY 液体培地で嫌気培養し、菌液 15 μL (1×10⁶ cfu 相当) をマウス (C57BL/6J) に経鼻感染した。感染

直後と 24 時間後に *AkaLumine* を投与し、生体マウスにおける *AkaLuc* の発光シグナルを *in vivo* イメージングシステム NEWTON により測定した。

【結果】

作製した組換え用 DNA 断片を肺炎球菌にトランスフォーメーションし、スペクチノマイシン含有血液寒天培地でセレクションしたところ、数百個のコロニーが得られた。そのうち、いくつかのコロニーを単離して *AkaLuc* 活性を測定したところ、半数程度のクローンでルシフェラーゼ活性が検出された。

その中で最も高いルシフェラーゼ活性を持つクローンをマウスに感染後、*AkaLumine* を静脈内投与して発光量を測定したところ、感染直後のマウスでは鼻腔、口腔、及び喉頭にシグナルが検出された。肺炎球菌が常在化する感染 24 時間後では、口腔内にはシグナルは検出されず、鼻腔・喉頭に加えて、耳の周辺 (副鼻腔) でシグナルが検出された (図 2)。また、生体マウスでは観察出来なかったが、解剖後の臓器で測定したところ、喉頭でもシグナルが検出された。

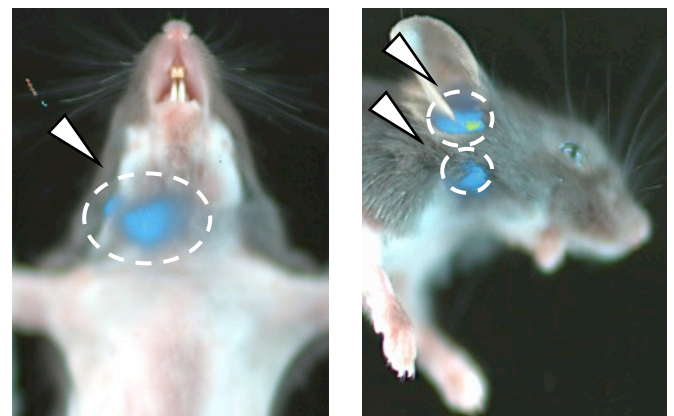


図 2. 感染 24 時間後のマウス体内における肺炎球菌の分布

【考察・展望】

感染 24 時間後において、組換え肺炎球菌由来の発光が鼻腔と喉頭に検出されたことから、組換え肺炎球菌でも野生型と同様に常在菌として上気道に定着していると考えられる。また、喉頭でもシグナルが検出されたことから、肺炎球菌は鼻腔だけでなく、喉頭にも定着している可能性が示唆された。今後、さらに検出感度を上げるため、より高い *AkaLuc* 活性をもつ組換え肺炎球菌株をスクリーニングする予定である。また、アルビノ系統のマウスを用いることでも、肺炎球菌の体深部での高感度イメージングを可能にし、インフルエンザウイルスとの重複感染による肺炎球菌の感染臓器特異性や常在細菌叢の変容機構を明らかにする予定である。

SAGAS: Simulated annealing and greedy algorithm scheduler for laboratory automation

新井 悠也 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 尾崎 遼 (筑波大学 医学医療系)

【Introduction】

生命科学実験は、実験者・実験スケジュール・使用する材料 (試薬や生物) など、様々な要素によって構成される。現在、人間が手動で行う生命科学実験には幾つかの問題が存在する。まず、実験には実験者の多くのリソースが割かれる。また、実験によって得られた知見は、論文にまとめて公開されるが、その再現性は高いとは言いがたい。実際、製薬会社への調査では、著者への問い合わせを行っても 50% の論文の再現性が取れないという結果が出ている [1]。こういった問題に対して、実験自動化という研究分野がある。

実験自動化とは、実験者の手技を実験機器で代替し、実験そのものへの人間の介入を減らす研究分野である。実験自動化は、複雑な実験手順や大量の実験実行が求められる中で、実験結果の品質の保証、実験コストの削減、実験効率の向上に重要である。

自動化された実験室において多くの実験を効率よく処理するためには、従来の人間用の実験スケジュールではなく、各実験自動化機器に実験手順を適切に割り当てたスケジュールが必要となる。そのスケジュールでは、サンプルの変化や変性や分解を防ぐために実験手順同士の前後関係 (dependency) や、時間制約 (TCMB) を考慮する必要がある。

このスケジューリング問題 (S-LAB 問題) に対し、Itoh らは、分枝限定法というアルゴリズムを用いて時間制約を満たすスケジューラ Slab.jl を開発した [2]。Slab.jl では制約を満たしつつ最も実験時間 (execution time) が最も短いスケジュール (厳密解) を出力できるが、複雑な実験に対してはスケジュール時間が非常に長くなるという問題点があった。そこで本研究では、焼きなまし法と貪欲法を組み合わせたスケジューリング手法、SAGAS を提案する。SAGAS は、Slab.jl では現実的な時間でスケジュール不可能な問題にも、制約を満たしたスケジュールを出力することが示された。さらに、グリッドサーチを用いたシミュレーションに基づく実験室構成の設計 (実験室設計) に SAGAS を利用できることを示す。

【Method】

1. 問題設定

スケジュールとは、複数の実験から構成される実験群を、実験機器群に割り当てることである。それぞれの実験は 1 つ以上の実験手順から構成される。それぞれの機器は固有のタイプを持ち、それぞれの実験手順は処理できる機器のタイプがただ一つ決まっている。さらに、各実験手順は 2 つの制約、Dependency (ある実験手順は、ある実験手順の終了後に開始しなければならない。) と TCMB (ある実験手順の開始時刻とある実験手順の開始時刻の差の絶対値は、 α 以内でなければならない。 (α は TCMB ごとの定数)) を持つ。

2. 提案手法

今回提案する SAGAS は、メタヒューリスティックアルゴリズムである焼き鈍し法 (SA) と、貪欲法というアルゴリズムを用いてスケジュールを探索する。SAGAS は SA の後に貪欲法により修正 (Mod) を行うパートと、単純な貪欲法 (Greedy) のみのパ

ートに分かれる。SAGAS はこれらのうち、より良いスケジュールを出力する (図 1)。以下では、SA-Mod の性能評価の基準として Greedy を用いる。また、実験室設計では、4 種類の機器を用いる複雑な S-LAB 問題を用いてそれぞれの機器の台数を 1-4 の範囲で変化させたすべての組み合わせでそれぞれスケジュールを 5 回ずつ行い、それぞれの機器構成での最小値を比較した。

【結果】

1. Slab.jl との比較

Slab.jl が 1.6 sec で計算を終了した問題に対して、SAGAS が同程度の計算時間で厳密解を求めることができるかを検証するため、平均 1.5 sec の計算時間でスケジュールを 5 回実施した結果、SAGAS は 5 回とも厳密解を出力した。

2. 複雑な S-LAB 問題への適用

Slab.jl が 1 h 以内でスケジュールを発見できなかった 3 種の S-LAB 問題に対し、3 min の SA でスケジュールを 5 回ずつ実施した。その結果、SAGAS はすべての S-LAB 問題において制約を満たした解を見つけることに成功した。SA-mod 解の execution time は、Greedy と比較して最大で 37% 短縮された (図 2)。

3. 実験室設計

タイプ 3、4 の実験機器の数を増やすと、タイプ 1、2 の実験機器の数を増やすよりも影響が大きいことが示された。詳細は当日の発表にて述べる。

【結論】

SAGAS は、S-LAB 問題の厳密解または制約を満たした解を数分で求められることが示され、S-LAB 問題に幅広く適応できることが示唆された。さらに、SAGAS の計算速度を生かすことで、シミュレーションに基づく実験室構成設計もグリッドサーチで実現できることが示された。これらは生命科学実験の実験室自動化に大きく寄与する結果である。

一方で、SAGAS のアルゴリズムでは、装置の物理的な空間配置を考慮していないこと、問題によっては Mod step にさらに数分の計算時間が必要なこと、静的なスケジュールを求めるため機器の故障を考慮できないことなどが、今後の課題である。

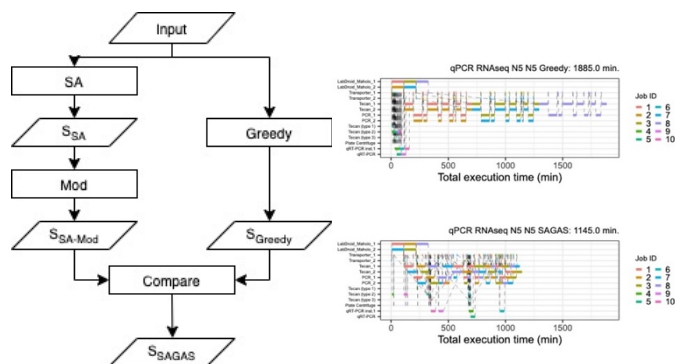


図 1. SAGAS の主要なステップ 図 2. スケジュール結果の例

【References】

[1]. Prinz, F. et al., Nat. Rev. Drug Discov. 10, 712 (2011).
 [2]. Itoh, Takeshi D. et al., SLAS Technology 26 (6), 650-59 (2021).

乳酸菌 H61 株がゼブラフィッシュ体内で発揮する酸化ストレス防御能

佐藤 綾香 (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】

近年、医療の発展などに伴い平均寿命や健康寿命は延伸傾向にあるが、両者の差すなわち日常生活に制限のある「不健康な期間」は大きく縮小されていないのが現状である。平均寿命と健康寿命の差の縮小は、生活の質の向上や持続可能な社会保障制度の達成を可能にするため、これまで以上に健康寿命を延ばすことが重要視されている。乳酸菌はホストの健康に役立つ「プロバイオティクス」の代表であり食品への応用が広く進んでいるが、乳酸菌の中でも特に *Lactococcus cremoris* H61 (以下 H61 株) は、加熱処理状態でマウスの老化抑制作用及びヒトの肌の乾燥予防作用があることが分かっている¹⁾³⁾。しかしそのメカニズムは不明であり、候補として酸化ストレス防御能が挙げられる。酸化ストレスとは「酸化力が抗酸化力を上回った状態」のことを指し、高レベルの酸化ストレスは DNA やタンパク質の損傷を引き起こすため、がんや神経変性疾患、炎症性疾患などの発症につながる可能性がある⁴⁾。従って生体内における酸化ストレス防御能は病気の予防に重要であり、健康寿命延伸にも貢献するシステムであるといえる。

私が所属する研究室では、動物体内での酸化ストレス防御能評価を目的にゼブラフィッシュを活用しており、これまで様々な食品成分について解析が行われてきた⁵⁾。H61 株についても酸化ストレス防御能を発揮することが準備的解析で示唆された。そこで本研究はその検証を行うために、H61 株のゼブラフィッシュ体内における酸化ストレス防御能を詳細に解析することにした。

【方法】

○生存率解析

第一段階: 酸化ストレス剤の最適濃度の決定を行った。受精後 4 日の野生型ゼブラフィッシュ稚魚に様々な濃度 (1.4~2.4 mM) の過酸化水素を処理し、その後の生存率を 12 時間毎に解析した。稚魚は受精後 3.25 日の段階で 3 cm ディッシュに 20 匹ずつ準備した。培養液には E3 medium 5 mL を用いた。過酸化水素処理の際には、ディッシュ内の溶液を 4 mL 除去した後、最終濃度の 1.5 倍の過酸化水素溶液を 4 mL 処理した。

第二段階: H61 株の毒性試験を行った。受精後 3.5 日の野生型稚魚に様々な濃度の H61 株懸濁液を処理し、その後の生存率を解析した。生存率が低下する濃度は毒性があると評価した。H61 株処理の際には、暴露したい菌濃度の 2 倍の濃度の菌懸濁液を調製し、調製した菌液をディッシュ内の E3 medium を 2.5 mL 除去した後 2.5 mL を加えた。

第三段階: H61 株の酸化ストレス防御能を調べた。受精後 3.5 日の野生型稚魚に様々な濃度の H61 株を 12 時間曝露させ、次に第一段階で決定した濃度の過酸化水素を 48 時間曝露させ、その後の生存率を 12 時間毎に解析した。H61 株懸濁液から過酸化水素溶液への交換の際には、まずディッシュ内の懸濁液 4 mL を除去した後、1.5 倍の過酸化水素溶液を 4 mL 処理し、次に最終濃度の過酸化水素溶液で再度、溶液を交換した。

第四段階: 菌の曝露時間を変化させたときの酸化ストレス防御能への影響を調べた。野生型稚魚に H61 株を処理し、その後第一

段階で決定した濃度の過酸化水素を 48 時間曝露させ、生存率の向上を 12 時間毎に解析した。

第五段階: 培養状態が異なる菌で酸化ストレス防御能に違いが生じるかを調べた。受精後 3.5 日の野生型稚魚に異なる培養時間で回収した H61 株を 12 時間曝露させ、次に第一段階で決定した濃度の過酸化水素を 48 時間曝露させ、その後の生存率を 12 時間毎に解析した。

第六段階: *myd88* 破壊システムを用いて H61 株がもつ酸化ストレス防御能と自然免疫応答の関係を調べた。酸化ストレス防御能の解析は、第三段階と同様の方法と濃度で解析した。稚魚は生死に関わらず全て回収し、抽出したゲノム DNA を用いて PCR 反応を行い、遺伝子型を判定した。

○ゼブラフィッシュ

第一から第五段階では野生型 AB 系統成魚を交配させて得られた稚魚を用いた。第六段階で用いた *myd88* 破壊システムは CRISPR-Cas9 法でフレームシフト変異を導入し作製した。ジェノタイプピングは PCR 法で行った。第六段階の実験では *myd88* ヘテロ破壊成魚を交配させて得られた稚魚を用いた。

○乳酸菌

MRS broth で 30°C 24 時間培養した H61 株を 0.85% NaCl で洗浄後、MilliQ 水で懸濁し OD₆₀₀=1.0 に調整した。次に 121 °C 15 分の条件でオートクレーブ滅菌を行い、死菌化した。なお第五段階では、菌の培養時間はそれぞれ 16, 24, 48 時間とした。H61 株は農研機構から提供していただいた。

【結果・考察】

発表会当日に紹介予定である。

【参考文献】

- 1) Kimoto-Nira et al. (2007). Anti-aging effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice. *Br. J. Nutr.* 98: 1178-1186
- 2) Kimoto-Nira (2018). Newlactic acid bacteris for skin health via oral intake of heat-killed or live cells. *Anim. Sci. J.* 89: 835-842
- 3) Kimoto-Nira et al. (2016). Dietary intake of heat-killed *Lactococcus lactis* H61 delays age-related hearing loss in C54BL/6J. *Sci. Rep.* 6: 23556
- 4) Sies (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91: S31-S38
- 5) Ruth et al. (2009). Nitratative and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol. Sci.* 112: 4-16
- 6) Endo et al. (2020) Evaluation of antioxidant activity of spice-derived phytochemicals using zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1109
- 7) Watanabe et al. (2022) Soy-derived equol induces antioxidant activity in zebrafish in an Nrf2-independent manner. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 5243

徐波発生機構における海馬の役割

須貝 麻央 (筑波大学 生物学類)

指導教員：本城 咲季子 (筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構)

【背景・目的】

徐波とはノンレム睡眠時においてみられる 0.5~4.0 Hz の脳波であり、大脳皮質において発生する脳波である。しかし、その発生機構の詳細は明らかになっていない。

海馬は睡眠時の記憶統合において重要な役割を果たしていると考えられており、記憶統合の際には徐波と海馬において発生する Sharp Wave Ripple が同期すると考えられているが、海馬がノンレム睡眠時の大脳皮質脳波生成に関与しているかどうかは明らかになっていなかった。近年、ヒトを対象とした実験において両側の海馬を特異的に損傷した患者群ではコントロール群に比べ NREM 睡眠中の徐波睡眠の減少が見られたという報告があった (Spanò et al., 2020)。しかし、齧歯類において両側海馬の損傷と睡眠の特徴との関係を検証したという報告は見つからなかった。

本研究では、齧歯類においても両側の海馬が損傷した場合に NREM 睡眠中の徐波睡眠の減少がヒトと同様に見られるのかを検証した。本研究は、ヒトでは難しい侵襲の実験を行うことのできる齧歯類において海馬と睡眠特徴の関係を明らかにすることで徐波発生機構の解明へ貢献することを目的としている。

【実験方法】

ウイルス注入

実験には生後 90~120 日の C57BL/6J マウスを使用した。マウスの両側の海馬を標的とし、アデノ随伴ウイルス (AAV) を注入した。コントロール群には、ウイルス注入した場所に mcherry を発現するウイルス (CMV-mCherry/CMV-cre)、実験群には mcherry を発現するウイルスと Cre 依存的にアポトーシスを起こすウイルス (CMV-mCherry/CMV-cre/EF1a-FLEX-taCasp3-TEVp)0.5 μ L を 100 nL/min の速度で注入した。

電極手術

脳波測定のため、頭蓋骨に穴を開け、脳表に電極を 4ヶ所 (ground, frontal, parietal, cerebellum) に埋め込んだ。また、覚醒の判定のためにマウスの僧帽筋に電線を差し込んだ。

睡眠の記録と解析

手術による回復を待つため、術後 3~4 日後にレコーディング用ケージにマウスを移動させ、12/12h 明暗サイクルの飲水・摂餌が自由な環境で 1ヶ月間にわたり、脳波と筋電位を記録した。睡眠の解析にはウイルス注入日から 1週間ごと 4週目までの脳波と筋電位の記録を使用し、Matlab により解析を行なった。解析では脳波、筋電位記録を 4秒ごとのエポックで区切り、明期 12時間、暗期 12時間の合計 24時間の睡眠覚醒状態を覚醒、NREM、REM のいずれかと判定した。

脳の免疫組織化学染色

目的の脳領域にウイルスが注入できているのか、目的領域の細胞が除去できているのかを確かめるために免疫組織化学染色を行なった。4%PFA により灌流固定を行なったマウスの脳を 50 μ m でスライスしたものを使用した。神経細胞のみに反応する抗 NeuN 抗体を一次抗体、Alexa488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を二次

抗体として免疫染色を行い、自家蛍光を軽減するために Sudan Black B solution 処理を行なった。

画像解析

海馬の細胞がどの程度除去できているかを調べるために免疫染色後、Axio zoom を用いて撮影した脳切片の画像のうち、ウイルス注入の標的となる脳領域の画像を ImageJ によって解析した。

【結果】

免疫組織化学染色により、両側の海馬にウイルスが注入できていることが観察されたが、海馬の中でもウイルス注入されている場所にばらつきが見られた。実験群においてはウイルス注入場所での細胞の除去が観察され、また海馬全体の縮小が見られた。

脳波についてウイルスを注入してから 1週目と 2週目のデータを解析したところ、parietal EEG においてのみ紡錘波、シータ波にコントロール群と実験群で有意に差が見られた。ノンレム睡眠時に見られる 8~15 Hz の紡錘波は明期、暗期ともに 2週目において実験群に有意に減少がみられた。レム睡眠時に見られる 6~11Hz のシータ波では明期の 2週目、暗期の 1、2週目において実験群が有意に減少していた。

【考察】

parietal EEG でのみ実験群に有意に差が見られたことに関して、今回ウイルス注入を行なった海馬の位置により近い電極で測定された脳波であったために frontal EEG では見られなかった脳波の違いが見られたと考えられる。

2週目の実験群において紡錘波の減少が見られたのは 1週目と比較し、アポトーシスがより進んだ結果である可能性が考えられる。

海馬の神経細胞集団の同期活動によりシータ波が生じることが報告されていることからシータ波が実験群で減少していることは、海馬の神経細胞の減少により神経細胞集団の同期活動が減少したためと考えられ、これまでの実験結果と矛盾しない。

実験群でのデルタ波の減少が有意に見られなかった原因として考えられるのは、ウイルス注入場所のばらつきが挙げられる。また、実験個体数が少なかったこともその影響を大きくした原因だと考えられる。

【展望】

コントロール群、実験群ともに個体数が少ないため、さらに個体数を増やし、実験の信頼性を高める。

海馬領域においてもウイルス注入ができた場所にばらつきが見られた。個体数を増やすことで海馬の中でも特定の領域に絞った解析を行い、徐波に影響を与えた場所をより詳細に調査する。

マウス大脳皮質におけるノンレム睡眠中の徐波を制御する分子機構の探索

中村 彩希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 本城 咲季子 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

睡眠は、動物に普遍的にみられる必須の生理現象であるが、その神経学的機能や制御機構の多くが未だ明らかになっていない。ヒトやマウスを含む哺乳動物の睡眠は、一般的にレム睡眠とノンレム睡眠に分けられ、脳波の特徴が異なる。睡眠の多くを占めるノンレム睡眠中には、徐波、紡錘波およびシャープウェーブリップルといった波形が見られる。なかでも大脳皮質においてみられる徐波は、高振幅で低周波数 (0.5~4 Hz) の成分で、睡眠時ではノンレム睡眠に特異的にみられる脳波である。これまでに、徐波は覚醒履歴から推定される睡眠圧や記憶の固定との相関が報告されており、睡眠の機能を説明する可能性がある。

徐波をつくる神経活動として、神経細胞群間での膜電位変動の同期が明らかになっている。ノンレム睡眠時の視床および大脳皮質の多くの神経細胞は、膜電位が脱分極していて激しい発火を伴う UP 状態と、過分極していて発火を伴わない DOWN 状態の 2 つの状態を繰り返している。この UP/DOWN 状態が神経細胞群で高度に同期しているために、脳波では振幅の大きな波として観察される。この同期は大脳皮質の広い範囲でみられ、一方で時間的に均一でなく、主に前頭部から後方に向かって伝播することが知られている。

大脳皮質の神経細胞は、覚醒中は常に入力に応じて発火する脱分極状態にあり、ノンレム睡眠中の DOWN 状態、すなわち同期した神経細胞の過分極は、徐波に特異的な現象である。神経細胞の過分極がどのようにして同期して生じるのか、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。

ノンレム睡眠中の DOWN 状態をつくるのは抑制性神経の活動ではなく、興奮性入力の減少による活動低下とする報告 (Timofeev et al., 2001) 以来、UP/DOWN 状態の同期に抑制性神経は関与しないと考えられていた。その後、大脳皮質に広く投射する抑制性神経が他の神経細胞を抑制することによって同期した DOWN 状態が作り出されるとする報告 (Funk et al., 2017) や、視床からの入力を受ける抑制性神経が GABA_B 受容体を介して他の神経細胞を抑制することによって同期した DOWN 状態が作り出されるとする報告 (Hey et al., 2021) があった。しかし、いずれも徐波をつくる UP/DOWN 状態の同期を十分には説明しておらず、他にも未知のメカニズムが存在しうると考えられる。

本研究の目的は、徐波をつくる UP/DOWN 状態の遷移と、その遷移の同期および伝播の分子機構を明らかにすることである。そのためマウス大脳皮質への受容体拮抗剤などの薬剤の局所投与を行い、そのノンレム睡眠中の徐波への影響を解析した。

【材料と方法】

材料

野生型マウス (C57BL/6J) の 12 週齢以降の成熟雄個体を用いた。飼育および薬剤投与実験は 12 時間/12 時間の明暗サイクル、自由行動下で行った。

脳波・筋電図測定および睡眠判定

頭骸骨の前側左右および後側左右の 4 か所に脳波測定用電極を、頸部および顔面 (ヒゲの生えている部分) に筋電図測定用電極を設置し、脳波および筋電図を記録した。脳波および筋電図のデータを用い、明期開始からの 6 時間の睡眠覚醒状態 (覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠) を 4 秒ごとに区切って判定した。

薬剤投与

薬剤の投与には、マウス前頭前野へのリバースマイクロダイアリースを用いた。リバースマイクロダイアリースとは、先端が半透膜のプローブを組織内に埋め、薬剤等の投与物質を溶解した人工細胞外液をプローブ内に還流させることで半透膜を介して細胞外液に物質を投与する手法である。本研究では、プローブをマウス前頭前野に設置して 4 種いずれかの薬剤を溶解した人工脳脊髄液を還流した。自由行動下のマウス前頭前野に局所的に薬剤を投与する目的でこの手法を用いた。薬剤の投与はノンレム睡眠の時間の長い明期開始後 30 分後前後に行い、薬剤を溶解していない人工脳脊髄液の還流をコントロールとした。

投与した薬剤は以下の 4 種である。

- Bumetanide: Na-K-Cl 共輸送体 1 (NKCC1) アンタゴニスト
- DK-AH: 過分極活性化環状ヌクレオチドゲートチャネル (HCN) アンタゴニスト
- CGP55845: GABA_B 受容体アンタゴニスト
- Danegaptide: ギャップ結合修飾因子

脳波の解析

明期開始後 6 時間の脳波をパワースペクトル解析した。さらに、睡眠覚醒状態の判定に基づき、ノンレム睡眠中の脳波から徐波成分を取り出し、解析した。

【結果と考察】

1. 徐波の伝播

コントロールでの 4 極の測定データを用いてノンレム睡眠中の徐波発生タイミングの解析を行ったところ、後側左右では前側左右よりも徐波の発生が平均で数ミリ秒〜十数ミリ秒遅かった。

この結果から、マウスの大脳皮質での徐波の前方から後方への伝播が確認できた。

2. 薬剤投与による徐波の変化

現在、解析を進めているため詳細は発表会にて示す。

【今後の展望】

現時点では、一匹のマウスのみの実験結果であるので、今後さらに複数のマウスで実験を行い、データを増やしていく。

これまでの薬剤投与実験では、薬剤投与による大脳皮質広範の徐波への影響を観察するため、神経活動の総和を捉える脳波での記録を行った。今後、さらに前頭前野の投与部付近の局所レコーディングを行い、薬剤投与によるより局所的な神経活動への影響を観察したい。

ヒストン異常による血液がんの発症機序の探索

金子 千尋 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 滋 (筑波大学 医学医療系)

【背景】

ヒストンとは、ヒトをはじめとする真核生物の細胞内において、ゲノム DNA を折り畳み、クロマチンを構成するタンパク質である。クロマチンは大量のゲノム DNA を核内に収納するほか、構造変化によって DNA の露出領域を変え、転写因子や種々の酵素などの DNA への近づきやすさを調整することにより、転写、DNA 複製、DNA 修復等を制御する。ヒストンはこのクロマチンの構造変化に寄与し、エピジェネティックな真核生物の発生や成長の制御、恒常性の維持に重要な役割を果たす。

ヒストンは 4 種のコアヒストンと 1 種のリンカーヒストン H1 に分類される。コアヒストン H2A、H2B、H3、H4 は各 2 分子からなるヒストン八量体を構成し、その周りをらせん状に巻き付く DNA と共に、ヌクレオソーム・コア粒子を形成する。一方、リンカーヒストン H1 はヌクレオソーム・コア粒子を繋ぎ、クロマチン構造の折り畳みを促進する。なお、各コアヒストンの N 末端領域ヒストンテイルは、核内酵素によるアセチル化やメチル化等の翻訳後修飾を受けやすい。これらの修飾は種々の調節タンパク質の結合場所となるため、ヒストン修飾パターンに応じて異なる調節タンパク質がクロマチンに引き寄せられ、クロマチンの凝縮や弛緩が調節、細胞の必要に応じたクロマチンの構造変化が生じる。

近年、全ゲノム配列解析技術の発展により、様々な種類のがんにおいて、ヒストン遺伝子のアミノ酸配列を変化させる多数の変異が発見され、がんの発症や進行の要因となる「オンコヒストン」変異の探索が進められている(Nacev *et al.*, *Nature*, 2019; Bagert *et al.*, *Nat Chem Biol*, 2021)。神経腫瘍における H3 のヒストンテイルの体細胞変異 K27M は、H3K27 トリメチル化の喪失及び H3K27 アセチル化の増加を生じ、クロマチンの構造変化により、遺伝子発現異常を引き起こす(Krug *et al.*, *Cancer cell*, 2019)。濾胞性リンパ腫でみられる H1 の機能欠損はクロマチンの凝縮異常を生じ、大規模なクロマチンの弛緩によってヒストン修飾を変化させる(Yusufova *et al.*, *Nature*, 2021)。また、乳がんや卵巣がんにおける H2B の球状ドメインの体細胞変異 D51A/N は、ADP リボース化の異常により Lys 残基のアセチル化を阻害し、細胞増殖を促進する(Huang *et al.*, *Cancer Res*, 2022)。さらに、膀胱がんや頭頸部がんで見られる H2B の球状ドメインにおける体細胞変異 E76K は、H2B と H4 の相互作用異常を生じ、ヒストン八量体の形成不良によるヌクレオソーム・コア粒子の不安定性を亢進、クロマチンへの調節タンパク質の近づきやすさに変化を生じ、遺伝子発現異常を引き起こす(Bennett *et al.*, *Can Dis*, 2019)。しかし、これらは全オンコヒストンのうちの僅かにすぎず、多くのオンコヒストンによる発がんへの寄与は未だほぼ解明されていない。

造血細胞に体細胞変異が生じることでがん化した血液がんの多くは難治性であり、各がん患者に適した治療法の開発のため、より詳細な発がん機序の解明が求められる。

本研究では、ある血液がんの患者 1001 例の全エクソン解析によりリカレントに確認された、コアヒストン *HistoneX* 遺伝子の

体細胞変異に着目し、該当変異を導入した細胞株における遺伝子発現異常の解析、および血液がんにおける該当変異と他変異との共在を探索することにより、新規のヒストン異常による血液がんの発症機序を解明することを目的とする。

【材料・方法】

(1) *HistoneX* 遺伝子への 着目変異の導入

筑波大学附属病院由来のヒト骨髄血検体から単核球細胞を分離し、RNA 抽出、cDNA 合成の後、*HistoneX* 遺伝子を PCR により増幅した。増幅産物を pGEM-T Easy プラスミドに組み込み、ヒートショック法により大腸菌コンピテントセル (DH5α) に形質転換した。寒天培地上に形成された大腸菌コロニーを培養し、Mini prep 法により回収したプラスミドにおいて、Quick Change Mutagenesis kit を用いて、プラスミド内の *HistoneX* に着目変異を導入した。なお、変異導入前後にはプラスミドを制限酵素で処理し、電気泳動による切断パターンの確認により、*HistoneX* がクローニングされていることを確認した。更に、DNA シーケンス解析により、*HistoneX* がプラスミドに正の向きで組み込まれていること、導入変異以外に特異な変異や多型がないことを確認した。

(2) 変異型 *HistoneX* 過剰発現細胞の用意と遺伝子発現解析

変異型 *HistoneX* 導入プラスミドから切り出した変異型 *HistoneX* を、2 種の発現ベクター (pGCDNsamIRESGFP, pcDNA3.1) にサブクローニングにより組み込んだ。Maxi prep 法により、純度の高い変異型 *HistoneX* 導入発現ベクターを高収量回収した後、リン酸カルシウム法により、上記発現ベクターを 293T 細胞株に計 3 回トランスフェクションし、変異型 *HistoneX* を一過性に過剰発現させた。なお、野生型 *HistoneX* 導入プラスミドをトランスフェクションした、野生型 *HistoneX* 過剰発現細胞を野生型コントロール群とした。緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子を発現する発現ベクター pGCDNsamIRESGFP をトランスフェクションした細胞株の GFP 蛍光割合により、全群において十分なトランスフェクション効率を確認した後、細胞を回収し、タンパク質と RNA を抽出した。抽出タンパク質を用いたウエスタンブロット法 (抗 *HistoneX* 抗体、抗βアクチン抗体使用) により、トランスフェクション細胞において *HistoneX* がタンパク質レベルで過剰発現していることを確認後、抽出 RNA を用いて変異型 *HistoneX* 過剰発現細胞 3 群と野生型コントロール細胞 3 群の RNA シーケンス解析を実施し、解析ソフト CLC11 等により変異型 *HistoneX* 導入により生じる遺伝子発現異常を探索した。

(3) COSMIC cell line project データベースを用いた変異共在の探索

オンライン上のデータベースである COSMIC cell line project を用い、ヒト造血器腫瘍由来の細胞株 175 種について、*HistoneX* 変異と他遺伝子変異との共在を探索した。

【結果・考察】

知的財産権の保護に関わるため、閉鎖型の審査会にて報告予定。